



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Etablierung und Charakterisierung eines artifiziellen Endothels in
3D - Mikrokanälen

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Manuela Prantl
Matrikel-Nummer:	0400855
Studienrichtung (lt.Studienblatt):	A 449-Pharmazie
Betreuer:	Ao.Univ.-Prof.Mag.Dr.Michael Wirth

Wien, im Jänner 2011

Ein herzliches Dankeschön an alle die mich während meines Studiums unterstützt haben!

Dieser Dank geht vor allem an

Herrn Ao.Univ.-Prof.Mag.pharm.Dr.Michael Wirth und Herrn

Ao.Univ.-Prof.Mag.pharm.Dr.Franz Gabor für die engagierte Betreuung und die

Möglichkeit die Arbeit in der Zellkultur kennen zu lernen

Herrn Mag.pharm.Dr.Christian Fillafer für seine kompetenten Ratschläge beim experimentellen Arbeiten und die Unterstützung bei der Verfassung meiner Diplomarbeit

das Zentrum für Biomolekulare Medizin und Pharmakologie in Wien, insbesondere an Frau Dr.Renate Hofer-Warbinek, für die Bereitstellung der HUVECs und die nette Zusammenarbeit

die gesamte Arbeitsgruppe für ein freundliches,
sehr angenehmes Arbeitsklima.

Ein besonderer Dank geht an meine lieben Eltern, Ingrid und Gerhard Prantl, die mir gelehrt haben an Träumen festzuhalten und stets nach vorne zu sehen! Durch eure Liebe, Motivation und Unterstützung war es mir möglich diesen Weg zu gehen! Ein großes Dankeschön gebührt auch meinem Freund Alexander Müllner, der mich und die dazugehörigen Launen während schwierigen Lernphasen ertragen hat und den Glauben an meine Fähigkeiten nie angezweifelt hat.

Ich danke auch meinen lieben Studienkollegen, meinen Freunden für die schönen, unvergesslichen Momente, die wir in den gemeinsamen Studienjahren erleben durften.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Akronyme	3
1. EINLEITUNG.....	5
2. GRUNDLAGEN	8
2.1. Zellkulturen in der pharmazeutischen Technologie	8
2.2. Aufbau des Blutgefäßsystems	9
2.3. Endothelzellen.....	16
2.4. Surface acoustic wave (SAW)-Chips	17
2.5. Grundlagen und Messung des Zetapotentials.....	18
3. MATERIALIEN, GERÄTE UND METHODEN	20
3.1. Puffer- und andere eingesetzte Lösungen	20
3.2. Lösungen für die Glasbeschichtung.....	22
3.3. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).....	23
3.3.1. Geräte und Materialien für die Zellkultur	23
3.3.2. Isolierung von HUVECs aus Nabelschnüren.....	28
3.3.3. Routinemethoden in der Zellkultur	29
3.3.4. Reinigung von Glasoberflächen.....	34
3.3.5. Zellkulturen in 3D-Mikrokanälen	35
3.3.6. Beschichtung von PDMS-Kanälen.....	36
3.4. Polystyrolmikropartikel.....	38
3.4.1. Modifikation der Partikeloberfläche mit PEI.....	39
3.5. Bestimmung von Flussgeschwindigkeiten am SAW-Chip	42
4. ERGEBNISSE	44
4.1. Beschichtung von PDMS-Kanälen.....	44
4.2. Identifizierung eines geeigneten Puffersystems für Experimente mit HUVECs	49
4.3. Oberflächenmodifikation von Mikropartikeln mit PEI	52
4.4. Eichgeraden für die Mikropartikelkonzentrationsbestimmung	53
4.5. Quantifizierung von PEI mittels Fluorescamin.....	63

4.6. Interaktion von PEI-modifizierten Mikropartikeln mit positiv und negativ 65	65
geladenen Glasoberflächen..... 65	65
4.7. Interaktion von carboxylierten und PEI-modifizierten Mikropartikeln mit..... 67	67
HUVEC Zellschichten 67	67
4.8. Flussgeschwindigkeitsmessungen am SAW-Chip 69	69
5. ZUSAMMENFASSUNG..... 71	71
6. Literaturverzeichnis 73	73
7. Curriculum Vitae..... 76	76

Abkürzungen und Akronyme

°C	G rad C elsius
µg	M ikro g ramm
µl	M ikro l iter
dBm	D ezibel M illiwatt
DMSO	D imethyl S ulfo x id
ECGS	E ndothelial c ell g rowth s upplement
EDTA	E thylendiamintetra a ctic a cid
FBS	fetal b ovine s erum
g	E rd b eschleunigung
h	S tunden
HEPES	20mM HEPES/NaOH Puffer pH 7,4; 4-(2- H ydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HUVEC	h uman u mbilical v ein e ndothelial c ells
IDT	interdigital t ransducer
isoHEPES	i sotonischer HEPES/NaOH Puffer pH 7,4
M	M olar
Mmol	m illimol
MG	M olekulargewicht
min	M inute(n)
mW	M illiwatt
mS/cm	M illisiemens pro C entimeter
P	P assage
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung pH 7,4
PdI	P olydispersitäts I ndex
PDMS	P oly(d imethylsiloxan)
PEI	P oly(e thylenimin)

Rpm/Upm	rounds per minute/ Umdrehungen per Minute
RT	Raumtemperatur
SAW	surface acoustic wave
SCS	supplemented calf serum
TC	tissue culture

Ich habe mich bemüht sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

1. EINLEITUNG

Durch die stetige Verbesserung biotechnologischer Verfahrenstechniken wird die Verfügbarkeit komplexer, hochwirksamer Arzneistoffe wie Cytostatika, Hormone, Immunmodulatoren, Antikörper und Nukleinsäuren erhöht. Dadurch sollte auch die Anwendung dieser Stoffklassen für therapeutische Zwecke zunehmen. Bei der Applikation von sensiblen Biomakromolekülen muss jedoch beachtet werden, dass diese Stoffe oft überproportional von frühzeitiger Metabolisierung, Degradation und Elimination betroffen sind. Beispielsweise beeinträchtigen nach peroraler Applikation sowohl das stark saure Magenmilieu als auch Enzyme wie Proteasen und Peptidasen die Stabilität von Biomakromolekülen. Aus diesem Grund kommt der Formulierung des Arzneistoffs in diesem Fall eine besonders hohe Bedeutung zu. Um die Stabilität der Wirkstoffe unter physiologischen Bedingungen zu verbessern, können kolloidale Trägersysteme eingesetzt werden. Über geeignete physikalische oder chemische Verfahren können sowohl hydrophile als auch lipophile Substanzen in Nano- oder Mikropartikeln inkorporiert werden. Der Arzneistoff kann dabei entweder als homogener Kern in einer Kapsel oder diffus verteilt in einer Partikelmatrix vorliegen. Durch Einsatz eines entsprechenden Matrixmaterials kann die Freisetzungsgeschwindigkeit des Wirkstoffs aus partikulären Trägersystemen gesteuert werden. Darüber hinaus kann durch Modifikation der Partikeloberfläche mit bioadhäsiven Liganden sowohl eine verlängerte Verweildauer des Arzneistoffs im Körper als auch eine spezifische Anreicherung im erkrankten Gewebe erreicht werden. Letzteres unterscheidet kolloidale Trägersysteme von konventionellen Formulierungen bei denen der Arzneistoff nach der Freisetzung meist einer unspezifischen Biodistribution unterliegt. Aufgrund der selektiven Anreicherung der Wirkstoffträger im Zielgewebe sollte ein adäquater therapeutischer Effekt auch nach Verabreichung von geringeren Dosen erreicht werden können. Daraus ergeben sich mehrere Vorteile, wie beispielsweise eine Reduktion der Einnahmefrequenz oder auch eine Senkung der Nebenwirkungsrate und Toxizität. Insgesamt sollte dies zu einer verbesserten Verträglichkeit der hochpotenten Arzneistoffe und damit zu einer erhöhten Compliance beitragen.

Um die Anwendbarkeit von Mikro- und Nanopartikeln als Wirkstoffträgersysteme untersuchen zu können sind realitätsgetreue und gut charakterisierte *in vitro* Modelle notwendig [1]. Da die parenterale Applikation von kolloidalen Formulierungen momentan als Methode der Wahl angesehen wird, sind hier biopharmazeutische Modelle des Lymph- bzw. Blutgefäßsystems von besonderem Interesse. In solchen Modellen könnten darüber hinaus pathologische Veränderungen der Vaskulatur wie Arteriosklerose und Entzündungen simuliert werden. Dies würde es ermöglichen, zielgerichtete Wirkstoffträgersysteme im Rahmen einer präklinischen biopharmazeutischen Forschung effizient auszutesten und weiterzuentwickeln. Während die volle Komplexität des kardiovaskulären Systems *in vitro* vermutlich nicht nachgebildet werden kann, sollte ein geeignetes Modell möglichst viele biologische und auch physikalische Grundparameter imitieren. Dies erfordert in erster Linie die Integration einer Endothelzellschicht und die Möglichkeit zur Erzeugung von Scherkräften, die mit dem Blutfluss unter physiologischen Bedingungen übereinstimmen. Einige Systeme erfüllen diese Grundvoraussetzungen bereits. Dazu zählen beispielsweise radial-flow detachment assays (RFDA) und parallel plate flow chambers (PPFC). Beim RFDA wird das flüssige Medium mittels Pumpe durch eine Einlassbohrung ins Zentrum eines Plexyglaszylinders gefördert. Durch Austritt des Mediums am Zylinderrand kommt es zwischen Deckel und Bodenplatte zur Ausbildung eines axialsymmetrischen laminaren Flussfeldes [2]. In diesem Flussfeld kann der Effekt von Scherstress auf Adhäsionsprozesse besonders präzise untersucht werden. Das PPFC stellt ein tunnelartiges Flusssystem mit parabolischem, laminarem Strömungsfeld dar [3]. Es ist in vereinfachter Form als Einweggerät unter der Bezeichnung „ibidi μ -slides“ kommerziell erhältlich. In diesem transparenten System mit der Größe eines Objektträgers können sowohl Endothelzellen kultiviert als auch über eine externe Pumpe physiologische Flussraten erzeugt werden. Aufgrund der Miniaturisierung im Vergleich zu konventionellen PPFCs und RFDAs können zudem kleiner Probenvolumina verwendet werden [4].

Durch die Integration von neuartigen Pumptechnologien in mikrofluidische Systeme wäre es möglich *in vitro* Modelle des Blutgefäßsystems zu konstruieren, die zu einem noch höheren Grad miniaturisiert sind. Eine vielversprechende Technik zu diesem Zweck sind surface acoustic wave (SAW) Chips [5]. Durch

Kombination dieser nichtinvasiven Pumptechnologie mit polymerbasierten Mikrokanälen könnten Kontaminationen weitgehend vermieden und die benötigten Zell- und Probenmengen deutlich verringert werden. Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit sollten grundlegende Arbeiten zur Realisierung eines derartigen Blutgefäßmodells durchgeführt werden. Um die Kultivierung von humanen Umbilikalvenenendothelzellen (HUVECs) in 3D-Mikrokanälen zu ermöglichen, musste zunächst eine effiziente Beschichtungsmethode mit Adhäsionsfaktoren erarbeitet werden. Darüber hinaus wurde ein Protokoll zur Modifikation der Oberflächenladung von carboxylierten Mikro- und Nanopartikeln über Adsorption des kationischen Polyelektrolyten Poly(ethylenimin) entwickelt. Um das Ausmaß der Bindung unterschiedlich geladener Teilchen an eine Endothelzellschicht untersuchen zu können, mussten geeignete Pufferlösungen identifiziert und Eichgeraden zur fluorimetrischen Quantifizierung erstellt werden. Die grundlegende Charakterisierung des Flusssystems sollte durch Messung der Strömungsgeschwindigkeiten in den Mikrokanälen erfolgen.

2. GRUNDLAGEN

2.1. Zellkulturen in der pharmazeutischen Technologie

Die Kultivierung von Zellen und Geweben außerhalb des humanen Organismus gewann in den letzten Jahrzehnten in der Arzneistoffentwicklung und präklinischen Biopharmazie zunehmend an Bedeutung. Durch die Annäherung an die biologischen Gegebenheiten und die dadurch verbesserte *in vitro* – *in vivo* Korrelierbarkeit stellen Zellkulturmodelle heute eine wichtige Erweiterung der klassischen galenischen Analytik dar. Der Einsatz von Zellkulturmodellen ermöglicht nicht nur eine Reduktion von Tierversuchen, sondern erleichtert darüber hinaus die systematische Entwicklung innovativer Strategien zur Optimierung der Bioverfügbarkeit. So können beispielsweise der Transport eines Wirkstoffs durch Gewebe oder die Interaktion von zielgerichteten Formulierungen mit unterschiedlichen Zelltypen rasch und unter definierten Bedingungen untersucht werden.

Tierversuche gestalten sich im Vergleich dazu teuer und zeitaufwendig und sind zudem durch interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren geprägt. Speziell letzteres erschwert oft eine exakte Bewertung aufgrund von inhomogenen Daten und interindividuellen Abweichungen. Im Gegensatz dazu stellen etablierte Zellkulturmodelle eine standardisierbare und vergleichsweise billige Versuchsumgebung für spezifische Fragestellungen dar. Jedoch können Zellkulturmodelle die Komplexität des Organismus nur bedingt abbilden. Daher bleibt in finalen Phasen der Arzneimittelentwicklung der Einsatz von Tierversuchen unabdingbar.

2.2. Aufbau des Blutgefäßsystems

Das Blutgefäßsystem besteht aus Arterien, Kapillaren und Venen, wobei der Aufbau je nach Gefäßtyp unterschiedlich ist. Die Grundkomponenten umfassen:

- Endothelzellen
- Kollagenfasern
- elastische Fasern
- Proteoglykane
- glatte Muskelzellen

Im menschlichen Blutgefäßsystem treten Flussgeschwindigkeiten im Bereich von 0,2 bis 300 mm/s auf (Tab. 1). Diese Geschwindigkeiten resultieren in erster Linie aus der Pumpleistung des Herzens und dem Querschnitt der Gefäße. Die kardiale Ejektionsfraktion ergibt sich aus Gleichung (1). Sie beträgt beim gesunden Herz 60-75% und bei einem insuffizienten Herz hingegen nur <40% [6].

$$\frac{\text{Schlagvolumen} \cdot 100}{\text{enddiastolisches Volumen (120 ml)}} = \text{Ejektionsfraktion} \quad (1)$$

Schlagvolumen: beim Gesunden (in Ruhe: 70 ml / bei Belastung: 110 ml)
 beim Kranken (in Ruhe: 50 ml / bei Belastung: 30 ml)

Das pro Zeiteinheit transportierte Blutvolumen (Herzzeitvolumen (HZV) oder Herzminutenvolumen (HMV)) errechnet sich aus Herzfrequenz mal dem Schlagvolumen. Es beträgt beim gesunden Herzen in Ruhe 4,9 L/min (70 ml x 70 Schläge/min) und kann bei körperlicher Belastung auf bis zu 20 l (110 ml x 180 Schläge/min) gesteigert werden. Ein insuffizientes Herz ist hingegen durch ein

vergleichsweise geringes HZV von 3,5 l (50 ml x 70 Schläge/min) in Ruhe und 4,5 l (30 ml x 150 Schläge/min) unter Belastung charakterisiert.

Gefäßregion	Gefäßdurchmesser ^[7] [mm]	Flussgeschwindigkeiten ^[8] [mm s ⁻¹]	Gesamtquerschnitt ^[8] [cm ²]
Arterien vom elastischen Typ	> 10	300	5,3 ^{a)}
Arterien vom muskulären Typ	0,1 - 10	300	20
Arteriolen	0,02 - 0,1 ^[8]	≥ 30 - 5 ^[9]	500 - 700
Blutkapillaren	0,006 - 0,012 ^[8]	0,2 - 1	3500
Venolen	0,01 - 0,1	≤ 1 - ≥ 10 ^[9]	2600
Venen	0,1 - ≥ 1	40 - 60	40 ^{b)}

a) Gesamtquerschnitt der Aorta, b) Gesamtquerschnitt der großen Venen

Tab.1: Charakteristische Gefäßdurchmesser, Flussgeschwindigkeiten und Gesamtquerschnitte humaner Blutgefäße

Im Lungenkreislauf (kleiner Kreislauf) wird sauerstoffarmes, venöses Blut aus der rechten Herzkammer über die Pulmonalarterie in die Lunge geleitet. Dort wird es mit Sauerstoff angereichert und anschließend dem linken Vorhof zugeführt. Über die rechte Herzkammer und die Aorta gelangt das oxygenierte Blut in den Körperkreislauf (großer Kreislauf). Die Arterien des Körperkreislaufes führen sauerstoffreiches Blut in die Peripherie. Sauerstoffarmes Blut wird über das venöse System gesammelt und in den rechten Vorhof zurückgeleitet. Der Strömungswiderstand im Lungenkreislauf beträgt mit ~15 mmHg Mitteldruck in der Pulmonalarterie nur einen Bruchteil des totalen peripheren Widerstands im großen Kreislauf (Mitteldruck in der Aorta ~100 mmHg). Der Hauptwiderstand im Körperkreislauf geht mit 47% von Arterien und kleinen Arteriolen aus (Abb. 1), die deshalb auch als Widerstandsgefäße bezeichnet werden [10].

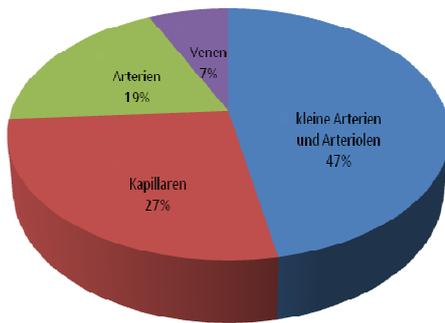


Abb.1: Beiträge der Gefäßtypen zum Gesamtwiderstand im Körperkreislauf [10].

2.2.1 Arterien

Die Wand von Arterien ist dreischichtig aufgebaut (Abb.2):

- Die innerste Schicht der Gefäßwand wird als **Tunica interna** (Intima) bezeichnet. Sie besteht aus einer die Gefäße auskleidenden Lage von Endothelzellen, die von kollagenen und elastischen Fasern (Elastica interna) umgeben ist. Während die Intima in direktem Kontakt mit dem Blut steht, kennzeichnet die *Elastica interna* die Grenze zwischen Intima und Media.
- Die darunterliegende **Tunica media** (Media) stellt eine Muskelschicht aus glatten Muskelzellen und Bindegewebsfasern dar. Die Dicke der Tunica media ist von der Lage und Funktion des jeweiligen Blutgefäßes abhängig. So weisen zum Beispiel Arterien vom elastischen Typ dichte elastische Netze in der Media auf welche erst die hohe Dehnbarkeit der herznahen Arterien ermöglichen. Die Arterien vom muskulären Typ hingegen zeichnen sich durch einen Überhang an glatten Muskelfasern und eine geringere Zahl von elastischen Fasern aus.
- Die äußere Schicht eines Blutgefäßes wird von der **Tunica adventitia** (Adventitia, Tunica externa) gebildet, die überwiegend aus längs verlaufenden Kollagenfibrillen und zahlreichen elastischen Fasern sowie Fibroblasten besteht. Darüber hinaus verlaufen entlang der Adventitia

Nerven und benachbarte Blutgefäße. Der Übergang zu lockerem Bindegewebe ist fließend. An der Grenze zwischen Media und Adventitia befindet sich eine *Elastica externa* die in vielen Arterien jedoch weniger klar ausgeprägt ist.

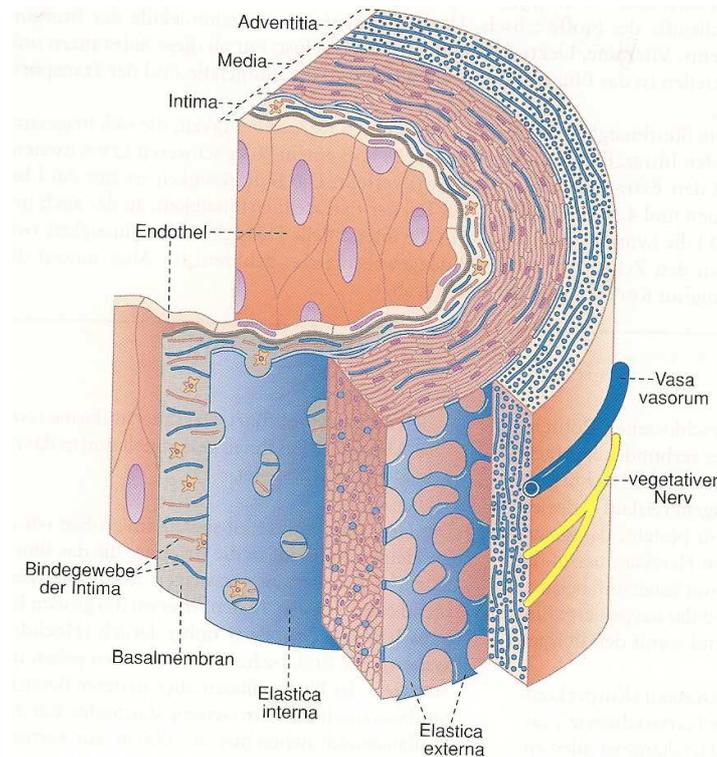


Abb.2: Wandaufbau einer Arterie [8]

Arterientypen:

- Arterien vom elastischen Typ

Die Arterien in Herznähe, insbesondere die Aorta und Arteria pulmonalis, stellen Gefäße vom elastischen Typ mit einem Durchmesser ≥ 1 cm dar. Sie besitzen zahlreiche Elastinlamellen, welche die Dehnbarkeit während der Systole und die Autokompression während der Diastole gewährleisten. Intima, Media und Adventitia sind in diesen Gefäßen klar voneinander abgrenzbar (Abb.3). Im Gegensatz zu Arterien vom muskulären Typ ist sowohl die Entwicklung einer *Elastica interna* als auch die einer *Elastica externa* weniger stark ausgeprägt. Dies ist auf die dicht gepackten elastischen Lamellen mit unterschiedlich großen

Lücken und Poren und die dazwischenliegenden glatten Muskelzellen in der Media zurückzuführen.

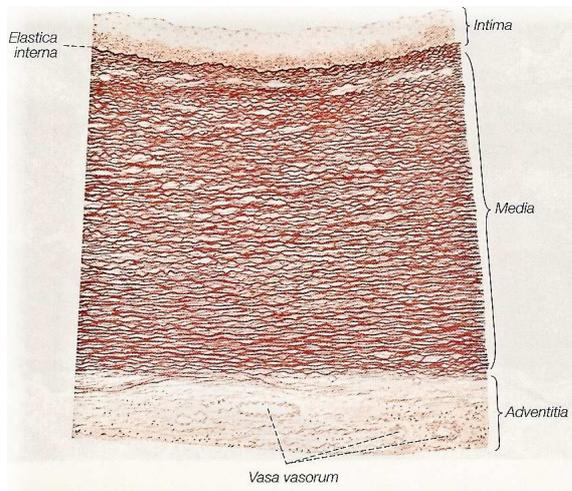


Abb.3: Arterie vom elastischen Typ [8]

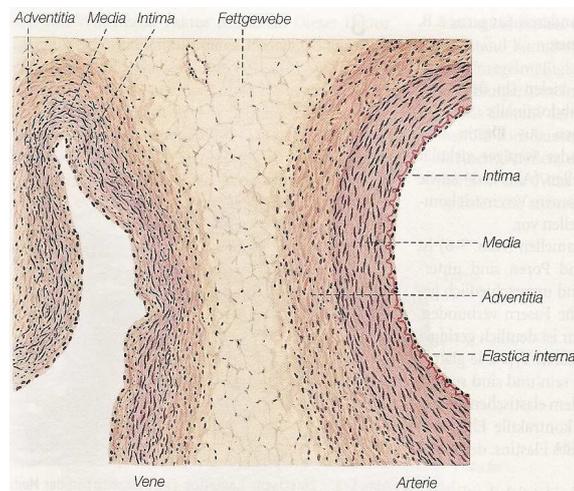


Abb.4: Arterie vom muskulären Typ [8]

- Arterien vom muskulären Typ

Alle kleinen und mittelgroßen Arterien stellen Arterien vom muskulären Typ mit einem Durchmesser von 0,1-1 mm dar. Im Vergleich zu Arterien vom elastischen Typ ist die Intima der Arterien vom muskulären Typ meist dünner und die Elastica interna ist deutlich erkennbar (Abb.4). Die Media besteht vorwiegend aus dicht gepackten glatten Muskelzellen. Die Elastica externa ist weniger klar begrenzt und zeigt sich als dünne und oft mehrlamellige Schicht. Bei Arterien vom muskulären Typ kann die Adventitia durchaus dicker sein als die Media.

2.2.2. Arteriolen

Arteriolen sind die kleinsten Arterien und haben einen Durchmesser von 20-120 µm. Sie bestehen aus wenigen Muskel- und einer inneren Endothelschicht.

2.2.3. Blutkapillaren

Wandaufbau der Kapillaren:

Zu den Kapillaren zählen Gefäße mit einem Durchmesser von 6-12 µm, deren Wände aus sehr dünnen Endothelzellen bestehen die an der Außenseite von einer Basalmembran und Perizyten umgeben sind.

Kapillartypen:

- Kapillaren vom kontinuierlichen Typ

Das Endothel besteht aus einer dünnen, geschlossenen, homogenen Zellschicht. Die Basalmembran ist nicht unterbrochen. Neben Aquaporinen sind die Endothelzellen auch durch eine Vielzahl von Pinozytosevesikeln gekennzeichnet. Kapillaren vom kontinuierlichen Typ kommen unter anderem in der Skelettmuskulatur, im Herz, in der Lunge und in der Retina vor.

- Fenestrierte Kapillaren

Die Besonderheit dieses Kapillartyps sind porenähnliche Fenestrations im Endothel mit einem Durchmesser von 20-100 nm (Abb.5). Diese Fenestrations sind mit porösen Diaphragmen (5 nm) überzogen die aufgrund der hohen Muzinkonzentration negative Ladungen tragen. Als Konsequenz dieser besonderen Ultrastruktur ist in fenestrierten Kapillaren der Transport von Wasser und gelösten Substanzen in den Extravaskularraum erleichtert. Fenestrierte Kapillaren mit Diaphragma finden sich in der Darmschleimhaut, im Pankreas, im Fettgewebe und in der Harnblase. Fenestrierte Kapillaren ohne Diaphragma kommen in den Nierenglomeruli vor.

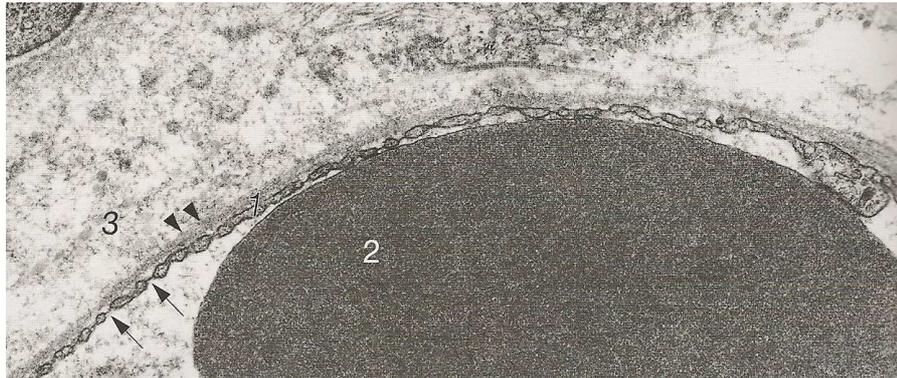


Abb.5: Fenestrierte Kapillare (Harnleiter, Mensch); fenestriertes Endothel (1), Diaphragmen (→), Basallamina (>), Erythrozyt (2), perikapilläres Bindegewebe (3) [8]

- Diskontinuierliche Kapillaren

Diskontinuierliche Kapillaren besitzen eine unterbrochene Basalmembran mit bis zu 1 µm großen intra- und interzellulären Stomata. Diese Öffnungen erleichtern den Austritt von Plasma und darin gelöster Substanzen in den Extravaskularraum. Diskontinuierliche Kapillaren finden sich in den Nierenglomeruli und Leberläppchen. In der Milz erreicht der Durchmesser der Stomata einen Bereich der auch die Extravasation von Blutzellen erlaubt.

2.2.4.Venen

Über das venöse System wird das Blut nach Gas- und Substanzaustrausch in den Kapillaren zum Herzen zurückgeführt. Durch ihre Ventilfunktion verhindern taschenförmige Venenklappen den Rückfluss von Blut in die Peripherie und geben die Transportrichtung zum Herz vor. Die Venen werden anhand ihres Durchmessers in Venolen und kleine Venen, mittelgroße und große Venen eingeteilt.

Wandaufbau der Venen

Das venöse System repräsentiert das Niederdrucksystem im Blutkreislauf. Der Wandaufbau von Venen unterscheidet sich von dem der Arterien und ist sehr variabel. Venen die Blut aus dem Kopfbereich zum Herz führen besitzen dünnere und muskelärmere Wände als Venen der Beine [8].

Die **Tunica interna** ist in Venen generell dünn und setzt sich häufig lediglich aus Endothel und Fasern zusammen. Die **Tunica media** ist ebenfalls dünner als bei Arterien. Sie ist eine Zone aus lockeren Bündeln glatter Muskulatur, zwischen denen breite Bahnen von Kollagen- und elastischen Fasern zu finden sind. Die **Tunica Adventitia** besteht aus kollagenfaserreichem Bindegewebe und Muskelzellbündeln.

2.3. Endothelzellen

Die Intima von Blut- und Lymphgefäßen besteht aus Endothelzellen. Das Endothel erfüllt zahlreiche essentielle physiologische Aufgaben. Neben der Steuerung des Stoffaustausches zwischen Blut und Gewebe, ist es durch Synthese von Stickstoffmonoxid, Endothelin und Prostacyclin für die Regulation des Gefäßtonus und folglich des Blutdrucks mitverantwortlich. Ein besonderes Charakteristikum von Endothelzellen stellen glattwandige Transzytosevesikel dar. Außerdem finden sich im Zytoplasma von Endothelzellen Weibel-Palade-Körper, die von-Willebrand-Faktor enthalten. Letzterer spielt eine essentielle Rolle bei der Thrombozytenaggregation und beim Wundverschluss. Durch Hemmung (z.B. Prostacyclin, Heparin, Stickstoffmonoxid) und Aktivierung (von Thrombozyten freigesetzte Gerinnungsfaktoren) von Gerinnungsprozessen beeinflusst das Gefäßendothel die Fließeigenschaften des Blutes. Darüber hinaus ist es bei Entzündungsprozessen und in der Angiogenese involviert. Primäre Endothelzellen können auch *in vitro* für begrenzte Zeit kultiviert werden. Zu diesem Zweck werden meistens HUVECs, die postnatal binnen weniger Stunden aus der Hauptvene der Nabelschnur isoliert werden, verwendet.

2.4. Surface acoustic wave (SAW)-Chips

SAWs sind akustische Wellen, die auf der Oberfläche eines Substrats propagieren. Besonders effektiv können Oberflächenwellen auf piezoelektrischen Materialien wie beispielsweise Lithiumniobat angeregt werden. Dazu werden metallische Interdigitaltransducer (IDTs) auf die Substratoberfläche aufgebracht. IDTs (Abb.6) sind fingerartige Elektroden, die zwei ineinander verschränkten Kämmen gleichen [11]. Wird ein Hochfrequenzsignal mit der entsprechenden Frequenz an diese Elektroden angelegt, so entsteht eine auf dem inversen piezoelektrischen Effekt beruhende, periodische Deformation der Materialoberfläche. Wenn Flüssigkeit in Kontakt mit dem Substrat steht, koppelt die akustische Oberflächenwelle unter einem mediumsabhängigen Brechungswinkel als longitudinale Welle in die Flüssigkeit ein. Der bei diesem Prozess lokal induzierte Druckgradient führt zu einer Strömung in der Flüssigkeit.

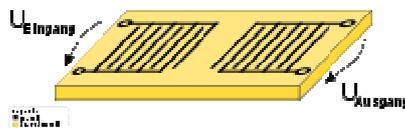


Abb.6: Interdigitaltransducer [12]

Durch Veränderung der Eingangsleistung, die an die IDTs angelegt wird kann die Amplitude der Oberflächenwelle und folglich der Druckgradient gesteuert werden. Neben konstantem Pumpen kann durch Amplitudenmodulation des Hochfrequenzsignals auch eine zeitliche Pulsation der Pumpleistung erzeugt werden.

Infolge des hohen Miniaturisierungsgrades können SAW-Chips mit sehr geringen Flüssigkeitsmengen operieren. Sie sind daher prädestiniert für Applikationen in mikrofluidischen Systemen. Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde ein SAW-Chip (Abb.7) eingesetzt, um in blutgefäßartigen Kanälen Fluss zu erzeugen. Aufgrund des kontaktfreien Pumpprinzips kann hierbei weitgehend auf Schlauchverbindungen verzichtet werden. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit

von Cross-Kontaminationen zwischen Experimenten reduziert. Darüber hinaus ist die Parallelisierung von mehreren IDTs auf einem Chip denkbar. Auf einer derartigen Plattform könnten unter identischen Bedingungen mehrere Experimente gleichzeitig durchgeführt werden.

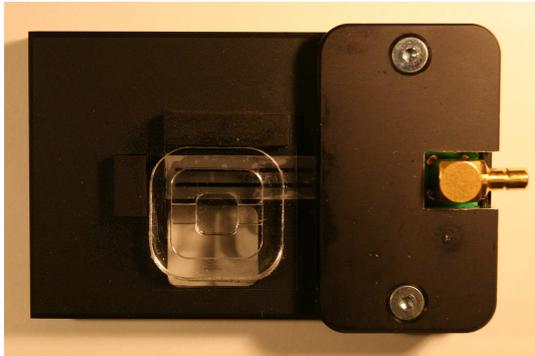


Abb.7: Positionierung eines PDMS-Kanals am SAW-Chip

2.5. Grundlagen und Messung des Zetapotentials

Die Stabilität einer Dispersion wird im Wesentlichen durch elektrostatische und sterische Faktoren bestimmt. Feste lyophile Kolloide besitzen in einem hydrophilen Dispersionsmittel in der Regel ein negatives Oberflächenpotential. Die zugrundeliegenden Oberflächenladungen (innere Helmholtzschicht) können sowohl von dissoziierbaren Gruppen als auch von adsorbierten Ionen herrühren. Die innere Helmholtz-Schicht zieht positiv geladene Gegenionen an, welche die äußere Helmholtz-Schicht bilden (Abb.8). Die innere und äußere Helmholtz-Schicht werden zusammengefasst als Stern-Schicht bezeichnet [13]. Das Oberflächenpotential des Teilchens ist an der Außenseite dieser elektrischen Doppelschicht durch Adsorption von Gegenionen bereits reduziert [14]. Die an die Doppelschicht anschließende diffuse Schicht weist eine gradientenartige Anordnung von Gegenionen auf. Mit zunehmender Entfernung von der Partikeloberfläche sinkt die elektrostatische Anziehung und folglich die Konzentration der Gegenionen. Je nach Ionenstärke der Suspension wird das Oberflächenpotential in einer bestimmten Entfernung durch Gegenionen gänzlich ausgeglichen.

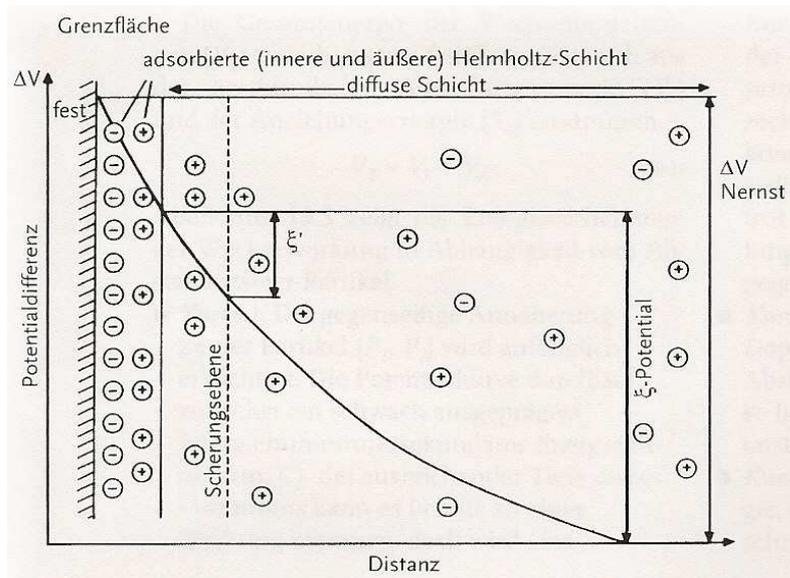


Abb.8: Aufbau einer elektrischen Doppelschicht nach Stern [14]

Bei der Messung des Oberflächenpotentials wird die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen in einem elektrischen Feld bestimmt. Bei Anlegen einer Spannung wandern Kolloide zur entgegengesetzt geladenen Elektrode. Bei der Beschleunigung der Teilchen im elektrischen Feld wird die diffuse Ionenhülle abgestreift. Im Gleichgewicht mit der Reibungskraft bleibt die Teilchengeschwindigkeit schließlich konstant. Aus dieser Geschwindigkeit kann auf die Oberflächenladung rückgeschlossen werden. Als elektrisches Potential oder Zetapotential (ζ -Potential) wird die Potentialdifferenz der diffusen Ionenschicht bezeichnet. Das gemessene Potential (ζ' -Potential) stellt hingegen nur die Potentialdifferenz zwischen der Stern-Schicht und der Scherungsebene dar. Es beschreibt also die Abstoßungsenergie zwischen den Teilchen [14]. Das Nernst-Potential, welches tatsächlich der Potentialdifferenz zwischen Teilchenoberfläche und Neutralzone entspricht, ist experimentell nicht bestimmbar [14].

Anhand des Zetapotentials kann die elektrostatische Stabilität einer Suspension abgeschätzt werden. Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass bei einem Zetapotential von ± 30 mV eine ausreichende elektrostatische Stabilisierung der Suspension besteht.

3. MATERIALIEN, GERÄTE UND METHODEN

3.1. Puffer- und andere eingesetzte Lösungen

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) steril

50 ml der PBS Stammlösung (10x) werden mit 450 ml Zellkulturwasser vermengt, gerührt und durch ein Filter mit 0.2 µm Porenweite sterilfiltriert. Die Lagerung von PBS erfolgt bei 4°C.

PBS Stammlösung (10x)

80 g NaCl, 2 g KCl, 26,8 g Na₂HPO₄ • 7 H₂O sowie 2,4 g KH₂PO₄ werden in 800 ml Aqua dest. gelöst. Anschließend wird der pH-Wert mit 1M HCl auf 7,4 eingestellt und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ pH 7,2-7,3 (PBS + Ca²⁺/Mg²⁺)

0,2 g KCl, 0,2 g KH₂PO₄, 0,1 g MgCl₂ • 6 H₂O, 8 g NaCl und 0,764 g Na₂HPO₄ • H₂O werden in 950 ml Aqua dest. gelöst. Anschließend werden 50 ml einer CaCl₂-Stammlösung (2,65 g CaCl₂ • 2 H₂O in 1000 ml Aqua dest.) zugesetzt. Die CaCl₂-Stammlösung ist bei Raumtemperatur (RT) zu lagern. Der fertige Puffer wird bei 4°C aufbewahrt.

NaCl-Lösung (0,9%)

9 g NaCl werden in 1000 ml Aqua dest. unter Rühren gelöst. Die fertige 0,9% NaCl-Lösung wird bei RT gelagert.

20mM Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure/NaOH Puffer pH 7,4 (HEPES)

4,77 g Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure werden in ~990 ml Zellkulturwasser gelöst und die Lösung mit ~7 ml 4M NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Anschließend wird mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

Isotoner Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure/NaOH Puffer pH 7,4 (isoHEPES)

4,77 g Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure werden zusammen mit 8 g NaCl in ~ 990 ml Aqua dest. gelöst. Danach wird wie zuvor angeführt vorgegangen.

100mM Phosphatpuffer pH 5,8

100mM Lösung von Na-Dihydrogenphosphat

13,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /1000 ml Aqua dest.

100mM Lösung von Di-Na-Monohydrogenphosphat

17,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ /1000 ml Aqua dest.

92 Teile der 100mM Na-Dihydrogenphosphat-Lösung werden in einem Becherglas vorgelegt. Dazu werden portionsweise und unter ständigem Rühren ~8 Teile der Na-Monohydrogenphosphat-Lösung zugesetzt bis der pH-Wert der Lösung 5,8 beträgt. Der Phosphatpuffer wird bei RT gelagert.

0,5M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung

208,1 g EDTA werden in 1000 ml Aqua dest. gelöst. Die EDTA-Lösung wird bei RT gelagert.

0,02N Essigsäure steril

0,3 g Essigsäure (100%) werden in einem Messkolben eingewogen und mit Aqua dest. auf 250 ml aufgefüllt. Nach Rühren wird die Lösung sterilfiltriert.

Poly(ethylenimin) (PEI)-Lösung (5 mg/ml)

5 mg PEI (MG: 10 000 g/mol) werden in 1ml Phosphatpuffer pH 5,8 gelöst. Die Lagerung der PEI-Lösung erfolgt bei 4°C.

3.2. Lösungen für die Glasbeschichtung

Gelatinelösung (1%)

0,5 g Gelatine (Gelatine from bovine skin, Type B, Cell Culture Tested, Sigma Life Science) werden mit 49,5 g Aqua ad inject. versetzt und unter ständigem Rühren für mindestens 2h bei 70-80°C gelöst. Anschließend wird die Lösung bei 1bar für 50 min autoklaviert. Die Gelatinelösung (1%) kann bei 4°C über mehrere Monate gelagert werden.

Kollagenlösung in PBS (0,14 mg/ml)

Unter dem Laminar Airflow werden 859 µl einer Lösung von Kollagen Typ I (3,26 mg/ml) aseptisch entnommen und in 19,14 ml sterilem PBS (37°C) aufgenommen. Die Kollagenlösung wird bei 4°C gelagert.

Kollagenlösung in Essigsäure (0,14 mg/ml)

Unter dem Laminar Airflow werden 859 µl einer Lösung von Kollagen Typ I (3,26 mg/ml) aseptisch entnommen und in 19,14 ml 0,02N Essigsäure (37°C) aufgenommen. Die Kollagenlösung wird bei 4°C gelagert.

Fibronectinlösung in PBS (100 µg/ml)

5 mg Fibronectin werden unter dem Laminar Airflow mit 5 ml sterilfiltriertem Aqua ad inject. versetzt und 1 h lang stehen gelassen, um vollständige Lösung zu erzielen. Die Fibronectinlösung wird bei 4°C gelagert.

3.3. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)

HUVECs sind primäre Endothelzellen, die aus der Vene der Nabelschnur von Neugeborenen isoliert werden und *in vitro* 5-10 mal passagiert werden können. Die im Rahmen dieser Diplomarbeit verwendeten HUVECs wurden vom Zentrum für Biomolekulare Medizin und Pharmakologie der Medizinische Universität Wien (Lazarettgasse 19, 1090 Wien) zur Verfügung gestellt.

3.3.1. Geräte und Materialien für die Zellkultur

Steriltechnik

Nährmedien stellen eine optimale Wachstumsgrundlage für die zu kultivierenden Zellen aber auch für unerwünschte Mikroorganismen dar. Durch konsequente Anwendung der Steriltechnik können mikrobiologische Kontaminationen der Kulturen und Medien vermieden werden. In erster Linie muss dabei ein hohes Maß an Personal- und Arbeitsplatzhygiene eingehalten werden. So ist die Edelstahlarbeitsfläche vor Arbeitsbeginn mit Alkohol (70%) gründlich zu reinigen.

Alle nichtsterilen Materialien müssen vor dem Einbringen in die Reinraumwerkbank entweder hitzesterilisiert, autoklaviert, oder mit Alkohol (70%) behandelt werden. Darüber hinaus müssen die Hände gründlich gereinigt und desinfiziert werden. Falls trotz aller Schutzmaßnahmen eine mikrobielle Verunreinigung auftritt, sollten die betroffenen Kulturen schnellstmöglich aus dem Brutschrank entfernt und entsorgt werden.

Reinraumwerkbank (Laminar Airflow)

Der Begriff „Laminar Airflow“ steht für einen gleichgerichteten Luftstrom ohne Turbulenzen, der in der Werkbank für aseptische Bedingungen sorgt. Bei derartigen Werkbänken wird zwischen jenen mit horizontaler Luftströmung und jenen mit vertikaler Luftströmung unterschieden. Beide Varianten sind durch einen laminaren, partikelfreien Luftstrom gekennzeichnet. Die Luft wird jeweils außen angesaugt und durch einen Hochleistungsschwebstofffilter (HOSCH-Filter) geleitet. In der Reinraumwerkbank mit vertikalem Luftstrom wird über Ansaugen von Außenluft eine Luftschleuse erzeugt. Dadurch werden sowohl die Materialien innerhalb der Werkbank als auch das Bedienpersonal geschützt. Bei sterilen Werkbanken mit horizontalem Luftstrom wird die Luft nach Passieren des HOSCH-Filters horizontal über die Arbeitsfläche geleitet. Durch die ständige Exposition des Bedienpersonals eignet sich dieser Werkbanktyp nicht zum Arbeiten mit pathogenem Material.

Brutschrank

Zur *in vitro* Kultivierung von Zellen wird ein Brutschrank verwendet, der die Inkubationsbedingungen weitgehend an die *in vivo* vorherrschenden Bedingungen anpasst. Dazu wird eine konstante Temperatur von 37°C und eine Luftfeuchtigkeit von 95% eingestellt. Zur Einstellung des Puffersystems der Medien, besteht die Atmosphäre in Brutschränken zumeist aus 5% CO₂ und 95% Luft.

Zellkulturmedien

Klassische Inhaltsstoffe von Zellkulturmedien sind Aminosäuren, Glukose, Vitamine, Puffersubstanzen, Serum menschlichen beziehungsweise tierischen Ursprungs, Glutamin, NaHCO_3 , Antibiotika sowie Phenolrot als pH Indikator. Das Medium hat die Aufgabe sowohl Proliferation als auch Differenzierung der kultivierten Zellen zu ermöglichen.

Endothelial cell growth supplement (ECGS)-Gewebekulturmedium

ECGS-Gewebekulturmedium besteht aus folgenden Komponenten:

Bio Whittaker[®] Medium 199

Fertigmedium M199 mit Earle's Balanced Salt Solution und mit L-Glutamin (Lonza) wird bei 4°C gelagert.

Fetales bovines Serum (FBS)

FBS wird aus dem Blut von 3-7 Monate alten Feten gewonnen. Als Hauptinhaltsstoffe sind neben Wachstumsfaktoren auch Hormone, Bindungsproteine und Anheftungsfaktoren zu nennen. Vor Gebrauch wird FBS unter häufigem, gleichmäßigem Schwenken bei 56°C für 30 min am Wasserbad hitzeinaktiviert. Hierbei ist starkes Schütteln zu vermeiden, da dies eine Denaturierung von Proteinen zur Folge haben kann. Die Wärmebehandlung führt zu einer Inaktivierung des Komplementsystems und von Immunglobulinen, zu einer Fällung von Fibrinogen und Fibrin, sowie zu einer Inaktivierung von Viren. Außerdem wird im Rahmen der Hitzeinaktivierung die Aktivität von alkalischer Phosphatase und Laktatdehydrogenase reduziert. Diese Enzyme können die Anhaftung der Zellen an die Wachstumsoberfläche stören. Nach der Hitzeinaktivierung kann FBS durch einen Filter mit 0.1µm Porenweite filtriert werden, um etwaige enthaltene Mykoplasmen abzutrennen. FBS wird danach aliquotiert (50 ml) bei -20°C gelagert. Tiefgefrorenes FBS sollte langsam aufgetaut werden, um die Denaturierung von Lipoproteinen zu vermeiden.

L-Glutamin

L-Glutamin ist eine essentielle, oft wachstumsbegrenzend wirkende Aminosäure. In Lösung wird L-Glutamin bei 37°C jedoch rasch abgebaut. Dies kann durch erhöhten L-Glutaminzusatz zum Medium in gewissen Maß ausgeglichen werden.

Penizillin/Streptomycin/Amphotericin B

Durch Zusetzen von Antibiotika soll eine mikrobielle Kontamination der Kultur vermieden werden. Um der Entwicklung von Resistenzen vorzubeugen, darf die effektive Dosis des Antibiotikums nicht unterschritten werden. Oft wird eine sterile Fertigmischung, die 10000 U/ml Penizillin, 10000 µg/ml Streptomycin und 25µg/ml Amphotericin B enthält, eingesetzt (Bio Whittaker® Pen/Strep/Amphotericin B; 100x; Lonza). 5 ml-Aliquote dieser Lösung können bei -22°C gelagert und je nach Bedarf einzeln aufgetaut werden.

Endothelial cell growth supplement (ECGS)

ECGS ist eine nach der Methode von Gospodarowicz aus bovinem Hypothalamus extrahierte Endothelzell-Wachstumsfaktorpräparation [15]. Um optimale Wachstumsbedingungen für humane Endothelzellen aus der Umbilicalvene zu gewährleisten, sollten 20-25 µg/ml ECGS zum Zellkulturmedium zugesetzt werden. In Gegenwart von Heparin ist die wachstumsstimulierende Aktivität von ECGS noch zusätzlich erhöht [16]. Während das sterile, lyophilisierte Extrakt bei 4°C aufbewahrt werden kann, sollte gelöstes ECGS bei -20°C gelagert werden.

Zusammensetzung und Herstellung von ECGS-Medium

▪ M199	500 ml
▪ FBS	100 ml
▪ L-Glutamin (200mM)	5 ml
▪ Pen/Strep/Amphotericin B (100x)	5 ml
▪ Heparin (1000 U/ml)	3 ml
▪ ECGS	2 ml
<hr/>	
Gesamt	615 ml

100 ml hitzeinaktiviertes FBS und ein Aliquot Bio Whittaker® Pen/Strep/Amphotericin B werden im Wasserbad bei 37°C langsam aufgetaut. 146,1 mg L-Glutamin (Fluka) werden in 5 ml Aqua ad inject. und 17 mg Heparin (Heparin sodium salt, Grade 1-A: from porcine intestinal mucosa, cell culture tested 177 USP units/mg dry powder, Sigma) in 3 ml Aqua ad inject. gelöst. Zwei Fläschchen mit lyophilisiertem ECGS (3x10 mg, Technoclone GmbH) werden vorsichtig geöffnet, mit jeweils 1 ml Aqua ad inject. versetzt und stehen gelassen, bis sich eine klare Lösung gebildet hat. Anschließend werden alle Bestandteile in einem Becherglas unter Rühren vermischt. Danach wird das fertige Medium sterilfiltriert (Porenweite 0,22 µm) und eine Probe zur Überprüfung der Keimfreiheit entnommen. Das so hergestellte Gewebekulturmedium kann bei 4°C über mehrere Wochen gelagert werden.

ECGS-Medium + 0,1% Pluronic F-68

0,02 g Pluronic F-68 (Poloxamer 188; Sigma Aldrich Chemie) werden in 20 ml ECGS-Medium gelöst.

Trypsin-EDTA (0,25%)

Trypsin ist eine Endopeptidase, die unter anderem Proteine spaltet, welche an Zell/Zell- und Zell/Matrix-Interaktionen beteiligt sind. Die Behandlung eines Zellmonolayers mit Trypsin führt zu einer Dissoziation des Gewebsverbands und zur Ablösung der Zellen von der Wachstumsunterlage. Die Desintegration des Zellverbandes wird durch EDTA als Ca^{2+} -Chelator zusätzlich unterstützt. Zellen sollten Trypsin-EDTA nur für begrenzte Zeit ausgesetzt werden, da sonst die Viabilität beeinträchtigt werden kann. Anschließender Zusatz von Zellkulturmedium führt zur Inaktivierung von Trypsin und EDTA. Trypsin-EDTA (0,25%, Sigma) sollte über einen längeren Zeitraum bei -22°C gelagert werden und kann bei Bedarf im Wasserbad (37°C) aufgetaut werden. Eine weitere kurzfristige Lagerung kann dann bei 4°C erfolgen.

3.3.2. Isolierung von HUVECs aus Nabelschnüren

Für jede Nabelschnur wird unter dem Laminar Airflow eine Gewebekulturflasche (25 cm^2) mit 1-1,5 ml einer $100\text{ }\mu\text{l/ml}$ Fibronectinlösung befüllt, für 30 min bei 37°C im Brutschrank beschichtet und die Flüssigkeit danach abgesaugt. Die Nabelschnur mit einer Länge von mindestens 10 cm wird mit Ethanol (70%) desinfiziert und oberflächlich vorsichtig mit Mullbinden abgetupft. Nachdem an beiden Enden etwa 0,5 cm abgetrennt worden sind, wird eine Kanüle an einem Ende der Nabelschnur in die Vene eingeführt und mit einer Bandklemme dicht schließend befestigt. An die Kanüle wird eine mit PBS befüllte Spritze mit 50 ml Fassungsvermögen angebracht. Das andere Ende der Nabelschnur befindet sich in einem Becherglas. Anschließend wird die Vene vorsichtig mit PBS gespült und die in der Nabelschnur verbleibende Flüssigkeit zwischen den Fingern durch Andrücken aus der Vene gepresst. Das offene Ende der Vene wird nun mit einer zweiten Kanüle und einem Ventil versehen. Eine Spritze mit 0,1% Kollagenaselösung in PBS wird an die Kanüle angelegt. Die Vene wird damit befüllt bis am anderen Ende Flüssigkeit austritt. Das Ventil wird geschlossen und die Präparation für sieben Minuten bei 37°C inkubiert. Das Abstoppen der Kollagenasereaktion erfolgt mit 5ml supplemented calf serum (SCS. Dazu wird die Nabelschnur senkrecht über ein mit SCS gefülltes Gefäß gehalten. Durch Öffnen

des Ventils wird die Suspension der durch Kollagenase abgelösten Zellen in das Gefäß abgeleitet. Mit Hilfe einer zweiten Spritze wird vom oberen Ende der Nabelschnur ausgehend mit 50 ml PBS gewaschen, um möglichst alle abgelösten Zellen zu gewinnen. Danach wird die Zellsuspension bei 1000-1500Upm acht Minuten lang bei RT zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgehoben, das Zellpellet in 10 ml ECGS-Medium resuspendiert und die Zellsuspension in die beschichtete Gewebekulturflasche überführt. Ein erster Mediumwechsel sollte spätestens nach 24 h erfolgen.

3.3.3. Routinemethoden in der Zellkultur

Subkultivierung von HUVECs

Eine Subkultivierung von HUVECs sollte durchgeführt werden, sobald sich ein zu ~80% konfluenter Monolayer ausgebildet hat (mikroskopische Kontrolle). Die für das Passagieren erforderlichen Reagenzien sind 30 min vor Arbeitsbeginn auf 37°C zu erwärmen. Für die Beschichtung der Gewebekulturflasche wird eine Gelatinelösung (1% in Aqua ad inject.) verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgen unter dem Laminar Airflow.

Praktische Vorgangsweise:

1. Die Wachstumsoberfläche einer sterilen Zellkulturflasche (75 cm²) wird für 30 min unter häufigem Schwenken mit 6 ml Gelatinelösung (1%) beschichtet.
2. Nachdem die Gelatinelösung mit einer Pipette aus der Flasche entfernt worden ist, werden 13 ml ECGS Medium zugesetzt.
3. Die Gewebekulturflasche mit dem zu ~80% konfluenten HUVEC Monolayer wird vom Brutschrank in die Sterilbank überführt und das Zellkulturmedium abgesaugt.

4. Anschließend wird zweimal mit je 2 ml sterilem PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Dadurch wird gewährleistet, dass die Trypsin-EDTA-Lösung für das Ablösen der Zellen nicht vorzeitig inaktiviert wird.
5. 2 ml Trypsin-EDTA (0,25%) werden zugesetzt, die Gewebekulturflasche gut verschlossen und horizontal geschwenkt, bis der gesamte Zellrasen gleichmäßig mit der Lösung benetzt ist.
6. Nun wird der Zellmonolayer unter dem Mikroskop beobachtet. Nach etwa 10-20 sek beginnen sich die ersten Zellen von der Wachstumsunterlage abzulösen. Zu diesem Zeitpunkt muss die Trypsin-EDTA-Lösung rasch mit einer Pasteurpipette entfernt werden. Mit der Kante der Gewebekulturflasche wird kurz auf die Arbeitsfläche geklopft, um die restlichen Zellen von der Flaschenwand zu lösen. Anschließend werden 6 ml frisches ECGS-Medium zugesetzt.
7. Die noch an der Wand der Gewebekulturflasche haftenden Zellen werden durch Resuspendieren mit einer Pasteurpipette von der Oberfläche gelöst.
8. Jeweils 2 ml der erhaltenen Zellsuspension werden in eine frisch beschichtete Gewebekulturflasche überführt (siehe Punkt 2.). Durch leichtes horizontales Schwenken der Flasche auf der Arbeitsfläche werden die Zellen gleichmäßig über die Wachstumsoberfläche verteilt.
9. Die Gewebekulturflasche wird verschlossen und in den Brutschrank überführt.
10. Nach Inkubation für 24 h wird das Zellkulturmedium erstmals gewechselt.

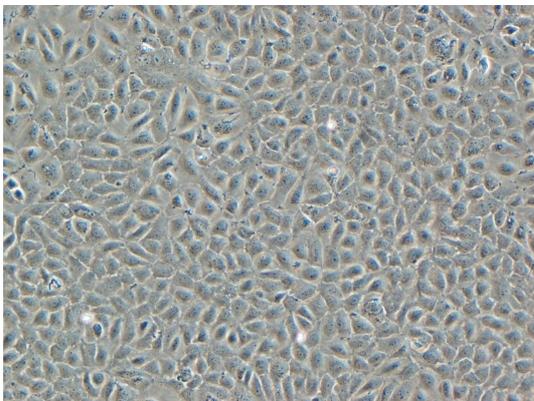


Abb.9: HUVECs (Passage 0) vor dem Subkultivieren

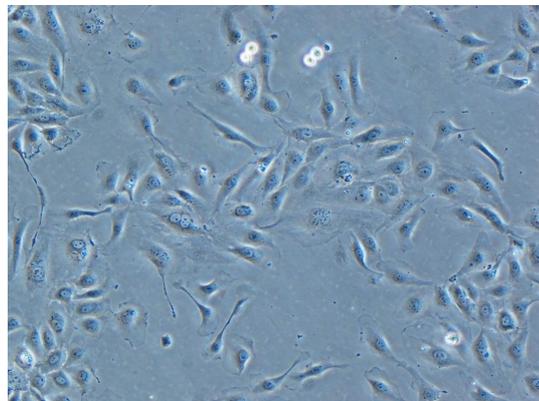


Abb.10: HUVECs (Passage 1) am Tag 1 nach dem Subkultivieren

Mediumwechsel

Ein regelmäßiger Wechsel des Gewebekulturmediums ist für eine Erhaltung der Viabilität der kultivierten Zellen unerlässlich. Grundsätzlich dient Phenolrot im Medium als pH Indikator, über den die Dringlichkeit eines Mediumwechsels abgeschätzt werden kann. Infolge des Zellmetabolismus wird Glukose zu Laktat abgebaut. Eine Anreicherung von Milchsäure führt zur Azidifizierung des Mediums und folglich zu einem Umschlag des pH Indikators von rot nach gelb. Im Fall von HUVECs sollte in der Regel ein Mediumwechsel 24 h nach dem Passagieren und danach alle 2-3 Tage durchgeführt werden. Vor Arbeitsbeginn muss das Medium für etwa 30 min am Wasserbad auf 37°C erwärmt werden. Nach Überführen der Gewebekulturflasche in die Sterilbank wird das Medium mit Hilfe einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt. Bei diesem Vorgang ist eine Berührung des Flaschenhalses zu vermeiden, da Mediumreste an dieser Stelle eine Kontamination begünstigen können. Mit einer sterilen Einmalpipette werden 15 ml ECGS-Medium in die Gewebekulturflasche (75 cm²) überführt. Für Flaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm² werden nur 5 ml Medium eingesetzt. Nach erfolgtem Mediumwechsel wird die Gewebekulturflasche wieder bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl kann mit Hilfe einer Buerker-Tuerk-Zählkammer erfolgen. Es handelt sich hierbei um einen modifizierten Glasobjektträger mit eingetzter Tiefe und Graduierung. Die Fläche des kleinsten regelmäßigen Quadrats der Buerker-Tuerk-Zelle beträgt 0,0025 mm². Durch präzises Auflegen eines Deckgläschens auf die graduierte Glasoberfläche wird eine Kammer mit einer Höhe von etwa 0,1 mm gebildet [17]. Um das Einsaugen der Zellsuspension durch Kapillarkräfte zu ermöglichen, muss beachtet werden, dass das Deckglas durch die Fixierschrauben nicht zu fest angepresst wird. Für einen Zellzählvorgang werden etwa 30 µl Zellsuspension benötigt. Nach gutem Resuspendieren mit einer Pipette werden jeweils ~10 µl Zellsuspension an den oberen und unteren Rand des aufgelegten Deckglases pipettiert. Wurde die Kammer ordnungsgemäß vorbereitet, kommt es zu einem automatischen Einsaugen der Zellsuspension

unter das Deckgläschen. Unter einem Mikroskop werden die Zellzahlen in jeweils sechs der größeren Quadrate (Fläche: $0,04\text{mm}^2$) an den 4 Ecken der Graduierung sowohl im oberen als auch im unteren Bereich der Zählkammer bestimmt. Erfasst werden sowohl Zellen, die sich gänzlich innerhalb der Quadrate befinden, als auch jene Zellen, die auf zwei der vier Begrenzungslinien liegen. Der Mittelwert der zwölf Zählergebnisse multipliziert mit $2,5 \times 10^5$ ergibt die Zellzahl pro 1 ml Zellsuspension.

Kryokonservierung / Lagerung von HUVECs

Die Kryokonservierung erlaubt eine Langzeitlagerung und Bevorratung der Zellen in Kultur. Während eine Lagerung bei -80°C nur über mehrere Monate möglich ist, können Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C über mehrere Jahre aufbewahrt werden. Für das "Einfrieren" von Zellen werden je nach Zelltyp unterschiedliche Kryomedien eingesetzt. Unter anderem wird eine Mischung von FBS mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) als Kryomedium verwendet. DMSO soll dabei eine Ruptur der Zellmembranen durch Wasserkristalle verhindern.

Das Kryokonservierungsmedium bestehend aus 15 ml sterilfiltriertem FBS und 1,5 ml DMSO wird aseptisch hergestellt und kann bei Bedarf bei 4°C gelagert werden. Vor dem "Einfrieren" der Zellen muss das Zellkulturmedium einer mit HUVECs bewachsenen Gewebekulturflasche abgesaugt und der Zellschicht zweimal mit je 2 ml PBS gespült werden. Nach Zusatz von 2 ml Trypsin-EDTA (0,25%) wird unter dem Mikroskop das Ablösen der Zellen verfolgt. Wie beim Passagieren werden anschließend 5 ml ECGS-Medium zugesetzt, um die Trypsin-EDTA-Lösung zu inaktivieren. Für eine möglichst vollständige Ablösung der Zellen sollte das Medium mit einer Pipette gut über die Wachstumsfläche gespült werden. Die erhaltene Zellsuspension wird resuspendiert und für 5 min bei 1000Upm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, und 2 ml der auf 4°C gekühlten FBS-DMSO(10%)-Mischung werden zugesetzt. Aufgrund der erniedrigten Umgebungstemperatur ist der Zellstoffwechsel deutlich reduziert, sodass DMSO keine schädigende Wirkung auf die Zellen hat. Nach gutem Resuspendieren wird je 1 ml der Zellsuspension in ein Kryogefäß überführt. Die mit Zellsuspension befüllten Gefäße werden für ~30 min bei 4°C im Kühlschrank gelagert, um einen

Konzentrationsausgleich von DMSO innerhalb und außerhalb der Zelle zu erzielen. Anschließend kann eine Lagerung bei -80°C über mehrere Monate erfolgen. Zur Langzeitkonservierung werden die Kryogefäße nach 12 h Lagerung bei -80°C in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Da sich im Rahmen dieser Diplomarbeit eine Lagerung bei -22°C als eher ungeeignet herausstellte, wurden HUVECs nur bei -80°C über einen Zeitraum von einigen Monaten gelagert.

Auftauen der Zellen

Kryokonservierte HUVECs können bei Bedarf jederzeit aufgetaut und in Kultur genommen werden. Das Auftauen sollte so rasch wie möglich erfolgen. Dazu wird ein Gefäß mit 10 ml 37°C warmem ECGS-Medium im Laminar Airflow vorbereitet. Das Kryogefäß wird direkt von der Lagerung in ein Wasserbad mit 37°C transferiert und bis zur Eisschmelze vorsichtig geschwenkt. Danach wird die Zellsuspension unverzüglich in das vorbereitete Zellkulturmedium überführt. Nach Resuspendieren wird für 5 min bei 1000Upm und $\sim 21^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert, um das enthaltene DMSO weitgehend zu entfernen. Der Überstand wird verworfen, und die Zellen werden in 5 ml ECGS-Medium gut resuspendiert. Anschließend überführt man die Zellsuspension in eine mit Gelatinelösung (1%) beschichtete Gewebekulturflasche (75 cm^2). Nach Inkubation im Brutschrank für 24 h wird das Zellkulturmedium erstmals gewechselt.

3.3.4. Reinigung von Glasoberflächen

Glasoberflächen können bei Lagerung an Luft durch Adsorption von organischen Substanzen verunreinigt werden [18]. Infolgedessen wird die Konzentration von Silanolgruppen an der Oberfläche reduziert [19]. Die Behandlung mit einer 7+3 Mischung aus konzentrierter Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid („Piranha-Lösung“) hat sich zur Reinigung von Glasoberflächen bewährt [20]. Hierbei werden organische Verunreinigungen entfernt und Silanolgruppen freigelegt, wodurch eine äußerst hydrophile Oberfläche entsteht.

Herstellung der Piranha-Lösung

Bei der Herstellung der Piranha-Lösung oder Caro'schen Säure muss Schutzkleidung getragen werden. Alle Arbeitsschritte sind unter einem Abzug durchzuführen. 7 Teile konzentrierter Schwefelsäure werden in einem Glastrog vorgelegt. Anschließend werden tropfenweise 3 Teile H_2O_2 (30%) zugesetzt. Durch langsames Zugeben kann eine übermäßige Wärmeentwicklung bei der Vermischung der zwei Komponenten verhindert werden. Die fertige Piranha-Lösung wird in einem verschlossenen Gefäß unter dem Abzug aufbewahrt.

Reinigung von Deckgläschen

Deckgläschen (24x24 mm) werden mit einer Pinzette in eine mit Piranha-Lösung befüllte Glaspetrischale überführt und für mindestens 1 h in dieser gelagert. Anschließend werden die Gläschen gründlich mit destilliertem Wasser gespült und in Ethanol (70%) gelagert.

3.3.5. Zellkulturen in 3D-Mikrokanälen

Poly(dimethylsiloxan) (PDMS)

PDMS ist ein anorganisches, elastomeres Polymer auf Siliziumbasis (Abb.11). Es eignet sich aufgrund seiner guten Werkstoffeigenschaften, der optischen Transparenz und seiner geringen Toxizität zur Fertigung von mikrofluidischen Kanalstrukturen im Labor- und Großmaßstab [1].

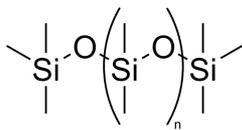


Abb.11: Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) [21]

Herstellung von Kanalstrukturen aus Poly(dimethylsiloxan) (PDMS)

10 g Silikonelastomer (Sylgard® 184 Silicone Elastomer; Dow Corning Corporation USA) werden mit 1 g curing agent in einem Plastikgefäß gut vermengt. Anschließend wird die Mischung für etwa 30 min im Vakuum gelagert, um Luftblasen zu entfernen. Eine Gussform aus Aluminium mit ausgefrästen Negativstrukturen wird mit dem noch flüssigen PDMS gefüllt (siehe Abb.12) und auf einer Heizplatte etwa 2 Stunden lang bei 120°C inkubiert. Nach Abkühlen können die PDMS-Strukturen vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette aus der Aluminiumform herausgelöst werden. Die aufgrund der Werkstoffeigenschaften von PDMS selbsthaftenden Kanalstrukturen (44mm x 4mm x 3mm; Länge x Breite x Höhe) werden auf gereinigte, trockene Deckgläschen (24 x 24mm) gepresst. Anschließend werden die 3D-Mikrokanäle in Glaspetrischalen überführt und für 50 min bei 121°C (1bar) autoklaviert.

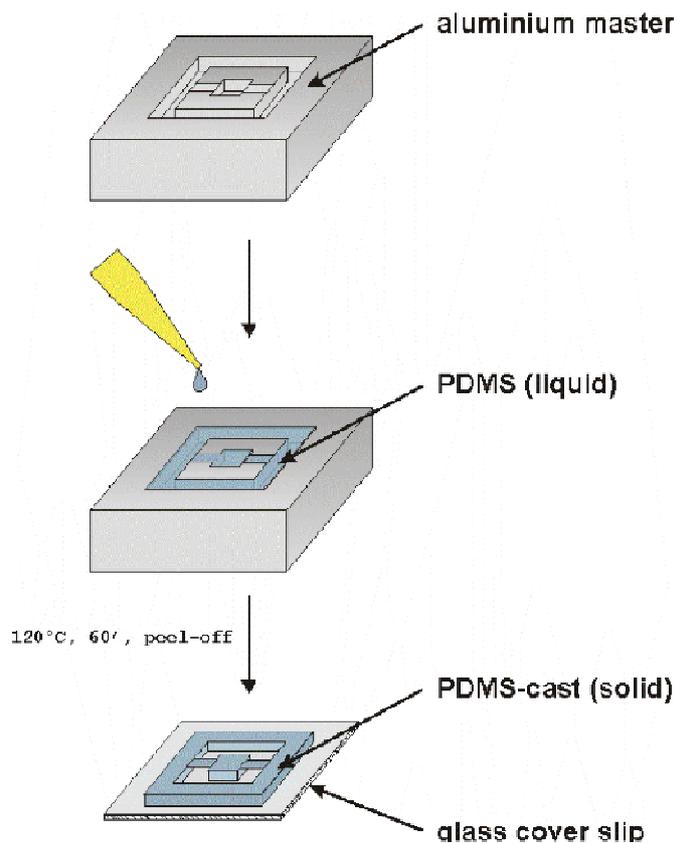


Abb.12: Herstellung von Kanalstrukturen mittels PDMS replica molding [zur Verfügung gestellt von C. Fillafer]

Für die Kultivierung von Zellen werden die Kanäle in sterile Plastikpetrischalen gelegt. Je Kanal werden 500 µl Zellsuspension (145 000 HUVECs/ml in ECGS-Medium) eingesetzt. Für einen Wechsel des Zellkulturmediums wird das verbrauchte Medium mit einer Eppendorf-Pipette vorsichtig abgehoben und durch 550 µl frisches ECGS-Medium ersetzt .

3.3.6. Beschichtung von PDMS-Kanälen

Um in den PDMS-Kanälen eine geeignete Wachstumsoberfläche für die Kultivierung von HUVECs zu schaffen, kann eine Beschichtung mit

Zelladhäsionsfaktoren durchgeführt werden. Alle Arbeitsschritte erfolgen in sterilen Plastikpetrischalen unter dem Laminar Airflow. Die eingesetzten Lösungen werden nach der Herstellung sterilfiltriert. Die zu beschichtenden Kanäle werden mit je 500 µl sterilem PBS befüllt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wird das PBS abgesaugt und die entsprechende Beschichtungslösung zugefügt.

Beschichtung mit Gelatinelösung (1%)

Für jeden PDMS-Kanal werden 300 µl Gelatinelösung (1%) eingesetzt. Nach Inkubation für 60 min bei 37°C wird die Gelatinelösung abgesaugt und Zellen ausgesät.

Beschichtung mit Kollagenlösung

Pro PDMS-Kanal werden 300 µl Kollagenlösung (0,14 mg/ml) zugesetzt. Nach Inkubation für 60 min bei 37°C wird die Beschichtungslösung aus den Kanälen entfernt und zweimal mit ECGS-Medium gewaschen, bevor Zellen angesetzt werden können.

Beschichtung mit Fibronectin

Für die Beschichtung werden pro PDMS-Kanal 300 µl einer Lösung von Fibronectin in sterilem PBS (100 µg/ml bzw. 200 µg/ml) verwendet. Nach Zusatz der Fibronectinlösung wird für 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend zweimal mit Aqua ad inject. gewaschen.

Beschichtung mit Kollagen- und Fibronectinlösung

300 µl einer Lösung von Kollagen in PBS (0,14 mg/ml) werden pro Kanal aufgetragen. Nach 60 minütiger Inkubation bei 37°C wird der Überstand mit Hilfe

einer Pipette abgesaugt und zweimal mit 500 µl ECGS-Medium gewaschen. Anschließend werden 300 µl Fibronectinlösung (100 µg/ml) in den Kanal pipettiert. Nach Inkubation für 15 min im Brutschrank wird die Beschichtungslösung entfernt und die beschichteten PDMS-Kanäle für weitere 15 min bei 37°C gelagert.

3.4. Polystyrolmikropartikel

Als Mikropartikel werden Teilchen mit einem Durchmesser von 1-1000 µm bezeichnet. Grundsätzlich wird bei mikropartikelären Wirkstoffträgern zwischen Mikrokapseln und Mikrosphären unterschieden (siehe Abb.13). Mikrokapseln sind Teilchen, bei denen der Wirkstoff in einem zentralen, polymerummantelten Kern enthalten ist. In Mikrosphären liegt der Wirkstoff homogen verteilt in einer Polymermatrix vor [22]. Eine Freisetzung des Arzneistoffs kann durch Ruptur der Kapselwand, Abbau des Matrixmaterials oder Diffusion in Wasserkanälen erfolgen.

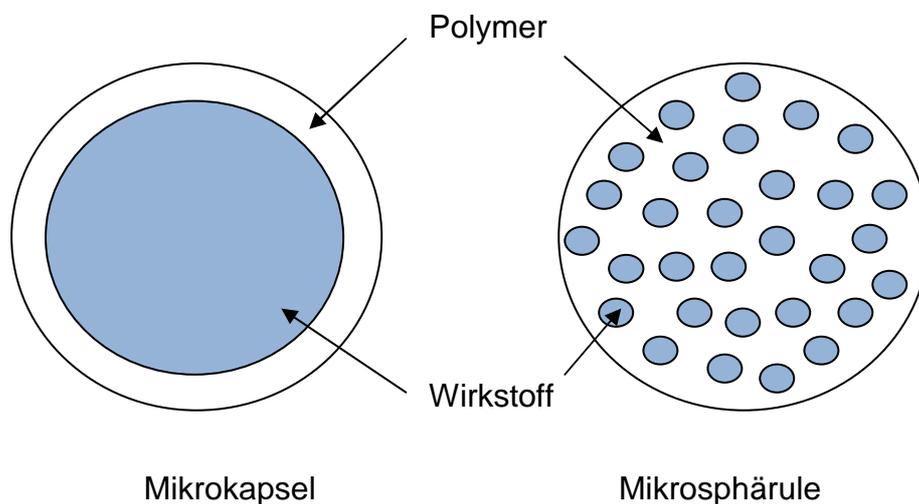


Abb.13: Darstellung von Mikrokapseln und Mikrosphären

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurden fluoreszenzmarkierte monodisperse Polystyrolpartikel (Fluoresbrite® carboxylate microspheres, Polysciences, Inc.) mit mittleren Partikelgrößen von 0,5 µm, 1 µm und 2 µm verwendet (Tab.2). Diese Teilchen sind nicht biodegradierbar und folglich nicht als Arzneistoffträger verwendbar. Aufgrund ihrer breiten kommerziellen Verfügbarkeit in einheitlichen Partikelgrößenklassen sind sie jedoch gut für Voruntersuchungen der Partikelinteraktion mit Zellen geeignet.

Durchmesser	Partikel/ml	Exzitation max.	Emission max.
0,5 µm	3.64×10^{11}	441 nm	486 nm
1 µm	4.55×10^{10}	441 nm	486 nm
2 µm	1.68×10^9	441 nm	486 nm

Tab.2: Spezifikationen der eingesetzten Polystyrolmikropartikel [23]

3.4.1. Modifikation der Partikeloberfläche mit PEI

Die Adsorption von PEI an Mikro- und Nanopartikel aus Poly(D,L-lactic acid) (PLA) kann laut Trimaille et al. in 100mM Phosphatpuffer (pH 5,8) für 10 min bei RT durchgeführt werden [24]. Dieses Protokoll wurde im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit adaptiert und zum Beschichten der Polystyrolpartikel verwendet (siehe Abb.14).

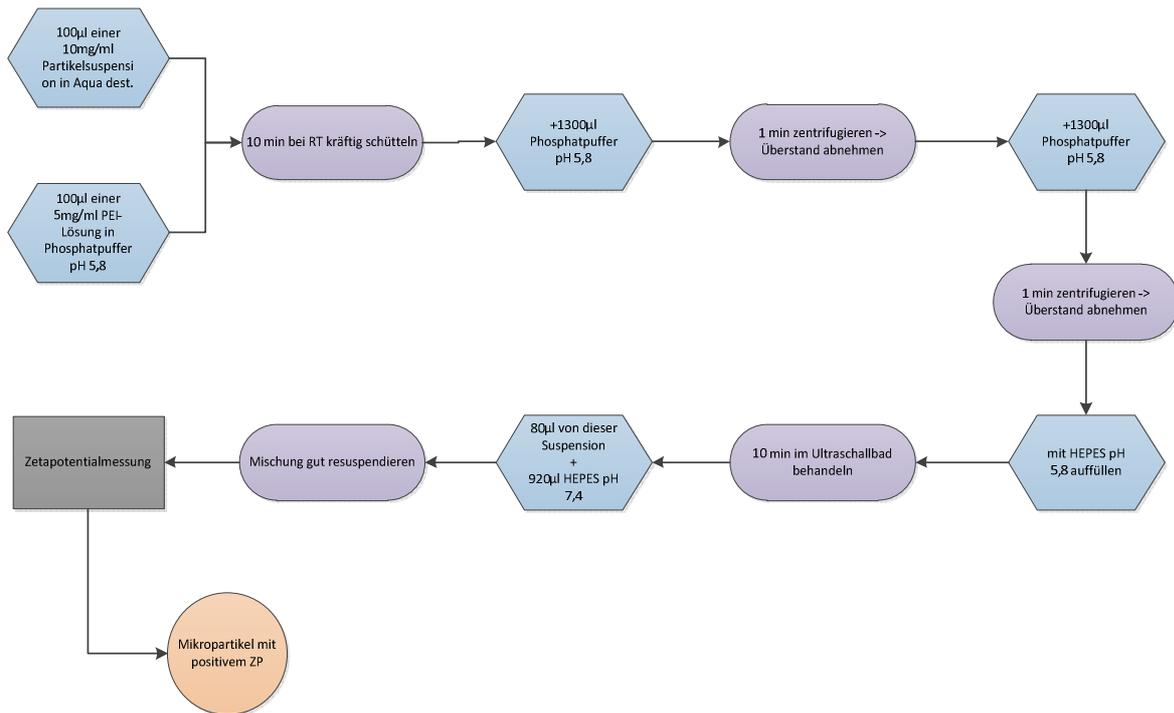


Abb.14: Schema der Modifikation von Polystyrolpartikeln (Durchmesser 1 µm) mit PEI

Praktische Durchführung für Partikel mit einem Durchmesser von 1 µm

Laut Hersteller sind 2,68% (w/v) Polystyrolpartikel in der gelieferten Stammsuspension enthalten. Daraus ergibt sich, dass 1 ml dieser Suspension 26,8 mg Partikel enthält. Für die Herstellung einer 10 mg/ml Suspension werden daher 373 µl der Partikelsuspension in 627 µl Aqua dest. aufgenommen. Anschließend wird wie folgt fortgefahren:

1. 100 µl Mikropartikelsuspension (10 mg/ml) werden in einem Eppendorfgefäß (2 ml) mit 100 µl PEI-Lösung in 100mM Phosphatpuffer pH 5,8 (5 mg/ml) vermischt und für 10 min bei RT kräftig geschüttelt. Als Kontrolle wurde Mikropartikelsuspension mit reinem Phosphatpuffer versetzt und analog behandelt.
2. Anschließend werden 1300 µl 100mM Phosphatpuffer pH 5,8 zugesetzt, die Suspension gut durchgemischt und 1 min bei 14 000 Upm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804 R).

3. Der Überstand wird möglichst vollständig mit einer Pipette abgehoben. Erneut werden 1300 µl Phosphatpuffer pH 5,8 zugesetzt und nach Durchmischung erfolgt ein weiterer Zentrifugationsschritt.
4. Nach Abheben des gesamten Überstands wird mit 20mM Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure/NaOH Puffer pH 7,4 (HEPES) bis zur 1ml-Marke des Eppendorfgefäßes aufgefüllt.
5. Anschließend werden die Partikel unter Schwenken im Ultraschallbad für mindestens 10 min bei circa 25-30°C resuspendiert.
6. Für die Bestimmung des Zetapotentials und der mittleren Partikelgröße werden 80 µl der erhaltenen Suspension mit 920 µl HEPES vermischt und am Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Großbritannien) analysiert.

Dieses Beschichtungsprotokoll wird auch für Polystyrolpartikel mit 2 µm und 0,5 µm Durchmesser verwendet. Da die Teilchen jedoch durch unterschiedliche Partikeloberflächen gekennzeichnet sind, müssen die Konzentrationen der Suspensionen so angepasst werden, dass die Gesamtoberfläche konstant bleibt. Die Gesamtoberfläche (O_{total}) der Partikel in einer Suspension errechnet sich aus (2)

$$O_{total} = O_{Teilchen} \cdot n_{Teilchen} \quad (2)$$

wobei $O_{Teilchen}$ die Oberfläche eines Partikels und $n_{Teilchen}$ die Partikelzahl ist. $n_{Teilchen}$ ergibt sich aus der Gesamtmasse m_{gesamt} und der Einzelteilchenmasse $m_{Teilchen}$ über (3).

$$n_{Teilchen} = \frac{m_{gesamt}}{m_{Teilchen}} \quad (3)$$

Während sich die Einzelteilchenoberfläche aus der Oberfläche einer Kugel mit äquivalentem Radius ergibt, ist die Einzelteilchenmasse das Produkt aus dem äquivalentem Kugelvolumen und der Teilchendichte ($\rho_{Polystyrol} = 1050 \text{ kg/m}^3$).

In 100 µl einer 10 mg/ml Suspension von Polystyrolpartikeln mit einem Durchmesser von 1 µm sind $\sim 1,8 \times 10^9$ Teilchen enthalten. Daraus errechnet sich eine Gesamtoberfläche von $0,005652 \text{ m}^2$. Um eine äquivalente Oberfläche bei

Partikeln mit einem Durchmesser von 2 μm zur Verfügung zu stellen, müssen $4,5 \times 10^8$ Teilchen in 100 μl enthalten sein. Dies entspricht einer Masse von ~ 2 mg. Laut Hersteller sind in der Stammsuspension 2,64% (w/v) Teilchen enthalten, was pro 1 ml Suspension 26,4 mg ergibt. Für die Herstellung einer Stammsuspension (20 mg/ml) werden 750 μl der Partikelsuspension mit 250 μl Aqua dest. gemischt. 100 μl dieser Suspension enthalten die gleiche Gesamtoberfläche wie 100 μl einer 10 mg/ml Suspension von Partikeln mit 1 μm Durchmesser. Das Protokoll für die Oberflächenmodifikation mit PEI kann somit direkt übertragen werden.

Für Polystyrolpartikel mit einem Durchmesser von 0,5 μm gilt ähnliches. Hier errechnet sich eine äquivalente Gesamtpartikelmasse von $\sim 0,5$ mg. Laut Hersteller sind in der Stammsuspension 2,65% (w/v) Teilchen enthalten was pro 1 ml Suspension 26,5 mg entspricht. Für die Herstellung einer Stammsuspension (5 mg/ml) werden 188 μl der Partikelsuspension mit 812 μl Aqua dest. vermischt.

3.5. Bestimmung von Flussgeschwindigkeiten am SAW-Chip

Die Strömungsgeschwindigkeit in 3D-Mikrokanälen (Abb.7) wurde über manuelle particle image velocimetry bestimmt. Dazu wird zunächst eine Suspension von fluoreszenzmarkierten Polystyrolmikropartikeln (mittlere Partikelgröße: 3 μm) in Aqua dest. hergestellt. Nach Vortexen werden 500 μl davon in einen PDMS-Kanal überführt. Im Bereich der IDTs des Chips werden 10 μl Immersionsöl oder Aqua dest. als Kopplungsmedium für die akustische Oberflächenwelle aufgebracht. Beim Platzieren des Kanals auf dem SAW-Chip ist darauf zu achten, dass die IDTs reproduzierbar an der gleichen Stelle unterhalb des Kanals positioniert werden. Diese Position sollte während der gesamten Messung konstant gehalten werden. Der SAW-Chip mit aufgesetztem PDMS-Kanal wird am Objektisch des Mikroskops mit Klebestreifen fixiert. Als Hochfrequenzquelle zur SAW Erzeugung dient ein RF (Radiofrequenz) Signalgenerator (SMB100A, Rhode und Schwarz, Österreich). Das RF Signal bei 181 MHz wird vor Einleitung in den SAW-Chip durch einen Verstärker geführt (ZHL-2, Mini Circuits, USA). Bei der Durchführung von Strömungsgeschwindigkeitsmessungen sollte darauf geachtet werden, dass die Partikeltrajektorien geradlinig durch das Gesichtsfeld des Okulars verlaufen.

Nach fünf Minuten Equilibrationszeit wird mit den Partikelgeschwindigkeitsmessungen begonnen. Je Messpunkt werden die Geschwindigkeiten von 10 Partikeln bestimmt. Dabei wird mit Hilfe einer Stoppuhr die Zeitdauer t bestimmt, die ein Polystyrolpartikel für das Durchqueren des Gesichtsfelds des Okulars benötigt. Diese Distanz l wird mit einem Objektmikrometer ausgemessen und beträgt $5071 \mu\text{m}$ (5x Vergrößerung), $2539 \mu\text{m}$ (10x Vergrößerung) bzw. $1270 \mu\text{m}$ (20x Vergrößerung). Die Partikeltranslationsgeschwindigkeit v kann anhand von Gleichung (4) berechnet werden.

$$v = \frac{l}{t} \quad (4)$$

Die Partikelgeschwindigkeitsmessungen wurden bei Eingangsleistungen von 0, 5, 10 und 15 dBm bei unterschiedlichen Vergrößerungen jeweils drei Mal durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Beschichtung von PDMS-Kanälen

Allgemeine Anmerkungen

Generell schienen sowohl die Wachstumsrate als auch der Konfluenzgrad der HUVECs unter den Stegen des PDMS-Kanals erhöht zu sein. Dies könnte auf einer durch die Kanalgeometrie bedingten unregelmäßigen Verteilung der Einzelzellen beim Ansetzen beruhen. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass eine inversmikroskopische Beurteilung des Zellwachstums unter den Stegen besser möglich war als im restlichen Kanal. Dies könnte auf Heterogenitäten in der Lichtbrechung beruhen. Während nämlich die Flüssigkeitsoberfläche im PDMS-Kanal durch Unregelmäßigkeiten gekennzeichnet ist, bildet sich unter den Stegen eine planare Grenzfläche. Letztere sollte eine geringere Streuung des eintretenden Lichts und dadurch kontrastreichere Bilder zur Folge haben.

Beschichtung mit Gelatinelösung (1%)

Die Beschichtung der Wachstumsoberfläche mit Gelatinelösung (1%) ist eine etablierte Methode, mit der bei der Kultivierung von HUVECs in Gewebekulturflaschen gute Ergebnisse erzielt werden. Diese Beschichtungstechnik erwies sich jedoch zur Modifikation der Glasoberfläche im PDMS-Kanal als wenig effektiv. Die Zellen bildeten hier keinen homogenen Layer, sondern wuchsen vereinzelt. Die Zellform war größtenteils langgestreckt oder sternförmig.

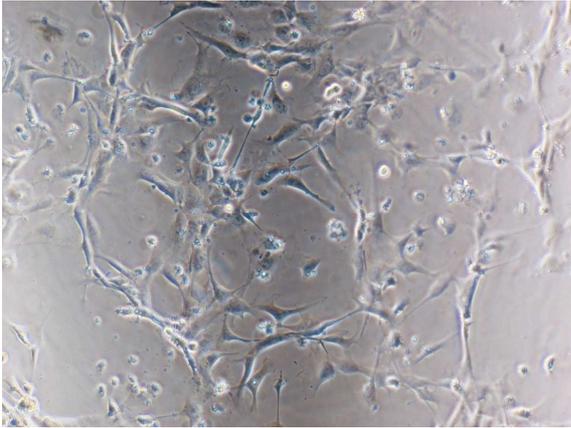


Abb.15: HUVECs (145 000 Zellen/ml; Passage 2) am Tag 1 nach Aussaat in einem PDMS-Kanal beschichtet mit Gelatinelösung (1%)

Beschichtung mit Kollagenlösung

Die Beschichtung des PDMS-Kanals mit Kollagenlösung (0,14 mg/ml) erwies sich ebenfalls als ungeeignet. Ein Großteil der ausgesäten Einzelzellen heftete sich überhaupt nicht an die Wachstumsoberfläche an. Die wenigen, adhären vorliegenden HUVECs wuchsen langgestreckt in sternförmigen Strukturen (Abb.16).

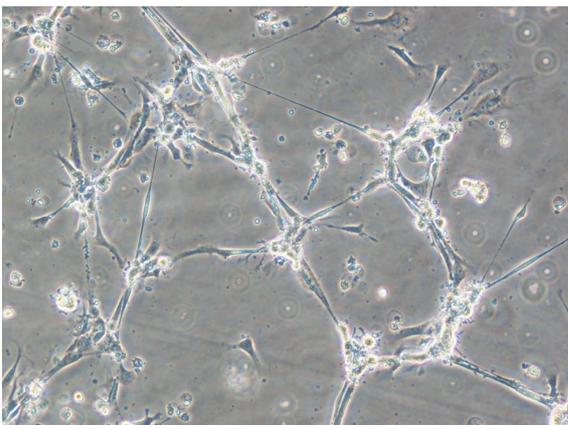


Abb.16: HUVECs (145 000 Zellen/ml; Passage 2) am Tag 1 nach Aussaat in einem PDMS-Kanal beschichtet mit Kollagenlösung (0,14mg/ml)

Beschichtung mit Kollagen- und Fibronectinlösung

Die sequentielle Beschichtung der 3D-Mikrokanäle mit einer Lösung von Kollagen in PBS (0,014 mg/ml) und Fibronectinlösung (100 µg/ml bzw. 200 µg/ml) stellt eine vergleichsweise aufwändige und kostenintensive Methode dar. Im Vergleich zu den Mono-Beschichtungen mit Gelatinelösung (1%) und Kollagenlösung (0,14 mg/ml), konnte mit dieser Vorbehandlung aber eine geringfügige Verbesserung der Zelladhäsion und des Zellwachstums erzielt werden. In einigen Regionen der Kanäle kam es zu einer recht gleichmäßigen Anheftung und Proliferation der HUVECs. Zwischen diesen Arealen zeigten sich jedoch auch deutliche Lücken im Zellrasen (Abb.17-20). Aufgrund des ungleichmäßigen Zellwachstums und der aufwändigen Beschichtungsprozedur, erscheint diese Methode der Beschichtung für die Kultivierung von HUVECs in PDMS-Kanälen ebenfalls als nicht geeignet.

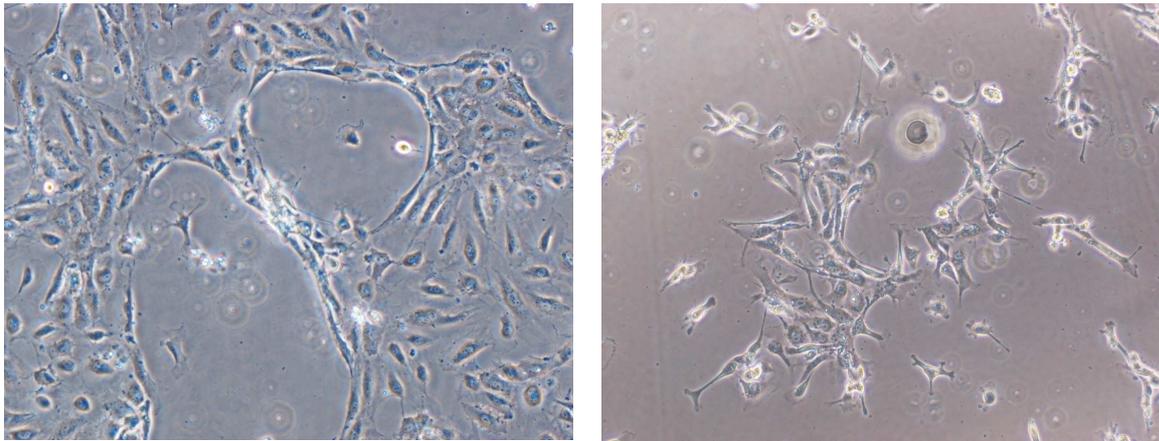


Abb.17,18: HUVECs (145 000 Zellen/ml; Passage 2) am Tag 1 nach Aussaat in einem PDMS-Kanal der sequentiell mit Kollagen (0,14mg/ml) und Fibronectin (100 µg/ml) beschichtet wurde

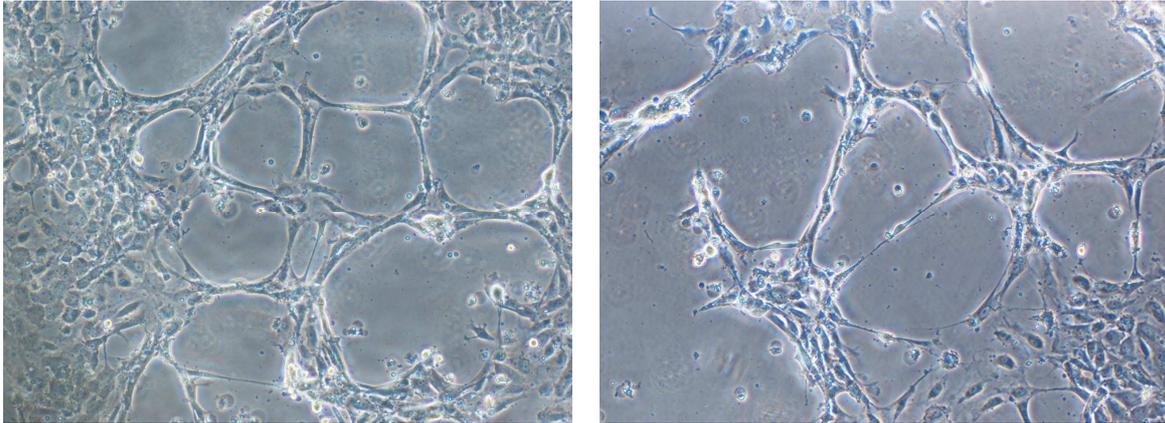


Abb.19,20: HUVECs (290 000 Zellen/ml; Passage 2) am Tag 1 nach Aussaat in einem PDMS-Kanal der sequentiell mit Kollagen (0,14mg/ml) und Fibronectin (100µg/ml) beschichtet wurde

Beschichtung mit Fibronectin

Zur Beschichtung von PDMS-Kanälen mit Fibronectin wurden Lösungen mit 100 µg/ml und 200 µg/ml in PBS eingesetzt. Nach Aussaat der HUVECs in einem mit Fibronectin beschichteten PDMS-Kanal bildete sich bereits nach 24h ein vergleichsweise dichter Zellrasen. Wie aus Abbildung 21 und 22 ersichtlich, konnte jedoch kein signifikanter Unterschied im Zellwachstum in Abhängigkeit der eingesetzten Fibronektinkonzentration festgestellt werden. Deshalb wurde für alle nachfolgenden Untersuchungen mit Zellen die Beschichtungslösung mit geringerer Konzentration verwendet.

In weiterer Folge wurde auch die Zellzahl beim Ansetzen variiert. Bei einer Suspension mit 290 000 Zellen/ml konnte bereits innerhalb von 24 h die Ausbildung eines dichten Zellrasens beobachtet werden (Abb.23, 24). Dieser löste sich jedoch mit fortschreitender Inkubationsdauer zusehends von der Wachstumsoberfläche ab. Bei Verwendung einer Suspension mit 145 000 Zellen/ml bildete sich zwar vergleichsweise langsam ebenfalls ein dichter Zellrasen aus, der sich aber kaum ablöste. Daher wurde für alle nachfolgenden Untersuchungen eine Suspension mit 145 000 Zellen/ml zum Ansetzen verwendet.

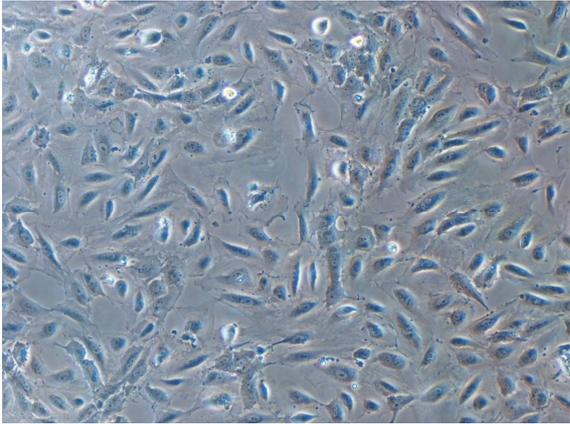


Abb.21: HUVECs (145 000 Zellen/ml; Passage 2) am Tag 1 nach Aussaat in einem PDMS-Kanal beschichtet mit Fibronectinlösung (100 µg/ml)

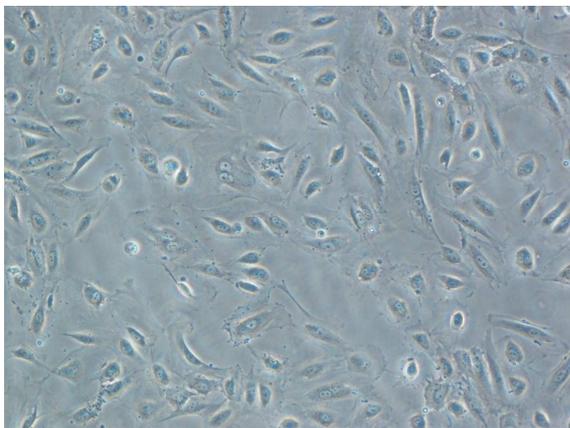


Abb.22: HUVECs (145 000 Zellen/ml; Passage 2) am Tag 1 nach Aussaat in einem PDMS-Kanal beschichtet mit Fibronectinlösung (200 µg/ml)

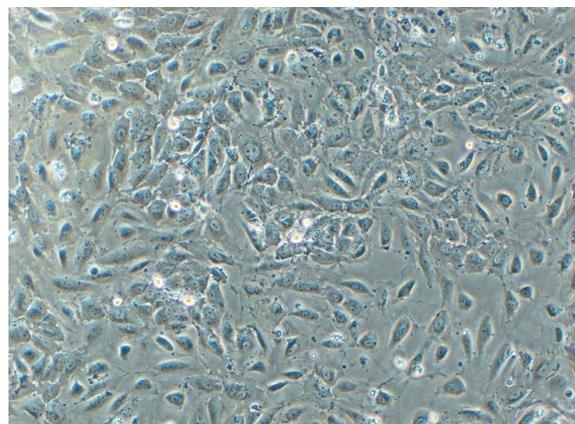
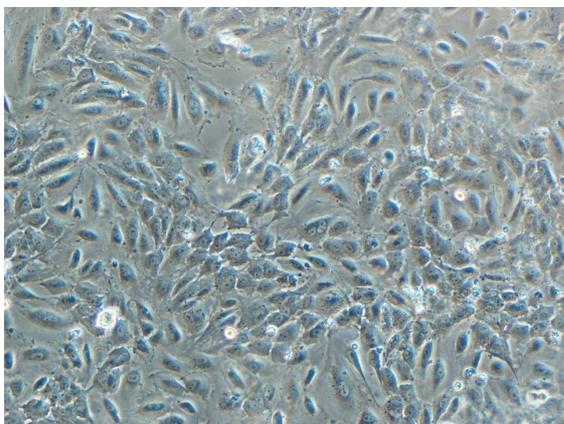


Abb.23, 24: HUVECs (290 000 Zellen/ml; Passage 2) am Tag 1 nach Aussaat in einem PDMS-Kanal beschichtet mit Fibronectinlösung (100 µg/ml)

4.2. Identifizierung eines geeigneten Puffersystems für Experimente mit HUVECs

Für die Pufferkompatibilitätsstudien wurden HUVEC-Zelllayer von Passage (P) 3-4 nach zweitägiger Kultivierung in PDMS-Kanälen verwendet. Dazu wurde zunächst das Zellkulturmedium aus den PDMS-Kanälen möglichst vorsichtig und vollständig mit Hilfe einer Pipette entfernt. Anschließend wurden 500µl des auf 37°C temperierten Puffers zugegeben und 30 min lang bei 4°C bzw. 37°C inkubiert. Als Pufferlösungen wurden isoHEPES und PBS + Ca²⁺/Mg²⁺ eingesetzt, während ECGS-Medium als Positivkontrolle und Aqua dest. als Negativkontrolle dienten.

isoHEPES

Bei Inkubation des HUVEC-Layers in isoHEPES für 30 min bei 4°C kam es weder zu einer Veränderung der Zellform noch zu einem Ablösen der Zellen von der Wachstumsoberfläche (Abb. 25 und 26). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurden auch nach Inkubation bei 37°C keine morphologischen Veränderungen beobachtet (Abb. 27 und 28). IsoHEPES stellt demnach ein geeignetes Puffersystem für Experimente mit HUVECs dar.

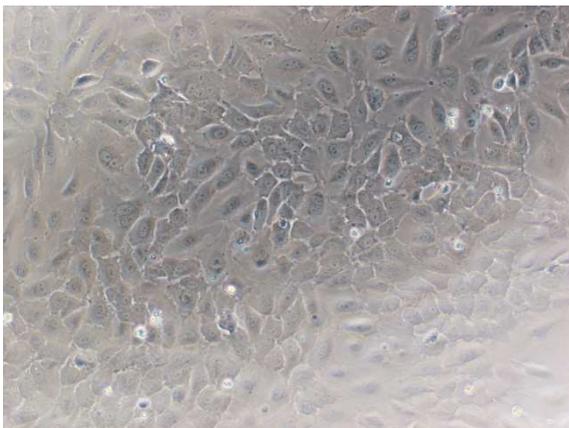


Abb.25: HUVECs P₃ (Tag 2) vor Zusatz von isoHEPES

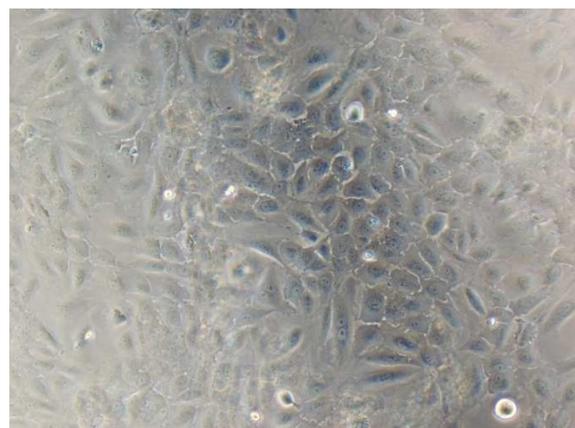


Abb.26: HUVECs P₃ (Tag 2) nach 30 min Inkubation in isoHEPES bei 4°C

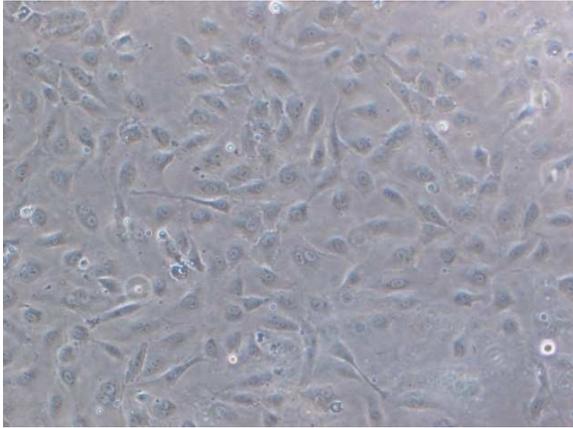


Abb.27: HUVECs P₄ (Tag 2) vor Zusatz von isoHEPES

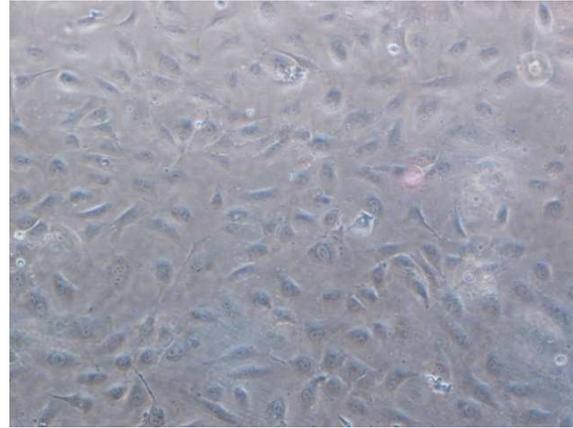


Abb.28: HUVECs P₄ (Tag 2) nach 30 min Inkubation in isoHEPES bei 37°C

PBS + Ca²⁺/Mg²⁺

Wie für isoHEPES wurden auch nach 30 minütiger Inkubation von HUVEC-Zelllayern in PBS + Ca²⁺/Mg²⁺ keine morphologischen Veränderungen des Zelllayers beobachtet (Abb. 29-32). Folglich ist auch PBS + Ca²⁺/Mg²⁺ ein geeignetes Puffermedium für Experimente mit HUVECs.

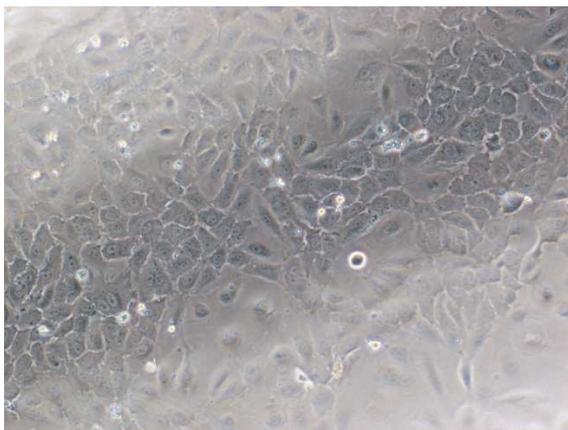


Abb.29: HUVECs P₃ (Tag 2) vor Zusatz von PBS + Ca²⁺/Mg²⁺

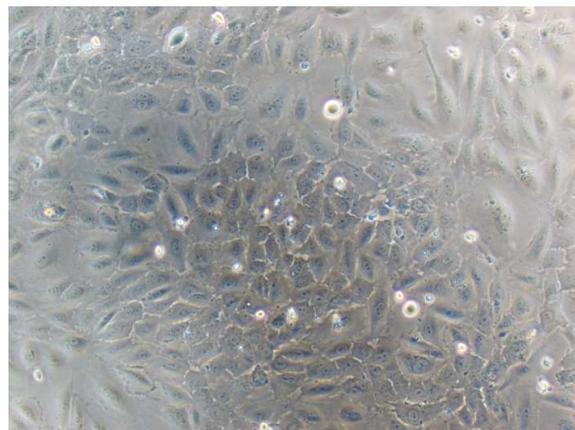


Abb.30: HUVECs P₃ (Tag 2) nach 30 min Inkubation in PBS + Ca²⁺/Mg²⁺ bei 4°C

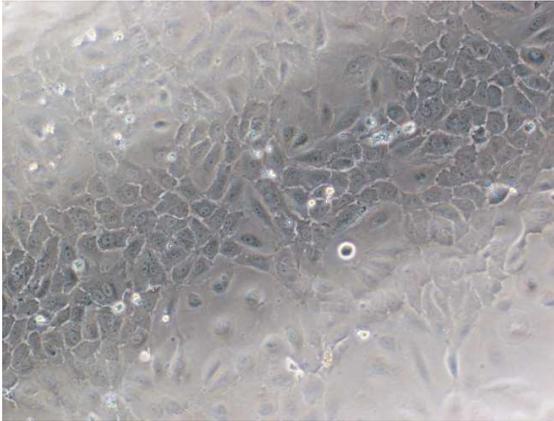


Abb.31: HUVECs P₄ (Tag 2) vor Zusatz von
PBS + Ca²⁺/Mg²⁺

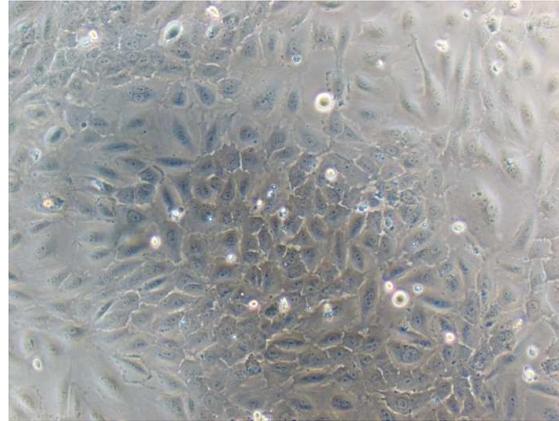


Abb.32: HUVECs P₄ (Tag 2) nach 30 min
Inkubation in PBS + Ca²⁺/Mg²⁺ bei 37°C

Positivkontrolle: ECGS-Medium

Da HUVECs standardmäßig bei 37°C in ECGS-Medium kultiviert werden, wurde nur ein Inkubationsversuch für 30 min bei 4°C durchgeführt. Erwartungsgemäß zeigten sich keine morphologischen Veränderungen der adhärent vorliegenden Zellen (Abb. 33 und 34).

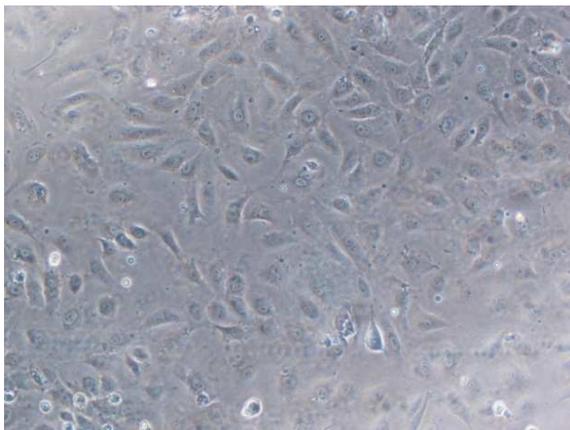


Abb.33: HUVECs P₄ (Tag 2) vor Zusatz von
ECGS-Medium

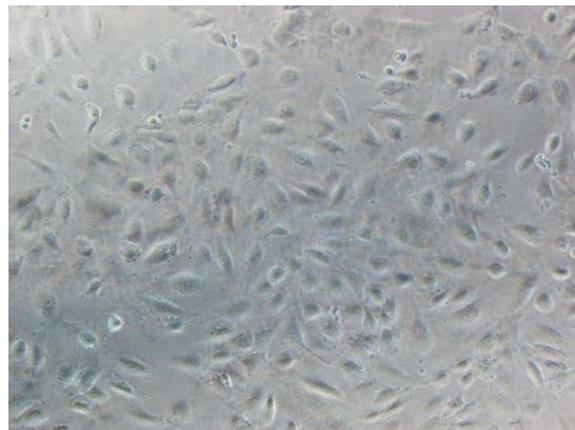


Abb.34: HUVECs P₄ (Tag 2) nach 30 min
Inkubation in ECGS-Medium bei 4°C

Negativkontrolle: Aqua dest.

Nach Inkubation von HUVEC Zelllayern in Aqua dest. kam es bereits nach wenigen Minuten zu morphologischen Veränderungen (Abb. 35 und 36) sowie zum Ablösen von Zellen. Vermutlich basiert dieser Effekt auf einem Mangel an zweiwertigen Kationen, die für die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion essentiell sind. Darüber hinaus ist zu erwarten, dass der verglichen mit dem Zytoplasma der Zellen deutlich niedrigere osmotische Druck von Aqua dest. einen osmotisch bedingten Wassereinstrom in die Zelle auslöst. Dieser Vorgang führt zu einem Anschwellen der Zelle und begünstigt vermutlich so auch das Ablösen von der Wachstumsoberfläche.

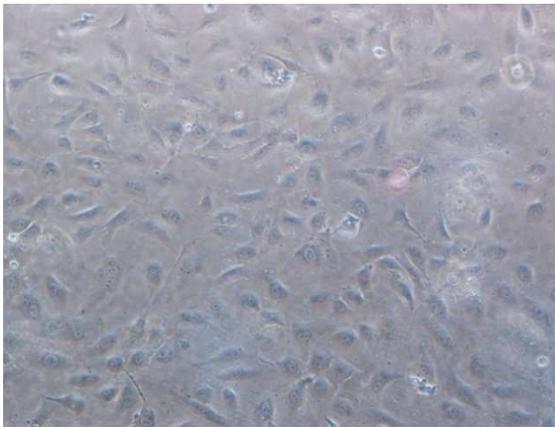


Abb.35: HUVECs P₄ (Tag 2) vor Zusatz von Aqua dest.

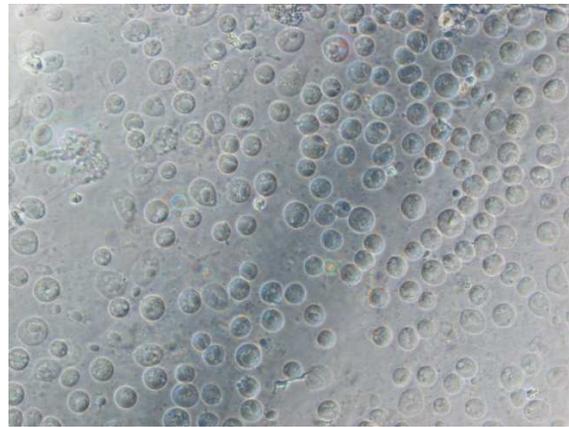


Abb.36: HUVECs P₄ (Tag 2) nach 30 min Inkubation in Aqua dest. bei 4°C

4.3. Oberflächenmodifikation von Mikropartikeln mit PEI

Die Modifikation der Oberfläche von Polystyrolpartikeln mit PEI (5 mg/ml) führte zu einer Umkehrung des Zetapotentials der Teilchen. Carboxylierte Mikropartikel sind durch eine negative Oberflächenladung im Bereich von -55 bis -75 mV charakterisiert (Tab. 3). Durch Adsorption des in einer coil Form vorliegenden Polykations PEI [24] an die negativ geladene Teilchenoberfläche kommt es zu einer Ladungsüberkompensation. Dies wiederum hat eine Umkehrung der

Oberflächenladung zur Folge. Durchschnittlich lagen die Zetapotentiale von PEI-modifizierten Polystyrolpartikeln bei +30 bis +60 mV (Tab. 3). Die hohen Polydispersitätsindizes von negativ und positiv geladenen Partikeln deuten darauf hin, dass die mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelten Partikelgrößen vermutlich nur bedingt den tatsächlichen Partikelgrößen entsprechen.

Size Mikropartikel [μm]	PEI	Zeta potential [mV]	Leitfähigkeit [mS cm^2]	PDI	mittlere Partikelgrößen [d.nm]
0,5	+	60,6	0,7	0,65	874
0,5	-	-57,1	0,8	0,72	652
1	+	50,9	0,8	0,85	1469
1	-	-71,7	0,9	0,69	1102
2	+	31,7	0,7	0,91	2481
2	-	-61,6	0,7	0,73	2093

Tab.3: Zetapotential und Polydispersitätsindex von Polystyrolmikropartikeln vor und nach Oberflächenmodifikation mit PEI

4.4. Eichgeraden für die Mikropartikelkonzentrationsbestimmung

Um die Konzentration von fluoreszenzmarkierten Polystyrolmikropartikeln in Suspension bzw. nach Bindung an eine Oberfläche bestimmen zu können, wurden fluorimetrische Messungen durchgeführt. Dazu wurden ausgehend von Stammsuspensionen mit bekannter Konzentration Verdünnungsreihen erstellt. Die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Verdünnungen wurde anschließend mit einem Mikrotiterplattenlesegerät (Infinite M200i, Tecan, Grödig, Austria) bestimmt.

Zu Beginn der Messung liegen die suspendierten Teilchen regelmäßig verteilt vor. Nachdem sich ein Gleichgewicht zwischen Reibungskraft und Gravitation eingestellt hat, sedimentieren die Mikropartikel mit einer konstanten Geschwindigkeit. Dadurch kommt es zu einer Anreicherung der Teilchen in Bodennähe des Messgefäßes. Nach einer bestimmten Zeitdauer, die abhängig von den Eigenschaften der Partikel und des Suspensionsmediums ist, sollten alle Teilchen am Boden abgeschieden worden sein. Eine Eichgerade, die in diesem Zustand erstellt wird, bietet vermutlich eine bessere Grundlage für die

Quantifizierung von zell- oder oberflächengebundenen Partikeln. Aufgrund der geringen Dichtedifferenz zwischen Polystyrol (1050 kg/m^3) und der wässrigen Pufferlösung ($\sim 1000 \text{ kg/m}^3$) liegen die durchschnittlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten der Teilchen nur zwischen $30,8 \text{ }\mu\text{m/min}$ ($2 \text{ }\mu\text{m}$ Partikeldurchmesser) und $1,9 \text{ }\mu\text{m/min}$ ($0,5 \text{ }\mu\text{m}$ Partikeldurchmesser). Ausgehend von einer Füllhöhe von etwa 1-2 mm im Mikrotiterplattenwell würde die Wartezeit bis zur vollständigen Sedimentation mehrere Stunden betragen. Um die Versuche praktikabler zu gestalten, wurden die Teilchen mit Hilfe einer Mikrotiterplattenzentrifuge beschleunigt abgeschieden.

Polystyrolmikropartikel in isoHEPES

10 ml der gelieferten Suspensionen (Durchmesser: $0,5 \text{ }\mu\text{m}$, $1 \text{ }\mu\text{m}$, $2 \text{ }\mu\text{m}$; Polyscience, Deutschland) enthalten laut Hersteller $\sim 0,265 \text{ g}$ Partikel. Zur Herstellung einer Stammsuspension wurden $11 \text{ }\mu\text{l}$ (Partikeldurchmesser: $0,5 \text{ }\mu\text{m}$ und $1 \text{ }\mu\text{m}$) bzw. $8 \text{ }\mu\text{l}$ (Partikeldurchmesser: $2 \text{ }\mu\text{m}$) entnommen und in einem Eppendorfgefäß (2ml) mit $989 \text{ }\mu\text{l}$ bzw. $992 \text{ }\mu\text{l}$ isoHEPES vermengt. Anschließend wurden $80 \text{ }\mu\text{l}$ dieser Stammsuspension entnommen und mit $920 \text{ }\mu\text{l}$ isoHEPES vermischt. Ausgehend von dieser Suspension wurden schrittweise vierzehn 1:1 Verdünnungen mit isoHEPES hergestellt. Für die Erstellung der Eichgeraden wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Jeweils $100 \text{ }\mu\text{l}$ einer Verdünnungsstufe wurden in eine Mikrotiterplatte (TC-treated 96 flat bottom transparent polystyrol, Iwaki) überführt. Anschließend wurde mit aufgesetztem Deckel die Fluoreszenzintensität (Exzitation: 440nm , Emission: 485nm , bottom read) bei einem Gain von 109 beziehungsweise 220 bestimmt. Die Fluoreszenzintensität von isoHEPES diente als Negativkontrolle und wurde von allen Messwerten subtrahiert. Nach erfolgter Messung wurde die Mikrotiterplatte 20 min (Partikeldurchmesser: $0,5 \text{ }\mu\text{m}$) bzw. 15 min (Partikeldurchmesser: $1 \text{ }\mu\text{m}$ und $2 \text{ }\mu\text{m}$) lang bei 3000 Upm zentrifugiert (Sorvall RT-7 Refrigerated Benchtop Cell Culture Centrifuge, Minnesota, USA). Danach wurde die Fluoreszenzintensität erneut bestimmt.

Im untersuchten Konzentrationsbereich besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der gemessenen Fluoreszenzintensität und der Konzentration der

Mikropartikel (Abb. 37 - 42). Eine Konzentrationsbestimmung der eingesetzten fluoreszenzmarkierten Polystyrolmikropartikel ist in isoHEPES somit im Bereich von 0,02 bis ~20 µg/ml möglich. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die Fluoreszenzintensitäten nach Zentrifugation tendenziell höher waren. Dieser Effekt beruht vermutlich darauf, dass die Teilchen durch den Zentrifugationsschritt konzentriert am Boden des Wells vorliegen. Bei der Bestimmung der Fluoreszenzintensität über bottom read könnte daher aufgrund der Nähe zum Detektor der Emissionsanteil, der über Streulicht verloren geht, reduziert sein. Diese Hypothese erklärt jedoch nicht, warum die Zunahme der Fluoreszenzintensität nach Zentrifugieren bei höheren Partikelkonzentrationen stärker ausgeprägt ist als bei niedrigen Partikelkonzentrationen.

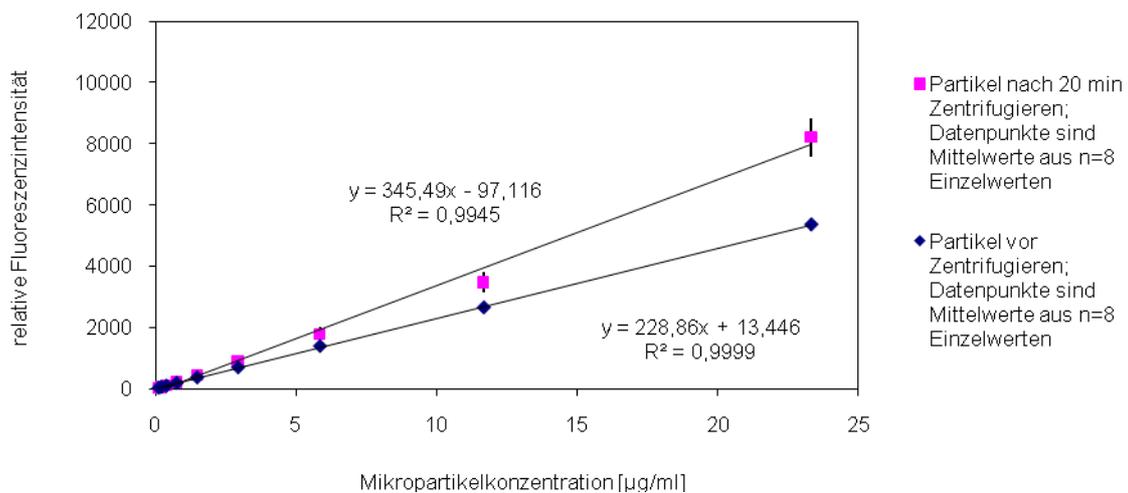


Abb.37: Fluoreszenzintensitäten von Polystyrolmikropartikeln (0,5 µm) suspendiert in isoHEPES vor und nach Zentrifugation; Gain: 109; Konzentrationsbereich: 23,32 µg/ml - 0,09 µg/ml

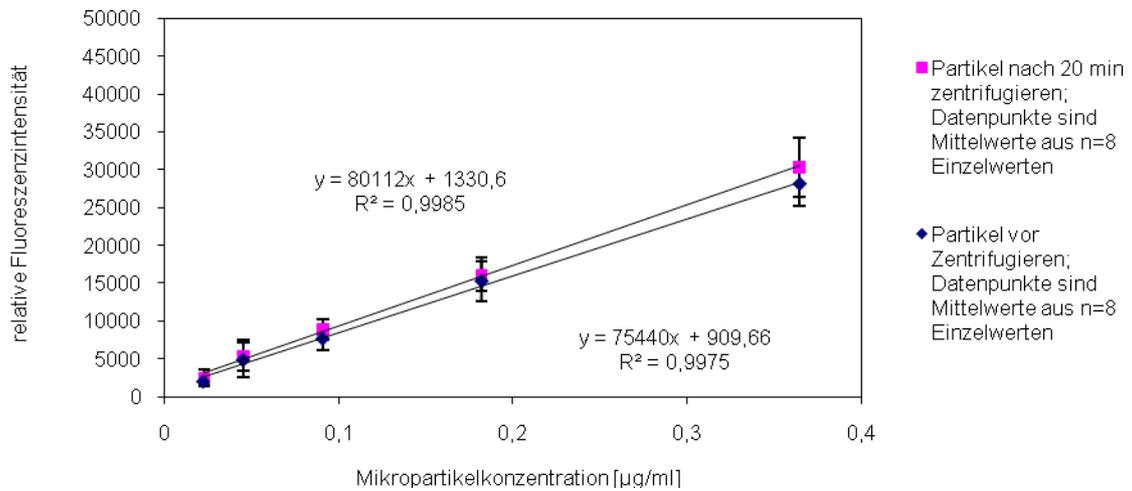


Abb.38: Fluoreszenzintensitäten von Polystyrolmikropartikeln (0,5 μm) suspendiert in isoHEPES vor und nach Zentrifugation; Gain: 220; Konzentrationsbereich: 0,36 $\mu\text{g/ml}$ - 0,02 $\mu\text{g/ml}$

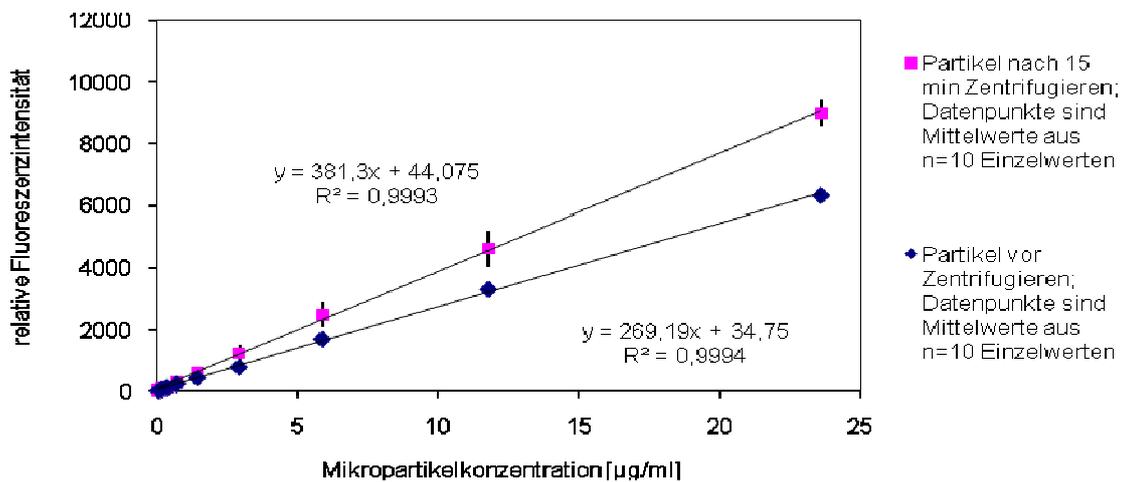


Abb.39: Fluoreszenzintensitäten von Polystyrolmikropartikeln (1 μm) suspendiert in isoHEPES vor und nach Zentrifugation; Gain: 109; Konzentrationsbereich: 23,6 $\mu\text{g/ml}$ - 0,09 $\mu\text{g/ml}$

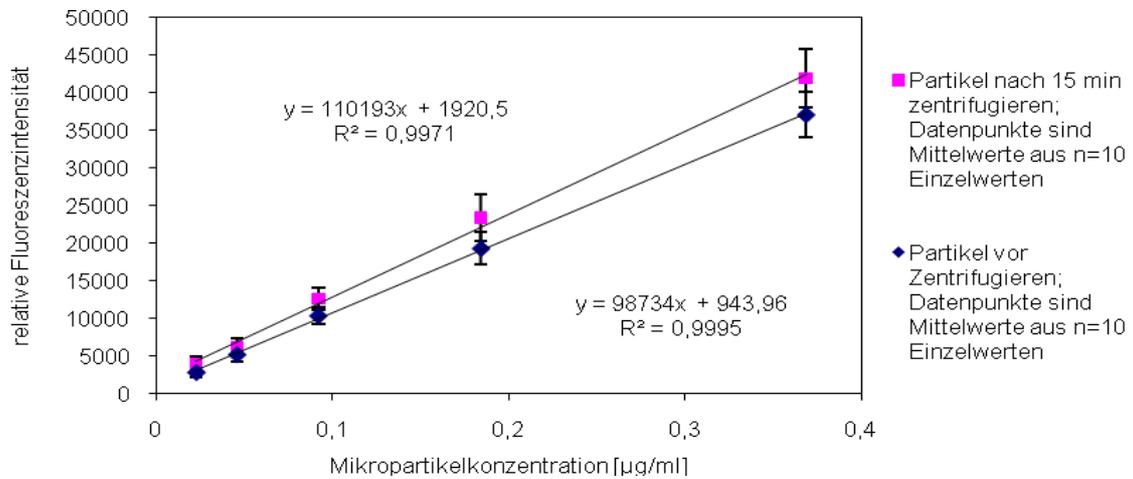


Abb.40: Fluoreszenzintensitäten von Polystyrolmikropartikeln (1 μm) suspendiert in isoHEPES vor und nach Zentrifugation; Gain: 220; Konzentrationsbereich: 0,37 $\mu\text{g/ml}$ - 0,02 $\mu\text{g/ml}$

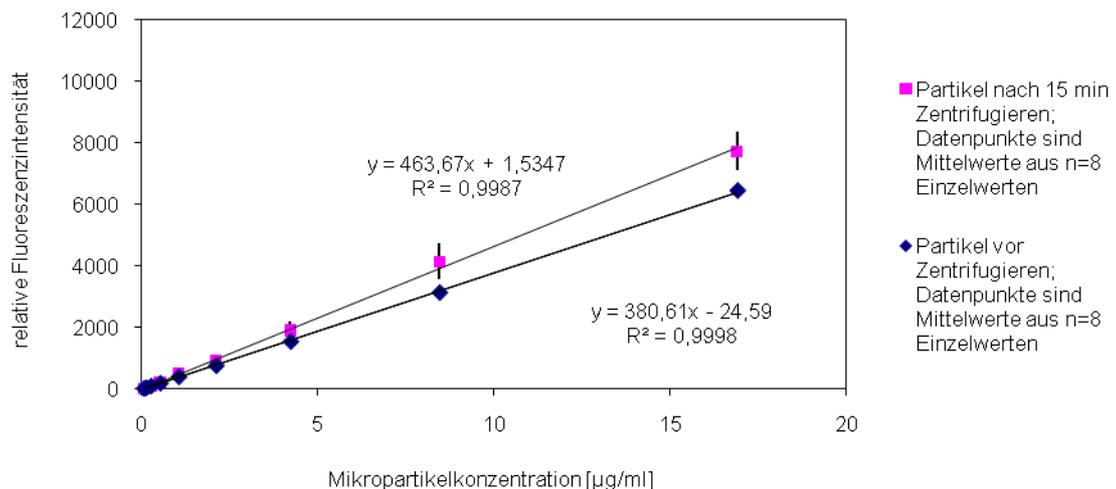


Abb.41: Fluoreszenzintensitäten von Polystyrolmikropartikeln (2 μm) suspendiert in isoHEPES vor und nach Zentrifugation; Gain: 109; Konzentrationsbereich: 16,90 $\mu\text{g/ml}$ - 0,07 $\mu\text{g/ml}$

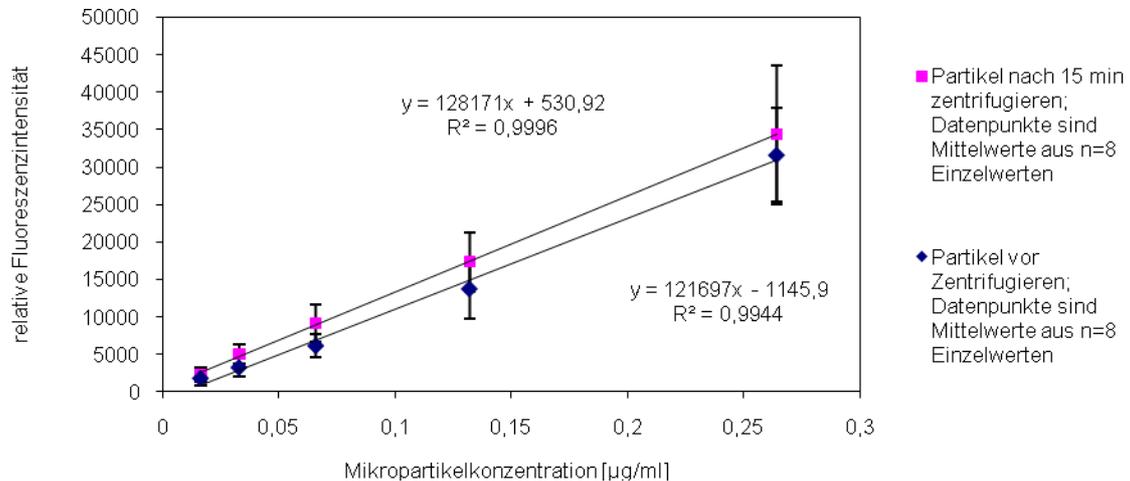


Abb.42: Fluoreszenzintensitäten von Polystyrolmikropartikeln (2 µm) suspendiert in isoHEPES vor und nach Zentrifugation; Gain: 220; Konzentrationsbereich: 0,26 µg/ml - 0,02 µg/ml

Polystyrolpartikel in PBS + Ca²⁺/Mg²⁺

Da sich sowohl isoHEPES als auch PBS + Ca²⁺/Mg²⁺ als geeignetes Puffersystem für Versuche mit HUVEC-Zelllayern erwiesen hatte, wurden auch mit PBS + Ca²⁺/Mg²⁺ als Suspensionsmedium Eichgeraden für die Partikeldetektion erstellt (Abb. 43-46). Wie im Fall von isoHEPES besteht auch in PBS + Ca²⁺/Mg²⁺ ein linearer Zusammenhang zwischen der analysierten Fluoreszenzintensität und der Partikelkonzentration. Die untere Nachweisgrenze für Partikel mit einem Durchmesser von 1 bzw. 2 µm liegt in beiden Pufferlösungen bei etwa 0,02 µg/ml. Interessanterweise wurde im Fall von 1 µm Polystyrolpartikeln bei Konzentrationen ≥ 2 µg/ml in PBS + Ca²⁺/Mg²⁺ eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität detektiert als in isoHEPES (Abb. 43). Dieser Effekt konnte jedoch für Polystyrolpartikel mit einem Durchmesser von 2 µm nicht bestätigt werden (Abb. 45). Ein Einfluss der

unterschiedlichen Pufferkompositionen von PBS + Ca²⁺/Mg²⁺ und isoHEPES auf die Fluoreszenzintensität der verwendeten Polystyrolpartikel konnte folglich nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Ähnlich wie in isoHEPES wurde auch in PBS + Ca²⁺/Mg²⁺ nach Zentrifugation eine Zunahme der Fluoreszenzintensität festgestellt. Das Ausmaß dieser Zunahme war im Fall von Polystyrolpartikeln mit einem Durchmesser von 1 µm in beiden Puffern vergleichbar (Abb. 43 und 44). Im Gegensatz dazu wurde bei Teilchen mit 2 µm Durchmesser und Konzentrationen ≥1 µg/ml in PBS + Ca²⁺/Mg²⁺ nach Zentrifugation ein höherer Anstieg beobachtet als in isoHEPES (Abb. 45). Dieser ist auch an der unterschiedlichen Steigung der Regressiongeraden deutlich erkennbar. Aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse bei unterschiedlichen Partikelgrößen kann auch für die Fluoreszenzzunahme nach Zentrifugation kein pufferspezifischer Effekt festgestellt werden.

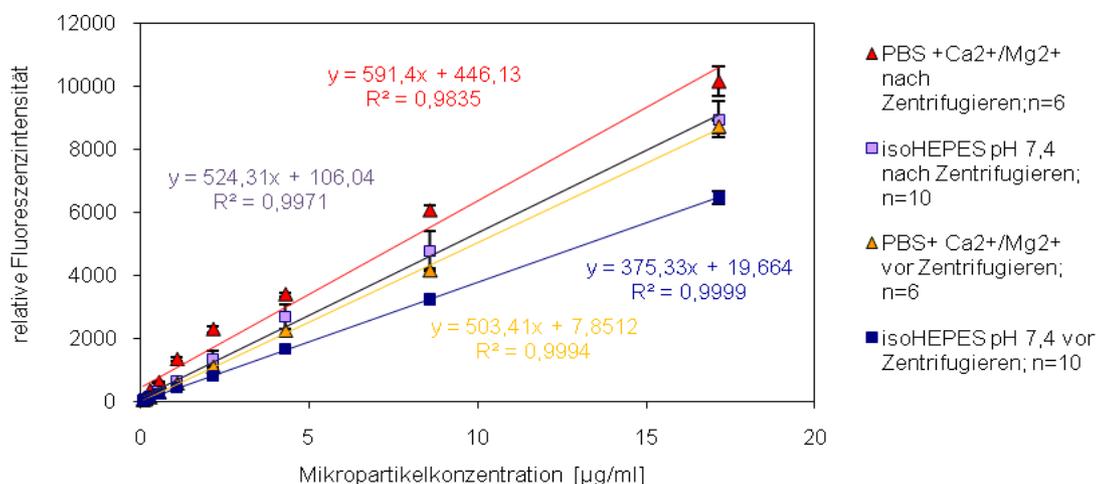


Abb.43: Fluoreszenzintensitäten von Polystyrolmikropartikeln (1 µm) suspendiert in isoHEPES bzw. in PBS + Ca²⁺/Mg²⁺ vor und nach Zentrifugation; Gain: 109; Konzentrationsbereich: 17,15 µg/ml – 0,07 µg/ml

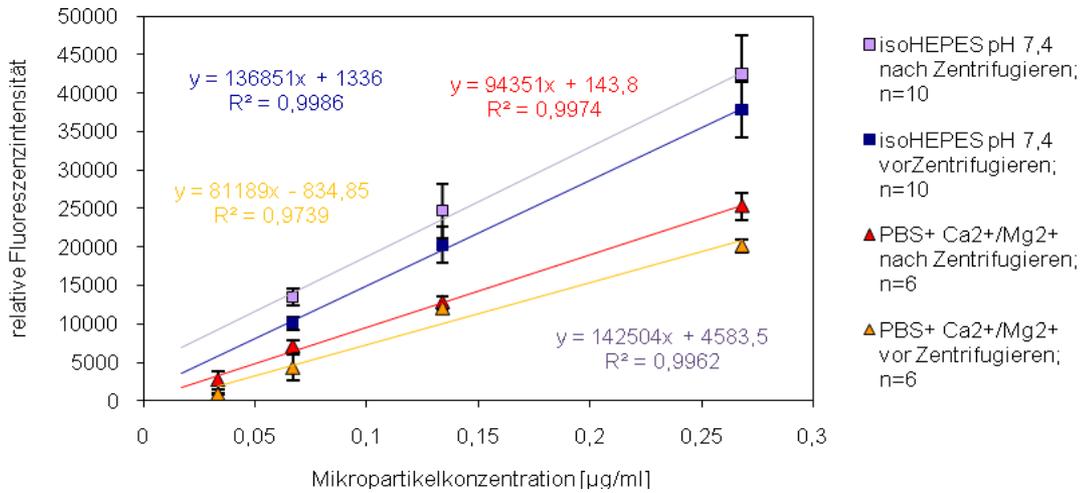


Abb.44: Fluoreszenzintensitäten von Polystyrolmikropartikeln (1 µm) suspendiert in isoHEPES bzw. in PBS + Ca²⁺/Mg²⁺ vor und nach Zentrifugation; Gain: 220; Konzentrationsbereich: 0,27 µg/ml – 0,02 µg/ml

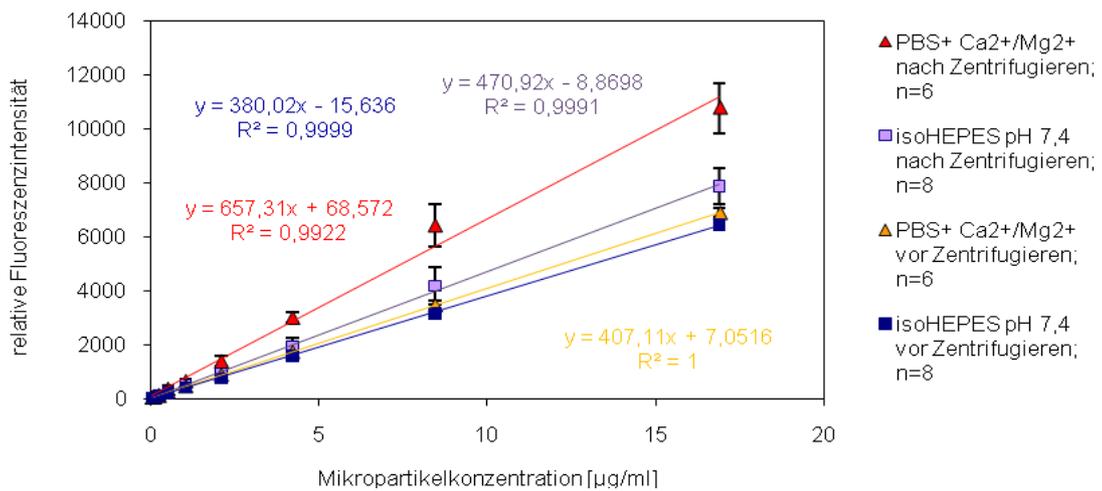


Abb.45: Fluoreszenzintensitäten von Polystyrolmikropartikeln (2 µm) suspendiert in isoHEPES bzw. in PBS + Ca²⁺/Mg²⁺ vor und nach Zentrifugation; Gain: 109; Konzentrationsbereich: 16,9 µg/ml – 0,07 µg/ml

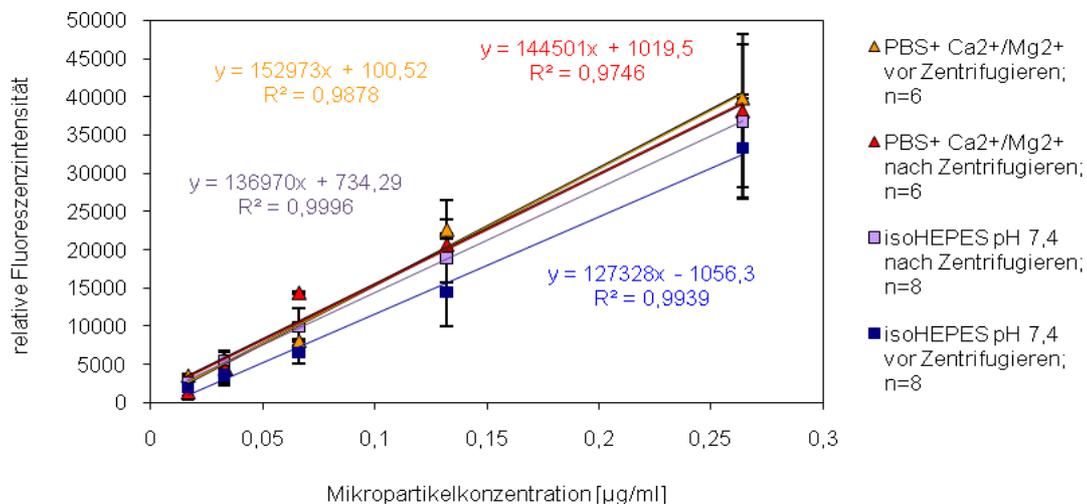


Abb.46: Fluoreszenzintensitäten von Polystyrolmikropartikeln (1 µm) suspendiert in isoHEPES bzw. in PBS + Ca²⁺/Mg²⁺ vor und nach Zentrifugation; Gain: 220; Konzentrationsbereich: 0,26 µg/ml – 0,02 µg/ml

Polystyrolpartikel in ECGS-Medium + 0,1% Pluronic F-68

Um eine Grundlage für etwaige zukünftige Partikelkonzentrationsbestimmungen in Gewebekulturmedium zu schaffen, wurden auch Eichgeraden für alle verwendeten Partikelgrößen in ECGS-Medium + 0,1% Pluronic F-68 erstellt (Abb. 47-49). Zur Herstellung einer Stammsuspension wurden 13 µl (Partikeldurchmesser: 0,5 µm) bzw. 8 µl (Partikeldurchmesser: 1 µm und 2 µm) entnommen und in einem Eppendorfgefäß (2ml) mit 987 µl bzw. 992 µl ECGS-Medium + 0,1% Pluronic vermengt. Die Herstellung der Verdünnungsreihen und die fluorimetrische Detektion erfolgten nach den oben beschriebenen Protokollen. Die Nachweisgrenzen liegen für Medium im Bereich von 0,43 µg/ml (0,5 µm Partikeldurchmesser), 0,07 µg/ml (1 µm Partikeldurchmesser) bzw. 0,13 µg/ml (2 µm Partikeldurchmesser). Eine adäquate Analyse erscheint hier jedoch nur kurz nach Herstellung der Suspension einwandfrei möglich. Infolge des Zentrifugationsschritts kam es nämlich zu einem deutlichen Anstieg der

Fluoreszenzintensität. Diese Zunahme war im Vergleich zu isoHEPES bei den Partikeln mit 0,5 und 1 µm Durchmesser besonders stark ausgeprägt und könnte auf Aggregation der Teilchen zurückzuführen sein.

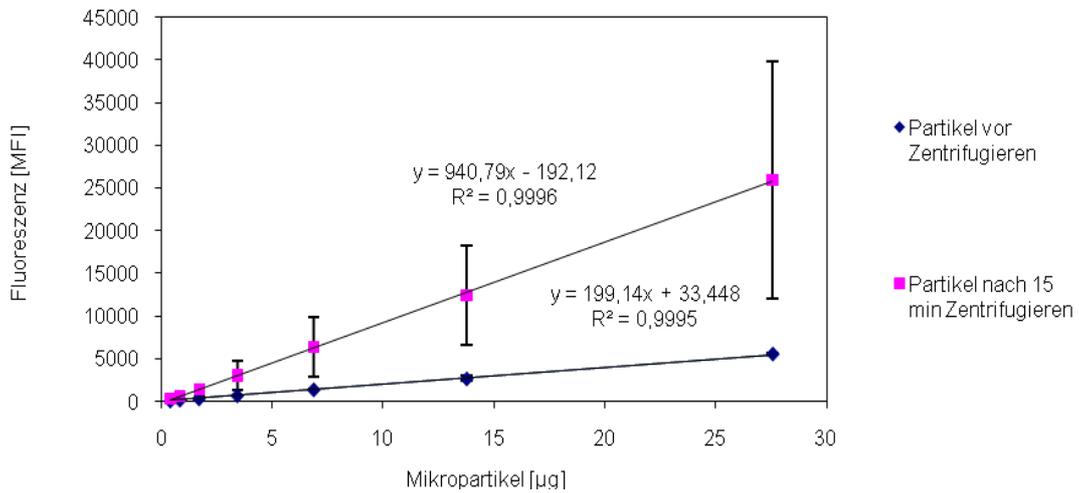


Abb.47: Fluoreszenzintensitäten von Polystyrolmikropartikeln (0,5 µm) suspendiert in ECGS-Medium + 0,1% Pluronic F-68 vor und nach Zentrifugation; Gain: 109; Konzentrationsbereich: 27,56 µg/ml – 0,43 µg/ml

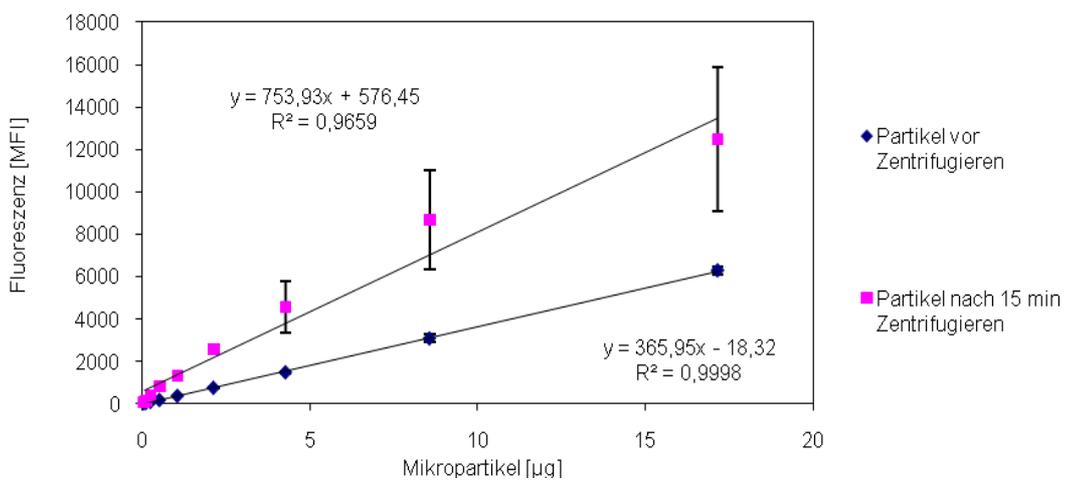


Abb.48: Fluoreszenzintensitäten von Polystyrolmikropartikeln (1 µm) suspendiert in ECGS-Medium + 0,1% Pluronic F-68 vor und nach Zentrifugation; Gain: 109; Konzentrationsbereich: 17,15 µg/ml – 0,07 µg/ml

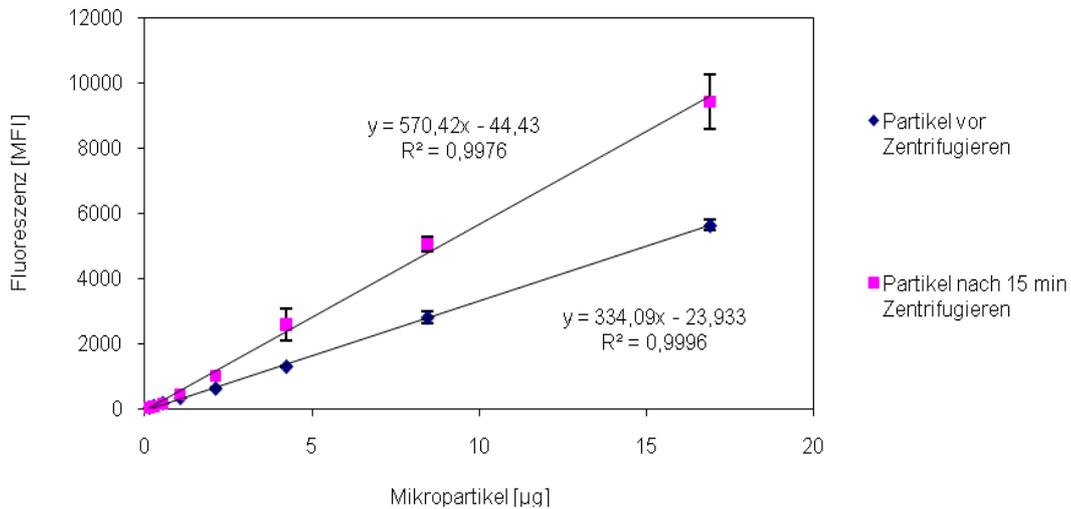


Abb.49: Fluoreszenzintensitäten von Polystyrolmikropartikeln (2 µm) suspendiert in ECGS-Medium + 0,1% Pluronic F-68 vor und nach Zentrifugation; Gain: 109; Konzentrationsbereich: 16,9 µg/ml – 0,13 µg/ml

4.5. Quantifizierung von PEI mittels Fluorescamin

Der Nachweis von primären Aminogruppen über Fluorescamin (Abb. 50) könnte sich für die Quantifizierung des Polyamins PEI als vorteilhaft erweisen und somit bei entsprechenden zukünftigen Fragestellungen eingesetzt werden. Daher wurde die grundsätzliche Eignung des Fluorescaminassays für den Nachweis von PEI untersucht.

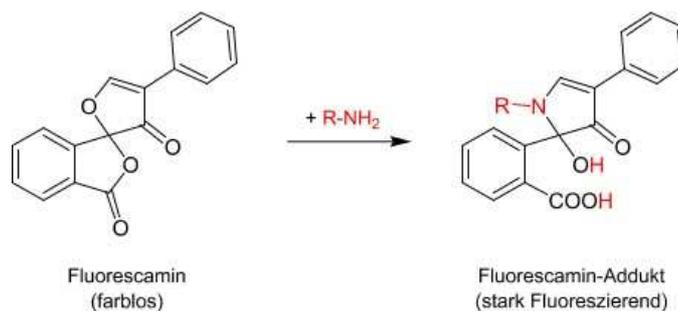


Abb.50: Reaktionsschema des Aminogruppenachweises über Fluorescamin.

Zu diesem Zweck wurden zunächst Verdünnungsreihen von PEI in HEPES bzw. 100mM Phosphatpuffer pH 5,8 hergestellt. 31 μ l einer Stammlösung von PEI im jeweiligen Puffer (1 mg/ml) wurden mit 969 μ l der entsprechenden Pufferlösung in einem Eppendorfgefäß vermischt. Ausgehend von dieser Lösung wurden sechs 1:1 Verdünnungsschritte durchgeführt. 150 μ l der jeweiligen Verdünnungsstufe wurden in ein Mikrotiterplattenwell transferiert. Nach Zusatz von 50 μ l einer Fluorescaminlösung in Aceton (3 mg/ml) pro Well wurde die Mikrotiterplatte unter Schütteln 1 min lang bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten der Lösungen bestimmt (Gain: 100; Exzitation: 400nm, Emission: 460nm). Die Leerwertkorrektur der Mittelwerte betrug für HEPES/Fluorescamin ~27 und für Phosphatpuffer pH 5,8/Fluorescamin ~30. Nach einer Wartezeit von fünf Minuten wurde die Messung der Fluoreszenzintensität wiederholt.

Im Konzentrationsbereich von 0,49 - ~15 μ g/ml PEI steigt die Fluoreszenzintensität durch Reaktion von Fluorescamin mit primären Aminogruppen weitgehend linear an (Abb. 51). Ab einer Konzentration von ~15 μ g/ml scheinen erste Sättigungseffekte aufzutreten und die Linearität ist dann nicht mehr gegeben. Dies ist sowohl in HEPES als auch in Phosphatpuffer pH 5,8 zu beobachten. Die Reaktion von Fluorescamin mit PEI in Phosphatpuffer pH 5,8 verläuft spontan. Die Fluoreszenzintensität nach 1 min Reaktionszeit blieb auch nach Inkubation für weitere 5 min weitgehend unverändert. Im Gegensatz dazu wurde in HEPES nach verlängerter Inkubation eine Zunahme der Fluoreszenzintensität detektiert. Dies deutet auf eine längere Reaktionsdauer bis zur Gleichgewichtseinstellung hin.

Interessanterweise ist die gemessene Fluoreszenzintensität in HEPES generell etwa doppelt so hoch wie in Phosphatpuffer pH 5,8. Dieser Effekt könnte auf der pH-Differenz zwischen den Pufferlösungen beruhen. Vermutlich erfolgt die Reaktion von Fluorescamin mit PEI erleichtert, wenn die primären Aminogruppen des Polykations in ihrer ungeladenen Form vorliegen. Je weiter der pH-Wert der Lösung im sauren Bereich liegt, desto mehr Aminogruppen werden protoniert, wodurch in weiterer Folge die Reaktionseffizienz sinkt. Grundsätzlich scheint der Fluorescaminassay jedoch gut geeignet zu sein, PEI sowohl in HEPES als auch in 100mM Phosphatpuffer pH 5,8 zu quantifizieren.

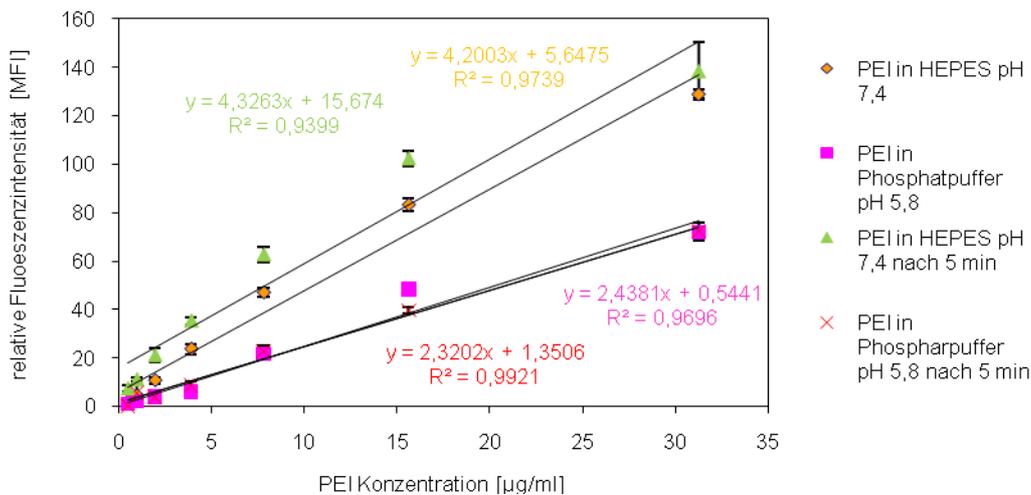


Abb.51: Quantifizierung von PEI im Konzentrationsbereich von 31,25 µg/ml-0,49 µg/ml in HEPES pH 7,4 und Phosphatpuffer pH 5,8 mittels Fluorescamin; jeder Datenpunkt wurde errechnet aus n=3 Einzelwerten

4.6. Interaktion von PEI-modifizierten Mikropartikeln mit positiv und negativ geladenen Glasoberflächen

Die Interaktion von geladenen Mikropartikeln mit einer geladenen Oberfläche sollte weitgehend durch Coulomb-Interaktionen bestimmt sein. Während sich entgegengesetzt geladene Oberflächen anziehen, sollte zwischen gleichsinnig geladenen Oberflächen Repulsion dominieren. Diese Hypothese wurde für die Interaktion von PEI-beschichteten Mikropartikeln (1 µm) mit positiv und negativ geladenen Kanaloberflächen getestet. Um unterschiedlich geladene Oberflächen zu erzeugen, wurden 3D-Mikrokanäle auf Deckgläschen, die zuvor mit Piranhalösung behandelt wurden, entweder mit einer Lösung von PEI in 100mM Phosphatpuffer pH 5,8 (5 mg/ml) oder nur mit 100mM Phosphatpuffer pH 5,8 befüllt und unter Schütteln 1 h lang bei RT inkubiert. Während die negative Grundladung der Kanaloberfläche in reinem Phosphatpuffer erhalten bleibt, sollten durch Adsorption von PEI an die Glasoberfläche positive Ladungen eingebracht werden. Die jeweilige Lösung wurde anschließend aus den Kanälen entfernt und

jeder Kanal zweimal mit Aqua dest. gewaschen. Durch Verdünnen der Stammsuspension (Partikeldurchmesser: 1 μm) mit HEPES pH 7,4 auf 200 $\mu\text{g/ml}$ wurde eine für die Untersuchung geeignete Partikelsuspension hergestellt. Die PDMS-Kanäle wurden mit jeweils 500 μl der Suspension befüllt und 30 bzw. 60 min lang bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Partikelsuspension entfernt, die Kanäle zweimal mit 500 μl Aqua dest. gewaschen und die Fluoreszenzintensität der Kanaloberfläche bei Gain 109 bestimmt. Um Fluoreszenzmessungen in einem PDMS-Kanal mit einem Mikrotiterplattenlesegerät durchführen zu können, wurde ein speziell angefertigter Alublock (Abb. 52) verwendet.



Abb.52: Aluminiumblock mit PDMS-Kanal

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Bindung von positiv geladenen Polystyrolmikropartikeln an die Glasoberfläche der PDMS Kanäle sowohl von der Oberflächenvorbehandlung als auch von der Inkubationsdauer abhängig ist. Wie aus den Ergebnissen in Abb. 53 hervorgeht, war das Ausmaß der Partikelbindung deutlich reduziert, wenn die Kanaloberfläche mit PEI beschichtet worden war. Dies deutet darauf hin, dass durch Adsorption von PEI positive Ladungen an der Glasoberfläche entstanden sind und somit aufgrund der elektrostatischen Repulsion zwischen positiver Oberfläche und positiven Mikropartikeln die Bindungswahrscheinlichkeit reduziert ist. Im Gegensatz dazu wurde nach Inkubation für 30 min in nichtbeschichteten Kanälen eine beinahe vierfach höhere Fluoreszenzintensität gemessen.

Somit konnte die eingangs ausgeführte Hypothese, nach der sich entgegengesetzt geladene Objekte anziehen sollten, auch experimentell bestätigt werden. Inkubation für weitere 30 min führte sowohl bei PEI-beschichteten als auch bei nichtbeschichteten Kanälen zu einer Zunahme der Partikelbindung. Das Ausmaß dieser Zunahme war bei nichtbeschichteten Kanälen höher.

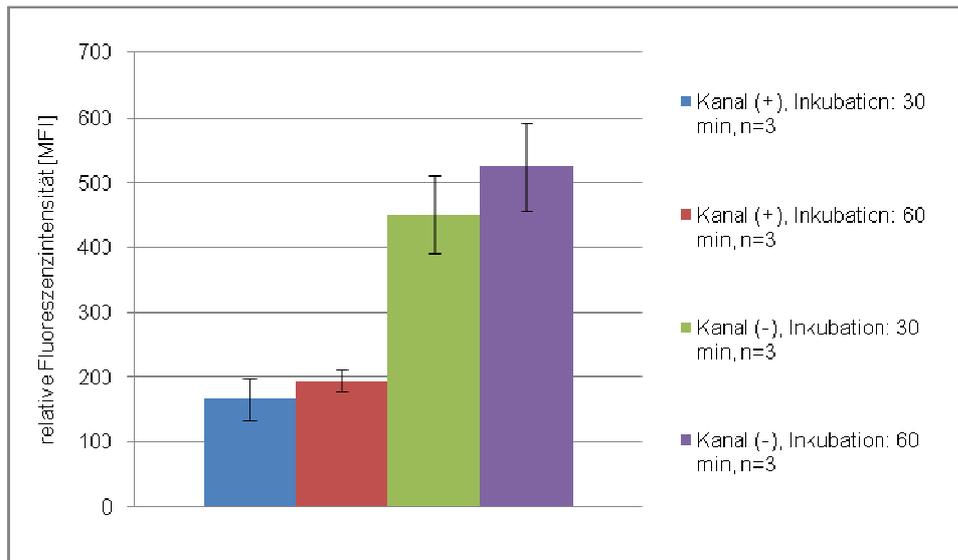


Abb. 53: Bindung von PEI-modifizierten Polystyrolpartikeln (1 μm) an PEI-beschichtete (+) und nichtmodifizierte Glasoberfläche (-) nach Inkubation für 30 oder 60 min bei RT, jeder Mittelwert errechnet sich aus n=3 Einzelwerten.

4.7. Interaktion von carboxylierten und PEI-modifizierten Mikropartikeln mit HUVEC Zelloberflächen

Alle Zelltypen von multizellulären Organismen zeichnen sich durch eine geladene Zelloberfläche aus. Neben negativen Ladungen, die hauptsächlich auf Sialinsäurereste und Phosphatkopfguppen der Phospholipide zurückzuführen sind, existieren auch positive Ladungen in Form von ϵ -Aminogruppen der Lysinseitenketten von Membranproteinen. Die Verteilung dieser Ladungsträger in der Membran unterliegt einer örtlichen und zeitlichen Dynamik. Im Allgemeinen wird jedoch davon ausgegangen, dass anionische Gruppen bei allen

eukaryotischen Zellen überwiegen [25]. Folglich sollte ein HUVEC-Zelllayer eine negativ geladene Oberfläche darstellen, an die bevorzugt positiv geladene Partikel binden. Diese Hypothese sollte mit positiv und negativ geladenen Polystyrolpartikeln getestet werden. Zu diesem Zweck wurden HUVECs von Passage 2-3 in einem mit Fibronectin beschichteten PDMS-Kanal, der auf einem Deckglas fixiert wurde, ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Für diese Testreihe wurden sowohl carboxylierte als auch PEI-modifizierte Polystyrolpartikel mit Durchmessern von 0,5 und 2 μm eingesetzt. Vor Versuchsbeginn wurde das ECGS-Medium vorsichtig unter Schräghalten des PDMS-Kanals entfernt. Anschließend wurde der Kanal mit 500 μl Partikelsuspension (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in isoHEPES) befüllt und 30 min lang bei RT inkubiert. Danach wurde die Partikelsuspension vorsichtig aus den Kanälen entfernt und zwei Mal mit 500 μl isoHEPES gewaschen. Die zellassoziierte Fluoreszenzintensität wurde anschließend bei Gain 109 mit dem oben beschriebenen Alublock bestimmt (Exzitation: 440nm, Emission: 485nm, bottom read; Infinite M200i, Tecan, Grödig, Österreich).

Interessanterweise konnte auf HUVEC-Zelllayern keine bevorzugte Bindung von positiv oder negativ geladenen Polystyrolpartikeln beobachtet werden (Abb. 54). Sowohl für PEI-modifizierte Partikel mit einem Durchmesser von 0,5 μm als auch für carboxylierte und PEI-modifizierte Teilchen mit 2 μm Durchmesser wurden annähernd gleiche zellassoziierte Fluoreszenzintensitäten detektiert. Lediglich nichtmodifizierte Polystyrolpartikel mit einem Durchmesser von 0,5 μm zeichneten sich durch vergleichsweise niedrige Bindungswerte aus. Inwiefern dies tatsächlich auf die Oberflächenladung der Teilchen zurückzuführen ist, muss in zukünftigen Experimenten näher untersucht werden. Es erscheint auch möglich, dass die geringe Partikelbindung auf unzureichender Konfluenz des HUVEC-Zelllayers im Messbereich beruhen könnte. Auch die zum Teil doch beträchtliche Standardabweichung könnte in ungleichmäßig dichten Zellayern ihre Ursache haben. Darüber hinaus liegen die im Versuch detektierten Fluoreszenzintensitäten teilweise nur knapp über dem Negativkontrollwert von 7 und somit nur geringfügig über der Nachweisgrenze. Daher sollte bei weiterführenden Untersuchungen entweder die Inkubationszeit verlängert oder ein möglichst breiter Bereich von Mikropartikelkonzentrationen eingesetzt werden.

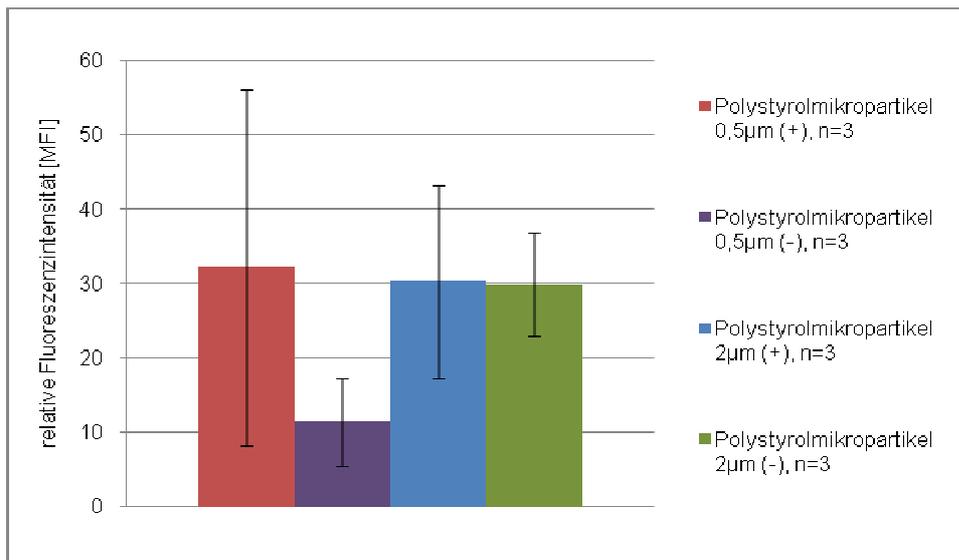


Abb.54: Bindung von carboxylierten bzw. PEI-modifizierten Polystyrolpartikeln mit 0,5 bzw. 2 µm Durchmesser an HUVEC-Zelllayer nach Inkubation für 30 min bei RT, jeder Mittelwert errechnet sich aus n=3 Einzelwerten.

4.8. Flussgeschwindigkeitsmessungen am SAW-Chip

Über die an den IDTs des SAW-Chips angelegte Eingangsleistung kann die Amplitude der erzeugten oberflächenakustischen Welle gesteuert werden. Für die RF-Signalgenerationskette gelten +16 dBm des Verstärkers und -3 dBm des Dämpfungsglieds als konstante Leistungsbeiträge. Die Ausgangsleistung des Hochfrequenzgenerators wurde im Bereich von 0 bis 15 dBm variiert. In der dBm-Skala ergibt sich folglich die Gesamtleistung am SAW-Chip additiv aus den Einzelleistungen der Signalgenerationskette. Für eine Ausgangsleistung des Hochfrequenzgenerators von 5dBm errechnet sich beispielsweise eine Eingangsleistung am Chip von 18 dBm (5 dBm – 3 dBm + 16 dBm). Diese Gesamtleistung kann über Gleichung (5) in die mW-Skala umgerechnet werden, wobei P_{ref} der Referenzleistung von 1 mW und x der jeweiligen Leistung in dBm entspricht.

$$P = P_{ref} 10^{\frac{x}{10}} \quad (5)$$

Für eine reproduzierbare Erzeugung von Strömungsgeschwindigkeiten mit dem SAW-Chip muss die exakte Positionierung des PDMS-Kanals über den IDTs beachtet werden. Ferner sollten die Geschwindigkeitsmessungen außerhalb des Einkopplungsbereichs der SAW durchgeführt werden.

Über manuelle particle image velocimetry konnten die Strömungsgeschwindigkeiten innerhalb eines breiten Bereiches von Eingangsleistungen am SAW-Chip ermittelt werden. Die Flussgeschwindigkeitsbestimmungen bei unterschiedlichen Objektivvergrößerungen lieferten dabei beinahe identische Ergebnisse. Dies unterstreicht die Verlässlichkeit der Methode (Abb. 55 und 56). Im Arbeitsbereich des Hochfrequenzgenerators konnten mit der verwendeten Anregungskette Flussgeschwindigkeiten im Bereich von 0 bis ~2000 $\mu\text{m/s}$ erzeugt werden. Je höher der Leistungseintrag aus der Hochfrequenzquelle, desto höher war die resultierende Strömungsgeschwindigkeit im PDMS-Kanal (Abb. 55 und 56). Im Bereich bis 200 mW ist dieser Zusammenhang linear. Am Leistungsmaximum des Hochfrequenzgenerators (+15 dBm) nimmt die Flussgeschwindigkeit bei Erhöhung der Eingangsleistung jedoch nur mehr geringfügig zu.

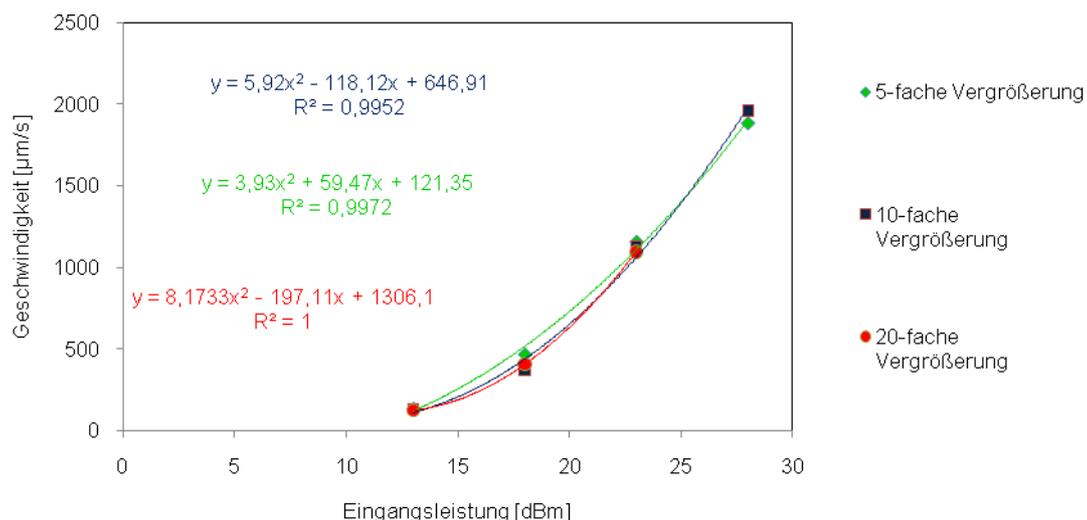


Abb.55: Flussgeschwindigkeit im PDMS-Kanal in Abhängigkeit von der Eingangsleistung am SAW-Chip in dBm. Manuelle Messungen bei unterschiedlichen Objektivvergrößerungen.

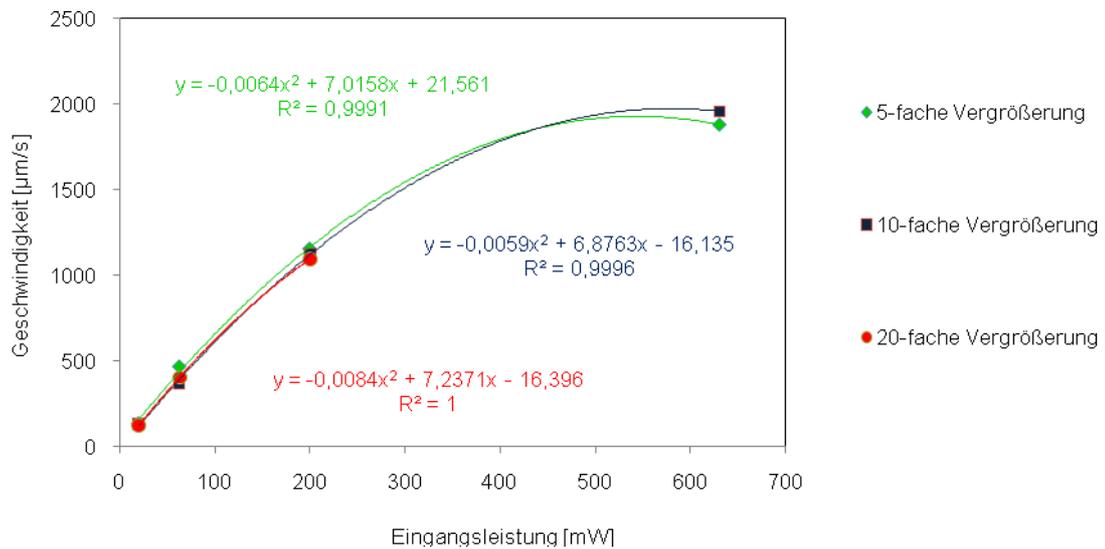


Abb.56: Flussgeschwindigkeit im PDMS-Kanal in Abhängigkeit von der Eingangsleistung am SAW-Chip in mW. Manuelle Messungen bei unterschiedlichen Objektivvergrößerungen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurden grundlegende Untersuchungen zur Realisierung eines Blutgefäßmodells durchgeführt, das aus einem Layer humaner Umbilikalvenenendothelzellen in einer 3D-Mikrokanalstruktur besteht. Über einen SAW-Chip soll in diesem Modell ein kontrolliertes Flussfeld erzeugt werden. Für die Charakterisierung des Flusssystems wurden die Strömungsgeschwindigkeiten in den blutgefäßähnlichen 3D-Mikrokanälen analysiert und nachgewiesen, dass mit dem SAW-Chip verlässlich kontrollierte Flüsse erzeugt werden können.

Um eine geeignete Wachstumsoberfläche für HUVECs in den verwendeten PDMS-Kanälen zu schaffen, wurde die Glasoberfläche durch Beschichtung mit unterschiedlichen Zelladhäsionsfaktoren modifiziert. Dabei erwies sich eine Lösung von Fibronectin in PBS (100 µg/ml) als die am besten geeignete Beschichtungsvariante. Anhand von Kompatibilitätsstudien konnte außerdem

nachgewiesen werden, dass sowohl isoHEPES als auch PBS+Ca²⁺/Mg²⁺ geeignete Puffersysteme für Experimente an HUVECs darstellen.

Um den Einfluss der Oberflächenladung von Mikropartikeln auf die Interaktion mit dem artifiziellen Endothel untersuchen zu können, wurden fluoreszenzmarkierte carboxylierte Polystyrolpartikel mit Poly(ethylenimin) behandelt. Durch Modifikation der Oberfläche infolge Adsorption von PEI konnte dabei eine Umkehrung des Zetapotentials der Teilchen erreicht werden. Für die fluorimetrische Quantifizierung der Polystyrolpartikel in Suspension und nach Bindung an Oberflächen wurden Eichgeraden in unterschiedlichen Puffersystemen erstellt. Unabhängig vom eingesetzten Puffer lag die Nachweisgrenze bei 0,02 µg/ml. Der Einfluss der Sedimentation auf das erhaltene Fluoreszenzsignal konnte jedoch nicht schlüssig geklärt werden.

Untersuchungen zur Interaktion zwischen PEI-modifizierten Partikeln und unterschiedlich geladenen Glasoberflächen ergaben, dass das Ausmaß der Bindungswahrscheinlichkeit reduziert ist, wenn Glas mit PEI beschichtet wird. Dies scheint auf elektrostatischer Repulsion zwischen der positiv geladenen Glasoberfläche und den positiv geladenen Mikropartikeln zu beruhen. Darüber hinaus wurde auch der Einfluss der Oberflächenladung auf die Partikelbindung an Endothelzellen charakterisiert. Vermutungen, dass ein HUVEC-Zelllayer, der eine negativ geladene Oberfläche darstellen sollte, bevorzugt positiv geladene Partikel bindet, konnten dabei nicht bestätigt werden. Die Bindung von positiv und negativ geladenen Partikeln an HUVECs war annähernd gleich groß. Ob und in welchem Ausmaß die Oberflächenladung der Partikel hier also tatsächlich eine Rolle spielt, muss in zukünftigen Experimenten noch näher untersucht werden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass durch die Arbeiten der vorliegenden Diplomarbeit wichtige Grundlagen für Partikelinteraktionsstudien mit humanen Endothelzellen in blutgefäßähnlichen Mikrokanälen geschaffen werden konnten. Detaillierte Untersuchungen zur Interaktion von positiv und negativ geladenen Teilchen mit Endothelzellen sowie zum Effekt von Fluss auf diese Interaktion müssen jedoch nachfolgenden Arbeiten vorbehalten bleiben.

6. Literaturverzeichnis

- [1] S. Dissauer. An acoustically-driven biochip – impact of flow on the cell-association of targeted drug carriers. Diplomarbeit, Universität Wien, 2009.
- [2] C. Cozens-Roberts, J.A. Quinn, and D.A. Lauffenburger. Receptor-mediated cell attachment and detachment kinetics. ii. Experimental model studies with the radial-flow detachment assay. *Biophysical Journal*, 1990, 58, 857–872.
- [3] V.R. Shinde Patil, C.J. Campbell, Y.H. Yun, S.M. Slack, and D.J. Goetz. Particle diameter influences adhesion under flow. *Biophysical Journal*, 2001, 80, 1733–1743.
- [4] www.qinstruments.com/content/dokumente/iprda_s1.pdf
- [5] M.F. Schneider, Z. Guttenberg, S.W. Schneider, K. Sritharan, V.M. Myles, U. Pamukci, A. Wixforth. An acoustically driven microliter flow chamber on a chip (μ FCC) for cell-cell and cell-surface interaction studies. *ChemPhysChem*, 2008, 9, 641-645.
- [6] T. Karow, R. Lang-Roth. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 18. Auflage, 2010, Dr.med.Thomas Karow, Köln, Deutschland.
- [7] G.J. Tortora and B. Derrickson. *Principles of anatomy and physiology*. 11th Edition, 2006, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, USA.
- [8] U. Welsch. *Lehrbuch Histologie*. 2. Ausgabe, 2006, Elsevier, München, Deutschland.
- [9] R.K. Jain. Delivery of molecular medicine to solid tumors: lessons from in vivo imaging of gene expression and function. *Journal of Controlled Release*, 74:7–25, 2001.
- [10] S. Silbernagl, F. Lang. *Taschenatlas der Pathophysiologie*. 2. Ausgabe, 2005, Thieme, Stuttgart, Deutschland.

- [11] A. Wixforth, J. Scriba. Nanopumpen für das Chiplabor. GIT Labor-Fachzeitschrift 2002, 5.
- [12] <http://de.wikipedia.org/wiki/Interdigitaltransducer>
- [13] B.J. Kirby, E.F. Hasselbrink Jr., Zeta potential of microfluidic substrates. *Electrophoresis*, 2004, 25, 187–202.
- [14] R. Voigt, *Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie*, 2006, 10.Auflage, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- [15] J. Gospodarowicz : Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J Biol Chem* 1975, 250:2515-2520.
- [16] S.C. Thornton, S.N. Mueller, E.M. Levine, Human endothelial cells: Use of heparin in cloning and long-term serial cultivation. *Science*, 1983, 222, 623-625.
- [17] B. Komorová, Immobilisierung und zellbiologische Charakterisierung von Biomolekülen an Glasobjektträgern, Diplomarbeit, Universität Wien, 2006.
- [18] B. Casemo, J. Lausmaa, Biomaterial and implant surfaces: On the role of cleanliness, contamination, and preparation procedures. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1988, 22, 145-158.
- [19] K.Shirai, Y. Yoshida, Y. Nakayama, M. Fujitami, H. Shintani, K. Wakasa, M.Okazaki, J. Snauwaert, B. van Meerbeek, Assessment of decontamination methods as pretreatment of silanization of composite glass fillers. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, 53, 204-210.
- [20] J.J. Cras, C.A. Rowe-Taitt, D.A. Nivens, F.S. Ligler, Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization. *Biosensors and Bioelectronics*, 1999, 14, 683-688.
- [21] <http://de.wikipedia.org/wiki/Polydimethylsiloxan>
- [22] C. Wischke. Oberflächenmodifizierte proteinbeladene Mikropartikel für das Targeting dendritischer Zellen. Dissertation, Universität Berlin, 2006.

- [23] http://www.polysciences.com/Catalog/Department/81/categoryId__340/
- [24] T. Trimaille, C. Pichot, T. Delair, Surface functionalization of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles with poly(ethylenimine) and plasmid DNA by the layer-by-layer approach. *Colloids and Surfaces A*, 2003, 221, 39-48.
- [25] J.N. Mehrishi, J. Bauer. Electrophoresis of cells and the biological relevance of surface charge. *Electrophoresis*, 2002, 23, 1984–1994.

7. Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Manuela Prantl
Geburtsdatum/-ort: 03. 03.1986, Wien
Staatsangehörigkeit: Österreich
Familienstand: ledig



Familie:

Eltern: Ingrid und Gerhard Prantl
Geschwister: Christine Zelinka

Akademische Ausbildung:

2004-dato: Universität Wien - Diplomstudium der Pharmazie
Sommersemester 2009: Diplomarbeit am Department Pharmazeutischer Technologie und Biopharmazie Wien

Berufliche Tätigkeiten:

Seit 09/2007: Internationale Apotheke Wien 1
03/2009-06/2010: Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie Wien
– Tutorin der Lehrveranstaltung Industrielle Arzneimittelherstellung

2009: Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
Wien

– Tutorin der Lehrveranstaltung

Anwendung von Zellkulturen in der Pharmazeutischen Technologie

10/2008-01/2009: Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
Wien

– Tutorin der Lehrveranstaltung Grundpraktikum aus
Pharmazeutischer

Technologie

07/2004 und 08/2005: Wienerberg Apotheke Wien 10

08/2004: Erste Bank Wien 1

08/2002: Bank Austria Wien 10

Schulbildung:

2004: Matura mit gutem Erfolg bestanden

1996–2004: Bundesrealgymnasium Pichelmayergasse (Wien 1100)

1992–1996: Volksschule Wendstattgasse (Wien 1100)