

**Fasermatrices aus synthetischen
und natürlichen Polymeren für
Tissue Engineering und
Wirkstofffreisetzung**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Markus Rudisile

aus Überlingen

Marburg/Lahn 2008

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. J.H. WENDORFF

Zweitgutachter: Prof. Dr. A. GREINER

Tag der mündlichen Prüfung am 09.07.2008

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Elektrosponnen	3
2.1.1 Grundprinzipien	5
2.1.2 Einflußparameter	7
2.1.2.1 Parameter der Polymerlösung	8
2.1.2.2 Geräteparameter und Umgebungsbedingungen	8
2.1.3 Fasermorphologien	9
2.1.4 Faserdeposition	11
2.1.4.1 Orientierte Fasern	11
2.1.4.2 Inhomogene Faservliese	12
2.1.4.3 Kontrollierte Einzelfaserdeposition	14
2.2 Gewebezüchtung (<i>Tissue Engineering</i>)	15
2.2.1 Definition und Einführung	15
2.2.2 Stamm- und Vorläuferzellen	17
2.2.3 Gewebeaufbau und -bildung	18
2.2.3.1 Aufbau und Bildung des Knochengewebes	18
2.2.3.2 Aufbau und Bildung des Skelettmuskelgewebes	21
2.2.4 Elektrosponnene Fasermatrixen im TE	22
2.3 Wirkstoffapplikation (<i>Drug Delivery</i>)	27
2.3.1 Einführung	27
2.3.2 Polymerbasierte Wirkstoffträgersysteme	27
2.3.3 Tumor- und Gentherapie	29
2.3.4 RNA-Interferenz und siRNA	29
3 Elektrosponnene, strukturierte und funktionalisierte Fasermatrixen für den Einsatz im Bone Tissue Engineering	31
3.1 Motivation und Zielsetzung	31
3.2 BMP-2 Freisetzung aus PLLA-Fasern	33
3.2.1 Poly- <i>l</i> -laktid-Matrixsystem	33
3.2.2 BMP-2	34
3.2.3 Konzeption einer mobilen Spinnapparatur	34
3.2.4 Inkorporation von BMP-2 in eine PLLA-Fasermatrix	36

3.2.5 Ergebnisse der Freisetzung von BMP-2 in der Zellkultur	38
3.3 Entwicklung einer Kollagenmatrix für die <i>in vitro</i> Zellkultivierung	41
3.3.1 Kollagen	41
3.3.2 Kollagenmatrixgenerierung	42
3.3.3 Verspinnen von Kollagen Typ I aus Kalbshaut	42
3.3.4 Wasserunlöslichkeit durch Quervernetzung der Kollagenfasern	46
3.3.5 Testung der Zellverträglichkeit der quervernetzten Kollagenmatrices	48
3.3.6 Kultivierung von hMSC auf Fasermatrices, der Vergleich von Kollagen und PLLA	50
3.4 MSC-Kultivierung mit einer dreidimensionalen Matrix	55
3.4.1 Generierung einer dreidimensionalen zellbesiedelten PLLA-Matrix	55
3.4.2 Generierung einer dreidimensionalen Kollagenmatrix	57
3.4.3 Bestimmung der Porengrößen der dreidimensionalen Matrices	58
3.4.4 Ergebnisse der mit MSC kultivierten dreidimensionalen Matrix	59
3.5 Entwicklung einer PLLA-Kollagen-Matrix	62
3.6 Zusammenfassung zu den <i>Bone Tissue Engineering</i> Projekten	65
4 Elektrogenesponnene strukturierte Fasermatrices für die Kultivierung von Myoblasten	66
4.1 Motivation und Zielsetzung	66
4.2 Systemauswahl und Testung der Kompatibilität mit Myoblasten	67
4.2.1 Ergebnisse der Kollagenmatrixbesiedelung mit primären Myoblasten	68
4.3 Generierung einer Kollagenmatrix aus orientierten Fasern	69
4.3.1 Auswahl des Orientierungsverfahrens	69
4.3.2 Spinnen der Kollagenfasern auf einen rotierenden Zylinder	70
4.3.3 SEM-Charakterisierung der Kollagenmatrices aus orientierten Fasern	71
4.3.4 Besiedelung der Kollagenmatrices aus orientierten Fasern mit primären Myoblasten	71
4.4 Systemauswahl für eine dreidimensionale Matrix mit Kollagenanteil	73
4.5 Entwicklung einer Matrix aus PCL-Kollagen-Blendfasern	75
4.5.1 Bestimmung des PCL-Kollagen-Blendverhältnisses	75
4.5.2 Abhängigkeit der Fasermorphologie und des -durchmessers von der Konzentration	77
4.5.3 Veränderung der Fasermorphologie und des -durchmessers durch Einwirkung von Wasser	81
4.5.4 Auswirkungen von quervernetzenden Verfahren auf die Fasermatrix und deren Zellkompatibilität	82

4.6 Entwicklung einer orientierten und/oder dreidimensionalen Blendmatrix	88
4.6.1 Generierung einer unorientierten, dreidimensionalen Blendmatrix	88
4.6.2 Generierung einer orientierten, dreidimensionalen Blendmatrix	88
4.6.3 Zelltestung der dreidimensionalen Blendmatrices	91
4.7 Zusammenfassung zur Muskelgewebezüchtung	92
5 Elektroverspinnene Polymerfasern als Trägersystem für PEI/siRNA-Komplexe	93
5.1 Motivation und Zielsetzung	93
5.2 PEI-komplexierte DNA Immobilisierung in Nanofasern	94
5.3 Immobilisierung PEI-komplexierter siRNA in Nanofasern	96
5.4 Zusammenfassung zu siRNA Trägersystemen	101
6 Zusammenfassung und Ausblick	102
7 Experimenteller Teil	105
7.1 Verwendete Chemikalien und Materialien	105
7.2 Präparation der <i>Tissue Engineering</i> -Matrices	106
7.2.1 Elektrosponnen der Faserproben auf Glasplättchen	106
7.2.2 Modifiziertes Elektrosponnen der Faserproben	106
7.2.3 Elektrosponnen der verschiedenen Polymere	106
7.2.4 Vernetzung der Polymerfasern auf Kollagenbasis	107
7.3 Präparation der DNA und siRNA modifizierten Fasern	108
7.3.1 Herstellung von PEO-Fasern mit PEI/DNA-Komplexen	109
7.3.2 Herstellung von PEO-Fasern mit PEI/siRNA-Komplexen	109
7.3.3 Herstellung von PVA-Fasern mit PEI/siRNA-Komplexen	109
7.3.4 PPX-Beschichtung durch Chemische Gasphasenabscheidung	110
7.4 Zellkulturen	110
7.4.1 Zellkulturen mit hMSC	110
7.4.2 Zellkulturen mit primären Myoblasten	111
7.4.3 Zelltransfektion der DNA und siRNA	112
7.4.4 Zellfixierung zur Elektronenmikroskopie	112
7.5 Verwendete Geräte	112
7.5.1 Optische Mikroskopie	112
7.5.2 Rasterelektronenmikroskopie (SEM)	112
7.5.3 Kontaktwinkelmessungen	113
7.5.4 Porometer	113

8 Literaturverzeichnis	114
9 Anhang	124
9.1 Abkürzungsverzeichnis	124
9.2 Veröffentlichungen, Tagungen, Messen und Auslandsaufenthalte	126
9.3 Eidesstattliche Erklärung	128
9.4 Danksagung	129

1 Einleitung

Strukturierte Mikro- und Nanosysteme spielen in vielen Gebieten der Medizin und Pharmazie eine immer größer werdende Rolle. Hier sind vor allem die Bereiche der Gewebezüchtung (*Tissue Engineering*) und der Wirkstoffträgersysteme (*Drug Delivery*) mit ihrem großen Zukunftspotential zu nennen. So bietet die Nanotechnologie die Möglichkeit, Objekte auf der Nanometerskala zu erzeugen, zu charakterisieren, zu manipulieren und zu organisieren, was mit neuen bzw. veränderten Eigenschaften dieser Objekte verbunden ist. Bei biologischen Systemen ist dies von besonderer Bedeutung, da beispielsweise Proteine, Bakterien und Viren die gleiche Größenordnung aufweisen.

Das *Tissue Engineering* stellt bei der Behandlung von zerstörten biologischen Strukturen eine vielversprechende Therapiemöglichkeit dar. Diese beinhaltet die Herstellung eines Gewebersatzes, um funktionale und strukturelle Defekte von Organen und Geweben zu behandeln. Herkömmliche Behandlungsansätze, wie z. B. die Transplantation, bergen Probleme wie Infektionen, Abstoßungsreaktionen oder einen Mangel an Spenderorganen. Eine besondere Variante der Gewebezucht besteht in der Verwendung von Trägermatrices, welche die Struktur und die Größe des zu ersetzenden Gewebes vorgeben. Durch Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Stamm- oder Vorläuferzellen sind unterschiedliche Zelllinien bzw. Gewebeklassen zugänglich. Das Anforderungsprofil für Trägermatrices umfasst beispielsweise Bioverträglichkeit, Porosität, Wirkstofffreisetzung und auch mechanische Eigenschaften. Die natürliche Umgebung von Zellen, die so genannte extrazelluläre Matrix (EZM), sollte ein vielversprechendes Vorbild darstellen. Zu einem großen Anteil besteht sie aus hierarchisch aufgebauten, fibrillären Strukturen, die eine zellunterstützende Rolle übernehmen. Diese Funktion beinhaltet nicht nur die Integrität, sondern vielmehr eine wechselseitige Regulation über Moleküle, wie z. B. Hormone und Wachstumsfaktoren. Eine Imitation der extrazellulären Matrix stellt eine aussichtsreiche Herangehensweise dar, effiziente Trägermatrices zu erzeugen. Eine Methode, die sich in den letzten Jahren zur Herstellung von fibrillären Strukturen durchgesetzt hat, ist das Elektrospleinverfahren. So kann eine Vielzahl bioverträglicher, sowie bioabbaubarer Polymere auf natürlicher und synthetischer Basis zu Mikro- und Nanofasern verarbeitet werden. Struktur- und Oberflächenmodifikationen sind ebenso möglich, wie die Inkorporation und Freisetzung von Funktionsstoffen.

Genau dieser Punkt, die Einbringung und die kontrollierte Abgabe von Wirk- bzw. Funktionsstoffen an einem bestimmten Ort aus elektrogenesponnenen Fasern, ist nicht nur für

die Regenerativmedizin, sondern auch für therapeutische Anwendungen von enormem Interesse. Zu nennen sind hier beispielsweise die Tumor- und die Inhalationstherapie. Bei der Wirkstoffapplikation (*Drug Delivery*) soll der Funktionsstoff vor einem vorzeitigen Abbau geschützt und am Zielort über einen bestimmten Zeitraum freigesetzt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, Mikro- und Nanofasern mittels Elektrospinnen für medizinische Anwendungen (*Tissue Engineering* und *Drug Delivery*) herzustellen. Es handelte sich dabei um einen rein materialwissenschaftlichen Ansatz, gezielt eine Funktionalisierung (Funktionsstoffinkorporation) und/oder eine Strukturierung von Fasern und Fasermatten vorzunehmen, um das anwendungsbedingte Anforderungsprofil zu erfüllen.

Im Folgenden werden die theoretischen Grundlagen über die allgemeinen Themen Elektrospinnen, Gewebezüchtung und Wirkstoffapplikation beschrieben. Anschließend wird im Ergebnisteil in den Abschnitten drei, vier und fünf im Einzelnen auf die Hintergründe, die genaue Zielsetzung und die erreichten Forschungsergebnisse der Anwendungsgebiete *Tissue Engineering* und Wirkstofffreisetzung eingegangen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Elektrosponnen

Mit dem Verfahren des Elektrosponnens ist es möglich, sehr dünne, endlos lange Polymerfasern herzustellen. Üblicherweise liegt der Faserdurchmesser zwischen wenigen Nanometern und einigen Mikrometern [1]. Der kleinste bisher beobachtete Durchmesser liegt bei unter zwei Nanometern [2].

Bereits 1929 wurde das Elektrosponnverfahren von A. FORMHALS patentiert [3], geriet aber über einen längeren Zeitraum in Vergessenheit und nur wenige Veröffentlichungen sind aus dieser Übergangszeit bekannt [4-7]. Erst mit Einzug neuer Analysemethoden, wie der Erfindung des Rastertunnelmikroskops im Jahr 1981 durch G. BINNIG und H. ROHRER [8] oder des Rasterkraftmikroskops durch G. BINNIG und C.F. QUATE [9], wurde ein vertiefter Zugang zu mikro- und nanostrukturierten Systemen möglich. Folglich wurde, mit der aufkommenden Nanotechnologie, seit den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts der Technik des Elektrosponnens wieder vermehrt Aufmerksamkeit zuteil. Besonders hervorzuheben sind die Leistungen der Arbeitsgruppe um D.H. RENEKER.

Die ansteigende Anzahl an Veröffentlichungen in den letzten Jahren auf dem Gebiet des Elektrosponnens verdeutlicht eine rapide Entwicklung (Abb. 2.1).

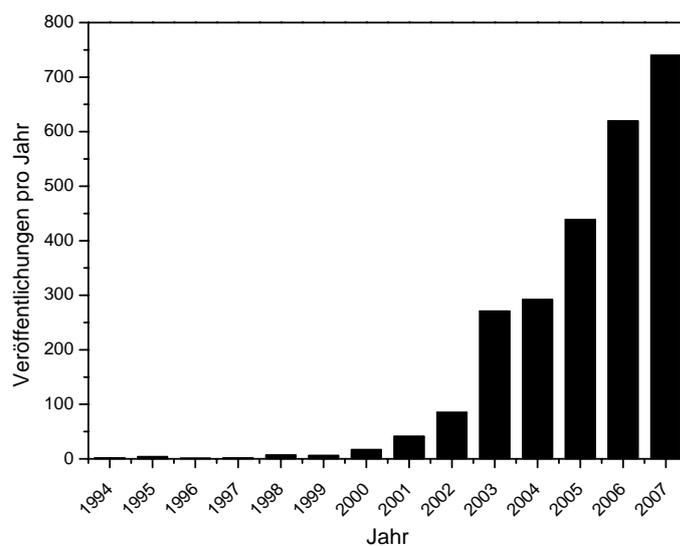


Abb 2.1 Anzahl der Veröffentlichungen pro Jahr, mit dem Suchbegriff „electrospinning“ gefunden (Suchmaschine: SciFinder Scholar, 31.12.2007)

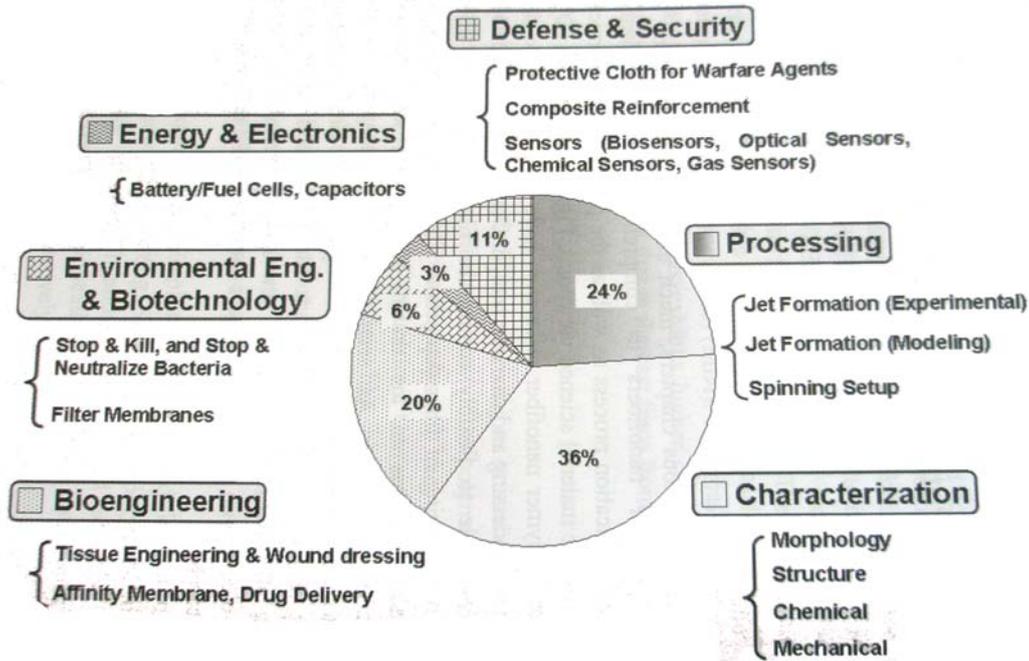


Abb 2.2 Aufteilung der Publikationen in Forschungsgebiete 2005 [10]

Eine Aufteilung der Publikationen in Forschungsgebiete aus dem Jahr 2005 ist in Abb. 2.2 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass neben Gebieten der Verarbeitung und Charakterisierung die anwendungsbezogene Forschung eine große Rolle spielt. So finden elektrogesponnene Fasern z. B. in der Filtration, der Katalyse, der Sensorik, der Materialverstärkung, der Textilindustrie und der Medizin, mit den teilweise schon in der Einleitung erwähnten Gebieten (*Tissue Engineering* und *Drug Delivery*), Verwendung [11-15]. Das größte Anwendungsgebiet dürfte die Filtration darstellen.

2.1.1 Grundprinzipien

Beim Elektrosponnen wird eine Polymerlösung oder Schmelze durch eine Kanüle oder Düse gedrückt, wobei sich am Ende ein Flüssigkeitstropfen ausbildet. Das Anlegen einer Hochspannung an diesen Tropfen führt zur Ausbildung eines Flüssigkeitsstrahls (oft auch als *Jet* bezeichnet), der zu einer Gegenelektrode, die sich gewöhnlicherweise in einem Abstand von ungefähr 15 cm befindet, hin beschleunigt wird. In Abbildung 2.3 ist ein typischer Elektrospinnaufbau schematisch dargestellt.

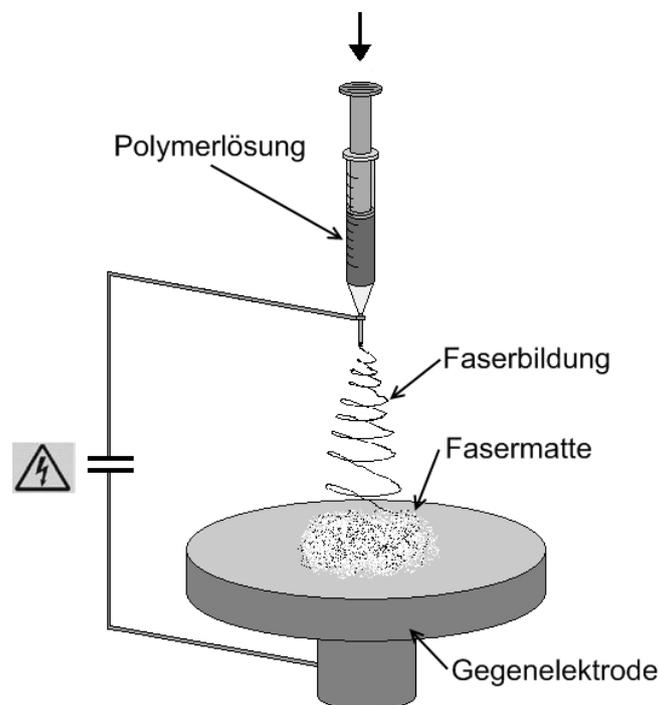


Abb. 2.3 Schematische Darstellung eines Elektrospinnaufbaus [16]

Genauer betrachtet, geschieht durch das angelegte elektrische Feld, das üblicherweise wenige kV/cm beträgt, eine Verformung des hängenden Tropfens durch Induzierung von Ladungsträgern, die der Oberflächenspannung entgegenwirken (siehe Abb.2.4). Der sogenannte Taylor-Konus bildet sich aus. Benannt wurde dieser Konus nach G. TAYLOR, der Wassertropfen und Polymerschmelzen in einem elektrischen Feld untersuchte [17].

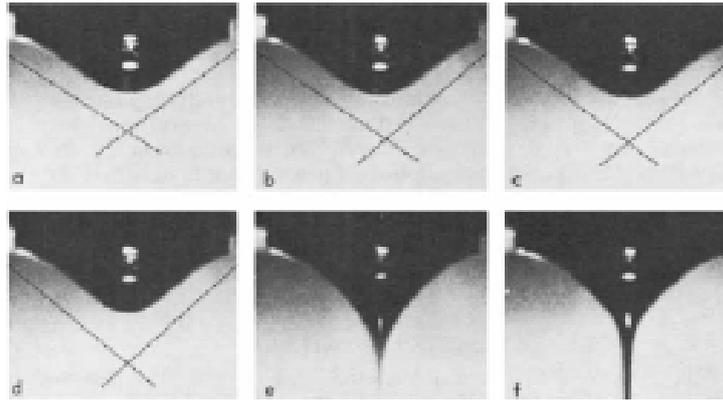


Abb. 2.4 Auswirkung eines stetig erhöhten elektrischen Feldes auf einen Polymertropfen mit Ausbildung des Taylor-Konus [5]

Bei weiterer Erhöhung der Spannung wird der Tropfen instabil und ein geladener Flüssigkeitsstrahl entsteht. Im Fall von niedermolekularen Substanzen führt dies zu einem Zerfall des *Jets* in kleine geladene Tröpfchen, bekannt als *Electrospraying*. Grund hierfür ist die Rayleigh-Instabilität, also die Tendenz zur Minimierung der Oberfläche. Für eine Polymerlösung ist dieser Effekt nicht dominant, da ein Zerfall durch das Verhaken der Polymerketten verhindert wird (*Entanglement*). Vielmehr nehmen elektrostatische Instabilitäten einen entscheidenden Einfluss auf den *Jet*. Zum einen liegt eine axisymmetrische Instabilität, hervorgerufen durch Schwankungen der Oberflächenladungsdichte entlang des Strahls, vor (Abb. 2.5 A, links). Dies kann zu einer Undulation des Durchmessers führen und das Abscheiden von Fasern mit Verdickungen bewirken, den so genannten *Beads*. Zum anderen tritt die *bending instability* auf (Abb. 2.5 A, rechts). Sie ist nicht axisymmetrisch und führt zu einem Verbiegen des Strahls. Die Auslenkung des *Jets* verstärkt sich und dieser beschreibt eine spiralförmige Flugbahn (Abb. 2.5 B). Dies führt zu einer Verstreckung und damit zu einer Ausdünnung des Strahls, wobei eine verstärkte Verdampfung des Lösungsmittels eintritt und sich solide, ultradünne Fasern auf dem Kollektor bzw. der Gegenelektrode abscheiden.

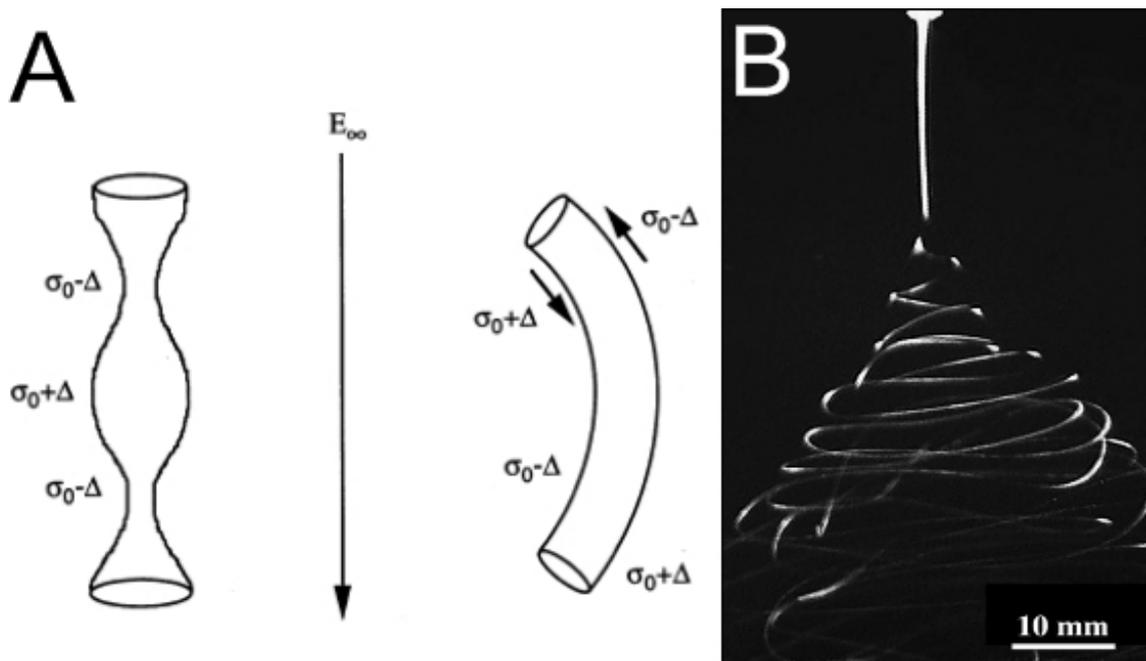


Abb. 2.5 (A) Axisymmetrische Instabilität (links) und *bending instability* (rechts) eines Flüssigkeitsjets in einem elektrischen Feld E_∞ (σ entspricht der Oberflächenladungsdichte und Δ deren Schwankung) [18], (B) Aufnahme eines Jets mit einsetzender *bending instability* [19]

Mittels Elektrosponnen lässt sich eine Vielzahl an natürlichen und synthetischen Polymeren aus Lösung oder Schmelze zu kontinuierlichen Mikro- und Nanofasern verarbeiten. Auch Mehrkomponentensysteme, wie beispielsweise durch Zugabe weiterer Polymere, niedermolekularer organischer und anorganischer Substanzen oder biologischer Objekte erhältlich, können benutzt werden. Diese Vielseitigkeit zeichnet diese konkurrenzlose Technik gegenüber Anderen aus [20].

2.1.2 Einflussparameter

Es gibt eine Reihe von Parametern, die das Elektrosponnverfahren und damit die Fasergenerierung bzw. die Fasermorphologie beeinflussen. Einen entscheidenden Einfluss haben die Eigenschaften der zu verspinnenden Polymerlösung. Hier sind beispielsweise die Viskosität, die Oberflächenspannung und die Leitfähigkeit zu nennen.

2.1.2.1 Parameter der Polymerlösung

Bei einer zu geringen Viskosität (hier fließen Molekulargewicht und Konzentration des Polymers ein) tritt kein *Entanglement* auf und eine Faserbildung findet nicht statt. Eine Erhöhung der Viskosität bewirkt, dass sich die Kettenmoleküle ausreichend verhaken können und die Faserbildung einsetzt. Diese Fasern weisen aber meist *Beads* auf. Dies kann durch eine weitere Erhöhung der Viskosität verhindert werden. Grund hierfür ist die Rayleigh-Instabilität, welche bei abnehmender Kettenbeweglichkeit eine immer kleiner werdende Rolle spielt [21]. Bei hoher Oberflächenspannung nimmt die Neigung zu *Beads* wieder zu, kann aber durch Zugabe von Additiven reguliert werden [22, 23]. Die Viskosität nimmt auch Einfluss auf den mittleren Faserdurchmesser. Eine dickflüssigere Lösung erzeugt größere Durchmesser und vice versa [24-26]. Grund hierfür ist wahrscheinlich die durch eine hohe Viskosität abnehmende Verstreckung des Strahls, welche durch die elektrostatische Abstoßung der Oberflächenladungen hervorgerufen wird. Die Leitfähigkeit der Lösung, welche durch Zugabe von Salzen erhöht werden kann, hat ebenfalls Auswirkung auf die Oberflächenladungsdichte und somit auf die Fasergenerierung. Tendenziell kann so die Anzahl der *Beads* reduziert, diese komplett beseitigt, oder der Faserdurchmesser verkleinert werden [27].

2.1.2.2 Geräteparameter und Umgebungsbedingungen

Weitere Einflussfaktoren sind gerätespezifisch (z. B. die angelegte Spannung, der Abstand zur Gegenelektrode oder die Flussrate) bzw. umgebungsbedingt (wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit) [10]. Auf diese wird im Folgenden nur verkürzt eingegangen, da sie meist eine untergeordnete Rolle spielen.

In den meisten Fällen lässt sich durch weitere Erhöhung der Spannung über den Schwellenwert der Jetinitiierung eine stärkere Verstreckung des Strahls erzielen und eine Verringerung des Faserdurchmessers erreichen [26]. Häufig geht dies aber auch mit einer Tendenz zu mehr Inhomogenität einher, d. h. eine vermehrte Bildung von Undulationen oder sogar einer generellen Durchmessererhöhung [25, 27, 28].

Der Abstand zur Gegenelektrode darf nicht zu gering gewählt sein, da sonst nur eine unzureichende Verstreckung des Jets auftritt oder das Lösungsmittel nicht komplett verdampft (Verschmelzen der Fasern).

Die Flussgeschwindigkeit und der Durchmesser der Kanüle können nur in einem geringen Maße auf den Faserdurchmesser Einfluss nehmen.

Die Umgebungsbedingungen, also die Temperatur und die Luftfeuchtigkeit, können die Verdampfung des Lösungsmittels verändern und damit ein stabiles Spinnen verhindern.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Fasereigenschaften (beispielsweise Faserdurchmesser oder Oberflächenporosität) hauptsächlich über die Lösungsparameter, wie z. B. die Polymerkonzentration, das Lösungsmittel, die Viskosität und die Leitfähigkeit, eingestellt werden.

2.1.3 Fasermorphologien

Es kann mit dem Elektrospleinverfahren, durch Auswahl geeigneter Parameter, eine Reihe von Fasermorphologien erzeugt werden. Dazu gehören die schon erwähnten *Beads* (Abb. 2.6 A und B), deren Form variieren kann. Des Weiteren sind beispielsweise noch Bandstrukturen und Verzweigungen bekannt (Abb. 2.6 C und D). Auf diese Strukturen soll nicht näher eingegangen werden, da sie für diese Arbeit nur eine untergeordnete Rolle spielen. Für vertiefte Informationen sei auf die Arbeiten von FONG et al. [22] und KOOMBHONGSE et al. [29] verwiesen.

Für verschiedene Anwendungen ist es interessant die Faseroberfläche zu strukturieren. So kann eine poröse Faser bzw. Faseroberfläche durch Phasenseparationsprozesse, einer Entmischung in Regionen höherer und niedrigerer Konzentrationen, erzeugt werden. Ein Beispiel, wo dies direkt während des Spinnvorgangs stattfindet und zu Poren führt, ist Poly-L-laktid (PLLA), versponnen aus Dichlormethan (Abb. 2.7 A) [30]. Auch das Verspinnen von Polymermischungen (*Blends*) und einer folgenden Entfernung einer Polymerphase kann zu porösen Strukturen führen (Abb. 2.7 B) [31, 32]. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Luftfeuchtigkeit zu nutzen, um eine Kondensation von Wassertropfen auf dem Jet herbeizuführen. Nach der Verdampfung des Wassers bleibt eine strukturierte Oberfläche zurück (Abb. 2.7 C und D), die so genannten *breath figures* [33].

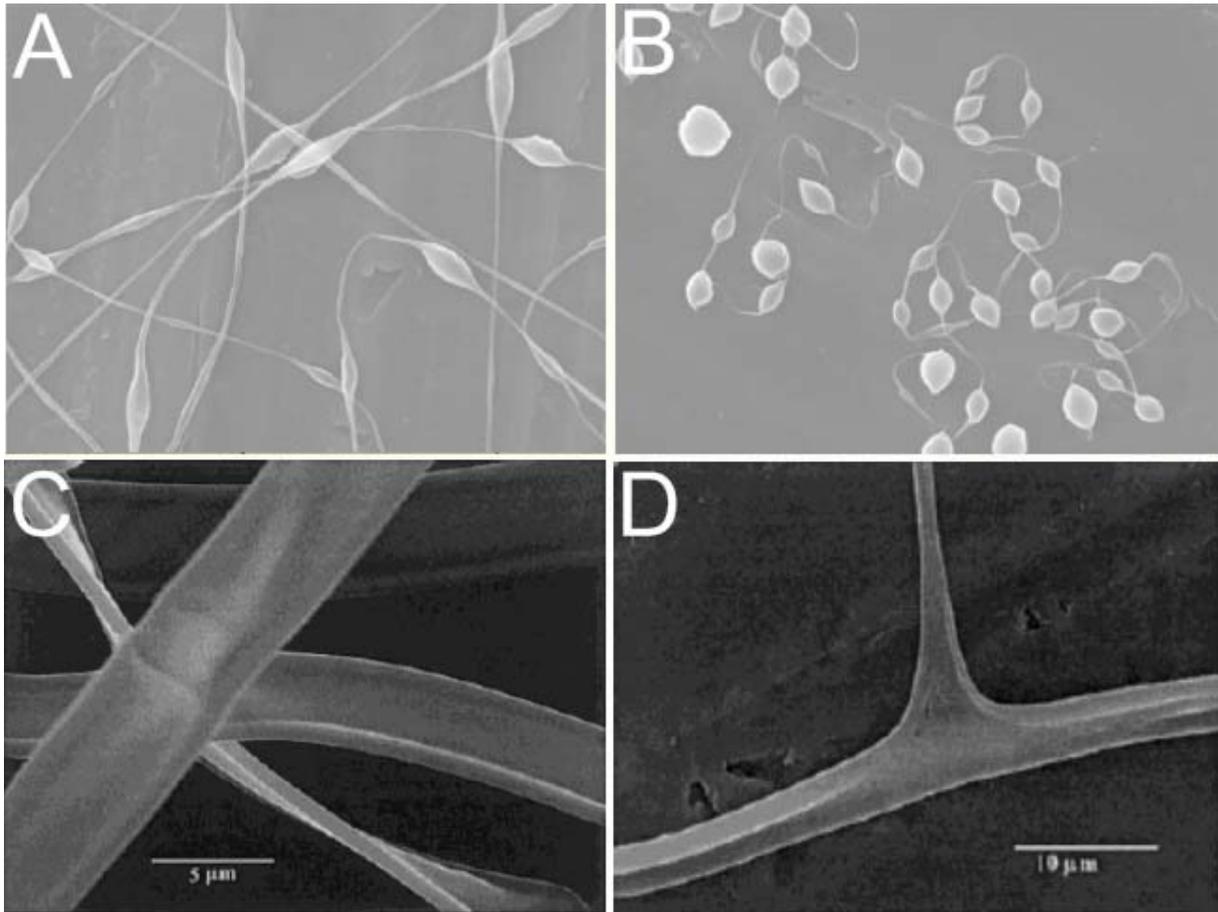


Abb 2.6 Fasern mit (A) spindelförmigen *Beads* [22], (B) kugelförmigen *Beads* [22], (C) Bandstruktur [29], (D) Verzweigung [29]

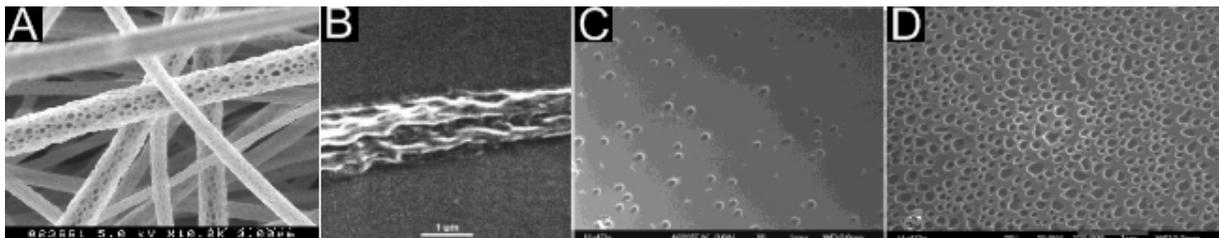


Abb 2.7 (A) Polylaktidfaser versponnen aus Dichlormethan mit Entmischungprozess während des Spinnvorgangs, (B) Polylaktidfaser nach selektivem Entfernen der Polyvinylpyrrolidonphase [32], (C) und (D) Polystyrolfaser versponnen aus THF bei einer rel. Luftfeuchtigkeit von 40-45 % bzw. 50-59 % unter Auftreten der *breath figures* [33]

2.1.4 Faserdeposition

Neben der gezielten Erzeugung verschiedener Fasermorphologien ist es für die Anwendung oft von entscheidender Bedeutung, die Faserdeposition, d. h. beispielsweise den Ort oder eine Vorzugsorientierung der Fasern, zu kontrollieren. Ohne eine Modifikation des Elektrospleinnvorgangs werden die Fasern unorientiert bzw. chaotisch auf einem Substrat abgeschieden. Durch Verwendung spezieller Gegenelektroden ist es möglich, eine strukturierte Faserplatte zu erhalten.

2.1.4.1 Orientierte Fasern

Es sind verschiedene Verfahren zur Faserorientierung bekannt.

Im Fall einer schnell rotierenden Walze lassen sich die Fasern mit einer guten Vorzugsorientierung aufwickeln. Die Geschwindigkeit der Kollektoroberfläche muss dabei so gewählt sein, dass sie im Bereich der Faserabscheidungsgeschwindigkeit liegt [34]. In Abb. 2.8 ist neben der schematischen Darstellung und dem apparativen Aufbau auch ein Beispiel einer mit dieser Methode erzeugten Faserplatte mit Vorzugsorientierung dargestellt.

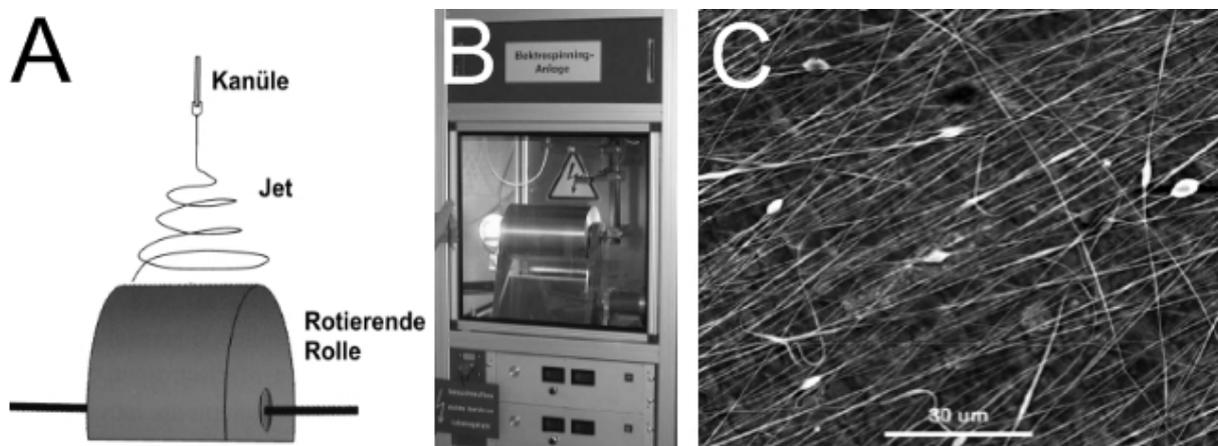


Abb 2.8 Parallele Orientierung der Fasern durch eine rotierende Rolle (A) schematische Darstellung [10], (B) apparativer Aufbau [35], (C) aufgewickelte PLLA-Matte [35]

Das Elektrospleinnen auf einen leitenden Metallrahmen lässt eine sehr hohe Orientierung der Fasern zu (Abb. 2.9) [36]. Dieser hohe Orientierungsgrad ist aber auf einige wenige Faserlagen begrenzt und die darüberliegenden Fasern scheiden sich chaotisch ohne Vorzugsorientierung ab.

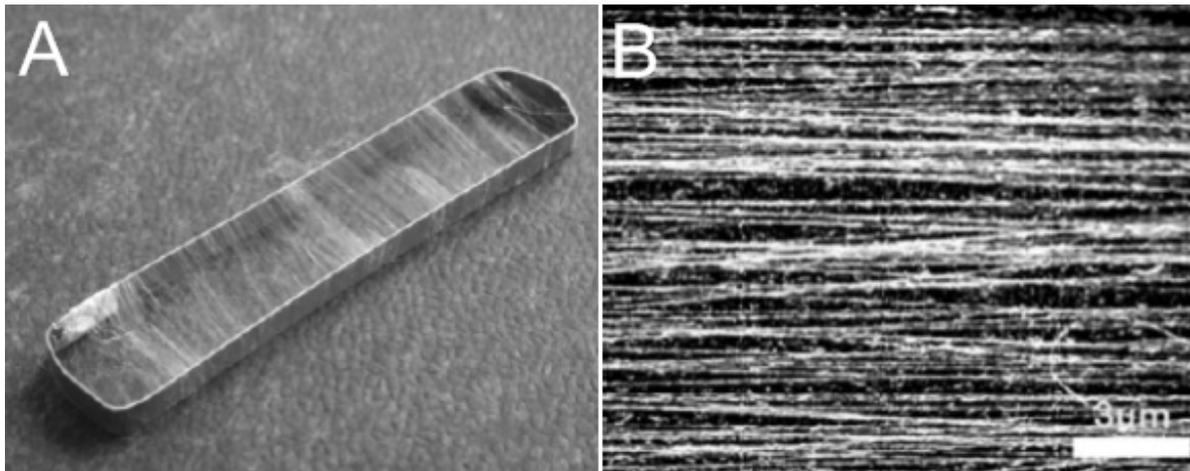


Abb 2.9 Parallele Orientierung der Fasern durch Spinnen auf einen Metallrahmen [36], (A) Metallrahmen mit orientiert abgeschiedenen Fasern, (B) Darstellung der parallelen Fasern

2.1.4.2 Inhomogene Faservliese

Bei Einsatz eines perforierten Metallbleches als Gegenelektrode wird eine Matte erzeugt, die Bereiche mit höherer und weniger hoher Faserdichte aufweist (Abb. 2.10) [35]. Dies hat auch Einfluss auf die Porengröße des Vlieses an der jeweiligen Stelle.

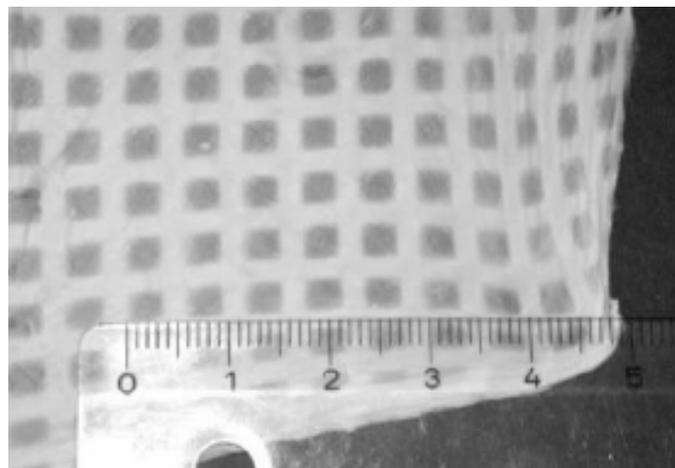


Abb 2.10 Strukturiertes Poly(lactide)faservlies

Durch die Verwendung von Mehrkanülenanordnungen sind neben strukturellen, auch chemisch inhomogene Fasermatten zugänglich.

Der schematische Aufbau dieser Elekterspinnanordnung ist in Abb. 2.11 dargestellt.

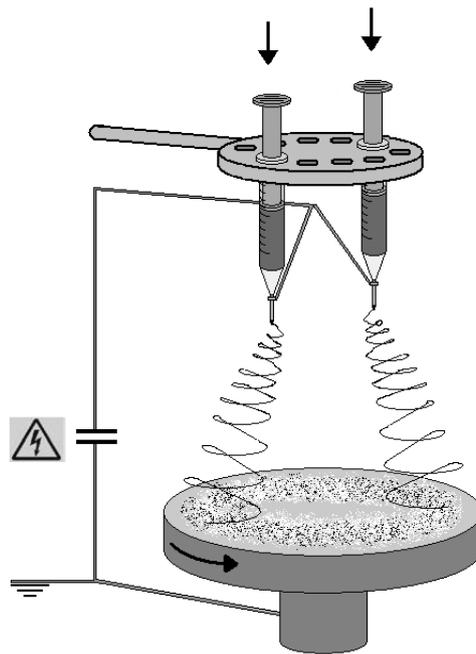


Abb. 2.11 Aufbau zum parallelen Elekterspinnen [37]

Die Porengröße eines Vlieses lässt sich z. B. durch das gleichzeitige Verspinnen von dicken und dünnen Fasern in einem weiten Bereich beeinflussen. Eine entsprechende Fasermatte ist in Abb. 2.12 dargestellt. Dies ist realisierbar, wenn eine Lösung hoher und eine niedrigerer Polymerkonzentration mit dem abgebildeten Aufbau gleichzeitig elektrospunnen werden.

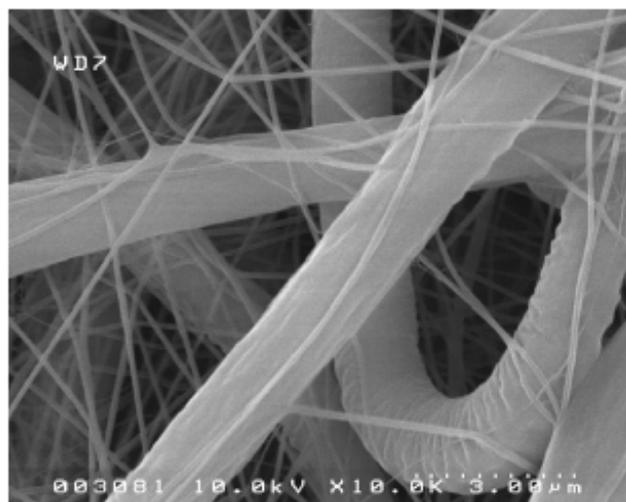


Abb. 2.12 Strukturell inhomogenes Polyamidfaservlies [37]

Es ist auch möglich, chemische Inhomogenität mittels Verarbeitung verschiedener Polymerlösungen zu erzeugen. Abb. 2.13 zeigt eine Fasermatte aus Polylactid- und Polyamidfasern.

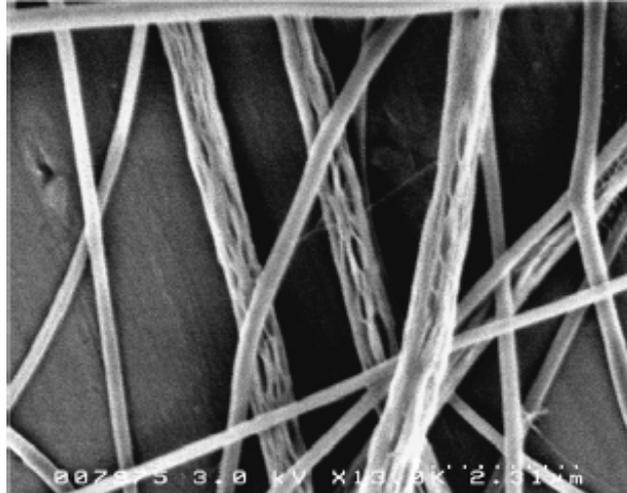


Abb. 2.13 Vlies aus Polyamid- (glatt) und Polylaktidfasern (porös) [37]

2.1.4.3 Kontrollierte Einzelfaserdeposition

Für spezielle Anwendungen kann es von Interesse sein, dass die Fasern kontrolliert an einem bestimmten Ort deponiert werden und so beispielsweise die Möglichkeit besteht, vorgegebene Muster darzustellen. Durch einen Elektrospinnaufbau mit geringem Abstand von Polymertropfen und Substrat ($>500\ \mu\text{m}$) konnte erstmals 2006 die prinzipielle Machbarkeit einer kontrollierten Faserdeposition nachgewiesen werden [38]. Im Folgenden wurde die Technik des Hochpräzisions-Elektrospinnens weiterentwickelt und bei einem Düse-Substrat-Abstand von wenigen Millimetern ist es nun möglich, kontinuierlich Fasern mit einem Durchmesser von wenigen 100 nm mit einer Genauigkeit im Bereich von Mikrometern gezielt abzulegen [39].

Eine ausführliche Zusammenfassung zu Spinnmodifikationen ist in einem Review-Artikel von W.E. TEO und S. RAMAKRISHNA veröffentlicht worden [14].

2.2 Gewebezüchtung (*Tissue Engineering*)

2.2.1 Definition und Einführung

Tissue Engineering (TE) ist ein interdisziplinäres Wissenschaftsgebiet aus Medizin, Material- und Naturwissenschaften und befasst sich mit der Wiederherstellung von erkrankten oder zerstörten Geweben bzw. Organen [40]. Ursprünglich geprägt wurde der Ausdruck 1987 von Y.C. FUNG im Zuge eines Treffens der NATIONAL SCIENCE FOUNDATION (NSF). Während eines Workshops der NSF mit dem Titel „*Tissue Engineering*“ im folgenden Jahr wurde zwar eine erste Definition des Begriffs gegeben, jedoch hatte sie noch wenig mit dem zu tun, was man heute unter *Tissue Engineering* versteht. So bezog man sich ausschließlich darauf, lebendes Gewebe zu manipulieren und es möglicherweise mit prothetischen Materialien zu kombinieren. Jedoch die Züchtung neuer Gewebe allein, oder in Verbindung mit passendem Gerüstmaterial (*Scaffold*) war nicht im Fokus der Tagung [41]. Eine moderne Definition gaben die Brüder C.A. und J.P. VACANTI erstmals im Jahr 1991 mit dem veröffentlichten Artikel „Functional Organ Replacement: The New Technology of Tissue Engineering“ in „Surgical Technology International“ [42]. R. LANGER und J.P. VACANTI schrieben sinngemäß: „Das Ziel von Tissue Engineering ist, die Beschränkungen der konventionellen Behandlung, also der Implantierung von Fremdorganen oder von Biomaterialien, hinter sich zu lassen und aus den entsprechenden Zellen das benötigte dreidimensionale Organ oder Gewebe *in vitro* zu kultivieren“ [40].

Eine weitere Definition von LAURENCIN et al. verdeutlicht, dass heute mehrere Vorgehensweisen verfolgt werden (sinngemäß übersetzt): „Tissue Engineering ist die Anwendung biologischer, chemischer und technischer Grundsätze und Methoden zur Reparatur oder Regeneration von lebendem Gewebe durch den Einsatz von Biomaterialien, Zellen und Faktoren, alleine oder in Kombination“ [43]. Folglich sind momentan mehrere unterschiedliche Ansätze bekannt [44]:

- *Guided Tissue Regeneration*: Die Implantation einer Matrix aus Biomaterial, welche die Form des späteren Surrogats vorgibt, reift durch die Besiedelung mit autologen Zellen *in vivo* zu einem funktionsfähigen Ersatz.
- *Cell Transplantation*: Ein selektiver Zelltransfer wird mittels systemischer oder lokalisierter Injektion von autologen, allogenen, xenogenen oder manipulierten

- (*gene therapy*) Zellpräparationen durchgeführt und bewirkt eine erhöhte Konzentration des gewünschten Zelltyps um eine Geweberegeneration zu fördern.
- *Tissue Engineering* (im klassischen Sinne): Durch die Besiedelung einer (funktionalisierten) Matrix mit Zellen wird ein Ersatzgewebe oder sogar ein ganzes Organ *in vitro* generiert.

Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit den auf Matrices (*Scaffolds*) basierenden Ansätzen. Ein schematischer Ablauf ist in Abb. 2.14 dargestellt. So werden auf einem biokompatiblen *Scaffold* Zellen angesiedelt und vermehrt, gegebenenfalls auch differenziert, um eine vorkultivierte Matrix oder ein schon ausgebildetes Gewebe zu erhalten und in einem folgenden Schritt zu Implantieren.

Heute ist das *Tissue Engineering* aus seinen Kinderschuhen entwachsen und der Machbarkeitsbeweis (*Proof of Concept*) ist erbracht. So ist der Bereich des Hautersatzes schon so weit fortgeschritten, dass eine klinische Anwendung stattfindet [45]. Es werden aber auch Versuche unternommen, nahezu jegliches menschliche Organ oder Gewebe wiederherzustellen [40, 46, 47].

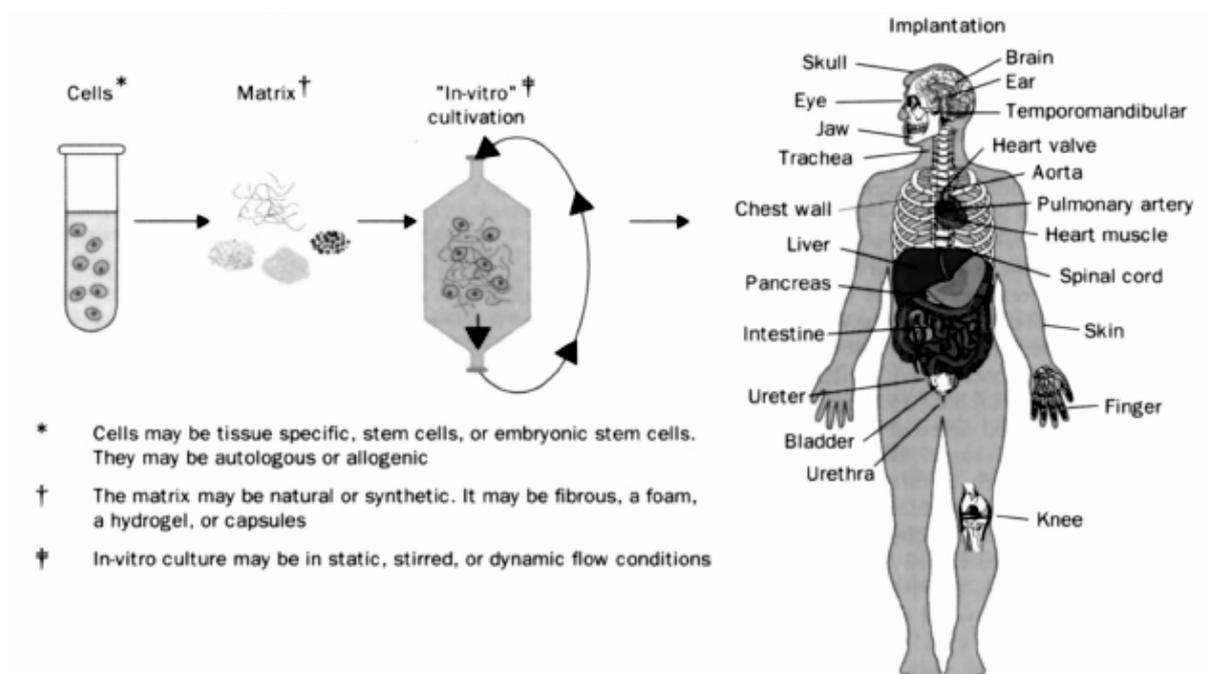


Abb 2.14 Schematische Darstellung des *Tissue Engineerings* [48]

Im Zuge dieser Arbeit wurden biokompatible, strukturierte und/oder funktionalisierte, d.h. mit Funktionsstoffen wie beispielsweise Wachstumsfaktoren versehene, Matrices aus Nano- und Mikrofasern generiert. Die zugrundeliegende Absicht ist das Proliferations- und das Differenzierungsverhalten von Zellen *in vitro* zu untersuchen bzw. besser zu verstehen und die Entwicklung hin zu Geweben, die ihrem natürlichen Pendant möglichst nahekommen, zu fördern. Es wurden projektabhängig mesenchymale Stammzellen und primäre Myoblasten zur Besiedelung eingesetzt, wobei das Zielgewebe zum einen Knochen- und zum anderen Skelettmuskelgewebe darstellte. Im dritten und vierten Abschnitt werden die *Tissue Engineering*-Projekte im Einzelnen vorgestellt.

2.2.2 Stamm- und Vorläuferzellen

Mesenchymale Stammzellen

Die mesenchymalen Stammzellen (MSC) wurden vor über 30 Jahren von FRIEDENSTEIN et al. erstmals beschrieben [49, 50] und es stellte sich über die Jahre heraus, dass sie für die *in vitro* Proliferation und Differenzierung großes Potential aufweisen. Stammzellen im Allgemeinen besitzen die Anlage zur Selbsterneuerung und zur geregelten Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen [51]. *In vitro* sind diese Kriterien von den nicht-hämatopoetischen, mesenchymalen Stammzellen erfüllt [52, 53], ein endgültiger *in vivo* Beweis bleibt aber noch aus [54]. Aus diesem Grund wird auch häufig von *Bone Marrow Stromal Cells* (BMSC) gesprochen. PITTENGER et al. veröffentlichten 1999 ein zusammenfassendes Konzept über das multilineare Differenzierungspotential von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark, dazu gehören unter anderem Knochenzellen [55].

Primäre Myoblasten

Primäre Myoblasten sind einkernige Vorläuferzellen (*Progenitor Cells*) und können *in vitro* kultiviert bzw. expandiert werden. Vorläuferzellen besitzen im Gegensatz zu Stammzellen nicht die Fähigkeit zur Selbsterneuerung [56]. Durch Differenzierung ist eine Umwandlung zu funktionalen, adulten Skelettmuskelzellen, so genannten Myotuben, möglich. Während dieses Prozesses verschmelzen die Myoblasten zu vielkernigen Muskelfasern, was durch verschiedene Reize (mechanisch, elektrisch oder chemisch) verursacht werden kann [57].

Die Fähigkeit zur vielfachen Expansion und der gezielten Differenzierung der Stamm- und Vorläuferzellen ist für den Einsatz in der regenerativen Medizin von hohem Interesse.

2.2.3 Gewebeaufbau und -bildung

2.2.3.1 Aufbau und Bildung des Knochengewebes

Das Knochengewebe zeichnet sich durch seine hohe Belastungsfähigkeit aus und übernimmt stützende und schützende Funktionen des Körpers. Grund hierfür ist eine Eigenschaftskombination aus Härte, geringem Gewicht und einer gewissen Elastizität. Des Weiteren dient der Knochen als Kalziumspeicher und das Knochenmark zur Blutbildung.

Neben den Knochenzellen (ca. 2% der Knochenmasse) stellt die extrazelluläre Matrix (EZM) den größten Anteil dar. Die chemische Zusammensetzung des Knochengewebes besteht aus bis zu 70% anorganischer Matrix und zu ca. 22% aus organischer Matrix, wobei Wasser den Restanteil darstellt.

Bei Lamellenknochen gibt es zwei Arten von Knochensubstanzen. Zum einen die *Substantia compacta* ein kompakter Knochen, der den äußeren Bereich darstellt und hauptsächlich für die mechanischen Funktionen verantwortlich ist. Im Inneren des Knochens liegt die schwammartige *Substantia spongiosa* in Form von dünnen Knochenbälkchen und erfüllt überwiegend metabolische Aufgaben.

Es gibt vier verschiedene Knochenzelltypen: Osteoblasten, Osteozyten, *bone lining cells* und Osteoklasten [58]. Die Osteoklasten sind mehrkernige Zellen die dem Knochenabbau dienen und aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet werden. Knochenvorläuferzellen (*osteoprogenitor cells*) werden aus mesenchymalen Stammzellen gebildet und haben eine ausgeprägte Neigung zur Proliferation. Lokalisiert sind sie an der inneren und äußeren Knochenoberfläche. Als relativ undifferenzierte Zellen weisen sie eine spindelförmige Gestalt auf und sind während des Knochenwachstums aktiv.

Osteoblasten entstehen aus den Knochenvorläuferzellen und sind für die Bildung der organischen Knochengrundsubstanz (Matrix) verantwortlich. Sie ist noch nicht verkalkt und wird auch Osteoid genannt. Die Matrix besteht hauptsächlich aus Kollagen, Proteoglykanen und Glykoproteinen. Osteoblasten sind in der Synthesephase etwa 20 µm groß und haben eine kubische Form. Durch das Abscheiden des Enzyms alkalische Phosphatase, dessen

Bestimmung im Serum zur Abschätzung der Osteoblastentätigkeit dienen kann, wird wahrscheinlich das Osteoid auf diese Mineralisierung vorbereitet.

Osteozyten gehen aus den Osteoblasten hervor und sind von mineralisierter extrazellulärer Matrix umgeben. Sie bilden Zellfortsätze, die dem Stofftransport und der Kommunikation dienen und sind dadurch mit anderen Osteozyten und mit Blutgefäßen verbunden. Hauptsächliche Funktion dieser Zellen ist es, den Knochen und die umgebende Matrix zu erhalten.

Bone lining cells sind inaktive Zellen, die weder Knochensubstanz auf- noch abbauen. Sie sind von flacher, gestreckter Gestalt und bedecken die Knochenoberfläche. Ihre Funktion ist noch nicht genau bekannt. Es wird spekuliert, dass sie inaktive Osteoblasten, die durch Stimuli wieder reaktiviert werden, sein könnten [59]. Eventuell sorgen die *bone lining cells* für eine Kalziumausschüttung, falls der Blutgehalt zu niedrig ist und schützen den Knochen vor Abbau durch Chemikalien des Blutes (Auflösung von Kristalliten) [60].

Osteoklasten sind für den Abbau der Knochengrundsubstanz zuständig. Es sind große, bewegliche Zellen, die aus 50 und mehr Zellkernen bestehen. Durch Sekretion von Enzymen und sauren Hydrolasen wird die Knochenmatrix ab- bzw. im Zusammenspiel mit Osteoblasten und Osteozyten umgebaut. Die Aktivität der Osteoklasten wird über Hormone gesteuert.

Die **extrazelluläre Matrix (EZM)** besteht aus mineralisierten anorganischen und organischen Bestandteilen. Die anorganische Matrix setzt sich aus etwa 50% Phosphat, ca. 35% Kalzium und aus geringen Anteilen von Carbonat, Citrat, Magnesium, Fluor und weiteren Spurenelementen zusammen. Hauptsächlich liegen die Mineralien als Hydroxylapatit vor.

Die organische Matrix ist zu über 90% aus Kollagen aufgebaut. Weitere Matrixproteine sind beispielsweise Osteonektin, Osteocalcin, Osteopontin, Proteoglykane, Sialoproteine und Wachstumsfaktoren. Diese Proteine sind an der Regulation der Knochenbildung und des Knochenumbaus beteiligt.

Zur Veranschaulichung sind die Knochenbildung (links) und der Aufbau eines Lamellenknochens (rechts) in folgender Graphik dargestellt (Abb. 2.15).

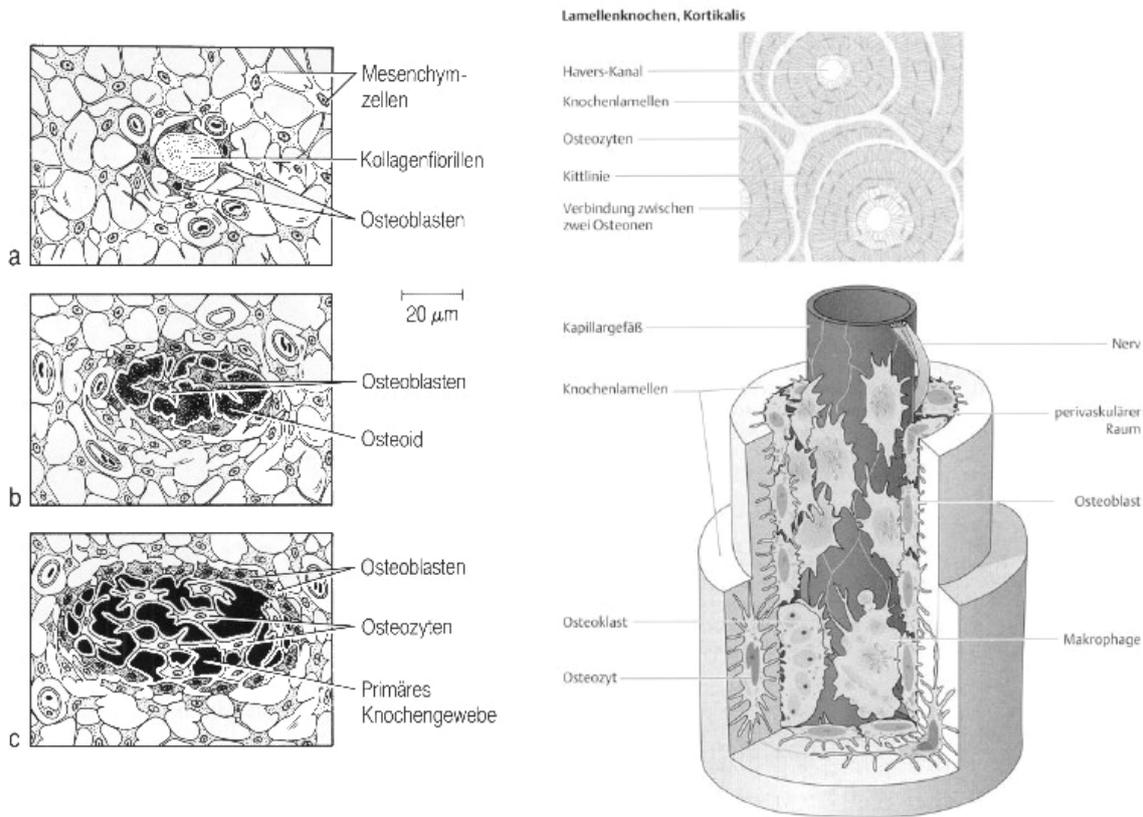


Abb 2.15 Schematische Darstellungen des Knochenaufbaus in verschiedenen Stadien (links) [61] und der Aufbau eines Lamellenknochens (rechts) [62]

Die bei der Knochenbildung beteiligten Zellen exprimieren in der *in vitro* Zellkultur, während der verschiedenen Stadien der Differenzierung, spezifische Marker, die im Folgenden gekürzt vorgestellt werden.

In der Proliferationsphase werden hauptsächlich Proteine, wie Kollagen Typ I, Fibronectin und *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) exprimiert, die für die Matrixformierung notwendig sind [58]. Nach der Proliferationsphase tritt die Matrixreifung ein, was mit einer fortgeschrittenen Differenzierung verbunden ist. Die Kollagen-Typ-I-Synthese nimmt ab und alkalische Phosphatase (AP) wird exprimiert, womit die Matrix auf das *Remodeling* vorbereitet wird. Während der Mineralisierung ist die Osteopontin- (OP), die Osteokalzin- (OC) und die Kollagenase-Synthese an einem Maximum angelangt [63].

Osteopontin kann als Marker für die Zelladhäsion dienen und wird auch schon in geringerem Maße zum Ende der Proliferation ausgeschüttet. Es wird von Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten produziert und soll positive Effekte auf die Kalziueinlagerung haben [64-66].

Osteokalzin wird von reifen Osteoblasten synthetisiert und dient für diese als Marker, sowie für den Knochenumbau [67-69]. Möglicherweise wird auch die Differenzierung zu Osteoklasten durch OC gefördert.

Alkalische Phosphatase ist ein Glykoprotein und wird von Osteoblasten, Osteozyten und Osteosarkomzellen produziert. AP spielt eine noch nicht genau geklärte Rolle bei der Matrixmineralisierung und ist ein Marker der osteoblastären Differenzierung, da sie von MSC wenig bzw. nicht synthetisiert wird [67].

Osteoprotegerin (OPG) ist ebenso eine Glykoprotein und spielt eine wesentliche Rolle bei der Osteoklastenbildung. Damit kommen ihm auch regulative Eigenschaften beim Knochenabbau bzw. beim Knochenumbau zu. Eine erhöhte Expression ist während der osteogenen Differenzierung zu beobachten [70].

2.2.3.2 Aufbau und Bildung des Skelettmuskelgewebes

Das Skelettmuskelgewebe zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, kontrahieren zu können und ist für die aktiven, willkürlichen Körperbewegungen zuständig. Es gehört, wie der Herzmuskel, zur quergestreiften Muskulatur. Für die Muskelkontraktion sind die Myofibrillen mit ihren Aktin- und Myosinfilamenten, die auch die Querstreifung in licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen bewirken, verantwortlich [71].

Der Muskel selbst besteht aus Muskelfaserbündeln und ist von Bindegewebe, der Faszie, umhüllt. Die Muskelfasern werden auch Muskelzelle genannt und bestehen aus vielen Zellkernen. Sie entstehen durch die Verschmelzung von einkernigen Muskelvorläuferzellen, den Myoblasten, während der Muskelentwicklung. Viele Myofibrillen bilden zusammen eine Muskelfaser und sind aus den kleineren Myofilamenten aufgebaut. Diese Aktin- und Myosinfilamente sind zu einer Ineinanderverschiebung fähig, womit die Muskelkontraktion bewirkt wird. In Abb. 2.16 ist der Muskelaufbau dargestellt.

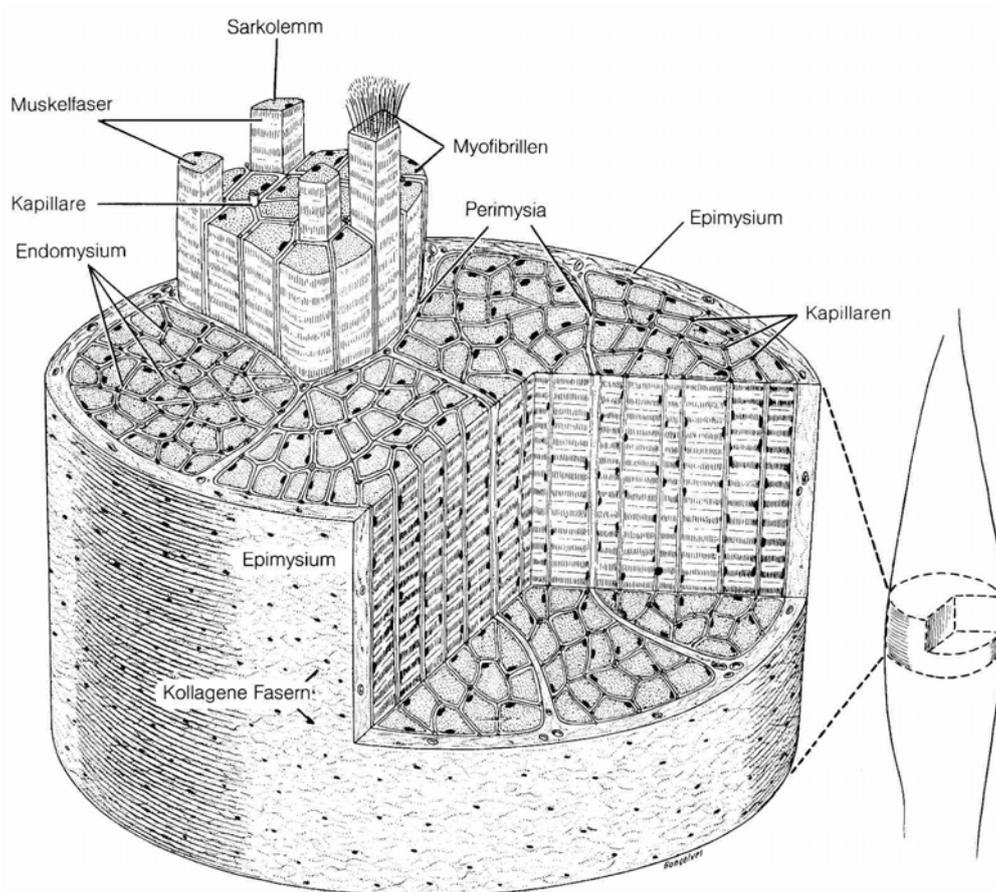


Abb 2.16 Schematische Darstellungen des Muskelaufbaus [61], rechts ist die Ausschnittslokalisierung im Muskel abgebildet.

2.2.4 Elektrogenespinnene Fasermatrices im *Tissue Engineering*

In den letzten Jahren haben sich elektrogenespinnene Polymerfasern als vielversprechende Matrix für die Züchtung unterschiedlicher Gewebearten (z. B. Knochen, Knorpel, Muskel, Haut, Blutgefäße) erwiesen [40, 72]. Bei der *in vitro* Kultivierung von autologen Zellen auf Trägermatrices (*Scaffolds*) muss deren Anhaftung und Proliferation gewährleistet und, im Fall von Stammzellen, eine Differenzierung entlang unterschiedlicher Zelllinien möglich sein. Das verwendete *Scaffold* gibt die Struktur des zu ersetzenden Gewebes vor und sollte die Morphologie und Funktion der extrazellulären Matrix möglichst imitieren.

Generell sind an ein *Scaffold* für den Einsatz im TE viele Anforderungen gestellt. Zu diesen gehören:

- Bioverträglichkeit
- Resorbierbarkeit
- Einstellbare, dreidimensionale Struktur
- Porosität
- Adäquate Oberflächeneigenschaften
- Adäquate mechanische Eigenschaften
- Wirkstoffinkorporation und Freisetzung
- Sterilisierbarkeit

Elektrogesponnene Fasern können aus einer Vielzahl an Polymeren erzeugt werden [1] und entsprechen somit, bezüglich Material- und Matriceigenschaften, dem Anforderungsprofil. Da die Bioverträglichkeit und Bioresorbierbarkeit für Anwendungen in der regenerativen Medizin von großer Bedeutung ist, wurde mittlerweile eine immense Anzahl biokompatibler und bioabbaubarer Polymere, synthetischen und natürlichen Ursprungs, zu Nanofasern versponnen und charakterisiert. Dazu gehören unter anderem Kollagen [34, 73, 74], Gelatine [73, 75], Fibrinogen [76], Chitosan [77], Cellulose [78, 79], Celluloseacetat [80], Polylactid [30, 27, 81], Poly(ϵ -caprolacton) (PCL) [82-84], Polyglycolid [85, 86] und Polyesterurethane [87-90]. Um die *Scaffold*-Eigenschaften zu modifizieren (bezüglich Biokompatibilität, Bioerosion, Struktur oder dem mechanischen Verhalten) wurden auch Copolymere wie Poly(lactid-*co*-glycolid) [86, 91-94] und Poly(L-lactid-*co*- ϵ -caprolacton) [95-97] verarbeitet. Weitere Möglichkeiten zur Modifikation bieten Polymer-Blends, Faserbeschichtungen oder Komposite. Beispielsysteme sind Blends von Polylactid/Poly(ethylen-*co*-vinylacetat) [81], Polyglycolid/Chitin [98], Chitosan/Polylactid [99], Poly(ϵ -caprolacton)/Kollagen [100-102], Poly(L-lactid-*co*- ϵ -caprolacton)/Kollagen [103, 104], Gelatine/PCL [75], Poly(3-hydroxybutyrat-*co*-3-hydroxyvalerat)/Kollagen [105], Kollagen/Chitosan [106], Poly(lactid-*co*-glycolid)/Gelatine/ α -Elastin [107] und Kollagen/Elastin mit einem Anteil bioerodierbarer synthetischer Polymere [108]. Ziel ist meist die natürliche Gewebezusammensetzung zu imitieren, weshalb Kollagen, Gelatine oder Elastin sehr häufig Anwendung finden. In der Mehrzahl der vorgestellten Systeme sind durch Variation der Spinnbedingungen und der Spinnparameter, Faserdurchmesser und Faserstrukturen in einem weiten Bereich zugänglich. Kollagenbeschichtungen von Fasern wurden unter anderem durch Eintauchen in Lösung

[83, 109], durch Plasmabehandlung [110, 111] und durch das Coelektroverspinnen von Kern-Schale-Fasern [109], nicht selten in Kombination mit PCL, vorgenommen.

Es sind sehr viele Arbeiten auf dem Gebiet der elektroversponnenen Biomaterialien in den letzten Jahren veröffentlicht worden. Für eine Übersicht sei auf die Review-Artikel von A. GREINER und J.H. WENDORFF [15] und von BOWLIN et al. [112] verwiesen.

Die Immobilisierung und Freisetzung von Funktionsstoffen stellt ein Thema mit großer Bedeutung in der regenerativen Medizin dar. Die Anwendung elektrogesponnener Polymerfasern auf diesem Gebiet wurde in den letzten Jahren von vielen Forschergruppen untersucht. Vorteile des Elektrosponnverfahrens sind die leicht variierbaren Fasereigenschaften und ein gutes Oberfläche/Volumenverhältnis, um eine kontrollierte Freisetzung zu erhalten. Viele Wirkstoffe können einfach durch Zugabe zur Spinnlösung in den Fasern immobilisiert werden. Beispiele sind: Tetracyclhydrochlorid in Polylactid [81], Poly(ethylen-*co*-vinylacetat) [81], Polylactid/Poly(ethylen-*co*-vinylacetat) [81], Polyvinylalkohol [113], Poly(lactid-*co*-glycolid) [114]; Paclitaxel in Polylactid [23, 115]; Diclofenac in PCL [113]; Bovines Serum Albumin (BSA) in PCL [84, 116], Polyvinylalkohol [117]; Silbernanopartikel in Polylactid [118]. In Kern-Schale-Strukturen wurden beispielsweise Resveratrol und Gentamycinsulfat, von PCL umhüllt, durch Coelektrosponnen inkorporiert [119]. Vorteil dieses Faseraufbaus ist, dass im Kern der Wirkstoff immobilisiert vorliegt und über die Eigenschaften der darumliegenden Schale die Freisetzung durch Diffusion kontrolliert wird [120]. Ein häufig beobachtetes Problem stellt nämlich die schlagartige Freisetzung des Funktionsstoffs dar. So konnte nachgewiesen werden, dass am Beispiel von PVA/BSA-Fasern, eine Beschichtung mit Poly(*p*-xylylen) aus der Gasphase zu einem nahezu linearen Freisetzungsverhalten führt [117]. Auch komplexere Moleküle, wie beispielsweise plasmidische DNA, konnten aus Fasern eines Triblockcopolymer aus Poly(D,L-lactid) und Poly(ethylenglycol) nach der Immobilisierung unter Erhalt der Aktivität freigesetzt werden [121]. Andere Systeme, wo dies ebenfalls erfolgreich nachgewiesen werden konnte, sind BSA und Lysozym [116, 117].

Für die Anwendung im *Tissue Engineering* ist nicht nur die Freisetzung von Medikamenten, sondern im hohen Maße auch die von Wachstumsfaktoren interessant. Eine kontrollierte lokale Abgabe eines oder mehrerer dieser Proteine, zu bestimmten Zeitpunkten der Kultivierung, könnte die Gewebeformierung positiv beeinflussen. Eine Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus elektrogesponnenen Fasern über einen längeren Zeitraum wurde von verschiedenen Autoren beschrieben. Es handelt sich hierbei um die Proteine: *Human Beta-*

Nerve Growth Factor (NGF) [122], *Basic Fibroblast Growth Factor* (FGF-2) [123], *Human Epidermal Growth Factor* (EGF) [124] und *Bone Morphogenetic Protein-2* (BMP-2) [125-127].

Mittlerweile wurden elektrogenesponnene *Scaffolds* mit einer großen Anzahl verschiedener Zellen besiedelt. Zu den verwendeten Zelltypen gehören unter anderem MSC, Chondrozyten, Myoblasten, Osteoblasten, Fibroblasten. Ebenso groß ist das Spektrum der daraus resultierenden Zielgewebe wie beispielsweise Bänder, Knochen, Haut, Knorpel, Muskel, Nerven und Blutgefäße [72, 128]. Aufgrund der Vielfalt soll im Folgenden nur auf die Gewebezüchtung mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) und Myoblasten, bezüglich Knochen und Muskelgewebe genauer eingegangen werden. Es wurden eine Reihe verschiedener elektrogenesponnener *Scaffolds* auf ihre Eignung zur Kultivierung von MSC getestet. Eine wichtige Erkenntnis wurde 2005 von TUAN et al. veröffentlicht. Es konnte nachgewiesen werden, dass hMSC auf einer Polycaprolacton-Fasermatte adipogen, chondrogen und auch osteogen differenziert werden können [129]. Vorausgegangen war die osteogene Differenzierung von Ratten MSC auf einer PCL-Matrix [82, 130]. Weitere verwendete Materialien sind Seidenprotein [131], Poly-L-lactid [132, 133], Kollagen [134] oder auf Basis von Gelatine, wie ein Blend mit Polycaprolacton oder ein Komposit mit nanokristallinem Hydroxyapatit [135, 136]. Eine prinzipielle Eignung der Nanofasermatrizes zur Proliferation von hMSC ist zu beobachten. Teilweise wurde auch eine Differenzierung vorgenommen und ein Einwachsen der Zellen in die Matrix beobachtet. Arbeiten mit Fasern aus PLLA und Poly(ethylenoxidterephthalat-co-butylenterephthalat) zeigten, dass eine poröse Oberfläche positive Effekte auf die Zelladhäsion und Proliferation hat [133, 137].

Eine Matrixweiterentwicklung findet dahingehend statt, dass die Systeme immer komplexer werden und ein möglichst genaues Abbild des natürlichen Gewebes darstellen. So wurden PCL/Hydroxyapatit/Kollagen und Hydroxyapatit/Kollagen Kompositfasern mit Osteoblasten besiedelt und eine geförderte Adhäsion, Proliferation und Mineralisierung beobachtet [138, 139]. WANG et al. benutzten Kompositmatrices aus Poly(lactid-co-glycolid) und Hydroxyapatit zur Freisetzung von BMP-2 und BMP-2-Plasmid-DNA [126, 140]. Das Kompositssystem Seide, Polyethylenoxid, Hydroxyapatit und BMP-2 wurde in verschiedenen Zusammensetzungen versponnen und mit hMSC getestet, eine Hochregulation der Kalziumexpression wurde beobachtet [125]. Eine Hybridmatrix aus PCL, Polyvinylalkohol und Chitosan wurde mittels Mehrkanülenanordnungen erzeugt und mit hMSC besiedelt und differenziert [141]. Um ein Einwachsen der hMSC zu fördern wurde ein Hybridscaffold aus

PCL und Polyethylenoxid (PEO) erzeugt. Das wasserlösliche PEO diente als Opfermaterial und führte nach der Auflösung zu einer erhöhten Porosität der Matrix, wodurch ein gesteigertes Einwachsen beobachtet wurde [142].

Bezüglich des Skelettmuskel *Tissue Engineering*, also der Myoblastenkultivierung wurde eine Eignung von elektrogesponnenen Fasermatten 2005 von RIBOLDI et al. mit einem *Scaffold* aus DegraPol[®], ein Blockcopolymer auf Polyesterurethan-Basis, nachgewiesen. An der murinen Myoblastenzelllinie C2C12 konnte Adhärenz, Proliferation und eine Differenzierung beobachtet werden [87]. LI et al. nutzten Gelatine und Fibronectin beschichtete PLLA-Fasermatten mit Vorzugsorientierung zur Myoblastenbesiedlung und stellten einen Einfluss der ausgerichteten Fasern auf die Morphogenese fest. So wurde ein vom Substrat bewirktes, ausgerichtetes Zellwachstum festgestellt und die Differenzierung zu Myotuben gefördert. Die Vergleichsgruppe mit nicht orientierten *Scaffolds* zeigte eine reduzierte Adhäsion und Proliferation. Des Weiteren konnte eine Differenzierung nicht beobachtet werden [143]. Entsprechende Ergebnisse wurden auch bei orientierten Matrices aus Polyamid 6/6, DegraPol[®] und einem PCL/Kollagen-Blend beschrieben [90, 144, 145].

Allgemein wichtige Punkte bezüglich der Matrixeigenschaften sind die Faserstruktur und die Porosität. Beim Vergleich von Polymerfilmen und -fasermatten ergab sich meist eine verbesserte Adhäsion und Proliferation bei den fibrillären Matrices [146, 147]. Des Weiteren sollte die Trägermaterialstruktur offenporig genug sein, um die metabolischen Erfordernisse der Zellen (wie Sauerstoff und Nährstoffe) zu garantieren und ein Einwachsen in die Matrix zu ermöglichen. Für das Wachstum in die Tiefe der Matrix sind je nach Zelltyp Porengrößen von 20 – 100 µm optimal [15, 148], bei Größen unter 1 µm wurde kein Einwachsen beobachtet [149]. Der übliche Faserdurchmesser von einigen 100 nm führt zu Porengrößen von einigen 100 nm bis zu einigen 10 µm und einer Gesamtporosität von meist über 80 % [85, 138, 150, 151]. Die Anordnung der Fasern ist ebenfalls bedeutend. So führt eine ausgerichtete Fasermatrix auch zu einem orientierten Zellwachstum [132, 133, 152, 153]. Bei Fibroblasten wurde berichtet, dass dies mit einer gesteigerten Sekretion von Matrixproteinen der EZM verbunden ist und durch Applikation einer Matrixdeformation noch weiter gesteigert werden kann [153].

2.3 Wirkstoffapplikation (*Drug Delivery*)

2.3.1 Einführung

Bereits 1964 wurde von FOLKMAN et al. der Versuch unternommen, im Tierversuch durch Implantation eines Trägermaterials, in diesem Fall Silikonkautschuk, eine anhaltende Wirkstofffreisetzung (*Drug Release*) zu erhalten [154]. Der Nutzen wurde in der Behandlung von chronischen Krankheiten, Allergien und der Prophylaxe von Infektionskrankheiten gesehen. Die erzielten Erfolge waren bis auf wenige Ausnahmen eher gering. Die Probleme waren neben einer kurzen Freisetzungsdauer meist Entzündungen im Tiergewebe. 1976 wurde von J. FOLKMAN und R. LANGER berichtet, dass der Einsatz bzw. die Implantierung von Polyvinylalkohol (PVA) oder Polyethylen-co-vinylacetat (PEVA) Kapseln mit nahezu keinen entzündlichen Effekten verbunden war und eine beständige Freisetzung von verschiedenen Proteinen von über 100 Tagen zuließ [155].

Heutzutage sind durch die Verwendung von nanostrukturierten Wirkstoffträgern die Möglichkeiten, aber auch die Anforderungen an solche Systeme deutlich gewachsen. Unter anderem soll der Wirkstoff durch ein Trägersystem vor vorzeitigem Abbau und Freisetzung geschützt werden, während am vorgesehenen Zielort eine kontrollierte und meist konstante Freigabe über einen längeren Zeitraum aus dem Wirkstoffträger erfolgen soll [15]. Dies ist mit einer Reduzierung der Wirkstoffmenge verbunden und auch die Anzahl der Verabreichungen kann minimiert werden [156]. Insgesamt sollen so und durch Verwendung von biokompatiblen und bioabbaubaren Materialien des Trägers schädliche Nebenwirkungen herabgesetzt werden.

2.3.2 Polymerbasierte Wirkstoffträgersysteme

Polymerbasierte Trägersysteme haben den Vorteil, durch viele unterschiedliche Techniken nanostrukturierbar zu sein. Des Weiteren ist eine Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit bzw. –resorbierbarkeit durch die Auswahl des entsprechenden Ausgangsmaterials möglich. Polymere bieten hier ein breites Spektrum von bereits medizinisch getesteten Materialien. Bei

der Verwendung von polymerbasierten Wirkstoffträgersystemen, wie z. B. Nanopartikeln oder Nanofasern, sind drei grundsätzliche Mechanismen der Freisetzung zu nennen [156]:

- durch Diffusion aus bzw. durch den Träger
- durch chemischen oder enzymatischen Abbau des Trägers oder Spaltung des Wirkstoffs vom Träger
- durch Lösungsmittelaktivierung mittels Osmose oder Schwellung

Auch Kombinationen der Mechanismen sind denkbar.

In manchen Fällen kann es gewünscht sein, dass der Wirkstoff nicht konstant, sondern gepulst freigesetzt wird, wie es beispielsweise bei der körpereigenen Insulinproduktion abläuft. Dies kann beispielsweise durch Einbringung magnetischer Objekte erfolgen, wobei durch Anlegen eines externen Magnetfelds die Wirkstofffreisetzung erhöht wird [157]. Es werden aber auch andere Systeme entwickelt, bei denen äußere oder auch körpereigene Reize die Freigaberate regulieren (z.B. pH-Wert, Temperatur) [158-161]. Aber auch der Wirkortfindung (*drug targeting*) der Trägersysteme kommt eine entscheidende Rolle zu. Ein Ansatz ist, die Oberfläche des Trägers durch Aufbringung von beispielsweise Antikörpern oder Zuckermolekülen so zu modifizieren, dass eine Anreicherung im Zielgewebe erreicht wird (*vector targeting*) [15, 162]. Einen weiteren Ansatz stellt die Verwendung anisometrischer Strukturen dar. Dies könnten Nanofasern, -röhren oder -stäbe sein. Besonders bei der lokoregionalen Inhalationstherapie sind die anisometrischen Wirkstoffträger interessant. Sie bieten die Möglichkeit, die Eindringtiefe in der Lunge, in Abhängigkeit von der Größe, der Dichte und vor allem der Form gezielt zu beeinflussen und werden dort auch länger zurückgehalten [163]. Dies ist ein entscheidender Vorteil gegenüber den konventionellen Systemen mit sphärischen Partikeln.

Denkbare Anwendungsgebiete sind beispielsweise die Behandlung von Asthma, Tumoren, Metastasen und pulmonarer Hypertonie [15, 164]. Von entscheidender Bedeutung für den Einsatz von polymeren Nanofasern als Trägersystem bei der Inhalationstherapie ist einerseits die Vermeidung inflammatorischer oder toxischer Effekte (bis hin zur Mutagenität) durch die Verwendung bioverträglicher Polymere und andererseits die gezielte Ablagerung der Trägerpartikel in der Lunge. Über die Gestalt, die Ausmaße und die Dichte des anisometrischen Trägers lässt sich der aerodynamische Durchmesser einstellen, welcher den Ort der Sedimentation in der Lunge bestimmt [165].

2.3.3 Tumor- und Gentherapie

Von herausragendem Interesse auf dem Gebiet des *Drug Delivery* ist die Tumorthherapie und damit verbunden, neben der Verabreichung von konventionellen niedermolekularen Antitumorwirkstoffen, die Gentherapie. Unter Gentherapie versteht man das Einschleusen von Genen in Zellen bzw. Gewebe, um dort die Expression bzw. Funktion eines Gens zu bewirken. Die Einbringung bezeichnet man als Gentransfer. Dies benötigt ein Träger- bzw. Vermittlersystem für das Gen, den sogenannten Vektor [166]. Im Falle von kleinen DNA- (Antisense) oder RNA-Molekülen (Ribozyme, siRNA), die in Zellen eingebracht werden, spricht man von *Gentargeting*. Die Gentherapie kann beispielsweise zur Funktionsaufklärung von Genen oder der Behandlung von zell- bzw. genbasierten Krankheiten dienen.

2.3.4 RNA-Interferenz und siRNA

Unter RNA-Interferenz (RNAi) versteht man die gezielte Inhibierung der Genexpression (*gene silencing*). Vermittelt wird dies durch kurze, zielerkennende RNA-Moleküle wie beispielsweise die *small interfering RNA* (siRNA). Die Vorgänge ihrer Generierung und der Blockierung der Genexpression sind in Abb. 2.18 schematisch dargestellt. So wird die siRNA durch die *Dicer*-vermittelte Spaltung von längeren *double-stranded RNA* (dsRNA) im Cytoplasma generiert [167]. Danach liegt die siRNA doppelsträngig vor und wird von verschiedenen Proteinen zu dem sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC) komplexiert. Dieser wird durch Abspaltung eines siRNA-Strangs aktiviert und bindet über den anderen siRNA-Strang selektiv an das Ziel, die Boten-RNA (*messenger RNA*, mRNA), durch komplementäre Basenpaare. Anschließend wird durch eine RISC-vermittelte Nukleasenaktivität die mRNA gespalten und inaktiviert bzw. die Genexpression inhibiert (Abb. 2.18) [168].

Es kann auch synthetische siRNA, beispielsweise durch Protein-Komplexierung oder liposomale Transfektionsreagenzien, in Zellen eingebracht werden und zum *gene silencing* genutzt werden. Diese Methode stellt ein wertvolles Instrument zur genauen Aufklärung der Genfunktionen und zur Heilung verschiedener Krankheiten dar. 2001 konnte durch TUSCHL et al. auch die Anwendbarkeit auf Säugetierzellen nachgewiesen werden [169]. Ein generelles Problem beim *in vivo* Einsatz von unmodifizierter siRNA ist ihre Instabilität und die schlechte

Zellpenetration. Von AIGNER et al. wurde gezeigt, dass eine Komplexierung mit niedermolekularem Polyethylenimin (PEI) in nicht toxischen Konzentrationen eine Stabilisierung und eine bessere Zellübertragung unter Erhalt der vollen Bioaktivität der siRNA bewirkt. Im Mausmodell konnte die Effizienz gegenüber Tumoren im Vergleich zu nicht modifizierter siRNA bewiesen werden [170-172]. Ein wichtiger Sachverhalt der PEI-Komplexierung ist die gesteigerte Leistungsfähigkeit der Transfektion von siRNA und DNA [173]. Mögliche Anwendungsgebiete sind neben der schon genannten Tumorthherapie z. B. Wundverbände oder Tissue Engineering.

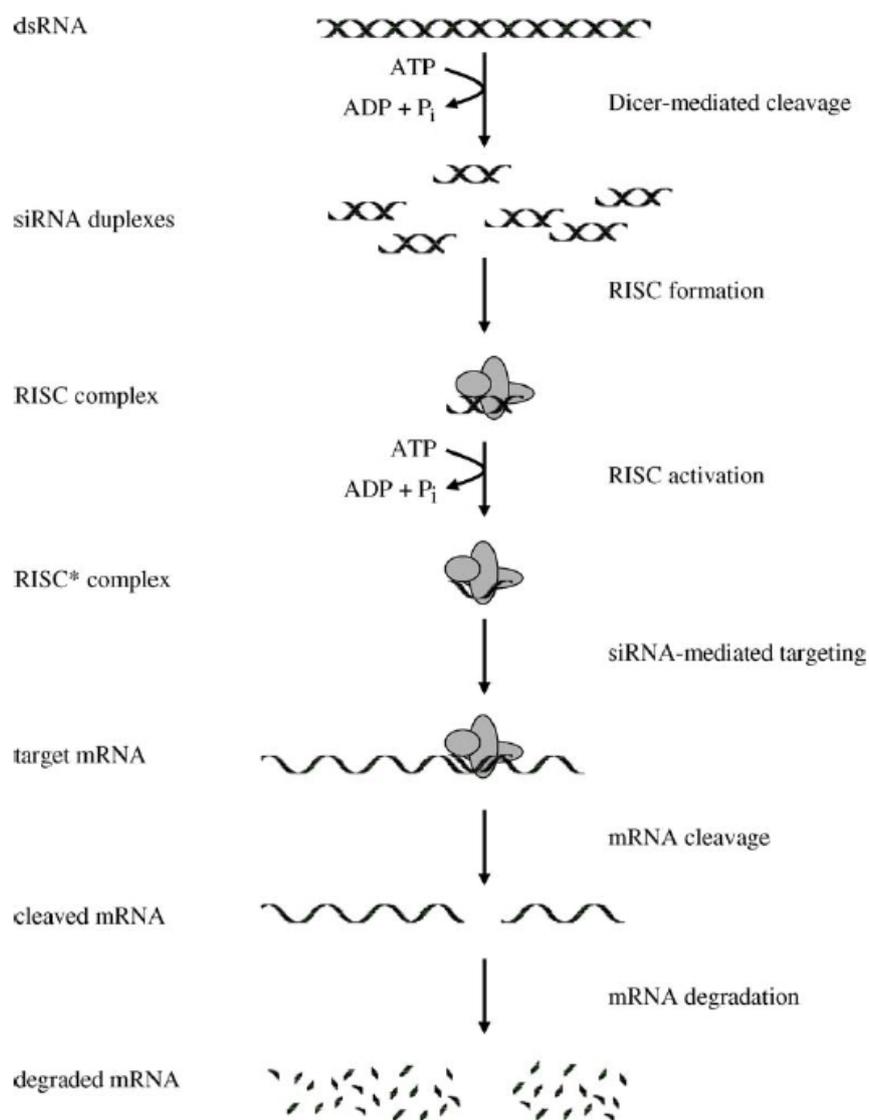


Abb. 2.18 Angenommener Mechanismus der siRNA Generierung und der Inhibition der Genexpression [174]

3 Elektrogenesponnene, strukturierte und funktionalisierte Fasermatrices für den Einsatz im Bone Tissue Engineering

3.1 Motivation und Zielsetzung

Arbeiten von R. DERSCH haben, in Kooperation mit der Orthopädie Marburg, ein anwendbares System für die *in vitro* Züchtung von Knochenzellen auf Basis von resorbierbaren Poly(L-lactid)-Fasermatrices ergeben. So wurde eine Eignung von elektrogenesponnenen bioabbaubaren PLLA-Fasern für die Proliferation und die Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen gezeigt. Die Inkorporation von Zuschlagstoffen wie z.B. β -Tricalciumphosphat zur Verbesserung der Osteoinduktion konnte nachgewiesen werden. Ebenso wurde eine Modifizierung des Elektrosponnverfahrens bzw. der Gegenelektrode entwickelt, um dreidimensionale Matrices zu erhalten, die eine Kultivierung von Osteosarkomzellen in einem Perfusionssystem zuließen [35].

Auf Grundlage dieser Arbeiten sollte das Matrixsystem dahingehend modifiziert werden, dass Wirkstoffe, in diesem Fall der Wachstumsfaktor *Bone morphogenetic protein 2* (BMP-2), aus Poly(L-lactid)-Fasern in der Zellkultur freigesetzt werden können und einen Einfluss auf die Proliferation und die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen nehmen.

Des Weiteren sollte die Anwendbarkeit der dreidimensionalen Matrix und des Perfusionssystems auf die Kultivierung von MSC übertragen werden. Die Frage nach der Porengröße der Fasermatrix und der damit verbundenen Möglichkeit des Einwachsens der Zellen stand hier im Vordergrund.

Während der Projektbearbeitung wuchs das Interesse an der Verwendung von Biomaterialien, die der natürlichen extrazellulären Matrix, dessen organischer Anteil hauptsächlich aus Kollagen besteht, ähneln. Aus diesem Grund sollte eine Matrix auf Kollagenbasis erzeugt werden und deren Eigenschaften bezüglich Zellverträglichkeit, Zelladhäsion, Abbaubarkeit, Proliferations- und Differenzierungsverhalten, sowie der Möglichkeit zur Freisetzung von Wirkstoffen untersucht werden.

Das langfristige Ziel des *Bone Tissue Engineerings* ist, eine Matrix zu erzeugen, die ein adäquates Knochenersatzgewebe aus autologem Material zur Regenerierung und Reparatur von geschädigtem oder zerstörtem Knochen erlaubt.

Alle Arbeiten zur Zellkultivierung und die immunhistologischen Auswertungen wurden durch und in enger Zusammenarbeit mit CH. WACK, I. LEIFELD, CH. GRÄBEDÜNKEL, S. BOCKELMANN, Dr. J. PALETTA, Dr. M. SCHOFER und PD Dr. U. BOUDRIOT vom Fachbereich Medizin der PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG durchgeführt.

3.2 BMP-2 Freisetzung aus PLLA-Fasern

Die Inkorporation und Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus der Matrix bei Zellkulturen stellt einen wichtigen Punkt des heutigen Forschungsinteresses dar. Die Induzierung der Zelldifferenzierung mittels Zellmedium ist etabliert, birgt aber Einschränkungen. So ist es beispielsweise nicht möglich, innerhalb eines *Scaffolds* in verschiedene Zelllinien zu differenzieren, was für Züchtung eines funktionsfähigen Gewebeersatzes durchaus notwendig sein kann. Auch bei der *in vivo* Implantierung eines Biomaterials kann durch Freisetzung eines Wachstumsfaktors die Heilung positiv beeinflusst werden. Die rein lokale Verfügbarkeit des aktiven Proteins hat den Vorteil, dass sowohl der Ort als auch die Konzentration regulierbar sind und an die Erfordernisse der entsprechenden Zellen angepasst werden können. Aus diesem Grund wurde versucht, das bestehende Poly(L-lactid)-Matrixsystem zu erweitern und den Wachstumsfaktor BMP-2 mit seinem bereits nachgewiesenen osteoinduktiven Effekt in der Zellmatrix zu immobilisieren und während der Kultivierung von MSC freizusetzen um eine osteoblastäre Differenzierung zu erhalten.

3.2.1 Poly(L-lactid)-Matrixsystem

Die PLLA-Matrix ist unter anderem von R. DERSCH bereits ausführlich beschrieben worden [132, 150, 175, 176]. Das bioresorbierbare Polylactid findet seit geraumer Zeit Einsatz als Knochenersatzmaterial. Die Resorptionsgeschwindigkeit ist im Vergleich zu anderen Biopolymeren aufgrund der Hydrophobizität relativ niedrig [177]. Der Abbau verläuft nichtenzymatisch durch hydrolytische Esterspaltung, wobei die entstehende *L*-Milchsäure zu Wasser und Kohlendioxid verstoffwechselt wird. Beim Abbau können Entzündungsreaktionen auftreten, die von einer lokalen Überbelastung oder einer lokalen pH-Wert-Erniedrigung durch die Milchsäure hervorgerufen werden [178]. Im Tierexperiment mit PLLA-Fasern ($d > 100 \mu\text{m}$) wurden keine bedeutenden Entzündungsanzeichen in einem Zeitraum über 30 Monate gefunden [179].

Untersuchungen über den *in vitro* Abbau von elektrogenesponnenen PLLA-Fasern mit einem Durchmesser von 300 nm zeigten über 45 Tage hinweg keinen wesentlichen Gewichtsverlust [86]. Poly(L-lactid) lässt sich z. B. aus Dichlormethan elektroverspinnen, wobei Nano- und Mikrofasern mit einer porösen Oberflächenstruktur erzeugt werden [30, 36, 180, 181]

(siehe Abb. 2.7 A), welche einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen aufweist [182]. Der Spinnprozess ist vor allem bei niedriger relativer Luftfeuchtigkeit teilweise mit Problemen behaftet. So trocknet der Polymertropfen an der Kanüle schnell aus und führt zu unregelmäßigen Fasern und zum Auftreten von Verdickungen.

Die gute Verfügbarkeit, die bekannten biomedizinischen Eigenschaften und die Verarbeitung zu strukturierten Mikro- und Nanofasern führten dazu, dass das Poly(L-lactid) als Modellsubstanz für die *Bone Tissue Engineering* Projekte mit der Orthopädie des Fachbereichs Medizin der PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG dient.

3.2.2 BMP-2

Das *Bone Morphogenetic Protein 2* (BMP-2) gehört zur TGF- β Familie und ist eines der am besten charakterisierten BMPs [183, 184]. Entdeckt wurde es aufgrund seiner osteoinduktiven und osteoregenerativen Effekte [185, 186] und es übernimmt eine Vielzahl von Funktionen in der Proliferation und der Differenzierung in unterschiedlichen Geweben (z.B. Morpho- und Organogenese) [183, 184]. Aufgrund der Fähigkeit eine *de novo* Synthese von Knochen, auch bei Abwesenheit von Knochenmarkselementen, zu induzieren, ist in zahlreichen Tierexperimenten eine beschleunigte und effektivere Knochenheilung zu beobachten [187, 188].

3.2.3 Konzeption einer mobilen Spinnapparatur

Für die Inkorporation des Wirkstoffs war es notwendig, eine Elektrospinnapparatur zu entwerfen, die innerhalb einer sterilen Werkbank betrieben werden kann (Abb. 3.1). Die herkömmliche Erzeugung der Fasern in einer semi-sterilen Spinnkammer und einer anschließenden Plasmasterilisation der Fasern hätte das eingelagerte Protein zerstört oder zumindest stark in Mitleidenschaft gezogen.

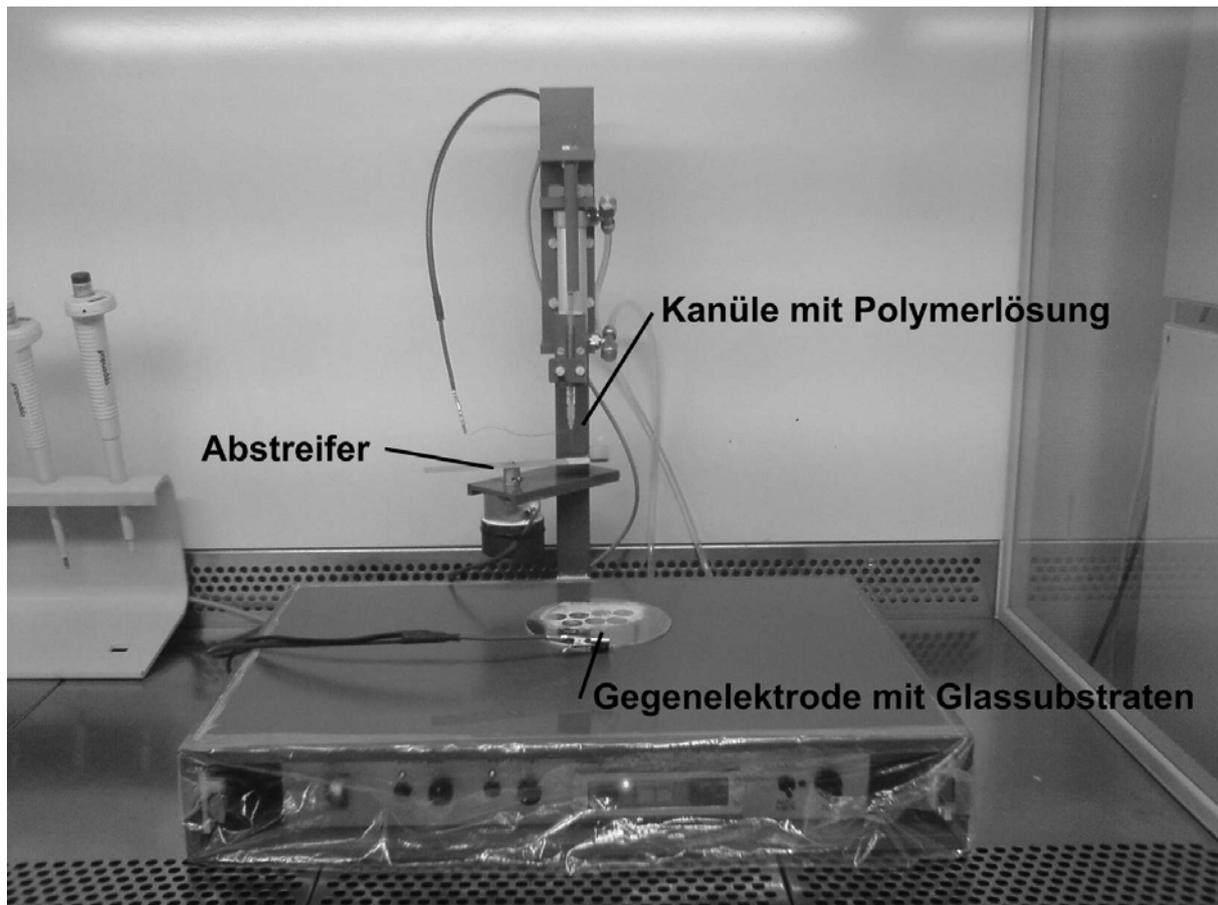


Abb. 3.1 Darstellung der mobilen Elektrosppinnapparatur in der sterilen Werkbank

Die Elektrosppinnapparatur wurde so konzeptioniert, dass sie ausreichend kleine AusmaÙe aufweist, um sie innerhalb einer sterilen Werkbank zu betreiben (Abb. 3.1). Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass eine Sterilisierbarkeit mit alkoholischer Lösung gewährleistet werden kann. Der Aufbau ist möglichst einfach gehalten, so dass aus einer Spritze die zu elektroverspinnende Polymerlösung in einer konstanten Geschwindigkeit gedrückt wird. Die Kanle mit dem Polymerlsungstropfen ist mit der Hochspannungsquelle kontaktiert und als Gegenelektrode wird ein rundes Aluminiumblech, auf dem die zu bespinnenden Substrate aufgebracht sind, verwendet. Da es beim Elektroverspinnen einer Polylactid-Dichlormethan-Lösung zu Polymerverfestigungen an der Kanle kommen kann, ist ein Abstreifer angebracht, der nach einem einstellbaren Zeitintervall oder durch individueller Auslösung eine Schwenkbewegung ausführt und die Verfestigung ablöst, so dass ein kontinuierlicher Spinnvorgang wieder möglich wird.

3.2.4 Inkorporation von BMP-2 in eine PLLA-Fasermatrix

Die wässrige BMP-2-Lösung wurde der Spinnlösung im Verhältnis 1:10 zugefügt und mittels eines Kreisschüttlers dispergiert. Die erhaltene Lösung wurde innerhalb einer sterilen Werkbank mit Hilfe der mobilen Spinnapparatur elektroversponnen. Die funktionalisierten Fasern wurden auf runden Glasplättchen (Durchmesser = 16 mm), die auf einer Aluminiumgegenelektrode lagen, aufgesammelt, wie in Abb. 3.1 dargestellt. Anschließend wurde die Fasermatte auf den Plättchen fixiert*. Dies ist aufgrund der sonst auftretenden Ablösung der Fasermatte im Kulturmedium notwendig. Die MSC wurden mit einer Dichte von $3 \cdot 10^4$ Zellen/cm² ausgesät und für 4 Tage mit Wachstumsmedium vorkultiviert. Danach wurde, um Vergleichsgruppen zu haben, bei einem Teil der Proben ein Wechsel zu Differenzierungsmedium vorgenommen. Wenn nicht anders erwähnt, wurden diese Kulturbedingungen bei allen folgenden Versuchen mit hMSC angewandt.

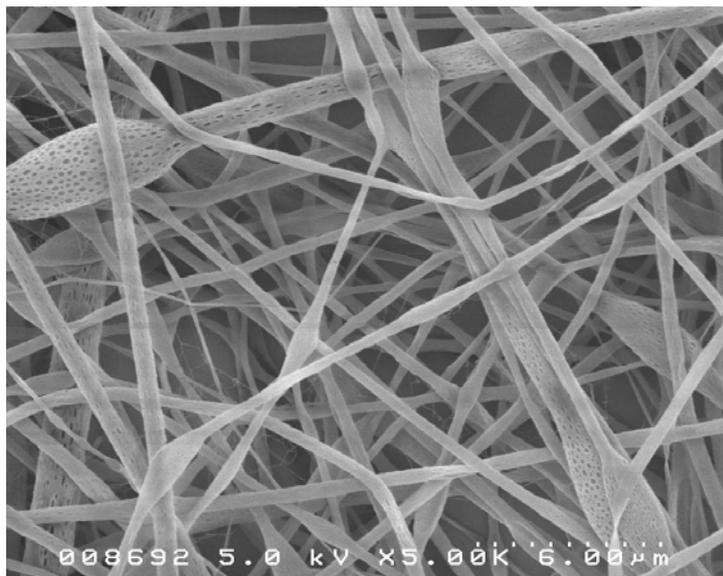


Abb. 3.2 SEM-Aufnahmen von BMP-2 funktionalisierten PLLA-Fasern

Die BMP-2 modifizierten Fasern weisen im Vergleich zu reinen PLLA-Fasern deutliche Veränderungen auf. So sind bei den meisten Fasern keine oder deutlich weniger Poren auf der Oberfläche zu erkennen und auch das Auftreten von spindelförmigen Verdickungen ist eher untypisch (Abb. 3.2). Möglicherweise sind die *Beads* durch die dispergierte wässrige Phase

* eine genaue Beschreibung der Faserplattenfixierung auf Glasplättchen erfolgt in Abschnitt 7.2

entstanden, was bedeuten könnte, dass dort der inkorporierte Wachstumsfaktor konzentriert vorliegt. Der mittlere Faserdurchmesser lag bei 600 ± 343 nm. Vereinzelt waren Fasern mit Durchmessern von über $2 \mu\text{m}$ zu beobachten.

Das Auftreten von spindelförmigen Beads durch das Einspinnen einer dispergierten wässrigen Phase tritt ebenso bei der Immobilisierung von Bovinem Serum Albumin (BSA) auf. Als ein mögliches Modellsystem für die Proteindistribution in PLLA-Fasern wurden 0,13 mL einer wässrigen (etwa 2 wt.%) Lösung von Fluoresceinisothiocyanat markiertem BSA und 1,1 mL einer 4 wt.% PLLA/DCM-Lösung zugefügt, durch einen Kreisschüttler dispergiert und anschließend versponnen. Die erhaltenen Fasern wurden mittels eines Fluoreszenzmikroskops untersucht.

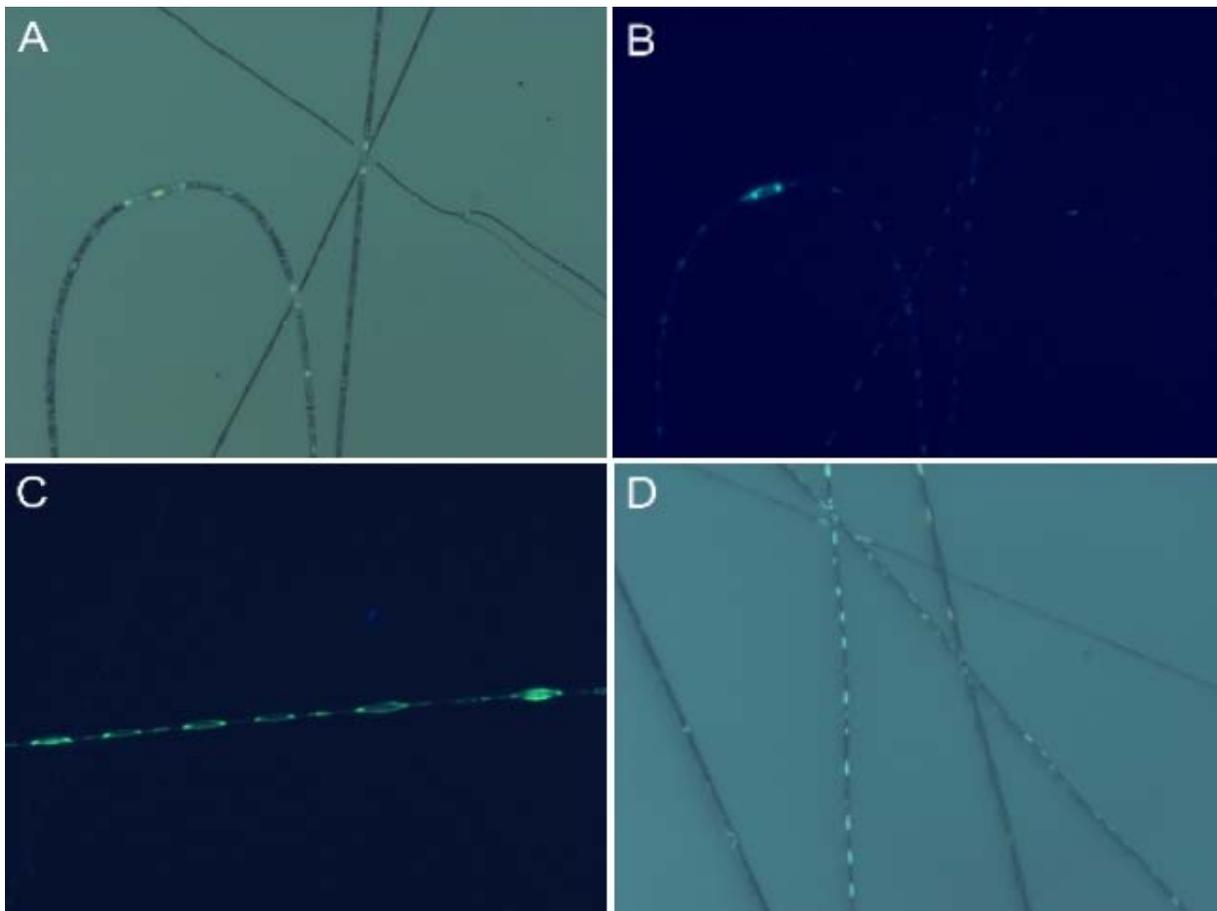


Abb. 3.3 Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von PLLA-Fasern mit dispergierten FITC-BSA bei verschiedenen Vergrößerungen (A) und (D) lichtmikroskopische Aufnahme, (B) und (C) Fluoreszenzaufnahmen

In Abb. 3.3 (C) ist die Verteilung des FITC-BSA innerhalb der Faser klar zu erkennen. Es scheint eine Konzentrierung des Proteins in ellipsoider Form und in regelmäßigen Abständen aufzutreten. Bei einer Mehrzahl der Fasern treten spindelförmige Verdickungen auf (Abb. 3.3 D). Genau an den Stellen der Beads ist auch das Protein eingelagert, wie beim Vergleich desselben Faserabschnitts in Abb. 3.3 (A und B) zu erkennen ist.

Dies ist wahrscheinlich auf die Dispergierung der wässrigen Phase in der organischen Spinnlösung zurückzuführen und resultiert beim Elektrospinnen in Fasern mit einer Morphologie von aufgereihten dispergierten Tröpfchen, in denen das Protein der wässrigen Phase angereichert vorliegt.

3.2.5 Ergebnisse der Freisetzung von BMP-2 aus einer PLLA-Fasermatrix

Um die Freisetzung des BMP-2 aus der Fasermatrix zu bestimmen, wurde Medium zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und mittels ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) die BMP-2 Konzentration bestimmt. Pro Glassubstrat kann eine inkorporierte Masse von 100 - 200 ng BMP-2 angenommen werden. Eine genaue Bestimmung ist aufgrund der geringen Masse der abgeschiedenen funktionalisierten Fasern nicht möglich, jedoch kann über die verbrauchte Menge an Spinnlösung und einer angenommenen Abscheidungsrate auf den Glasplättchen von mindestens 50 %, von einem Wert über 100 ng BMP-2 pro Substrat ausgegangen werden. Die Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchung sind in Abb. 3.4 dargestellt.

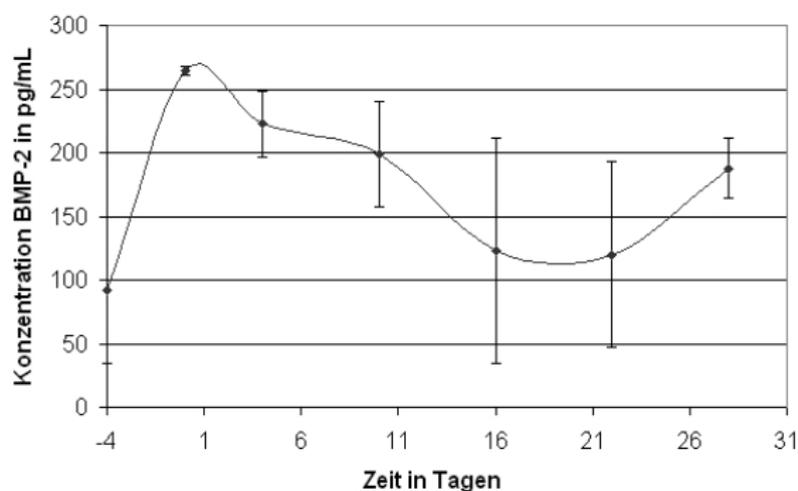


Abb. 3.4 Verlauf der BMP-2 Freisetzung durch Bestimmung der Konzentrationen im Medium

Eine deutliche Freisetzung des Wachstumsfaktors konnte über den gesamten Zellkulturzeitraum nicht festgestellt werden. Das Freisetzungsprofil erscheint mit einem anfänglichen Anstieg und einer folgenden Absenkung in eine Sättigung nachvollziehbar (Abb. 3.4). Bei der Betrachtung der Absolutwerte fällt aber auf, dass nach der Gesamtkulturdauer von 32 Tagen maximal 1 % der immobilisierten Gesamtmasse des BMP-2 nachgewiesen werden konnte. Da nahezu alle erhaltenen Werte mit einer großen Streuung versehen sind und nur wenige über dem Grundwert des Mediums von 92 ± 58 pg/mL liegen, kann von einer nennenswerten Freisetzung nicht gesprochen werden. Das Experiment wurde wiederholt durchgeführt und mit verschiedenen BMP-2 sensitiven ELISA untersucht. Eine eindeutige Freisetzung wurde bei keinem Versuch beobachtet.

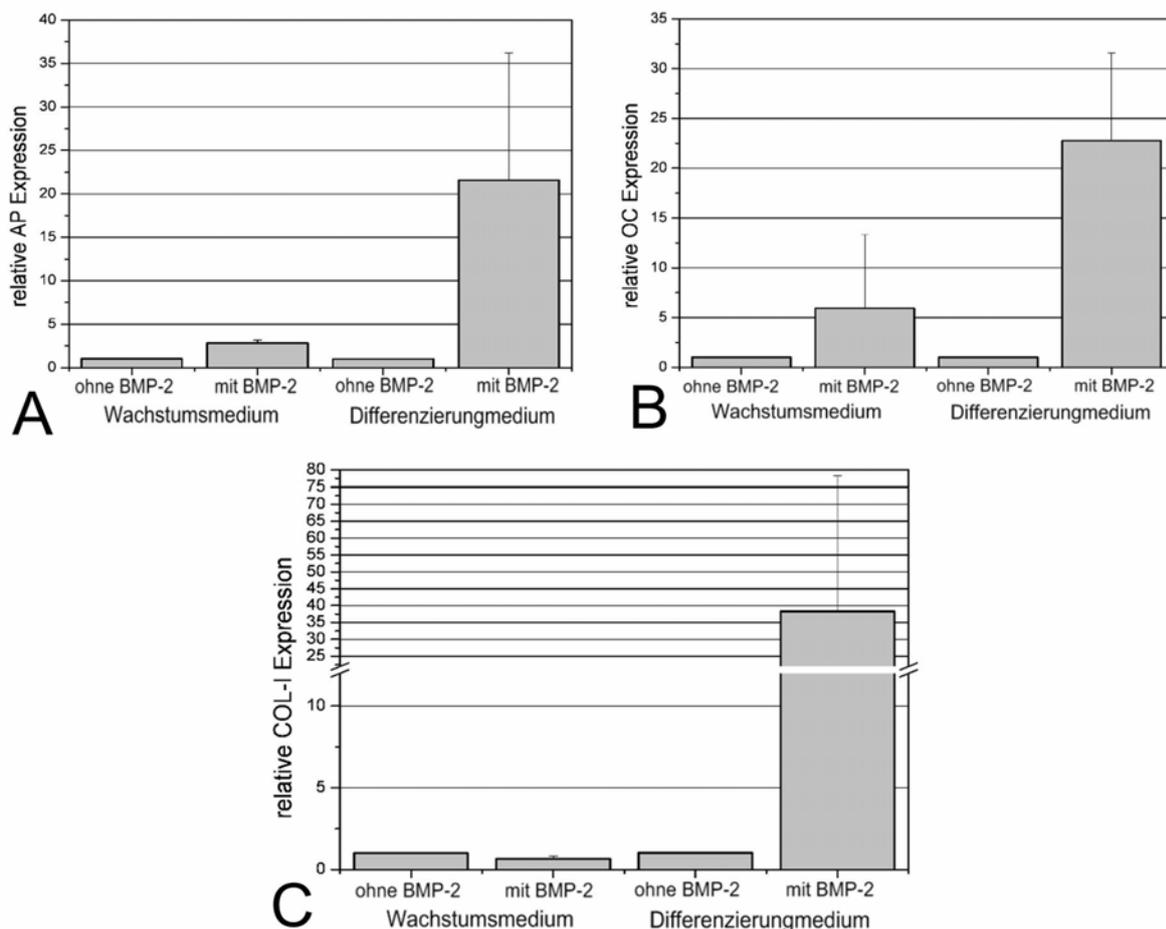


Abb. 3.5 Genexpression der Marker für die osteoblastäre Differenzierung und der Matrixbildung an Tag vier der Kultivierung (normalisiert auf Fasern ohne BMP-2)

Für dieses Ergebnis können verschiedene Ursachen verantwortlich sein. Zum Einen ist es möglich, dass eine diffusionskontrollierte Wirkstofffreisetzung in nur sehr geringem Maße stattfand und ein hydrolytischer oder enzymatischer Abbau von PLLA ist bei der Gesamtkulturdauer von 32 Tagen nicht zu erwarten (siehe Kapitel 3.2.1).

In der Literatur ist die eingeschränkte, langsame Proteinfreisetzung aus Poly(L-lactid)-Fasern in wässrigen Medien bekannt und wird auf die hohe Hydrophobizität und den geringen Abbau zurückgeführt [23, 189].

Die Auswertungen der Marker der osteoblastären Differenzierung und der Matrixbildung am vierten Tag der Kultivierung mit Wachstums- und Differenzierungsmedium sind in Abb. 3.5 dargestellt. Es wurde die Genexpression von alkalischer Phosphatase (AP), Osteocalcin (OC) und Kollagen-I (COL-I) mittels RT-PCR (*real time - polymerase chain reaction*) bestimmt.

Die Expression der Differenzierungsmarker AP und OC ist bei BMP-2 inkorporierten Fasermatrizes im Vergleich zu reinen PLLA-Fasern, sowohl unter Wachstumsbedingungen, als auch unter Differenzierungsbedingungen deutlich erhöht (Abb. 3.5 A und B). Auch die Expression des Matrixproteins COL-I ist zumindest unter Differenzierungsbedingungen bei den BMP-2 Proben erheblich erhöht (Abb. 3.5 C). Eine Signifikanz der Werte ist leider, aufgrund der großen Streuung, nur bei der AP unter Wachstumsbedingungen vorhanden. Bei hMSC ist dies wegen ihrer abnehmenden Vitalität und Differenzierungsfähigkeit mit zunehmendem Alter der Spender häufig zu beobachten.

Besonders unter Differenzierungsbedingungen ist der Anstieg bei allen Markern der wachstumsfaktormodifizierten Fasern ausgeprägt. Dies zeigt einen osteoinduktiven Effekt und muss durch eine Signaltransduktion des BMP-2 mit den MSC verursacht sein. Das Ergebnis lässt nur den Schluss zu, dass entweder eine Wachstumsfaktorfreisetzung erfolgte oder durch die Zelladhäsion eine oberflächenvermittelte Signalübertragung stattfand. Für eine genaue Klärung des Mechanismus müssten weitere experimentelle Untersuchungen folgen und der BMP-2-Gehalt in den Fasern nach der Kultivierung bestimmt werden. Dies ist für die Zukunft angedacht.

3.3 Entwicklung einer Kollagenmatrix für die *in vitro* Zellkultivierung

Der Wunsch, die artifizielle Zellmatrix immer mehr der natürlichen extrazellulären Matrix anzupassen, macht die Verwendung von kollagenbasierten *Scaffolds* im *Bone Tissue Engineering* interessant. Vorteile könnten beispielsweise darin liegen, dass die Zellen beim Aufbau ihrer natürlichen Umgebung unterstützt werden, möglicherweise verbesserte adhäsive, proliferative und differenzierende Effekte aufweisen und/oder inflammatorische Auswirkungen des Abbaus von synthetischen Matrixmaterialien vermieden werden.

Die gestellten Anforderungen beinhalten als Ziel die Entwicklung einer Kollagenmatrix, die sowohl in zwei-, als auch in dreidimensionaler Zellkultivierung angewendet werden kann. Des Weiteren soll die Möglichkeit gegeben sein Wirkstoffe, wie den Wachstumsfaktor BMP-2, zu immobilisieren und *in vitro* freizusetzen.

Die hier dargestellten Arbeiten zur Entwicklung einer Kollagenmatrix wurden von und in Kooperation mit D. HUSSAIN im Zuge seiner Diplomarbeit durchgeführt [190].

3.3.1 Kollagen

Kollagen ist ein Strukturprotein der extrazellulären Matrix bei Mensch und Tier. Es ist der Hauptbestandteil von Knorpel, Sehnen, Bändern und der organischen Matrix in Knochen und Zähnen [191]. Insgesamt hat es einen Massenanteil von 30 % aller Proteine im menschlichen Körper. Wenn man von „Kollagen“ spricht wird meistens der Typ I gemeint, jedoch ist dieser nur einer aus einer Familie von insgesamt 27 derzeit bekannten Typen, die verschiedene Aufgaben im Körper übernehmen [192]. Gemeinsam ist allen Kollagenarten ihr chemischer und struktureller Aufbau. So ist jede dritte Aminosäureeinheit Glycin und jeweils drei linksgewundene helikale Polypeptidketten bilden eine rechtsgängige Superhelix (Abb. 3.6).

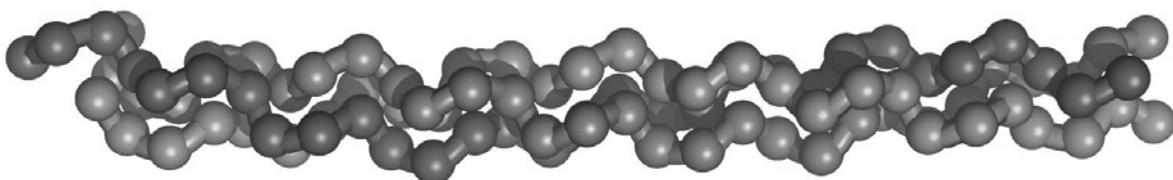


Abb. 3.6 Schematische Darstellung einer Kollagentripelhelix [193]

Der Typ I gehört unter anderen zur Klasse der fibrillären Kollagene. Die ausgebildeten Fibrillen weisen eine hohe Zugfestigkeit auf und stellen sozusagen das strukturelle Gerüst für viele Gewebe, wie z. B. Knochen oder Haut, dar [58].

Aufgrund des hauptsächlichlichen Vorkommens des Strukturproteins Kollagen Typ I im Knochen wurde für die *Bone Tissue Engineering* Experimente auch dieser Typ, gewonnen aus Kalbshaut, verwendet.

3.3.2 Kollagenmatrixgenerierung

Der erste Schritt bei der Generierung einer Kollagenmatrix war das Ermitteln der Spinnbedingungen, um relativ einheitlich elektrogesponnene Fasern zu erhalten. Als Orientierung konnten hier in der Literatur bekannte Erkenntnisse dienen [34, 74, 194]. BOWLIN et al. berichteten 2002 als Erste von elektroversponnenem Kollagen der Typen I und III. Das Elektroverspinnen aus Hexafluoroisopropanol (HFIP), einem flüchtigen organischen Lösungsmittel mit einem Siedepunkt von 61 °C, erwies sich in Kombination mit Kollagen Typ I aus Kalbshaut für die Generierung möglichst einheitlicher Fasern als geeignet [34].

3.3.3 Verspinnen von Kollagen Typ I aus Kalbshaut

Das Verarbeiten durch Elektrospinnen erwies sich als anfällig gegenüber der relativen Luftfeuchtigkeit, der Temperatur und der Alterung der Spinnlösung. Eine zu niedrige, oder zu hohe rel. Luftfeuchtigkeit (< 15%; > 60%) verhindert ein konstantes Spinnen und führt zu uneinheitlichen Fasern sowie Tropfenbildung. Es wurden Konzentrationen von 10 - 80 mg/mL (entspricht 1 – 8% (w/v)) von Kollagen Typ I aus Kalbshaut in HFIP gelöst, versponnen und die erzeugten Fasern hinsichtlich der Morphologie, des mittleren Durchmessers und der Durchmesservertelung untersucht. Im Folgenden wird Kollagen Typ I aus Kalbshaut als Kollagen ohne weitere Spezifizierung bezeichnet.

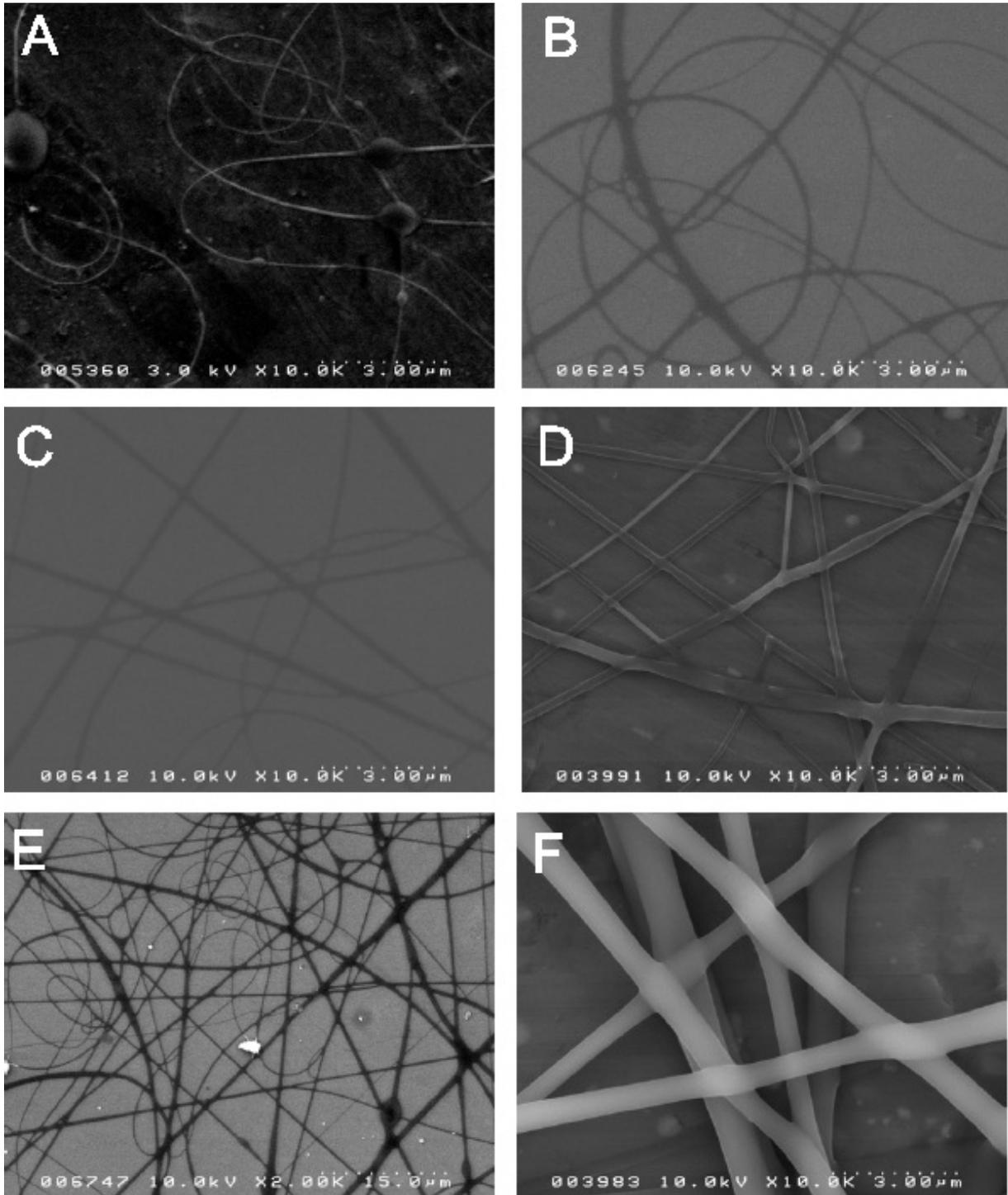


Abb. 3.7 SEM-Aufnahmen von Kollagenfasern gesponnen aus HFIP mit Polymerkonzentrationen von (A) 10 mg/mL, (B) 20 mg/mL, (C) 30 mg/mL, (D) 40 mg/mL von (E) 50 mg/mL und (F) 60 mg/mL (wird auf der nächsten Seite fortgesetzt)

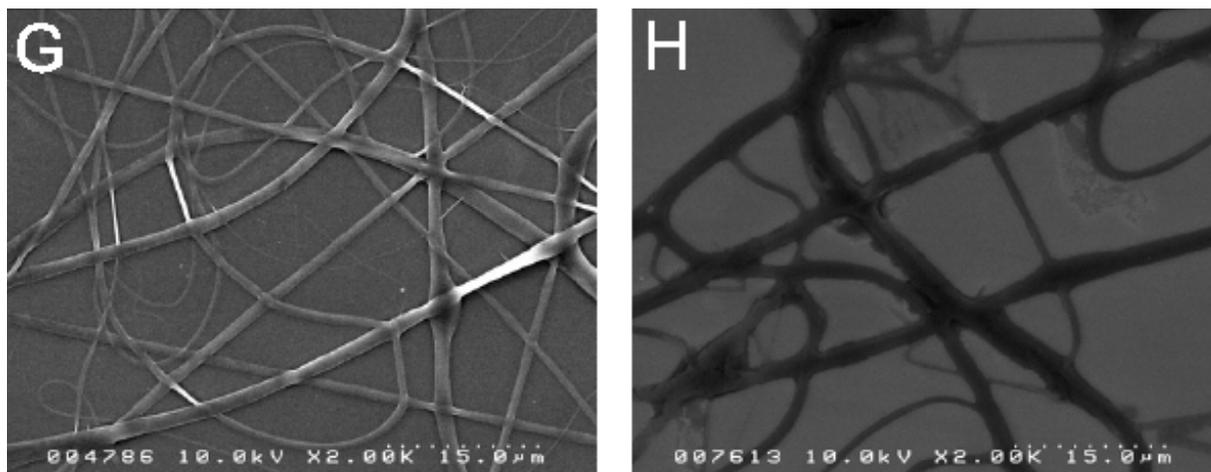


Abb. 3.7 (Fortsetzung) SEM-Aufnahmen von Kollagenfasern gesponnen aus HFIP mit Polymerkonzentrationen, (G) 70 mg/mL und (H) 80 mg/mL

Die erhaltenen Ergebnisse des Elektroverspinnens von Kollagen aus HFIP sind in folgender Tabelle und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 3.7 dargestellt:

Tabelle 3.1 Ergebnisse der mittleren Durchmesser, ihrer Verteilung und der Morphologie

Polymerkonzentration in mg/mL	mittlerer Faserdurchmesser in nm	Standardabweichung in nm	Bemerkungen zur Morphologie
10	103	± 31	häufig sphärische Verdickungen
20	159	± 54	spindelförmige Verdickungen
30	212	± 64	vereinzelte Verdickungen
40	386	± 197	keine Verdickungen
50	548	± 143	keine Verdickungen
60	880	± 330	vereinzelte Verdickungen
70	1082	± 422	keine Verdickungen
80	1556	± 625	häufig Verzweigungen und Verdickungen

Bei den niedrigen und hohen Konzentrationen ist ein Auftreten von Verdickungen zu erkennen (Abb. 3.7 A, B, H). Bei einer Konzentration von 80 mg/mL war die Viskosität der Lösung so hoch, dass ein konstantes Verspinnen nicht möglich war. An der Kanüle bildeten sich häufig Verfestigungen, die auch zu einem kompletten Verstopfen führten. Die Fasern zeigen generell eine glatte Oberflächenstruktur und sind in Konzentrationen von 30 - 70 mg/mL ohne oder nur vereinzelt mit Verdickungen versehen (Abb. 3.7 C-G).

Zur Veranschaulichung ist in Abb. 3.8 der Einfluss der Konzentration auf den Faserdurchmesser dargestellt. Es ist auffällig, dass ab einem Kollagengehalt von 60 mg/mL ein deutlicher Anstieg des mittleren Faserdurchmessers und der Standardabweichung auftritt. Eine reproduzierbare Generierung relativ einheitliche Fasern ist nicht mehr möglich. Aus diesem Grund wurde dieser Bereich (schraffierte Fläche) gekennzeichnet.

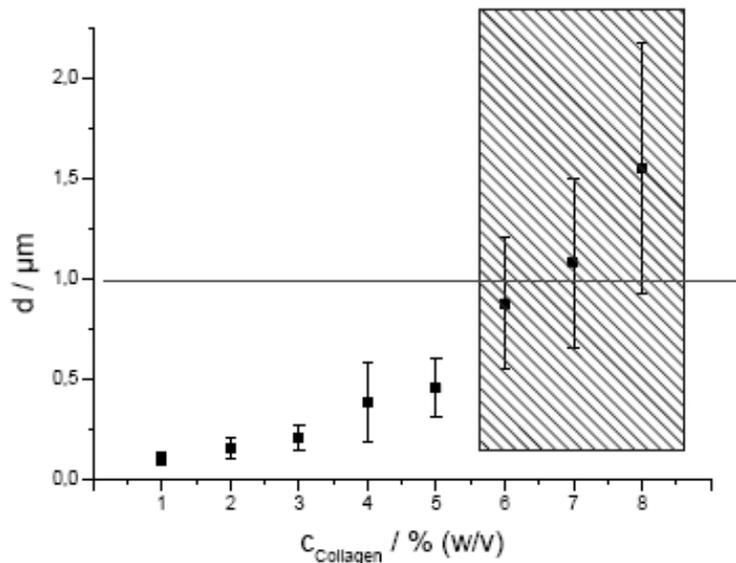


Abb. 3.8 Graphische Auftragung des mittleren Durchmessers d in Abhängigkeit der Konzentration c (1 % (w/v) entspricht 10 mg/mL)

Einen deutlichen Einfluss der angelegten Spannungsdifferenz und der Flussrate konnte beim Elektrosponnen von Kollagen aus HFIP nicht beobachtet werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für alle folgenden Experimente mit Kollagenfasern Lösungen mit einer Konzentration von 50 mg/mL verwendet. Die entsprechenden Fasern lassen keine Verdickungen erkennen, haben eine glatte Oberflächenstruktur, weisen einen mittleren Durchmesser von 548 nm und eine enge Durchmesser-Verteilung auf (Abb. 3.7 E und Abb. 3.8).

3.3.4 Wasserunlöslichkeit durch Quervernetzung der Kollagenfasern

Die mit der industriellen Gewinnung verbundene Aufarbeitung des Kollagens führt zu einer Löslichkeit in wässrigen Medien durch reduzierte Quervernetzungen. Für die Anwendung von Kollagenfasermatrizes in *in vitro* Kulturen ist eine Wasserunlöslichkeit aber unabdingbar. Aus diesem Grund ist eine Modifizierung der Fasern durch quervernetzende Reaktionen notwendig, um einen vorzeitigen Abbau der Matrix im Zellmedium zu vermeiden.

Es sind eine Reihe von Methoden zur Vernetzung von Kollagenfasern bekannt [195-200]. Eine Möglichkeit ist die Reaktion mit bifunktionalen Chemikalien, wie Glutaraldehyd (GTA), Hexamethyldiisocyanat (HMDI) und anderen. Weitere sind die Behandlung mit ultraviolettem Licht oder mit erhöhter Temperatur im Vakuum, das sogenannte Dehydrothermalverfahren (DHT). Alle drei Methoden wurden auf ihre Eignung untersucht. Die Verfahren sollten unter Erhalt der Faserstruktur eine Wasserunlöslichkeit des Kollagens bewirken.

Auf die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Methoden soll nun kurz eingegangen werden. Die Bestrahlung mit ultraviolettem Licht führt zu einer radikalischen Quervernetzung von verschiedenen Aminosäuregruppen abhängig von der eingestrahnten Wellenlänge. Vorteil dieser Methode ist die Vermeidung von Rückständen (Chemikalien) und den damit evtl. verbundenen cytotoxischen oder inflammatorischen Reaktionen der Zellen. Zu den Nachteilen ist zu sagen, dass u. a. von der Zerstörung der Kollagen- und Faserstruktur berichtet wurde [195, 198]. Beim Dehydrothermalverfahren reagieren Aminosäuregruppen (Carbonsäure-, Amid-, oder Alkoholgruppen) miteinander durch Bildung von Estern und Amiden unter Abspaltung von Wasser. Dies geschieht bei erhöhter Temperatur (110 °C) im Vakuum. Stärke dieser Methode ist wiederum die Vermeidung von Rückständen. Jedoch führt auch diese Methode zu einem partiellen Abbau von Kollagen und benötigt mit drei bis fünf Tagen auch deutlich mehr Zeit als andere Verfahren [199, 201]. Die Quervernetzung mittels bifunktionaler Chemikalien verläuft im Fall des GTA über eine Kondensationsreaktion mit den endständigen Aminogruppen der Lysinseitenketten durch Bildung von Iminen unter Wasserabspaltung [197, 202]. Beim HMDI ist der angenommene Mechanismus eine Additionsreaktion mit Alkoholgruppen zu Carbamaten oder mit primären Aminen zur Harnstoffgruppe [202].

Diese Behandlungen führen zu stabilen Quervernetzungen und zu Wasserunlöslichkeit des Kollagens. Aufgrund der hohen Reaktivität der Chemikalien und der nicht quantitativen

Umsetzung muss eine Aufarbeitung erfolgen. Generell sind Rückstände in der Matrix problematisch, da sie cytotoxische Effekte auslösen können [200].

Nachteil aller Verfahren ist, dass durch Vernetzungsreaktionen jegliche Proteine denaturiert werden. Eine Immobilisierung von beispielsweise Wachstumsfaktoren kann dementsprechend erst nach der Quervernetzungsreaktion erfolgen, wodurch ein direktes Einspinnen von Proteinen, wie z. B. bei einer PLLA-Matrix, unmöglich ist.

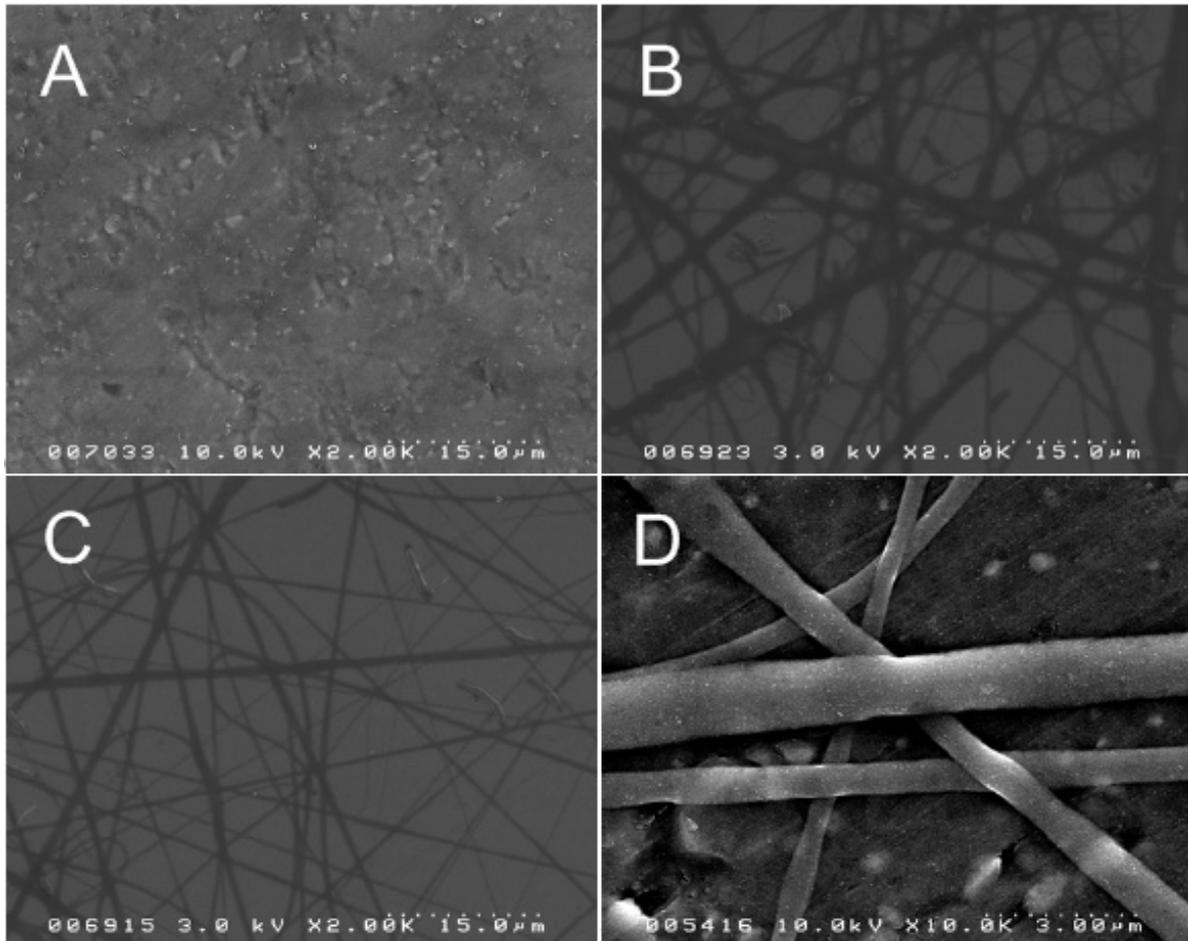


Abb. 3.9 SEM-Aufnahmen der quervernetzten Kollagenfasern nach 24 h in Wasser nach (A) UV-Bestrahlung für 2 h, (B) GTA-Behandlung, (C) HMDI-Behandlung, (D) DHT

Um die Tauglichkeit der verschiedenen Verfahren zu überprüfen, wurden Löslichkeitsexperimente an den quervernetzten Kollagenfasern durchgeführt. Die Proben wurden nach der Durchführung der Quervernetzungsverfahren für 24 h in Wasser eingelegt und anschließend elektronenmikroskopisch betrachtet. Wie in Abb. 3.9 zu erkennen, wurde durch die UV-Bestrahlung (A) die Faserstruktur zerstört. Der Strukturverlust war bei allen

UV-Proben aufgetreten. Auch eine Bestrahlung mit verschiedenen Wellenlängen oder Zeitdauern führte zu keinem anderen Ergebnis. Bei den anderen Verfahren (Abb. 3.9 B-D) konnte eine Wasserunlöslichkeit unter Erhalt der Faserstruktur beobachtet werden. Anzeichen einer Auflösung oder eines Verschmelzens der Fasern wurden nicht festgestellt.

3.3.5 Testungen der Zellverträglichkeit der quervernetzten Kollagenmatrices

Für den Einsatz der quervernetzten Kollagenmatrices in weiteren Experimenten ist es notwendig, die Verträglichkeit der Fasern und der angewandten Vernetzungsverfahren mit hMSC zu testen.

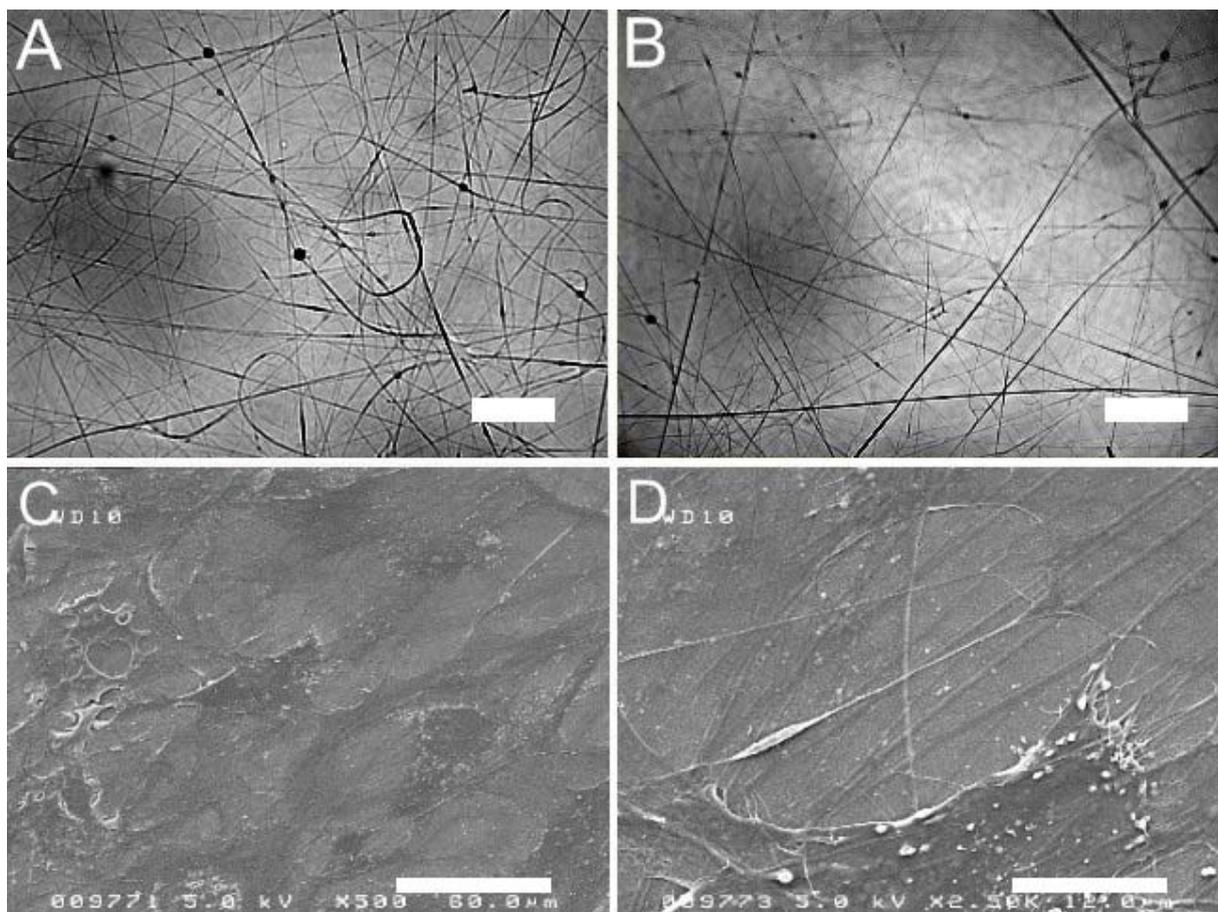


Abb. 3.10 Lichtmikroskopische (A, B) und elektronenmikroskopische Aufnahmen (C, D), der DHT-Verfahren behandelten Kollagenmatrix nach 11 bzw. 32 Tagen der Zellkultur. Der Maßstab entspricht 100 μm bei A und B, 60 μm bei C und 12 μm bei D

Neben der Zellkompatibilität sind das Proliferations-, sowie das Abbauverhalten der Matrix von Interesse. Für diese Untersuchungen wurden Kollagenfasern auf Glasplättchen versponnen und mit GTA, HMDI und dem DHT-Verfahren behandelt. Anschließend wurde die Matrix auf den Glasplättchen fixiert und einer Plasmasterilisation unterzogen. Die MSC wurden mit einer Dichte von $3 \cdot 10^4$ Zellen/cm² ausgesät und mit Wachstumsmedium kultiviert.

In Abb. 3.10 ist die thermisch behandelte Fasermatte nach 11 Tagen (A) und nach 32 Tagen (B) der Kultivierung ohne Zellen zu sehen. Eine morphologische Veränderung oder Anzeichen einer Degradation konnten nahezu nicht beobachtet werden. Der Vergleich mit den chemisch behandelten Matrices (Abb. 3.11 A, B) lässt den Eindruck aufkommen, dass ein thermisches Vernetzen zu einer etwas geringeren Stabilität der Fasern führt. Der Faserkontrast scheint reduziert.

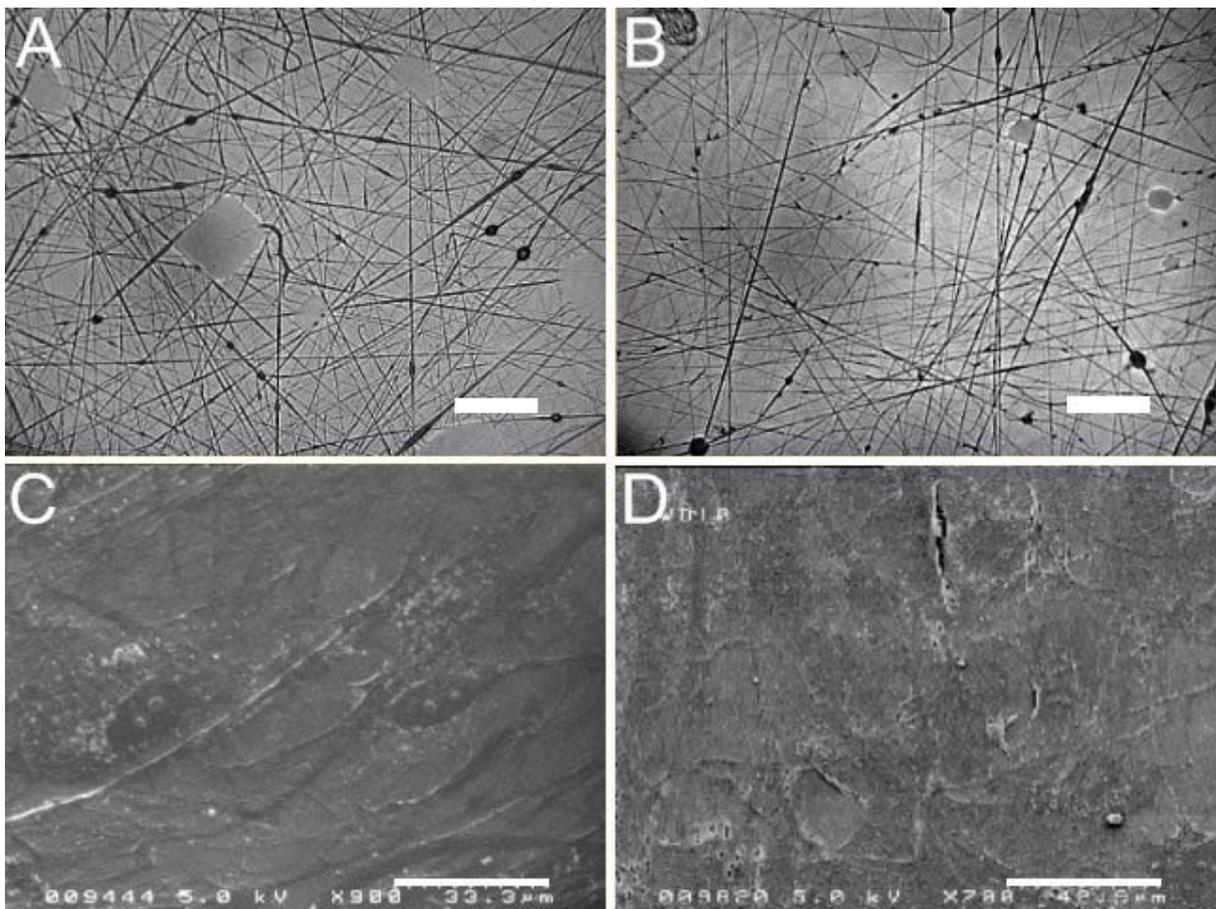


Abb. 3.11 Lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Aufnahmen der mit GTA (A, C) und HMDI (B, D) behandelten Kollagenmatrix nach 32 Tagen der Zellkultur. Der Maßstab entspricht 100 µm bei A und B, 33 µm bei C und 40 µm bei D

Die mit GTA und HMDI behandelten Fasern weisen keine erkennbaren Veränderungen auf. Auch bei der Kultivierung mit Zellen sind nach 32 Tagen die Fasermatrices deutlich zu erkennen (Abb. 3.10 D und Abb. 3.11 C, D).

Die Kultivierung führte bei allen Proben zu einer Adhäsion und Proliferation der angesiedelten MSC. Jedoch scheinen die Vernetzungsmethoden einen Effekt auf die Zellkultur zu zeigen. Während mit dem DHT-Verfahren eine konfluente Zellschicht nahezu ohne Freiräume nach 32 Tagen zu beobachten war (Abb. 3.10 C), war dies bei den mit GTA und HMDI behandelten Proben nur eingeschränkt der Fall. So sind die Kollagenfasern in größerer Anzahl und auch deutlicher, bedingt durch einen weniger dichten Zellrasen, in den lichtmikroskopischen Aufnahmen erkennbar. Nach 23 Kulturtagen war ein gehemmtes Wachstum gegenüber den DHT-Proben zu registrieren. Die verminderte Proliferation der MSC muss auf Rückstände der Vernetzungschemikalien zurückgeführt werden. Obwohl eine Aufarbeitung nach der Reaktion durchgeführt wurde, scheinen negative Effekte auf Zellkulturen, aufgrund der hohen Reaktivität und der damit verbundenen Cytotoxizität, nicht ausgeschlossen.

Für die Wasserunlöslichkeit der Kollagenfasern durch Quervernetzung scheinen sowohl die Methoden mit Chemikalien, als auch das Dehydrothermalverfahren geeignet zu sein. Die Testungen der Zellkompatibilität zeigten jedoch, dass mit dem DHT-Verfahren eine bessere Zellproliferation zu beobachten ist. Aus diesem Grund wurde diese Methode für weitere Experimente bevorzugt, obwohl eine reduzierte Stabilität im Vergleich zu den chemisch vernetzten Fasern anzunehmen ist.

Für Beschreibungen des Kollagensystems in allen Details sei auf die Diplomarbeit von D. HUSSAIN verwiesen [190].

3.3.6 Kultivierung von hMSC auf Fasermatrices, der Vergleich von Kollagen und PLLA

Um die Eignung des Kollagenfaservlieses als *Tissue Engineering Scaffold* zu überprüfen wurde eine Kultivierung mit MSC, im Vergleich zur bereits etablierten PLLA-Matrix, vorgenommen und bezüglich Zellwachstum und Markerexpression untersucht. Als

Kontrollgruppe diente eine nicht modifizierte Glasoberfläche (Glasplättchen). Die Kulturbedingungen wurden bereits in Kapitel 3.2.4 beschrieben.

Die verglichenen Matrices wiesen einen mittleren Faserdurchmesser von 765 ± 235 nm bei PLLA und 548 ± 143 nm bei Kollagen auf. Die entsprechenden Kontaktwinkel lagen bei $124,6 \pm 5,7^\circ$ bzw. $64,8 \pm 3,0^\circ$.

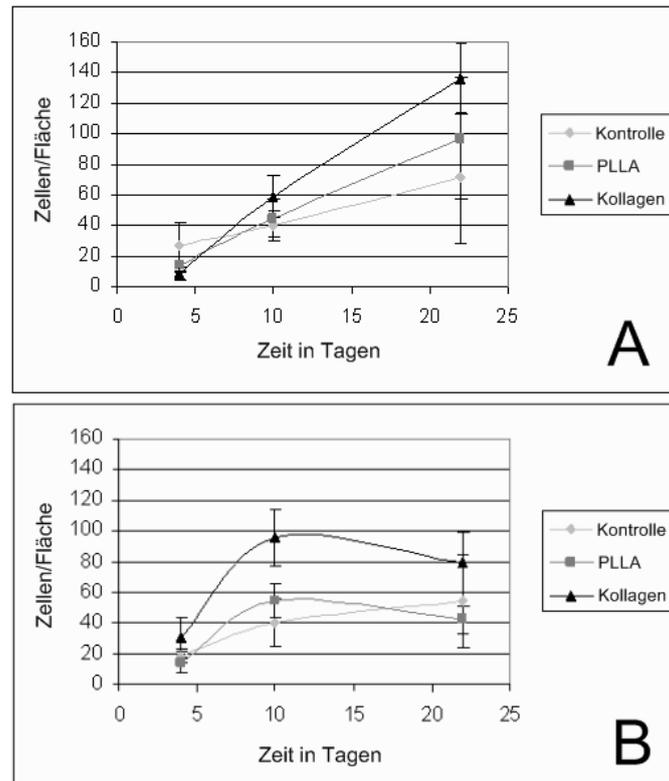


Abb. 3.12 Zeitverlauf der MSC-Proliferation unter Wachstums- (A) und Differenzierungsbedingungen (B). Die Zelldichten wurden durch Auszählen der Zellkerne (DAPI) auf einer Einheitsfläche bestimmt.

Die Kollagenmatrix zeigt in der Mitte und zum Ende der Kulturdauer sowohl unter Wachstumsbedingungen als auch unter Differenzierungsbedingungen die höchsten Zelldichten (Abb. 3.12). Dementsprechend scheint die Proliferation im Vergleich zur PLLA-Matrix und auch zur Glaskontrolle durch Kollagen gefördert worden zu sein. Auffällig ist bei den Fasermatrixes die mit fortschreitender Differenzierung wieder abnehmende Zellzahl unter

osteinduktiven Bedingungen (Abb. 3.12 B), was bei der Kontrollgruppe nicht beobachtet wurde.

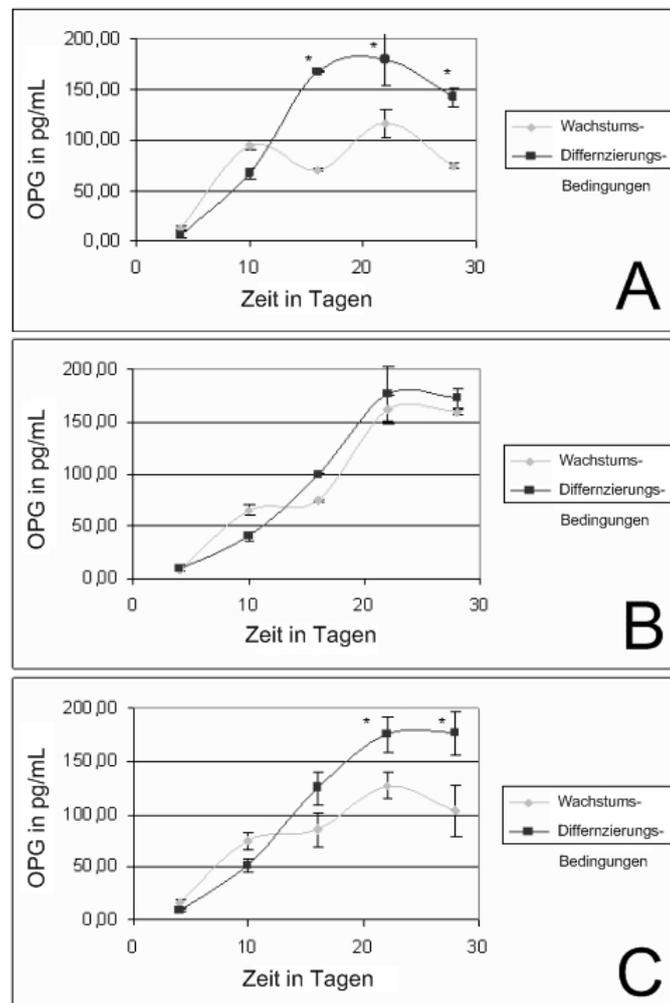


Abb. 3.13 Zeitverlauf der OPG-Expression unter Wachstums- und Differenzierungsbedingungen bei PLLA (A), Kollagen (B) Fasermatrices und der Glaskontrolle (C). OPG wurde an verschiedenen Zeitpunkten durch ELISA bestimmt.

Während im Verlauf der Kulturdauer bei den PLLA-Fasern (Abb. 3.13 A) und der Glaskontrolle (C) eine signifikant erniedrigte OPG-Expression unter Wachstumsbedingungen im Vergleich zu Differenzierungsbedingungen vorliegt, ist dies bei der Kollagenmatrix (B) nicht zu erkennen. Hier liegen die Expressionswerte nahezu auf gleichem Niveau. Dieses spricht für einen osteoinduktiven Effekt der Kollagenfasern. Die Genexpression der Marker AP, OC und COL-I zeigt verglichen mit der Glaskontrolle bei der PLLA-Matrix keine

nennenswert erhöhten Werte (Abb. 3.14 A-C). Bei der Kollagenmatrix sind dagegen ab Tag 10 erhöhte Werte besonders unter Wachstumsbedingungen zu beobachten (Abb. 3.14 D-F). Zusammenfassend kann man sagen, dass bei der Besiedelung von Kollagenmatrices mit hMSC vor allem unter Wachstumsbedingungen die Zellproliferation, die OPG-Produktion und die Genexpression von AP, OC und COL-I erhöht sind, während bei PLLA-Fasern kein Effekt beobachtet werden konnte. Von den Kollagenfasern scheinen dementsprechend eine osteogene Induktion und ein verbessertes Zellwachstum auszugehen. An Kollagenfilmen wurden diese Effekte ebenfalls bereits beobachtet [203].

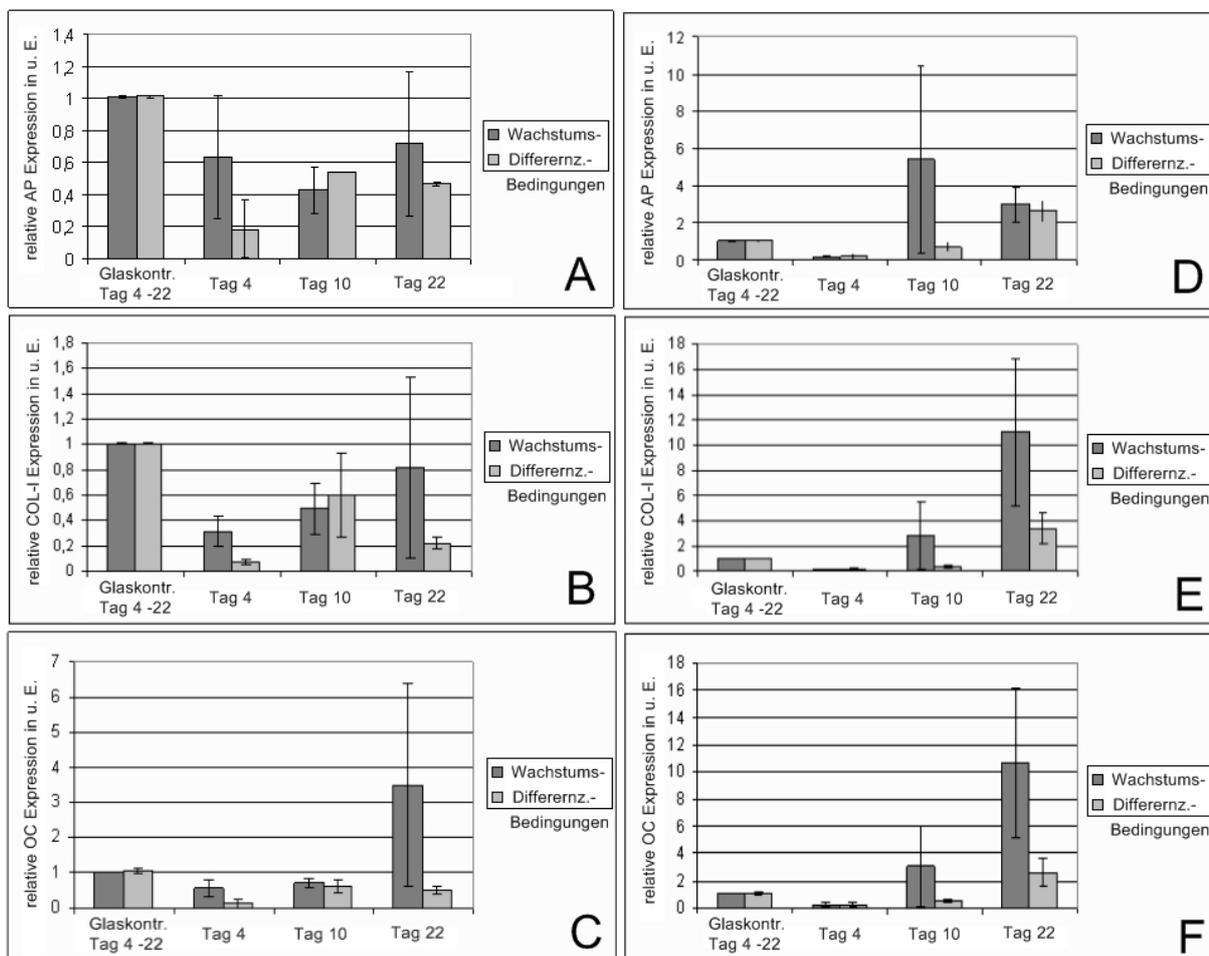


Abb. 3.14 Zeitverlauf der Genexpression der Differenzierungsmarker AP und OC und dem Matrixprotein COL-I unter Wachstums- und Differenzierungsbedingungen bei PLLA (A-C) und Kollagen (D-F) Fasermatrices. Die Bestimmung erfolgte durch RT-PCR.

Auffällig war allerdings, dass chargenabhängig ein Abbau der Kollagenmatrix bereits zum Ende der Kulturdauer von 32 Tagen zu beobachten war. In Abb. 3.15 sind Glassubstrate mit

fixierter Kollagenmatrix in *12-well-plates* zu erkennen. Die Matrices zeigen deutliche Auflösungsanzeichen, die Glasträger sind nicht mehr komplett bedeckt (Trübung), wie es beispielsweise bei der Probe am unteren linken Bildrand der Fall ist. Häufig sind nur noch der Rand, der auf die Fixierung mit PLLA zurückzuführen ist, oder ein großer Anteil Matrixfreier Flächen auf den Substraten vorhanden. Da dies nicht bei allen Experimenten auftrat, muss von einer nicht reproduzierbaren Stabilität der Matrix entweder durch die Charge des Kollagenausgangsmaterials oder durch das DHT-Verfahren ausgegangen werden.

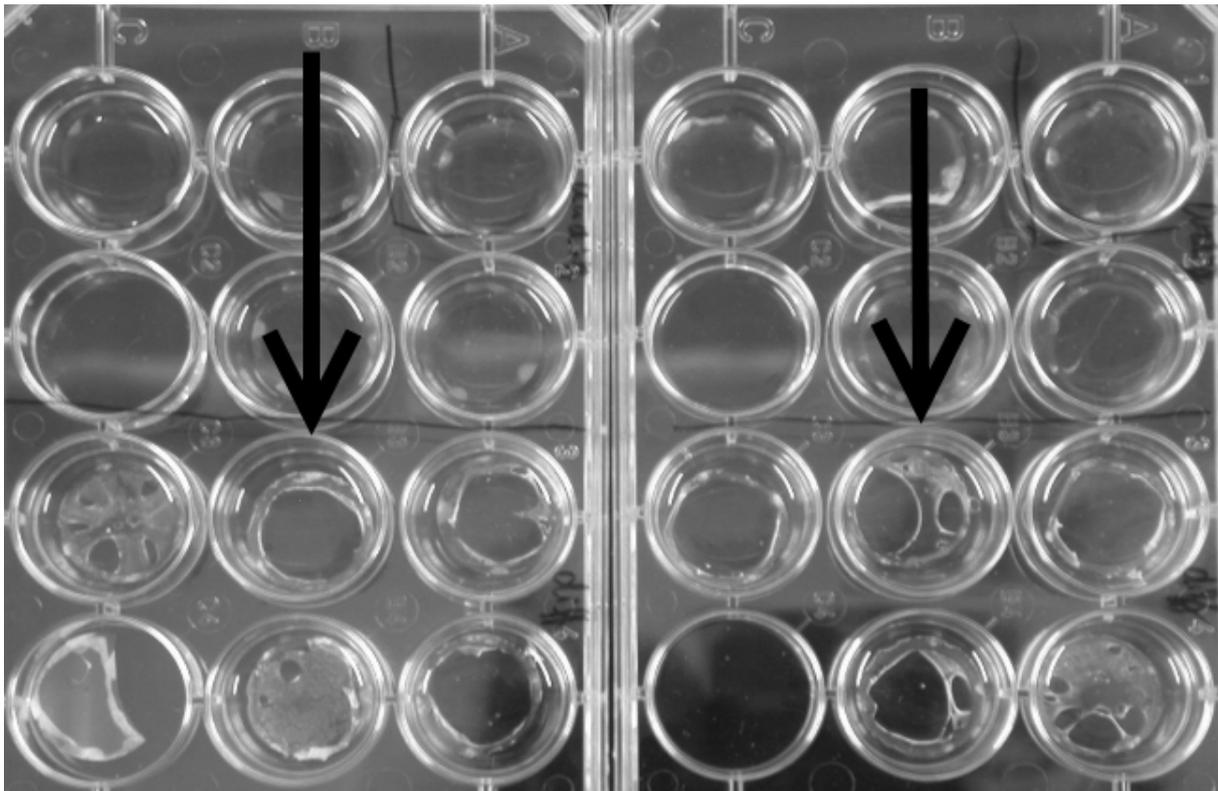


Abb. 3.15 Teilweise zerstörte Kollagenmatrices am Ende der Kulturdauer von 32 Tagen

3.4 MSC-Kultivierung mit einer dreidimensionalen Matrix

Um einen anwendbaren Knochenersatz zu erzeugen, ist eine plastische Form entscheidend. Ermöglicht werden kann dies durch die Verwendung einer dreidimensionalen Matrix, die den wachsenden Zellen die Zielstruktur vorgibt. Arbeiten von R. DERSCH in Zusammenarbeit mit CH. WACK und PD Dr. U. BOUDRIOT haben gezeigt, dass eine unmodifizierte Fasermatrix mit Ausdehnungen von einigen Millimetern bei der Besiedelung mit humanen mesenchymalen Stammzellen in einem Perfusionssystem kein Einwachsen der Zellen zulässt, da die Poren der Matrix keine ausreichende Größe aufweisen [35]. Notwendig ist eine zumindest teilweise offenporige oder lose Struktur, die aber trotzdem über eine ausreichende mechanische Formstabilität verfügt. Unter Verwendung des, bereits in der Einleitung erwähnten, perforierten Metallblechs als Gegenelektrode ist es möglich, die benötigte Matrixstruktur zu erhalten (Abb. 2.10). Der experimentelle Versuch mit der Kultivierung von MG-63 Osteosarkomzellen in einer dreidimensionalen PLLA-Matrix zeigte zwar nur ein vereinzeltes Einwachsen lebender Zellen, bewies aber die prinzipielle Machbarkeit [35]. Ziel dieser Arbeit sollte es sein, die Porengrößen konventionell und modifiziert gesponnener 3D-Matrices zu bestimmen und ein mögliches Einwachsen von humanen mesenchymalen Stammzellen zu untersuchen.

3.4.1 Generierung einer zellbesiedelten dreidimensionalen PLLA-Matrix

Zur Erzeugung einer dreidimensionalen PLLA-Matrix wurde ein perforiertes Aluminiumblech unter normalen Spinnbedingungen besponnen (Abb. 2.10). Die mit dichten und weniger dichten Faserbereichen aufgebaute Matrix wurde in einer sterilen Werkbank auf Objektträger übertragen und fixiert. Eine Vorkultivierung mit humanen MSC für vier Tage fand statt (Abb. 3.16).

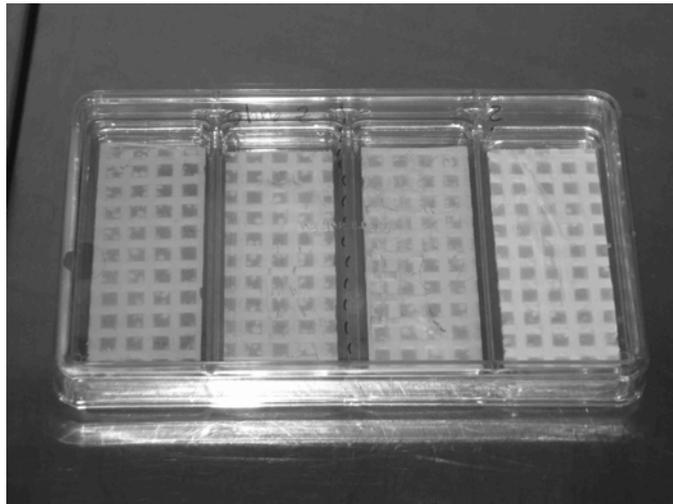


Abb. 3.16 Auf Objektträger fixierte 3D-Matrix

Danach wurde die oberflächenbesiedelte Matrix zu einem Konstrukt mit Ausmaßen von mehreren Millimetern zusammengerollt und in eine Probenkammer kultiviert (Abb. 3.17 links), die mittels einer Peristaltikpumpe konstant mit Medium aus einem Vorratsbehälter durchspült wurde (Abb. 3.17 rechts).



Abb. 3.17 Aufnahme der Probenkammer (links) und des Perfusionsystems (rechts)

3.4.2 Generierung einer dreidimensionalen Kollagenmatrix

Die Erzeugung einer dreidimensionalen Kollagenmatrix stellte sich als kompliziertes Unterfangen heraus. Die bei ersten Versuchen durch Besspinnen des perforierten Aluminiumblechs erhaltenen Matrices konnten weder direkt nach dem Spinnprozess noch nach der Quervernetzung durch thermische oder chemische Behandlung unter Erhalt der Struktur abgelöst werden. Jeder Versuch, mit einer Pinzette die Matrix abzuheben, führte zu einem Zerreißen und nur winzige Bruchstücke ($< 1\text{ mm}$) wurden abgetrennt. Im Fall der thermisch vernetzten Fasermatte war ein Loslösen vom Metallblech nicht möglich.

Weitere Tests mit einer Parafilm-modifizierten Gegenelektrode erwiesen sich als besser geeignet. Durch Verstrecken des Parafilms wurde eine hauchdünne Lage auf dem Metallblech aufgebracht und mit Kollagen für mind. 2,5 h besponnen. Nach der Quervernetzung mit GTA und einer Trocknung im Vakuum konnte die Kollagenmatrix problemlos abgelöst werden.

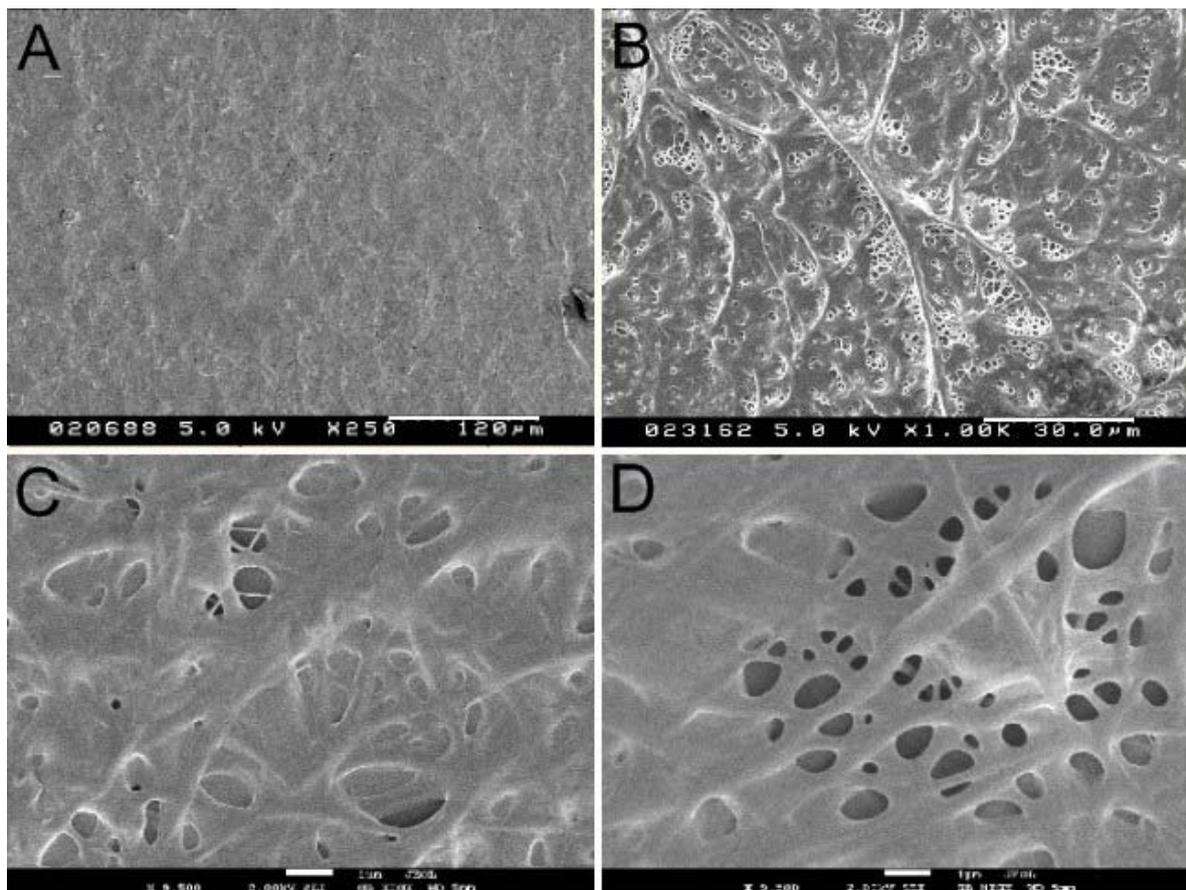


Abb. 3.18 SEM-Aufnahmen einer dreidimensionalen Kollagenmatrix nach der GTA-Vernetzung (A und B) und direkt nach dem Elektrosponnen (C und D). Maßstab entspricht 120 μm bei A, 30 μm bei B und 1 μm bei C und D

Die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigte, dass die Erzeugung einer dreidimensionalen Kollagenmatrix mit einem Verlust der Faserstruktur verbunden war, wie in Abb. 3.18 (A und B) zu erkennen ist. Vereinzelt ist ein faserartiger Aufbau der entstandenen Membran noch zu erkennen (Abb. 3.18 B). Eine Verfilmung der Matrix war bei allen dreidimensional gesponnenen Proben zu beobachten. Auch die Variation der Zeitdauer der GTA-Vernetzung führte zu keinen anderen Ergebnissen.

Bei der Betrachtung von Fasermatten direkt nach dem Spinnprozess (Abb. 3.18 C und D) bestätigte sich der Eindruck, dass die bei längeren Spinnzeiten abgeschiedenen Fasern mit den darunterliegenden Faserschichten unter Filmbildung verschmelzen. Auch der Versuch bei geringer rel. Luftfeuchtigkeit (<20%) zu arbeiten, um eine zügigere Verdampfung des Lösungsmittels zu gewährleisten, konnte diesen Effekt nicht vermeiden.

Die Verfilmung und die schwache Integrität der dreidimensionalen Kollagenmatrix machen einen anderen Ansatz notwendig.

3.4.3 Bestimmung der Porengrößen der dreidimensionalen Matrices

Die Porengrößen und deren Verteilung wurden bei einer unmodifizierten (unmod.) und bei einer auf ein Aluminiumlochblech (modifiziert, mod.) gesponnenen Fasermatte mit einem Porometer AEXL 1200 der Firma PMI bestimmt (siehe Abb. 3.19). Der mittlere Porendurchmesser der beiden Matrices lag bei 11,6 μm (unmod.) bzw. 12,0 μm (mod.). Die größten Poren wurden bei 23,1 μm (unmod.) und 33,0 μm (mod.) gemessen. Die Verteilungen sind bimodal mit einem Maximum beim mittleren Porendurchmesser. Ein zweites deutlich weniger ausgeprägtes Maximum liegt bei etwa 3,5 - 3,7 μm , welches bei der modifizierten Matrix nahezu nicht ausgeprägt ist.

Beim Vergleich der beiden Matrices fällt auf, dass durch das Elektrosponnen auf ein Aluminiumlochblech die Verteilung der Porengrößen auf der Seite der zunehmenden Größe verbreitert wurde. Auch die maximale Porengröße wurde wie schon beschrieben erhöht, wobei aber der mittlere Porendurchmesser nahezu unverändert bleibt. Es wurde also eine Vergrößerung der Poren durch das modifizierte Elektrosponnen bewirkt, auch wenn der Anteil dieser an der Gesamtporenverteilung nur gering ist.

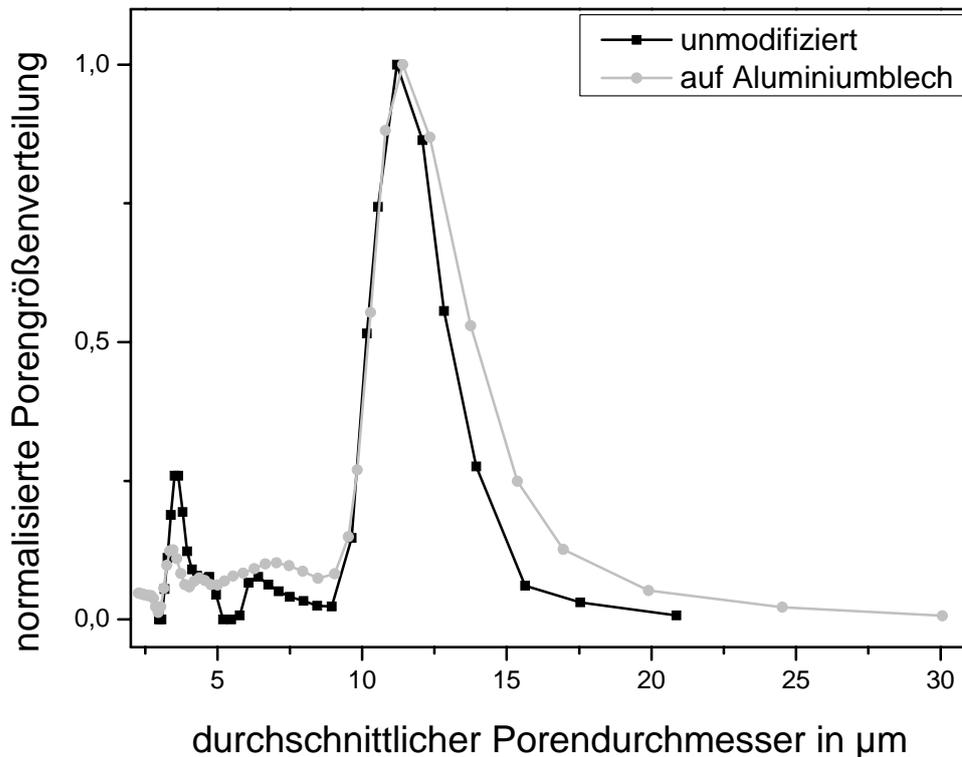


Abb. 3.19 Porengrößenverteilung einer unmodifizierten und einer auf ein Aluminiumlochblech gesponnenen Fasermatte

3.4.4 Ergebnisse der mit MSC kultivierten dreidimensionalen Matrix

Mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden Schnitte durch die dreidimensionale Matrix nach zehntägiger Kultivierung im Perfusionssystem auf ein Einwachsen von hMSC untersucht. In Abb. 3.20 sind deutlich angefärbte Zellkerne zu erkennen (mit Pfeilen markiert). Auch die Faserrückstände sind zart rosa angefärbt zu erkennen. Die elektronenmikroskopische Untersuchung wurde mit einem SEM (JSM-7500F von JEOL) mit Kryo-Transfereinheit (von GATAN) durchgeführt. Dazu wurden die in Wasser gelagerten Proben mit unterkühltem flüssigem Stickstoff ausgefroren und innerhalb einer gekühlten SEM-Vorkammer ein Gefrierbruch unter Zuhilfenahme eines Skalpells durchgeführt. Es folgte nach einer Sublimation für 12 min bei $\Delta T = 100$ K eine Platinbedampfung und die Probe wurde an der Bruchstelle betrachtet.



Abb. 3.20 HE-Färbung eines Schnitts durch eine, in Paraffin eingebettete, 3D-Matrix

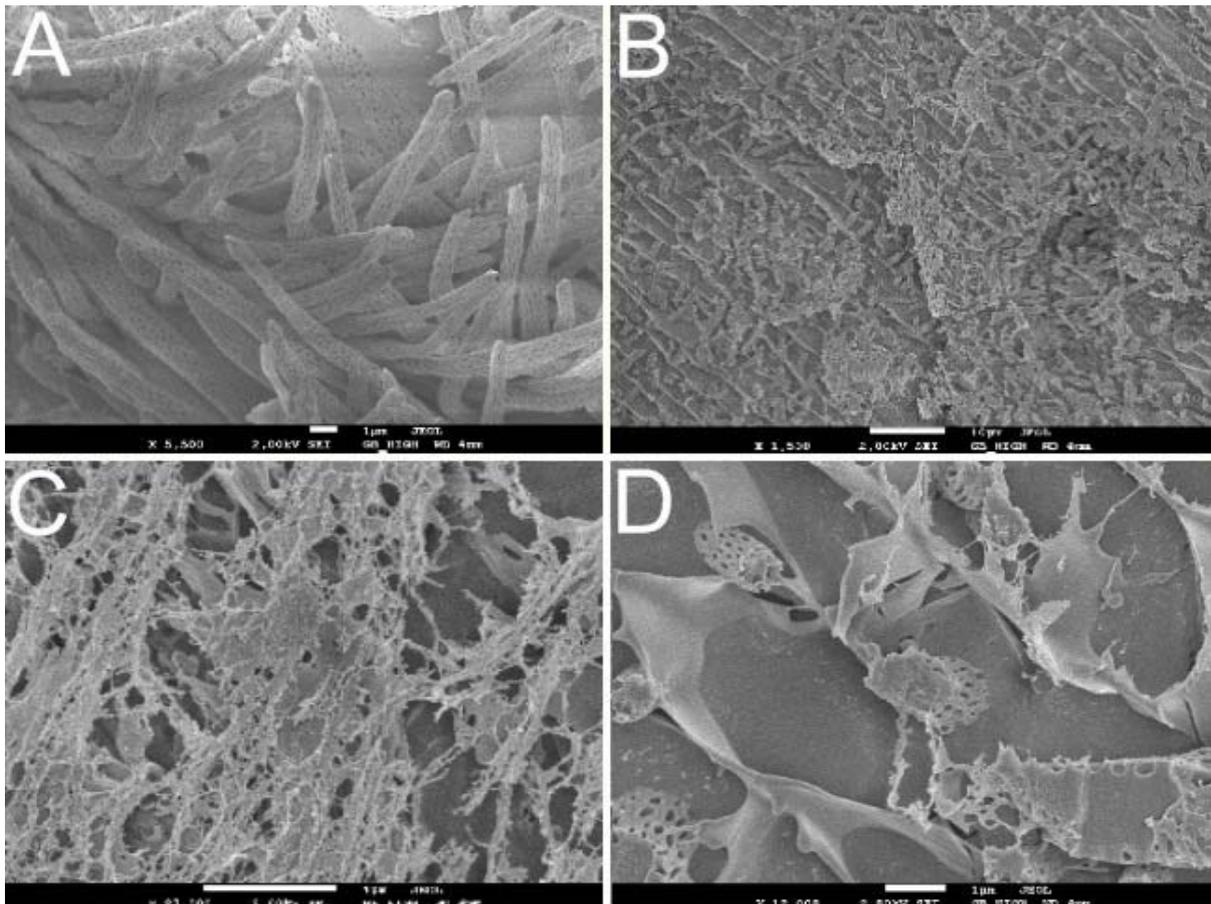


Abb. 3.21 Kryo-SEM an einem Gefrierbruch der 3D PLLA-Matrix. Maßstab entspricht 1 µm bei A, C, D und 10 µm bei B

In Abb. 3.21 (A) sind die gebrochenen PLLA-Fasern und ein fein ausgeprägtes Netzwerk zwischen den Matrixfasern (B-D) zu erkennen. Dies ist wohl auf exprimierte Matrixproteine der Zellen zurückzuführen (in C sehr gut zu erkennen). Häufig traten auch geordnete Strukturen auf, wie in Abb. 3.21 (D) zu sehen. Eine Zuordnung dieser Formationen konnte nicht vorgenommen werden.

Das Matrixproteingeflecht trat an vielen Stellen des betrachteten Bruchs auf und spricht für eine Besiedelung mit MSC. Zellen konnten jedoch in dieser Untersuchung nicht direkt beobachtet werden. Möglicherweise muss eine andere Zellfixierung vorgenommen werden um ein vorzeitiges Ablösen zu vermeiden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Annahme, dass die Zelldichte an dem betrachteten Ort nicht ausreichend groß war.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine dreidimensional besiedelte Matrix erhalten werden konnte. Die HE-Färbung aus Abb. 3.20 zeigt das Vorhandensein von Zellen im Matrixkonstrukt. Mittels elektronenmikroskopischer Auswertung konnten Ablagerungen von Matrixproteinen beobachtet werden.

Für eine Analyse der Zelldichte müssten weitere Experimente vorgenommen und die Methodik des Gefrierbruchs optimiert werden.

3.5 Entwicklung einer PLLA-Kollagen-Matrix

Die Kollagenmatrix weist, wie bereits vorgestellt, bezüglich Stabilität und Strukturverlust Mängel auf, besitzt aber in der Zellkultur von MSC vorteilhafte Eigenschaften, wie beispielsweise die Osteoinduktivität. Um diese Überlegenheit im Vergleich zu anderen Materialien zu erhalten, aber gleichzeitig eine verbesserte Matrixstabilität zu gewährleisten, wurde der Versuch unternommen, elektrogenesponnene Fasern aus einem Blend von Poly(L-lactid) und Kollagen zu erzeugen. Zu diesem Zweck wurden Mischungen mit verschiedenen Zusammensetzungen versponnen und die Eignung zur Kultivierung von hMSC getestet. Eine Beschreibung der Ergebnisse kann hier nicht erfolgen, da die Versuche momentan noch ausgeführt und ausgewertet werden. Eine generelle Zellkompatibilität konnte aber bereits beobachtet werden.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung von in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) bei 37 °C eingelegten Blends (Zusammensetzung 1:1) zeigt ein über die Zeit zunehmendes Herauslösen der Kollagenphase, wie in Abb. 3.22 dargestellt. Am Tag vier des Experiments weisen die Fasern noch keine Degradationserscheinungen auf (Abb. 3.22 A und B). Die Faseroberfläche ist strukturiert (B). Am achten Tag ist eine beginnende Verfilmung zwischen den Fasern zu erkennen (C und D), welche sich am Tag zwölf weiter fortführt (E und F) und am Tag 16 bereits weite Teile der Matrix betrifft (G und H). Die Fasern zeigen am Tag 16 eine deutlich verstärkte Strukturierung im Vergleich zu Tag 4 (H), was wahrscheinlich auf das Herauslösen des Kollagens und dessen Filmbildung zwischen den Fasern zurückzuführen ist. Diese ausgebildete Membran könnte mit positiven Effekten der Zellkultivierung verbunden sein, da auch im natürlichen Gewebe die Zellen von einer Kollagenmatrix umgeben sind. Es sind, um endgültige Aussagen zu treffen, aber noch die Ergebnisse der aktuell laufenden Versuche notwendig.

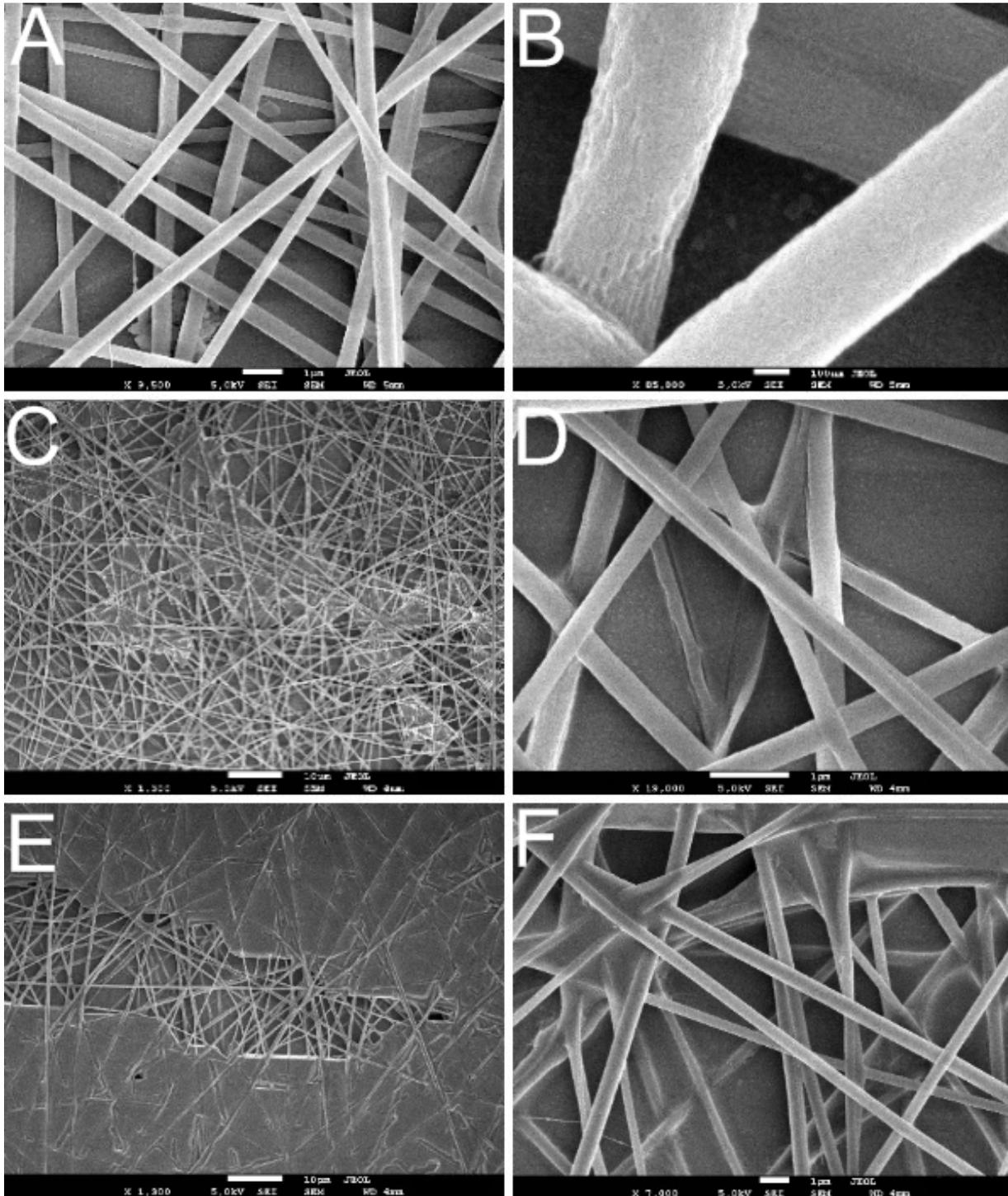


Abb. 3.22 SEM-Aufnahmen von in PBS eingelegten PLLA-Kollagen-Blendfasern (1:1) nach 4 Tagen (A und B), 8 Tagen (C und D) und 12 Tagen (E und F) (wird auf der nächsten Seite fortgesetzt). Maßstab entspricht 100 nm bei B, 1 µm bei A, D, F und 10 µm bei C, E

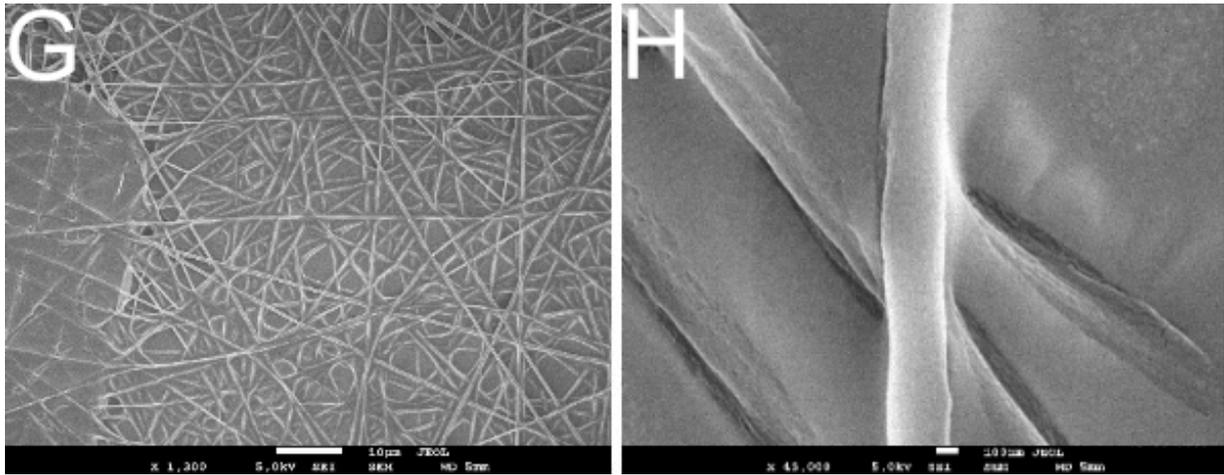


Abb. 3.22 (Fortsetzung) SEM-Aufnahmen von in PBS eingelegten PLLA-Kollagen-Blendfasern (1:1) nach 16 Tagen (G und H). Maßstab entspricht 100 nm bei H und 10 µm bei G

3.6 Zusammenfassung zu den *Bone Tissue Engineering* Projekten

Das, in Zusammenarbeit mit der Orthopädie Marburg, bereits etablierte Matrixsystem auf Basis von Poly(L-lactid) zur *in vitro* Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen und deren osteoblastäre Differenzierung wurde dahingehend erweitert, dass es möglich ist, eine Immobilisierung des Wachstumsfaktors BMP-2 in der Matrix vorzunehmen. Es wurde bei der Kultivierung mit hMSC ein osteoinduktiver Effekt des Wachstumsfaktors festgestellt, obwohl keine Freisetzung beobachtet wurde. Für die Wirkstoffeinbringung musste eine Elektrospinanlage entwickelt werden, die innerhalb einer sterilen Werkbank betrieben werden kann. Als mögliches Modell für den immobilisierten Wachstumsfaktor wurde auf gleiche Weise ein Fluoreszenz-markiertes Modellprotein eingebracht und die Verteilung in den Fasern untersucht.

Des Weiteren wurde das EZM-Protein Kollagen auf seine Tauglichkeit als Matrixmaterial für hMSC getestet. Eine prinzipielle Eignung konnte beobachtet werden. Eine osteogene Induktion und ein verbessertes Zellwachstum wurden festgestellt. Aufgrund von unzureichender Stabilität und Anwendbarkeit der Kollagenmatrix wurde das System zu einer Mischmatrix aus PLLA und Kollagen weiterentwickelt, die momentan auf ihre Eignung untersucht wird.

Das bereits existierende System zur dreidimensionalen Matrixbesiedelung im Perfusionssystem wurde mit hMSC getestet und die, durch modifiziertes Elektrosponnen erhaltene, strukturierte Matrix wurde auf Veränderungen der Porengrößen untersucht. Im Vergleich wurde eine Tendenz zu größeren Poren festgestellt. Ebenso konnte eine dreidimensionale Besiedelung der Matrix direkt durch Anfärbung von Paraffinschnitten und indirekt über die Matrixexpression durch SEM-Aufnahmen an einem Gefrierbruch nachgewiesen werden.

4 Elektrogenessponnene strukturierte Fasermatrices für die Kultivierung von Myoblasten

4.1 Motivation und Zielsetzung

Eine Zusammenarbeit mit Dr. J. BEIER von der CHIRURGISCHEN UNIVERSITÄTSKLINIK ERLANGEN führte zu der Motivation die elektrogenessponnenen Polymermatrices für andere Zelltypen, in diesem Fall Myoblasten, anzuwenden.

So soll die Matrixstruktur und das verwendete –material eine geeignete Umgebung bieten und bei fortschreitender Generierung des natürlichen Gewebes einem biokompatiblen Abbau unterliegen. Die Möglichkeit, über eine parallel ausgerichtete Fasermatrix eine Orientierung der kultivierten Zellen zu erhalten ist bei Muskelzellen ein Punkt von besonderem Interesse. Eine prinzipielle Machbarkeit wurde bereits mit Osteosarkomzellen nachgewiesen [35]. Hierdurch könnte bei angestrebter Fusion der Myoblasten zu mehrkernigen Myotuben eine längsparallele Zellausrichtung induziert werden. Des Weiteren sollte das Matrixmaterial bioabbaubar sein, der extrazellulären Matrix ähnlich sein und den Kräften, die bei der Kontraktion von differenzierten Muskelzellen auftreten, standhalten. Eine Vaskularisation ist bei Generierung von Gewebeersatz von zentraler Bedeutung, da eine Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, sowie der Abtransport von Abfallstoffen ohne Blutversorgung nur bis zu einer maximalen Gewebetiefe von etwa 100 µm durch Diffusion gewährleistet ist [204]. Arbeiten von J. BEIER et al. haben gezeigt, dass eine Ausbildung von Blutgefäßen innerhalb einer Fibrinmatrix, die folgend mit Myoblasten besiedelt wurde, im *AV-loop*-Modell möglich ist [205].

Ziel dieses Projekts sollte der Aufbau eines Matrixsystems sein, dass zur *in vitro* und *in vivo* Kultivierung von Myoblasten angewandt werden kann. Dies beinhaltet im ersten Schritt eine bioabbaubare, myoblastenkompatible Matrix für die *in vitro* Züchtung zu entwickeln. In einem folgenden Schritt sollte ein orientiertes Zellwachstum durch Besiedlung einer Matrix mit parallel ausgerichteten Fasern auf Basis der zuvor gewonnen Erkenntnisse bezüglich der Kompatibilität mit Myoblasten erreicht werden. Aufbauend auf diesen Erfahrungen sollte das System auf eine dreidimensionale Matrixstruktur erweitert werden, um schließlich mittelfristig in dem an der UNIVERSITÄT ERLANGEN etablierten Tiermodell zur Vaskularisation einer besiedelten Matrix (*AV-loop*) Anwendung zu finden.

Alle Arbeiten zur Zellkultivierung, die immunhistologischen und mikroskopischen Auswertungen wurden durch und in enger Zusammenarbeit mit D. KLUMPP und Dr. J. BEIER, Plastisch und Handchirurgische Klinik, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ERLANGEN, durchgeführt.

4.2 Systemauswahl und Testung der Kompatibilität mit Myoblasten

Der Wunsch, ein bioabbaubares und der EZM chemisch ähnliches Material zu verwenden, führte zur Testung von Kollagen Typ I. Das Strukturprotein bildet den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix. Die zuvor gewonnenen Erkenntnisse der Kooperationspartner in Erlangen bezüglich der Verwendung von Kollagen-Fibrin-Gelen bei der Besiedelung mit primären Myoblasten der Ratte ergaben eine prinzipiell gute Eignung des Materials. Die ungeordnete Struktur induzierte jedoch keine parallele Ausrichtung der Zellen. Die bis dahin von unserer Seite gewonnenen Erfahrungen zu elektrogesponnenen Kollagenfasermatrices durch das *Bone Tissue Engineering* Projekt bezüglich Zellverträglichkeit und Anwendbarkeit waren vielversprechend. So bietet eine Matrix des Strukturproteins eine Ähnlichkeit zur natürlichen Umgebung, Bioabbaubarkeit, Zellverträglichkeit (zumindest bei MSC) und gute Verarbeitung mittels Elektrospinnen (Beschreibung der Kollagenmatrix in Abschnitt 3.3).

Für erste Adhäsions- und Proliferationstests wurden Kollagenfasern auf Glasplättchen gesponnen, so dass eine homogen bedeckte Oberfläche entstand und mit dem Dehydrothermalverfahren behandelt werden konnte. Die vernetzten Matrices wurden anschließend fixiert und für Zellkulturexperimente nach Erlangen gesendet. Bei der Verpackung für den Versand wurde darauf geachtet, dass eine Beschädigung möglichst auszuschließen ist. Dazu wurden die Plättchen in *12-well-plates* gelegt und mit verstrecktem Parafilm bedeckt, bevor der Deckel aufgesetzt wurde.

4.2.1 Ergebnisse der Kollagenmatrixbesiedelung mit primären Rattenmyoblasten

Die Myoblasten der besiedelten Matrices zeigten bereits nach 24 h der Besiedelung gute Adhärenz. Nach drei Wochen Kulturdauer wurde eine dichte Zellpopulation beobachtet (Abb. 4.1).

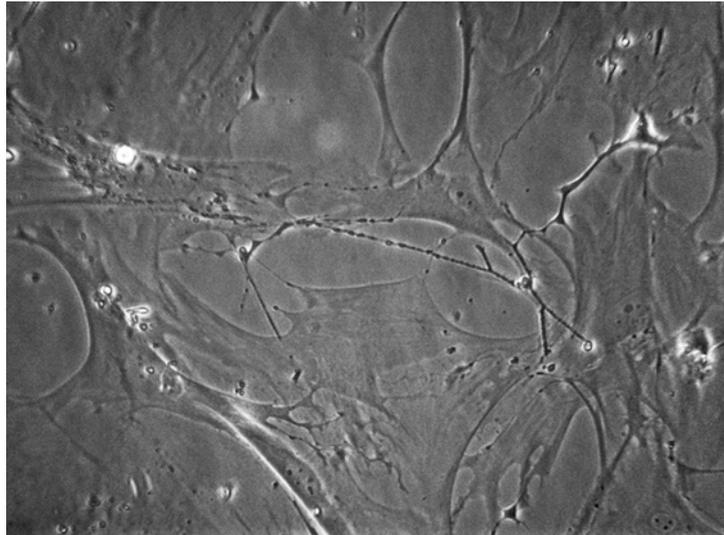


Abb. 4.1 Myoblasten-besiedelte Kollagenmatrix nach drei Wochen Kulturdauer, Phasenkontrast-Aufnahme mit 200x-Vergrößerung

Die Ergebnisse sprechen für eine prinzipielle Eignung der Kollagenmatrix für die *in vitro* Kultivierung von primären Myoblasten der Ratte. Der nächste Schritt war nun die Weiterentwicklung zu einer Matrix aus orientierten Kollagenfasern.

Der muskel-spezifische Phänotyp der Zellen konnte durch Nachweis der Expression von MyoD, einem muskelspezifischen Transkriptionsfaktor, sowie Desmin, einem muskelspezifischen Intermediärfilament, bestätigt werden. Dieser Nachweis wurde auch bei den folgenden Experimenten erbracht.

4.3 Generierung einer Kollagenmatrix aus orientierten Fasern

4.3.1 Auswahl des Orientierungsverfahrens

In der Einleitung sind verschiedene Methoden zur Orientierung der Fasern in einer Vorzugsrichtung beschrieben. Die Auswahl des Verfahrens wurde durch die Ansprüche einer Matrix zur Zellkultivierung beschränkt. Das ausgerichtete Vlies sollte für die Myoblasten-Experimente das Glasplättchensubstrat zu großen Teilen ohne Anzeichen von Bereichen deutlich geringerer Faserdichte bedecken. Die Dichte der Fasermatte muss ausreichend sein, damit die aufgebrachtten Zellen nicht die Glasoberfläche sondern nur die elektrogewebenen Fasern besiedeln. Für Folgeversuche mit dreidimensionalen Proben wäre eine Fasermattenhöhe von mehreren 100 μm notwendig.

Eine nahezu perfekte parallele Ausrichtung der Fasern läßt sich durch das Bessinnen eines leitenden Metallrahmens erreichen. Die Faserlage könnte dann durch Abheben auf dem Glassubstrat aufgebracht werden. Diese Methode ist aber auf wenige Faserschichten beschränkt und würde bedeuten, dass eine große Anzahl an Spinnvorgängen für die homogene Belegung eines einzigen Plättchens notwendig wäre. Die nahezu makellose Orientierung der Fasern würde diesen Zeitaufwand rechtfertigen. Aber im Hinblick auf weitere Versuche mit dreidimensionalen Matrices wäre diese Methode dann nicht mehr anwendbar.

Aus diesem Grund wurde sich für das Orientierungsverfahren mit einer schnell rotierenden Rolle entschieden. Hier werden die Fasern auf einem schnell rotierenden Zylinder abgeschieden. Die Geschwindigkeit der Fasererzeugung und der Zylinderoberfläche sollten nahezu übereinstimmen und führen zu einem orientierten Aufwickeln. Dadurch wird eine ausgeprägte Vorzugsorientierung erzeugt. Eine annähernd perfekte parallele Ausrichtung, wie bei der Metallrahmenmethode, ist aber nicht möglich. Querliegende Fasern bezüglich der Orientierungsrichtung und leichte Abweichungen von der parallelen Ausrichtung treten mehr oder wenig häufig auf.

In punkto Anwendbarkeit musste dieser Kompromiss eingegangen werden.

4.3.2 Spinnen der Kollagenfasern auf einen rotierenden Zylinder

Für die Orientierung der Fasern wurden die Glasplättchen an der Zylinderoberfläche mit Klebeband fixiert (siehe Abb. 4.2). Bei hohen Zylinderdrehzahlen wurde mit einer 50 mg/mL konzentrierten Kollagenlösung auf das Substrat gesponnen.

Vereinzelt wurde ein Ablösen der Plättchen aufgrund der hohen Rotationsgeschwindigkeit beobachtet. Das Verspinnen von 0,6 bis 0,8 mL Spinnlösung war ausreichend um eine deutlich erkennbare, orientierte Fasermatte abzuschneiden (Abb. 4.2).

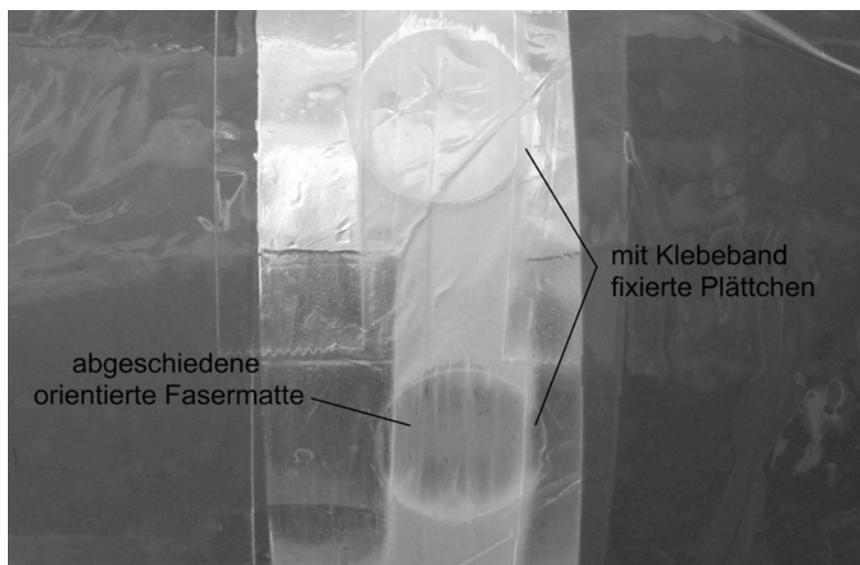


Abb. 4.2 Darstellung der Glasplättchenfixierung auf dem rotierenden Zylinder

Zum Abnehmen der Glasplättchen wurde das Klebeband vorsichtig mit einem Skalpell durchtrennt. Anschließend wurden die Fixierungsrückstände mit einer Pinzette entfernt. Die erhaltenen Fasermatrices wurden dem Dehydrothermalverfahren zur Kollagenvernetzung unterzogen bevor sie fixiert und versandfertig gemacht wurden.

4.3.3 SEM-Charakterisierung der Kollagenmatrices aus orientierten Fasern

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Kollagenmatrix nach der DHT-Behandlung zeigen ein Zusammenfließen der Struktur (Abb. 4.3). Die Fasern sind also nicht mehr vereinzelt abgelegt, sondern weisen eine Filmbildung auf. Eine Vorzugsorientierung bleibt jedoch weiterhin zu erkennen. Die Verfilmung der Fasern wurde häufiger beobachtet und ist abhängig von der Spinddauer und der rel. Luftfeuchtigkeit. Eine erfolgreiche Besiedelung mit Zellen war jedoch möglich.

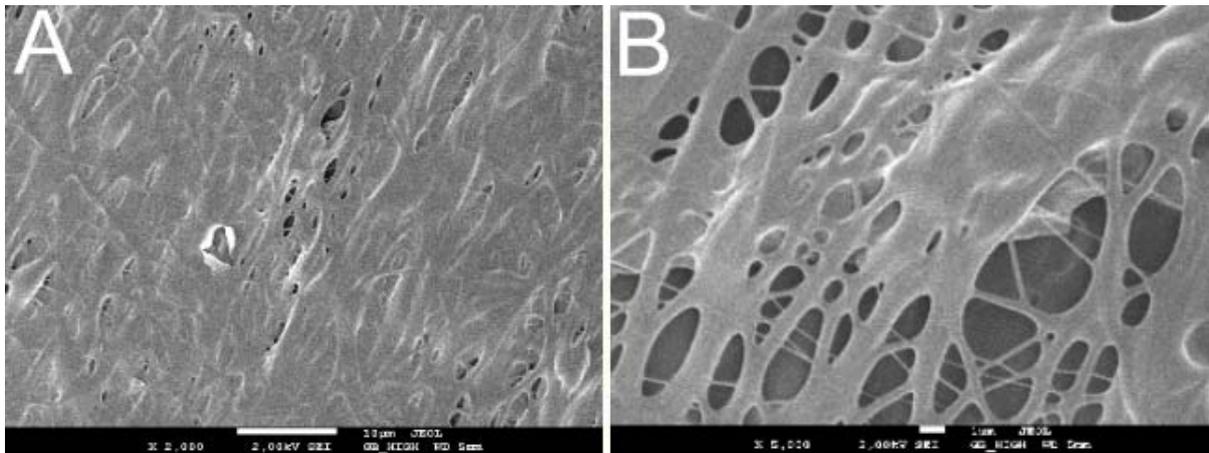


Abb. 4.3 SEM-Aufnahmen einer orientierten Kollagenmatrix nach dem DHT-Verfahren, Maßstab entspricht 10 μm bei A und 1 μm bei B

4.3.4 Besiedelung der Kollagenmatrices aus orientierten Fasern mit primären Myoblasten

Die mit dem DHT-Verfahren behandelten orientierten Kollagenmatrices wurden nach Erlangen gesandt und mit primären Myoblasten der Ratte besiedelt.

Bereits nach einem Tag in Kultur konnte eine Adhäsion und Proliferation der Zellen beobachtet werden (Abb. 4.4 A). Außerdem zeigten die Zellen eine spindelförmige Gestalt und eine Längsausrichtung entsprechend der Matrix. Nach einer Kulturdauer von einer Woche war das Zellwachstum fortgeschritten und eine Orientierung der Zellen weiterhin zu erkennen (Abb. 4.4 B).

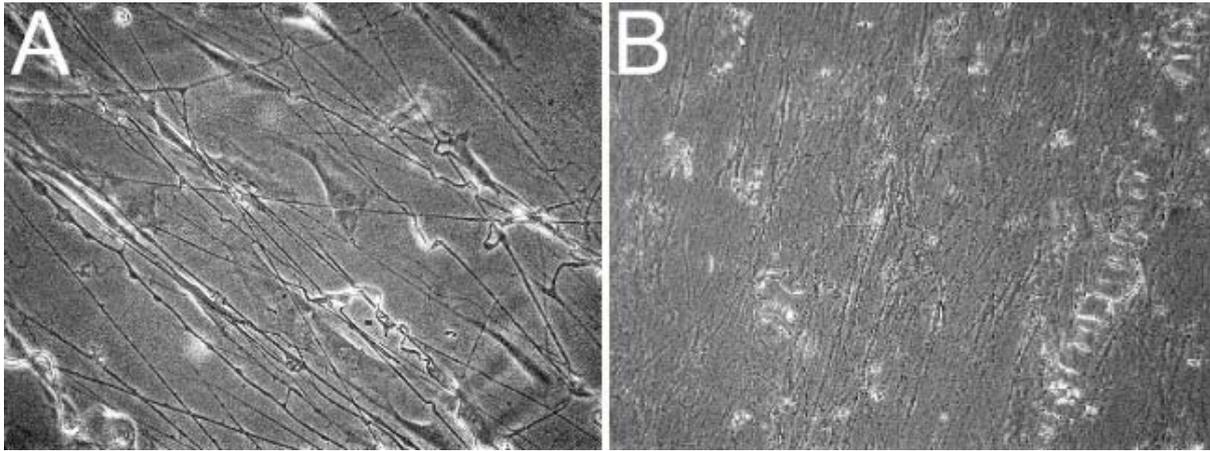


Abb. 4.4 Phasenkontrast-Aufnahmen einer mit Myoblasten besiedelten, orientierten Kollagenmatrix nach einem Tag (A) bzw. nach einer Woche (B) Kulturdauer, Vergrößerungen 200x bei A und 100x bei B

Die Ergebnisse sprechen für eine prinzipielle Eignung der orientierten Kollagenmatrix für die *in vitro* Kultivierung von primären Myoblasten der Ratte. Der gewünschte Effekt zur Ausrichtung des Zellwachstums bzw. der Zellen selbst konnte beobachtet werden.

Die inzwischen gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Instabilität und starken Verfilmung von dreidimensionalen Kollagenmatrixen machten allerdings, obwohl sich die Kollagenfasern als geeignete Matrix für *in vitro* Kultivierung von Myoblasten erwies, einen Systemwechsel notwendig.

4.4 Systemauswahl für eine dreidimensionale Matrix mit Kollagenanteil

In Abschnitt 3.4 wurde bereits berichtet, dass eine dreidimensionale Matrix aus Kollagen aufgrund der Verfilmung nicht erzeugt werden kann. Aus diesem Grund mußte ein anderer Ansatz gewählt werden. Die Beibehaltung von Kollagen als Teil der Matrix war hinsichtlich der guten Kultivierbarkeit von Myoblasten erwünscht.

In der Literatur ist eine Reihe von Möglichkeiten zur Faserbeschichtung oder Verblendung von Kollagen beschrieben. Zum einen kann eine nachträgliche Beschichtung von elektrogesponnenen Fasern aus Lösung erfolgen [83, 109]. Hierzu wurden Fasern aus Poly(ϵ -caprolacton) (PCL) über Nacht in eine Kollagenlösung (10 mg/mL) eingelegt, anschließend mehrmals gewaschen und getrocknet. Die beschichtete Matrix wurde mit glatten Muskelzellen besiedelt und zeigte nach 72 h eine signifikant höhere Proliferation im Vergleich zu unbehandelten PCL-Fasern, gegenüber Kollagenfasern allerdings war sie reduziert [83]. Bei der Kultivierung von Fibroblasten der Haut zeigte sich ein analoges Proliferationsverhalten [109]. Zum anderen kann eine kovalente Beschichtung vorgenommen werden. Dazu wurden elektrogesponnene PCL-Fasern mit einem Argonplasma behandelt. Abhängig vom Abstand der Plasmaquelle und der gewählten Zeitintervalle der Behandlung konnten nachfolgend durch eine Vorbehandlung mit dem Vernetzungsgens 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid unterschiedliche Mengen von Kollagen aus Lösung auf der modifizierten Faseroberfläche immobilisiert werden. Die Proliferation von Fibroblasten der Haut war nach 72 h bei beschichteten Fasern im Vergleich zu unbehandelten erhöht [111]. Ein anderer Ansatz ist das Elektroverspinnen von Kollagen verblendet mit anderen Polymeren [100, 104, 105, 194, 206-208]. Das Mischen von Kollagen mit anderen natürlichen und/oder synthetischen Polymeren lässt einen großen Spielraum zu, um die Matriceigenschaften an die Erfordernisse des *Tissue Engineerings* anzupassen. Verwendet wurden u. a. Polyethylenoxid, Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat), PCL und Glykosaminoglykan und meistens wurde ein verändertes Spinnverhalten bzw. eine Modifikation von Fasermorphologie und -durchmesser beobachtet. Die Proliferation von Fibroblasten der Haut auf einer Kollagen-PCL-Blendfasermatrix zeigt eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu reinen PCL-Fasern, ist jedoch bezüglich Kollagenfasern niedriger [100]. Eine weitere bekannte Methode ist das Co-elektrospinnen von Kollagen mit PCL und führt zu Fasern mit einer Kern-Schale Struktur [109]. Die Kontrolle dieses modifizierten Elektrospinnverfahrens ist aber teilweise problematisch.

Von der technischen Ausführung waren zwei Methoden anwendbar, sowohl die Beschichtung von Fasern aus Lösung, als auch das Elektrospinnen eines Blends. Die oben dargestellten Daten zur Zellproliferation sind bei beiden Verfahren vergleichbar.

Unter der Annahme, dass das Kollagen bei einer oberflächlichen Auftragung schneller in Lösung geht als nach der Verarbeitung aus einem Blend, wurde sich für letztere Methode, einer Mischung aus Kollagen und PCL, entschieden.

Poly(ϵ -caprolacton) ist bereits ausführlich in der Literatur untersucht und wurde aufgrund seiner elastischen Eigenschaften, der Biokompatibilität und der Bioabbaubarkeit ausgewählt. Es ist von der FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) zugelassen und wird als Biomaterial für *Tissue Engineering* und *Drug Delivery* Zwecke verwendet [111, 112].

4.5 Entwicklung einer Matrix aus PCL-Kollagen-Blendfasern

4.5.1 Bestimmung des PCL-Kollagen-Blendverhältnisses

In der Literatur sind verschiedene Verhältnisse von Kollagen zu PCL bereits elektroversponnen worden. Sie reichen von 1:1 bis 1:3 [100-102]. Ein höherer Kollagenanteil ist für die Stabilität bei orientierten Fasern nicht zuträglich. Die verwendeten Lösungsmittel waren neben HFIP ein Gemisch aus Dichlormethan und Dimethylformamid (3:1). Wie schon im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, war bei Experimenten mit Hautfibroblasten die Proliferation im Vergleich zu Fasern aus reinem PCL signifikant erhöht [100]. Bei Gliazellen konnte dieser signifikante Effekt bei der Proliferation nicht beobachtet werden. Jedoch wurde die kollagenhaltige Matrix generell von den Gliazellen bevorzugt. Ebenso wurde ein gerichtetes Zellwachstum auf orientierten Blendfasern nachgewiesen [101].

Für die Kultivierung von primären Myoblasten der Ratte war ein möglichst hoher Anteil von Kollagen in der Matrix erwünscht. Ein erstes Experiment mit Blendfasern (Kollagen:PCL - 3:1 und 1:1) sollte nach Einwirkung von Wasser für 24 h durch morphologische Betrachtung zeigen, ob bei einem Kollagenanteil von über 50% noch eine ausreichende Faserintegrität vorhanden ist. Als Lösungsmittel diente HFIP, der Gesamtpolymeranteil betrug 80 mg/mL.

Die Blendfasern mit 75% Kollagenanteil weisen deutliche Anzeichen der Auflösung auf (Abb. 4.5 B, D, F). Manche Fasern sind fast gänzlich desintegriert, andere sind miteinander verschmolzen. Die Oberfläche hat eine fraktale Struktur. Es ist anzunehmen, dass ein beträchtlicher Teil des Kollagens in Lösung gegangen ist. Bei einem Anteil von 50% Kollagen ist die Faseroberfläche baumrindenartig, ein Verschmelzen der Fasern ist nicht zu beobachten (Abb. 4.5 A, C, E). Der Vergleich der Morphologie zeigt eindeutig einen Verlust der Faserintegrität bei erhöhtem Kollagenanteil.

Aus diesem Grund wurde für weitere Untersuchungen ein Blend der Zusammensetzung von 1:1 verwendet, wie auch in der Literatur bekannt [102]. Ein zwischenzeitliches Experiment hat die Eignung dieses Blends für dreidimensionale Matrices erwiesen. Aus diesem Grund wurde eine Weiterentwicklung vorgenommen, die Ergebnisse werden in einem folgenden Abschnitt zur Generierung von dreidimensionalen Blendmatrices diskutiert.

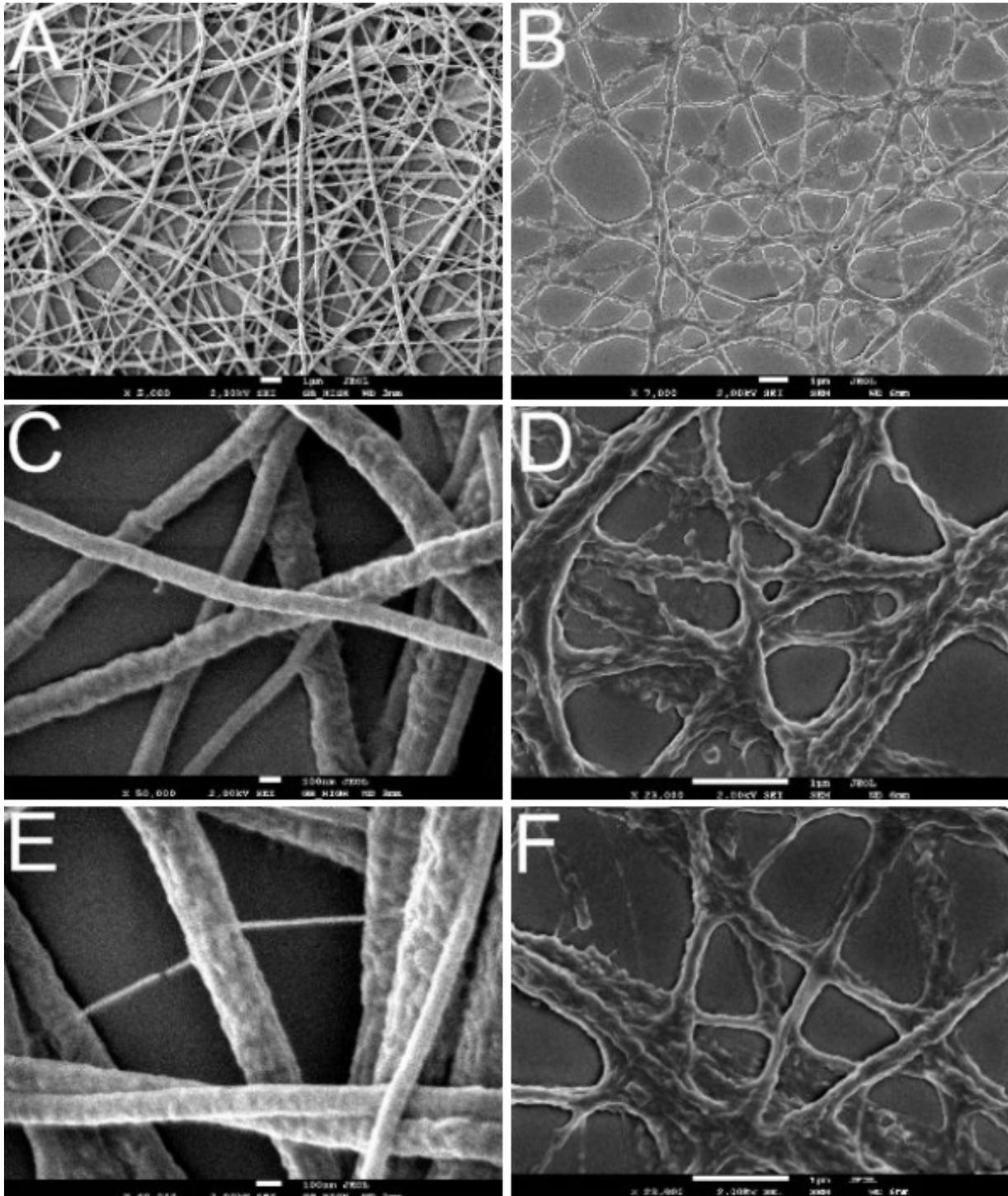


Abb. 4.5 SEM-Aufnahmen von Blendfasern (Kollagen:PCL 1:1 bei A, C, E und 3:1 bei B, D, F) nach Behandlung mit Wasser für 24 h. Maßstab entspricht 1 μm bei A, B, D, F und 100 nm bei C, E

4.5.2 Abhängigkeit der Fasermorphologie und des -durchmessers von der Konzentration

Die Arbeiten zur Untersuchung der Fasermorphologie und zum mittleren Faserdurchmesser bei verschiedenen Polymerkonzentrationen wurden von R. SÜTTERLIN im Zuge ihrer Diplomarbeit durchgeführt.

Es wurden verschiedene Konzentrationen (von 30 mg/mL bis 120 mg/mL) des Kollagen-PCL-Blends aus HFIP elektrospunnen. Es wurde darauf geachtet, dass eine stabile Jetausbildung und ein konstanter Spinnvorgang stattfanden. Der Spinnprozess ist jedoch beeinflusst von den äußeren Bedingungen. Die rel. Luftfeuchtigkeit darf nicht zu gering sein (< 15 %), da sonst ein zu schnelles Verdampfen des Lösungsmittels eintritt und zu Verfestigungen am Kanülenende führt. Dies ist mit einem wiederholten Abbrechen des Spinnvorgangs verbunden und läßt die Fasergenerierung deutlich inhomogener ablaufen. Die Flussrate muss genau auf die Umweltbedingungen eingestellt werden, da sonst eine Tropfenbildung auftritt und zu einer Schädigung der bereits gesponnenen Fasermatte führen kann. SEM-Aufnahmen von elektrospunnenen Fasern aus Spinnlösungen mit verschiedenen Polymerkonzentrationen sind in Abb. 4.6 dargestellt.

Aus allen versponnenen Polymerkonzentrationen konnten Fasern ohne Verdickungen erzeugt werden. Die Faseroberfläche war glatt bzw. wenig strukturiert. Bei den niedrigen Konzentrationen (30 und 40 mg/mL) war die Viskosität der Lösung zu gering um ein Tropfen während des Spinnvorgangs zu verhindern (Abb. 4.6 A). Des Weiteren ist ein Verschmelzen der Fasern zu beobachten (Abb. 4.6 A und B). Bei höheren Konzentrationen ist eine komplette Verschmelzung des Fasernetzwerks nicht mehr zu beobachten, jedoch tritt dies noch vereinzelt an den Kreuzungspunkten der Fasern bis zu einer Polymerkonzentration von 80 mg/mL auf (Abb. 4.6 C-F). Bei den darüber liegenden Konzentrationen war es nicht mehr zu beobachten (Abb. 4.6 G-J).

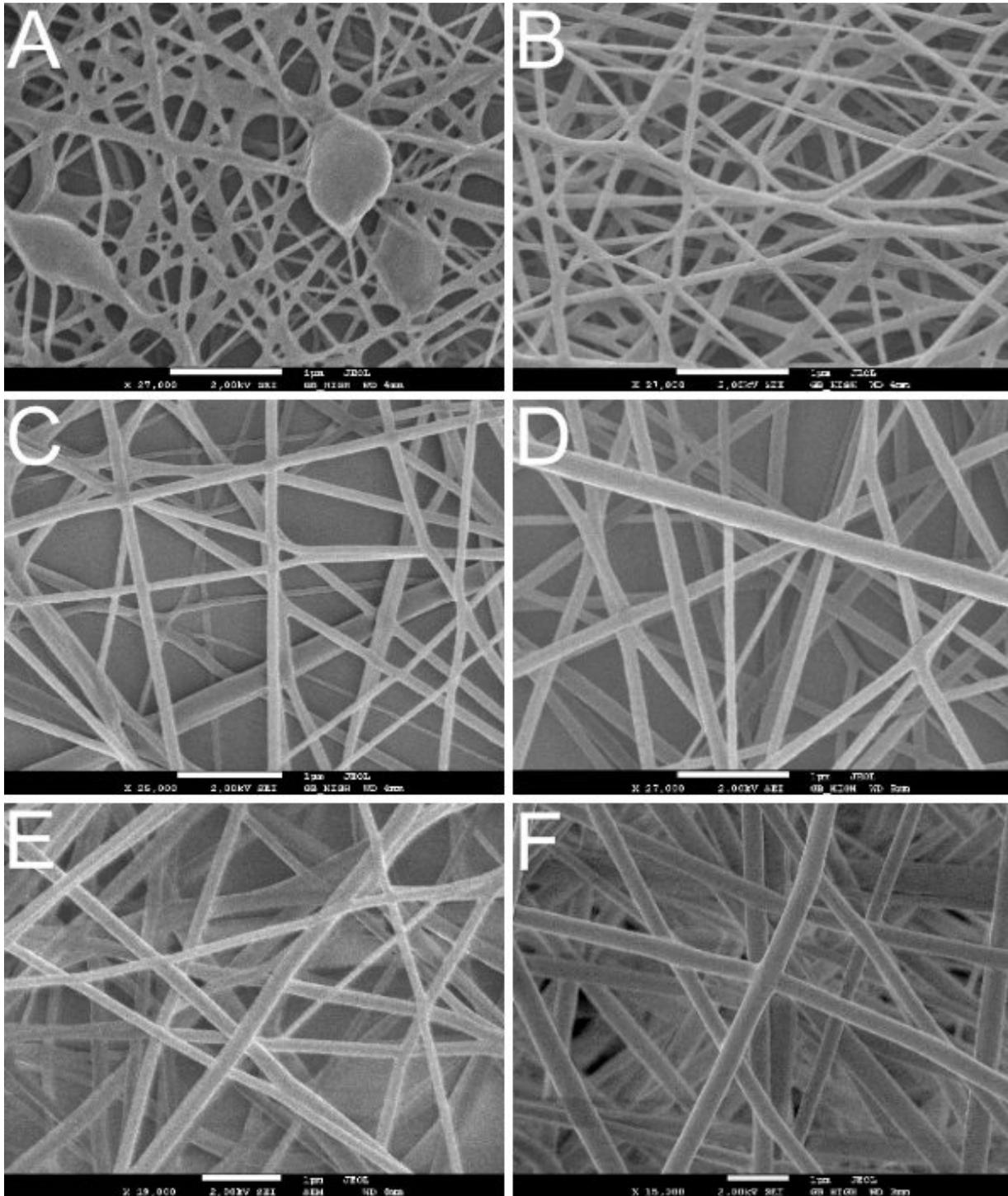


Abb. 4.6 SEM-Aufnahmen von Blendfasern (Kollagen:PCL 1:1) versponnen aus HFIP mit Polymerkonzentrationen von (A) 30 mg/mL, (B) 40 mg/mL, (C) 50 mg/mL, (D) 60 mg/mL, (E) 70 mg/mL und (F) 80 mg/mL (wird auf der nächsten Seite fortgesetzt). Maßstab entspricht jeweils einem Mikrometer

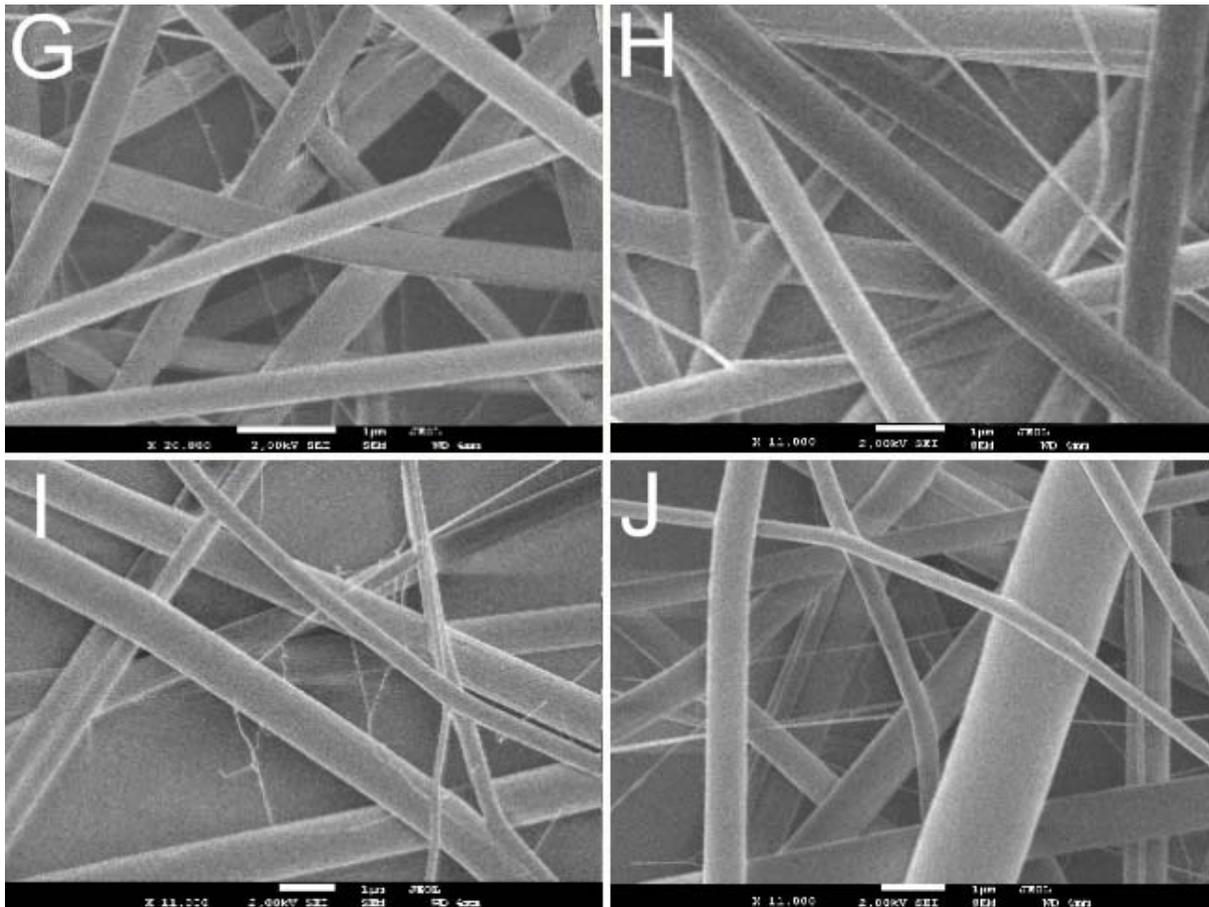


Abb. 4.6 (Fortsetzung) SEM-Aufnahmen von Blendfasern (Kollagen:PCL 1:1) versponnen aus HFIP mit Polymerkonzentrationen von (G) 90 mg/mL, (H) 100 mg/mL, (I) 110 mg/mL und (J) 120 mg/mL. Maßstab entspricht jeweils einem Mikrometer

Der Verlauf der mittleren Faserdurchmesser ist vergleichbar mit anderen Polymeren. Ab einer Konzentration von 10 mg/mL steigt der mittlere Faserdurchmesser sprunghaft an. Ebenso nimmt die Faserdurchmesserverteilung zu und die erzeugten Fasern werden vermehrt inhomogener (Abb. 4.7).

Für weitere Untersuchungen wurden Lösungen einer Gesamtpolymerkonzentration von 80 mg/mL verwendet, da ein durchschnittlicher Faserdurchmesser von etwa 250 nm von Seiten des Kooperationspartners gewünscht wurde.

Die erhaltenen Ergebnisse des mittleren Faserdurchmessers, der Standardabweichung und der Fasermorphologie sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 4.1 Ergebnisse der mittleren Durchmesser, Durchmesserverteilung und der Morphologie

Polymerkonzentration in mg/mL	mittlerer Faserdurchmesser in nm	Standardabweichung in nm	Bemerkungen zur Morphologie
30	72	± 23	generelle Faserverschmelzung
40	85	± 28	generelle Faserverschmelzung
50	103	± 27	wenige Faserverschmelzungen
60	129	± 33	vereinzelt Faserverschmelzungen
70	179	± 53	vereinzelt Faserverschmelzungen
80	252	± 73	vereinzelt Faserverschmelzungen
90	355	± 83	keine Faserverschmelzungen
100	589	± 280	keine Faserverschmelzungen
110	671	± 219	keine Faserverschmelzungen
120	845	± 392	keine Faserverschmelzungen

Für einen besseren Überblick der erhaltenen Ergebnisse wurden die mittleren Faserdurchmesser und die Standardabweichungen in einer Graphik aufgetragen (Abb. 4.7):

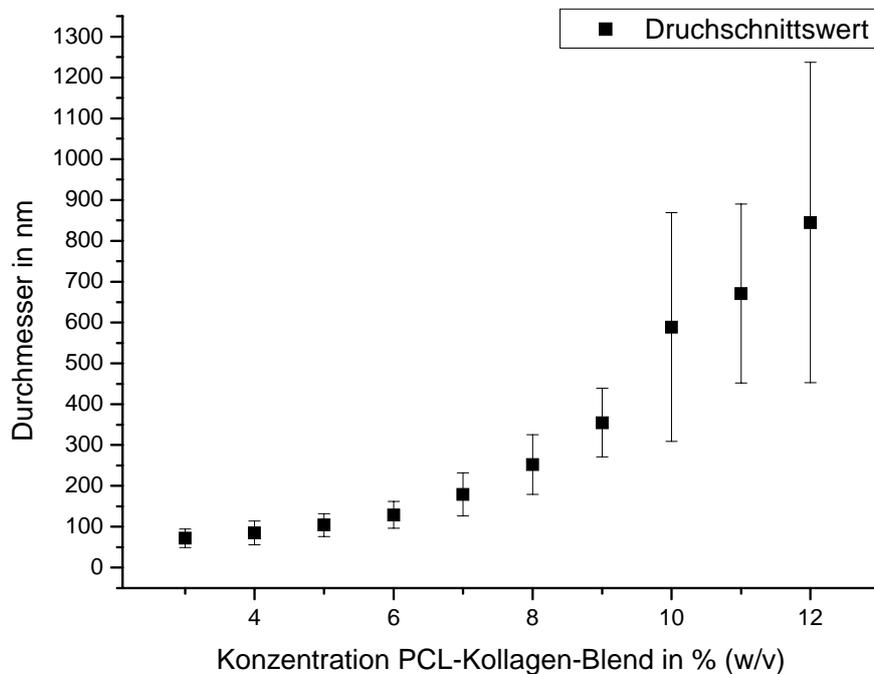


Abb. 4.7 Graphische Auftragung des mittleren Durchmessers mit Standardabweichung in Abhängigkeit der Konzentration (1 % (w/v) entspricht 10 mg/mL)

4.5.3 Veränderung der Fasermorphologie und des –durchmessers durch Einwirkung von Wasser

Um eine Veränderung der Blendfasern genauer zu untersuchen wurden Proben auf Si-Wafer gesponnen und vor bzw. nach der Behandlung mit Wasser für 24 h elektronenmikroskopisch betrachtet. Festzustellen ist, daß, wie schon in den vorigen Abschnitten beschrieben, vor der Wasserbehandlung eine glatte Faser Oberfläche (Abb. 4.9 A und B) und danach eine baumrindenartige Strukturierung vorhanden ist (Abb. 4.9 C und D). Dies ist wohl auf ein Herauslösen von Kollagen oder ein Aufquellen der Fasern zurückzuführen. Der durchschnittliche Faserdurchmesser nahm bei diesem Experiment von 308 ± 102 nm vor, auf 248 ± 86 nm nach der Behandlung ab. Diese Abnahme ist aber nicht signifikant ($p > 0,05$) (Abb. 4.8). Eine Faserquellung ist aufgrund dieser Ergebnisse auszuschließen. Eine Faserverschmelzung ist vereinzelt bei allen Proben zu beobachten und ist wohl dem Spinnvorgang zuzuschreiben, bei dem eine komplette Verdampfung des Lösungsmittels vor dem Ablegen der Fasern auf dem Substrat nicht gewährleistet war. Auffällig ist bei den nachbehandelten Blendfasern, dass in wenigen Fällen eine Filmbildung in den Zwischenräumen der Fasern auftritt (Abb. 4.9 D). Hervorgerufen wird dies wahrscheinlich durch aus der Faser gelöstes Kollagen, das eine Filmbildung zwischen den fibrillären Strukturen eingeht.

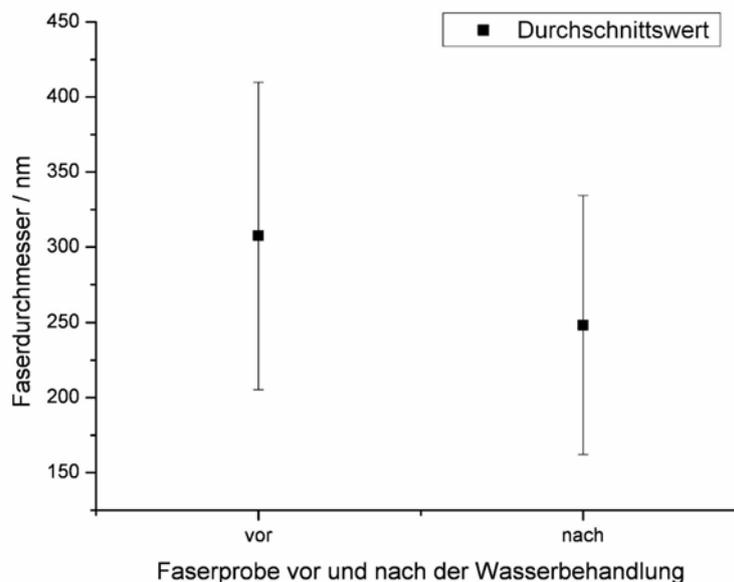


Abb. 4.8 Durchschnittlicher Durchmesser mit Standardabweichung der Blendfasern (Kollagen:PCL 1:1) vor und nach der Behandlung mit Wasser für 24 h

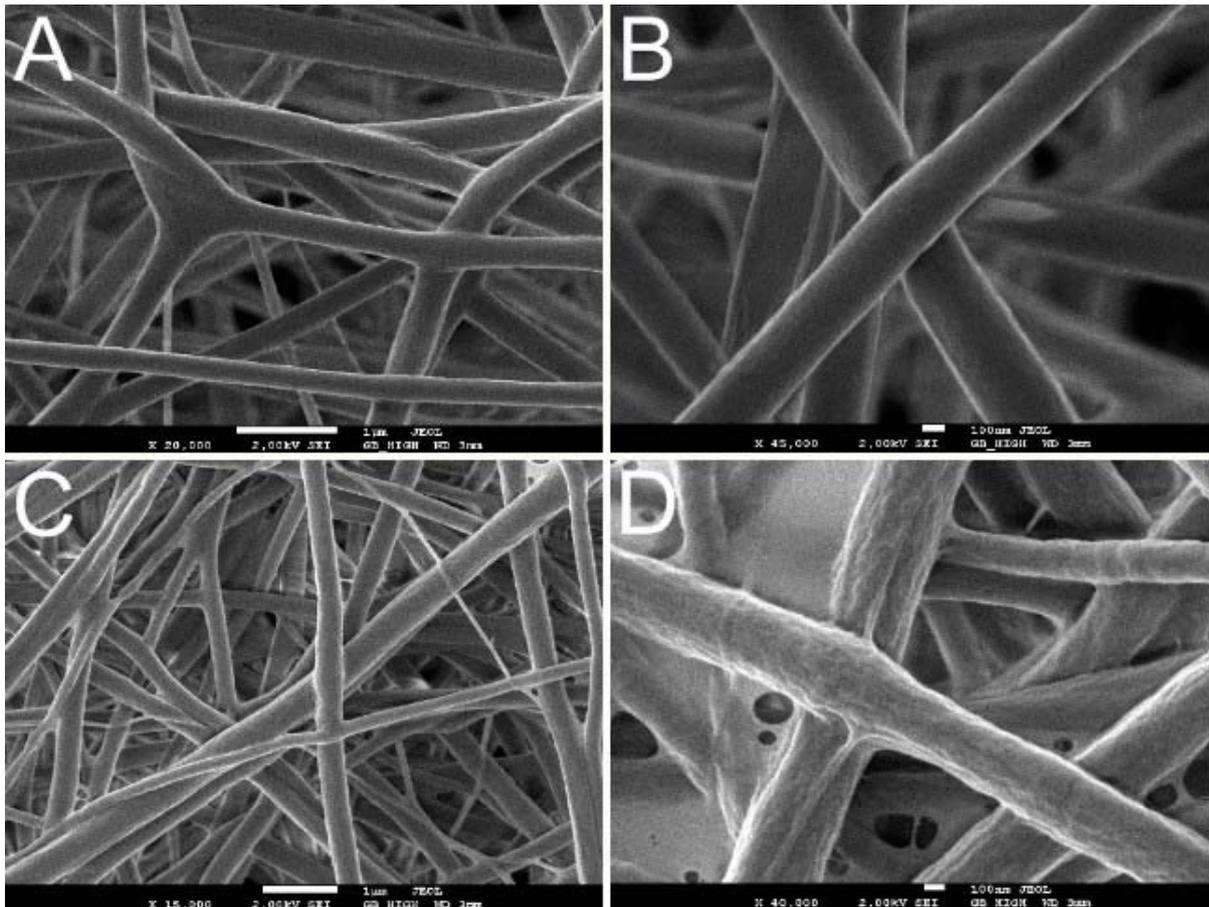


Abb. 4.9 Blendfasern (Kollagen:PCL 1:1) vor (A, B) und nach (C, D) der Behandlung mit Wasser für 24 h. Maßstab entspricht 1 µm bei A, C und 100 nm bei B, D.

4.5.4 Auswirkungen von quervernetzenden Verfahren auf die Fasermatrix und deren Zellkompatibilität

Im vorherigen Abschnitt wurde beschrieben, dass ein Herauslösen von Kollagen und vereinzelt eine Filmbildung zwischen den Blendfasern durch Behandlung mit Wasser auftritt. Dieser Effekt muss für Zellwachstum und –kompatibilität nicht nachteilhaft sein, umschließt doch das Kollagen in der natürlichen Zellumgebung (der EZM) die Zellen. Dennoch wurde untersucht, ob eine Quervernetzung der Blendfasern das Kollagen in der Matrix immobilisiert. Zu diesem Zweck wurden Proben mit GTA aus der Gasphase mit verschiedenen Zeitdauern vernetzt und aufgearbeitet. Es erfolgte eine elektronenmikroskopische Untersuchung. Die statistische Auswertung der Durchmesser ergab keine signifikante Änderung. Einzig bei der

Probe mit GTA-Behandlung für 24 h ist ein etwas niedrigerer mittlerer Durchmesser und eine breitere Verteilung zu beobachten (Abb. 4.10).

Die Werte waren:

Tabelle 4.2 Ergebnisse der Durchmesserbewertung

Zeitdauer der GTA-Behandlung in h	mittlerer Faserdurchmesser in nm	Standardabweichung in nm
0 (unbehandelt)	308	102
1	307	96
2	318	89
24	228	144

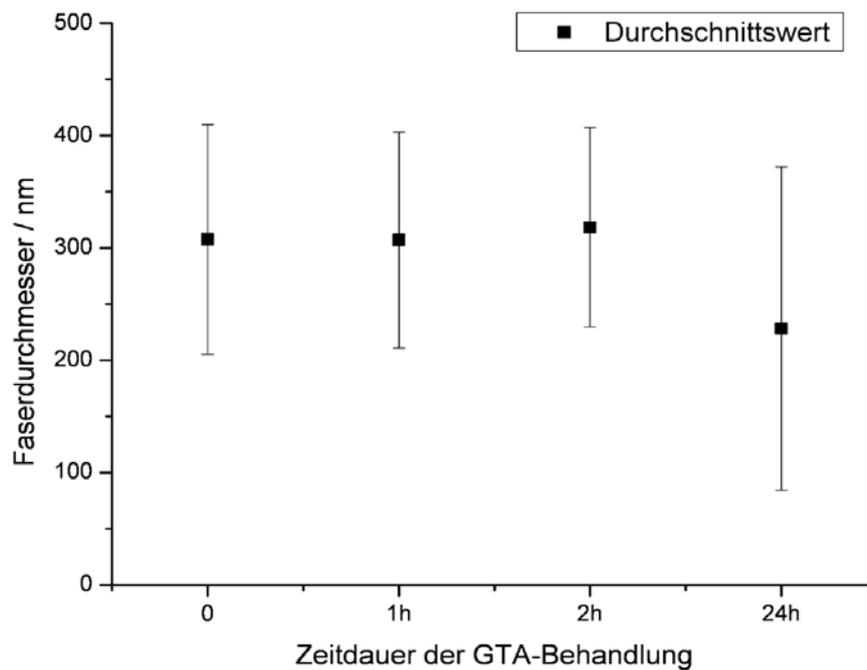


Abb. 4.10 Durchschnittlicher Durchmesser mit Standardabweichung der Blendfasern (Kollagen:PCL 1:1) nach der Vernetzung mit GTA

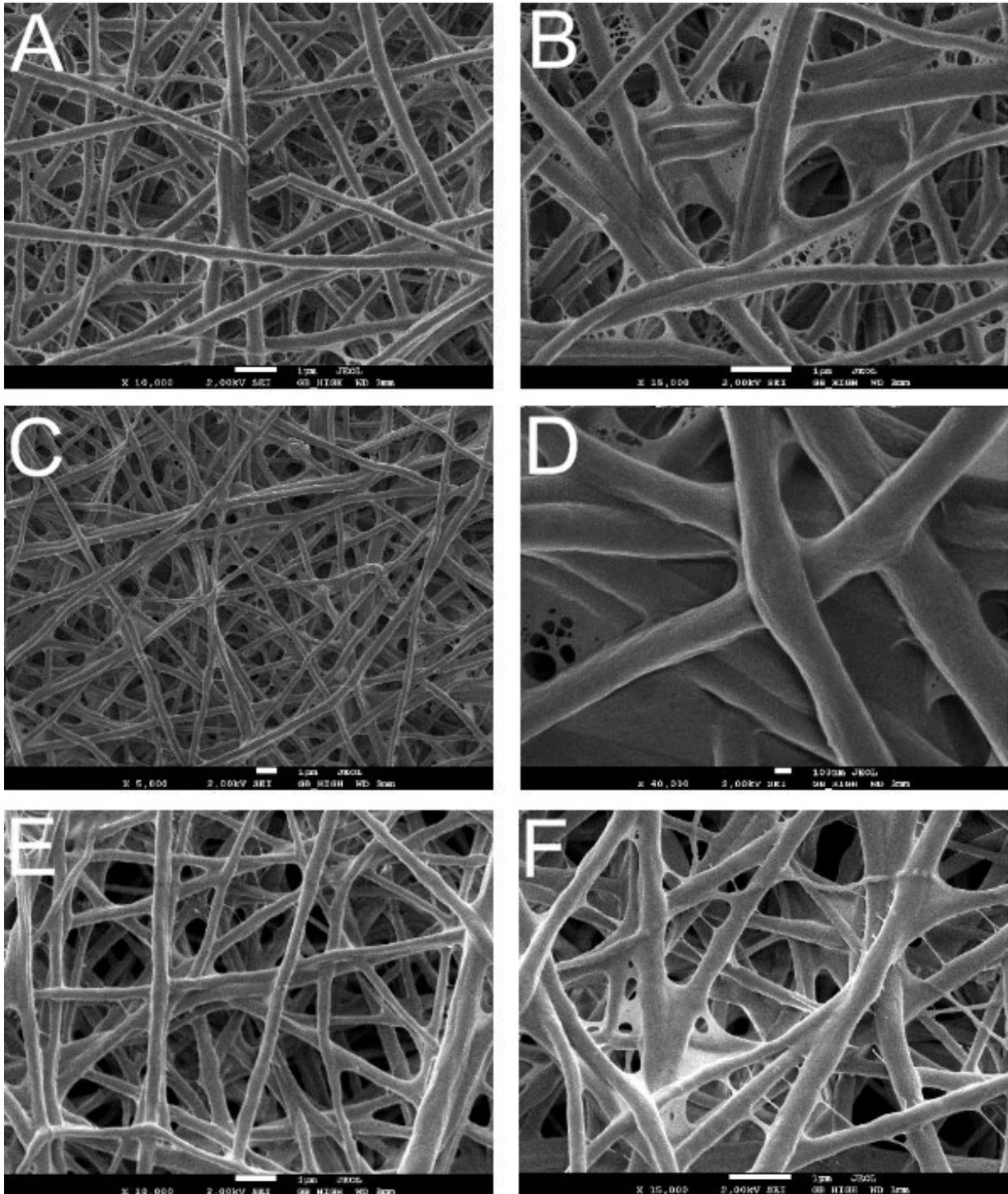


Abb. 4.11 Blendfasern (Kollagen:PCL 1:1) nach 1 h (A, B), nach 2 h (C, D) und nach 24 h (E, F) Behandlung mit GTA. Maßstab entspricht 1 μm bei A, B, C, E, F und 100 nm bei D.

Bei der elektronenmikroskopischen Betrachtung fällt auf, dass eine Filmbildung zwischen den Fasern, vor allem an den Kreuzungspunkten, bei allen Proben auftrat (Abb. 4.11 A-F). Bei den Faseroberflächen sind keine Unterschiede zu erkennen. Sie weisen generell eine etwas baumrindenartige Struktur auf und sind nicht glatt, wie direkt nach dem Verspinnen (Abb.

4.11 B, D, F). Der Vernetzungsprozeß mit GTA scheint wenig bis keinen Einfluss auf die Fasermorphologie und den Faserdurchmesser zu nehmen, jedoch konnte eine Filmbildung beobachtet werden.

Zur Bestimmung der Zellkompatibilität wurden zuerst hMSC in Zusammenarbeit mit dem Fachbereich Medizin der Universität Marburg auf die Blendmatrices aufgebracht und nach drei Tagen der Proliferation die Zellzahlen auf einer normierten Fläche ausgezählt. Obwohl eine dreidimensionale Anwendung von thermisch vernetzten Matrices aufgrund des Zerfließens der Fasern auszuschließen ist (PCL-Schmelzpunkt $\approx 63\text{ }^{\circ}\text{C}$, DHT-Verfahren läuft bei $110\text{ }^{\circ}\text{C}$), wurden zum Vergleich auch thermisch vernetzte Proben untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 4.12 dargestellt.

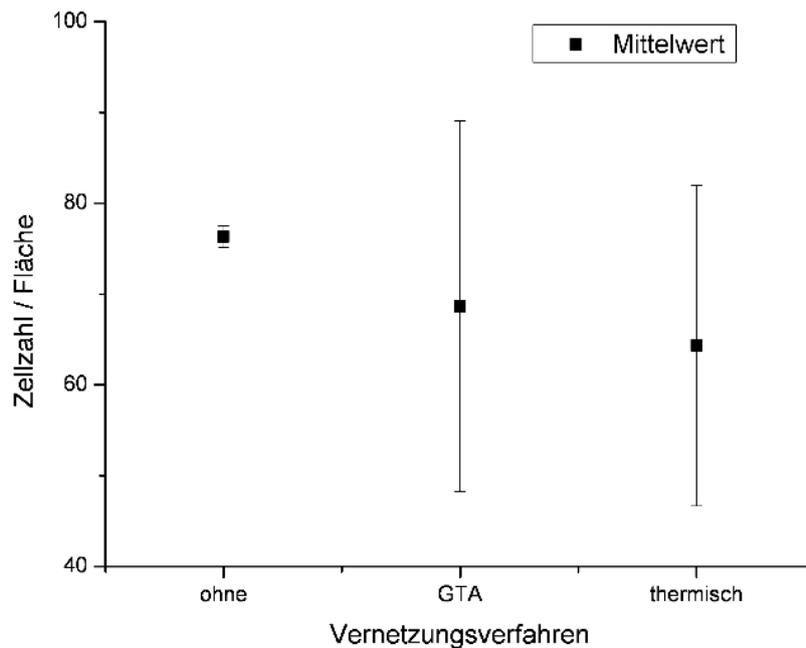


Abb. 4.12 Auszählungen der hMSC auf einer normierten Fläche, Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung

Es konnten bei der Auszählung, durch DAPI-Anfärbung der Zellkerne, keine signifikanten Änderungen festgestellt werden. Auffällig ist die niedrige Standardabweichung der unbehandelten Proben (Abb. 4.12). Ein negativer Effekt der Vernetzungsverfahren konnte in den drei Tagen der Kultivierung nicht festgestellt werden. Grundlage dieser Auswertung waren DAPI-Zellkernanfärbungen. Exemplarisch sind Aufnahmen der fluoreszierenden Kerne

in Abb. 4.13 dargestellt. Auffällig war bei einer mit dem DHT-Verfahren behandelten Probe, dass eine Anhäufung von hMSC entlang dickerer, in Schlangenlinien verlaufender Fasern zu erkennen ist (Abb. 4.13 C). Dieses Phänomen wurde nicht weiter untersucht und aufgrund des vereinzelten Auftretens als Artefakt behandelt. Alle anderen Aufnahmen zeigen eine relativ homogene Verteilung der Zellen.

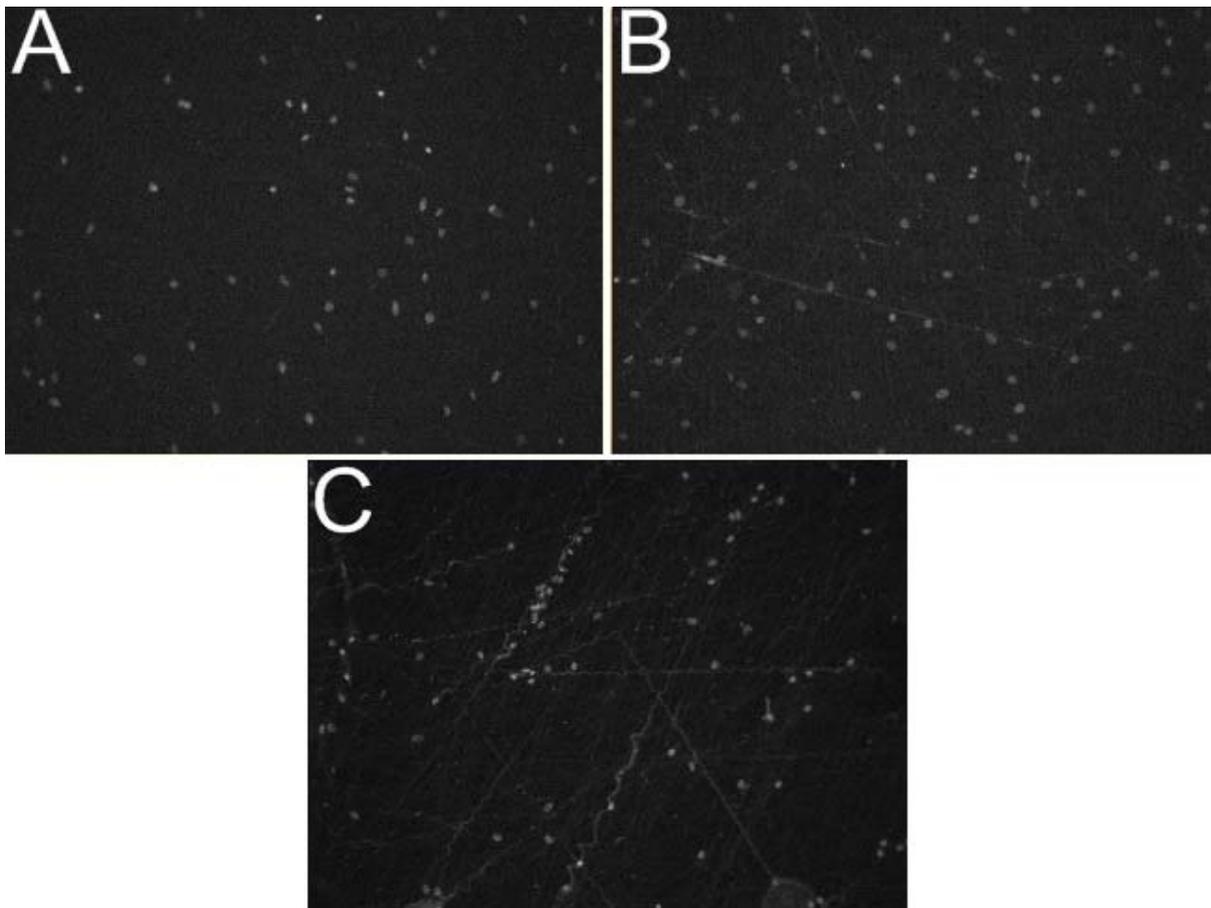


Abb. 4.13 Schwarzweiß-Aufnahmen der DAPI-angefärbten Zellkerne, A ohne, B mit GTA, C mit thermischen Verfahren behandelten Proben. Vergrößerung x100 (aufgrund der Eigenfluoreszenz sind die Blendfasern teilweise zu erkennen)

Dieses Experiment sollte zur Abschätzung negativer Effekte der Vernetzungsverfahren auf die Zellproliferation dienen. Dies wurde aber nicht beobachtet. Der nächste Schritt war die Kompatibilitätstestung der Blendmatrix mit primären Rattenmyoblasten. Dazu wurden Proben unbehandelt und mit GTA bzw. dem DHT- Verfahren behandelt nach Erlangen gesendet und dort kultiviert.

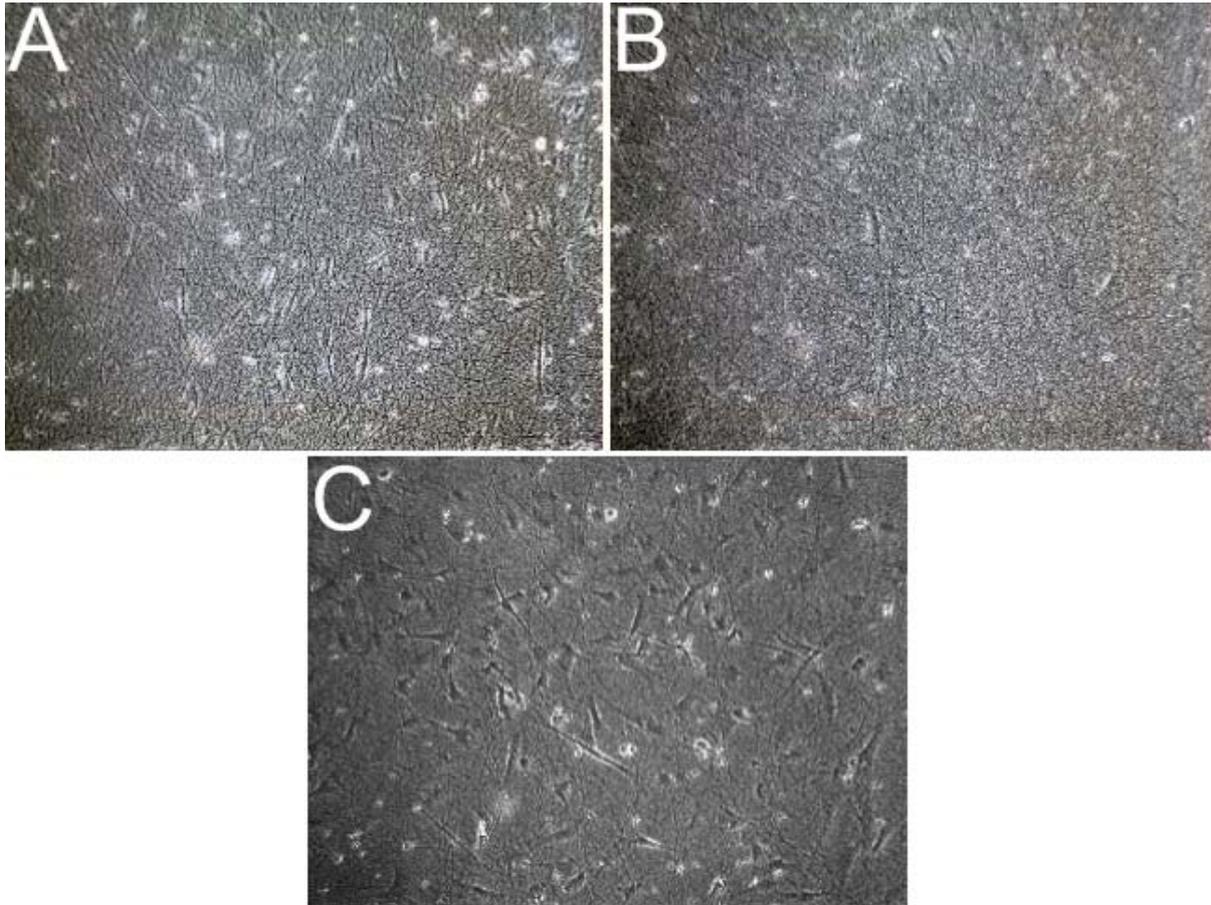


Abb. 4.14 Phasenkontrast-Aufnahmen der Myoblasten besiedelten Blendmatrices, welche A ohne, B mit GTA, C mit thermischen Verfahren behandelt wurden. Vergrößerung x100

Nach einer Vorbehandlung mit Ethanol für 24 h wurden die Proben mit Myoblasten besiedelt. Nach einer Kultivierung von vier Tagen wurde bei der mit GTA vernetzten Fasermatrix ein geringeres Wachstum festgestellt als dies bei den anderen Proben der Fall war (Abb. 4.14). Der direkte Vergleich zur nicht behandelten Fasermatte lässt erkennen, dass die Zellen (helle Bereiche) in geringerer Anzahl vorhanden sind (Abb. 4.14 A und B). So weist die unbehandelte Matrix nahezu eine homogene Verteilung der Zellen auf. Die thermisch behandelte Probe ist bezüglich der Zelldichte mit der unbehandelten vergleichbar. Es ist eine homogene Verteilung über die gesamte Matrix zu erkennen (Abb. 4.14 C).

Bei der Besiedelung mit Myoblasten scheint ein vermindertes Zellwachstum bei mit GTA behandelten Fasermatten aufzutreten. Daher wurde eine Vernetzung der Blendmatrices in folgenden Experimenten nicht mehr vorgenommen.

4.6 Entwicklung einer orientierten und/oder dreidimensionalen Blendmatrix

4.6.1 Generierung einer unorientierten, dreidimensionalen Blendmatrix

Da sich das verwendete Matrixmaterial als geeignet erwies, wurde die Weiterentwicklung zu einer dreidimensionalen unorientierten Matrix unternommen. Es wurden hierzu Blendfasern auf ein Aluminiumlochblech gesponnen. Die erzeugte Matrix, mit einer Höhe von etwa 400 μm , konnte ohne Probleme mit einer Pinzette vom Träger abgelöst und auf Glasplättchen fixiert werden. In Abb. 4.15 ist eine auf einem Glassubstrat fixierte Matrix dargestellt. Die weniger dicht besponnenen Bereiche sind zu erkennen.



Abb. 4.15 Aufnahme einer 3D-Blendmatrix fixiert auf einem Glasplättchen

4.6.2 Generierung einer orientierten, dreidimensionalen Blendmatrix

Für die Orientierung der Fasern auf Glassubstraten wurde das gleiche Verfahren (rotierender Zylinder) angewendet, wie bereits in Abschnitt 4.3 beschrieben. Diese Technik erzeugt jedoch einen nicht unerheblichen Anteil von Fasern, die für die Zellkulturexperimente keinen Einsatz finden können. Die besponnene Fläche ist deutlich breiter als der Durchmesser der

Glasplättchen und die Fasern in den Bereichen zwischen den Substraten können nicht genutzt werden (Abb. 4.2). Für die Erzeugung einer dreidimensionalen, orientierten Matrix (Höhe: 400 - 500 μm) würde dies einen hohen Aufwand an Material mit sich bringen, da die aufgesponnene Fasermatte an den Rändern eine nicht ausreichende Höhe aufweisen würde. Aus diesem Grund wurde die Kollektoroberfläche reduziert und der Außenrand einer rotierenden Scheibe zum Aufwickeln der Fasern verwendet (Abb. 4.16).

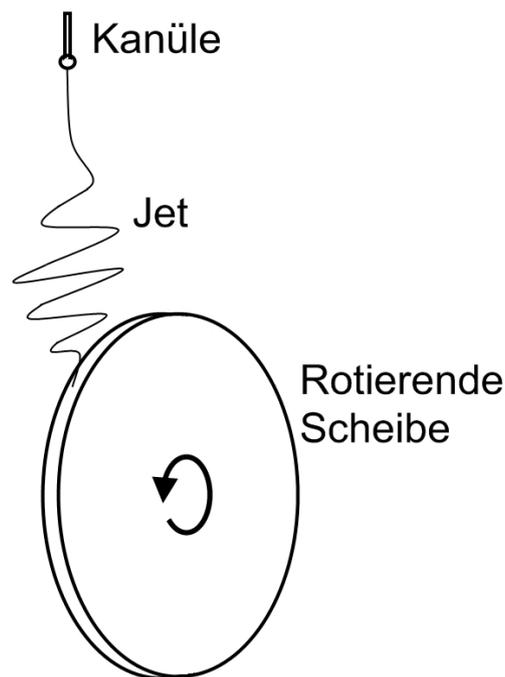


Abb. 4.16 Schematische Darstellung einer rotierenden Scheibe als Kollektor.

In der Literatur wurde diese Methode mit einem hohen Orientierungsgrad bei Drehzahlen von etwa 1000 pro Minute beschrieben [95, 181, 209].

Das Elektrospinnen des Kollagen-PCL-Blends auf den Scheibenaußenrand (Breite: 1 cm) erwies sich als prinzipiell möglich. Eine Anfälligkeit gegenüber niedriger Luftfeuchtigkeit, da die zusätzliche Konvektion der Luft durch die Scheibenrotation das Austrocknen des Lösungstropfens an der Kanüle verstärkt, wurde festgestellt. Ein stabiles und konstantes Spinnen war nur bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von über 30% möglich. Es konnten orientierte Faservliese mit einer Höhe von mehreren 100 μm erhalten werden.

Im Folgenden sind die, mit diesen beiden Techniken erzeugten, orientierten Fasermatten dargestellt (Abb. 4.17).

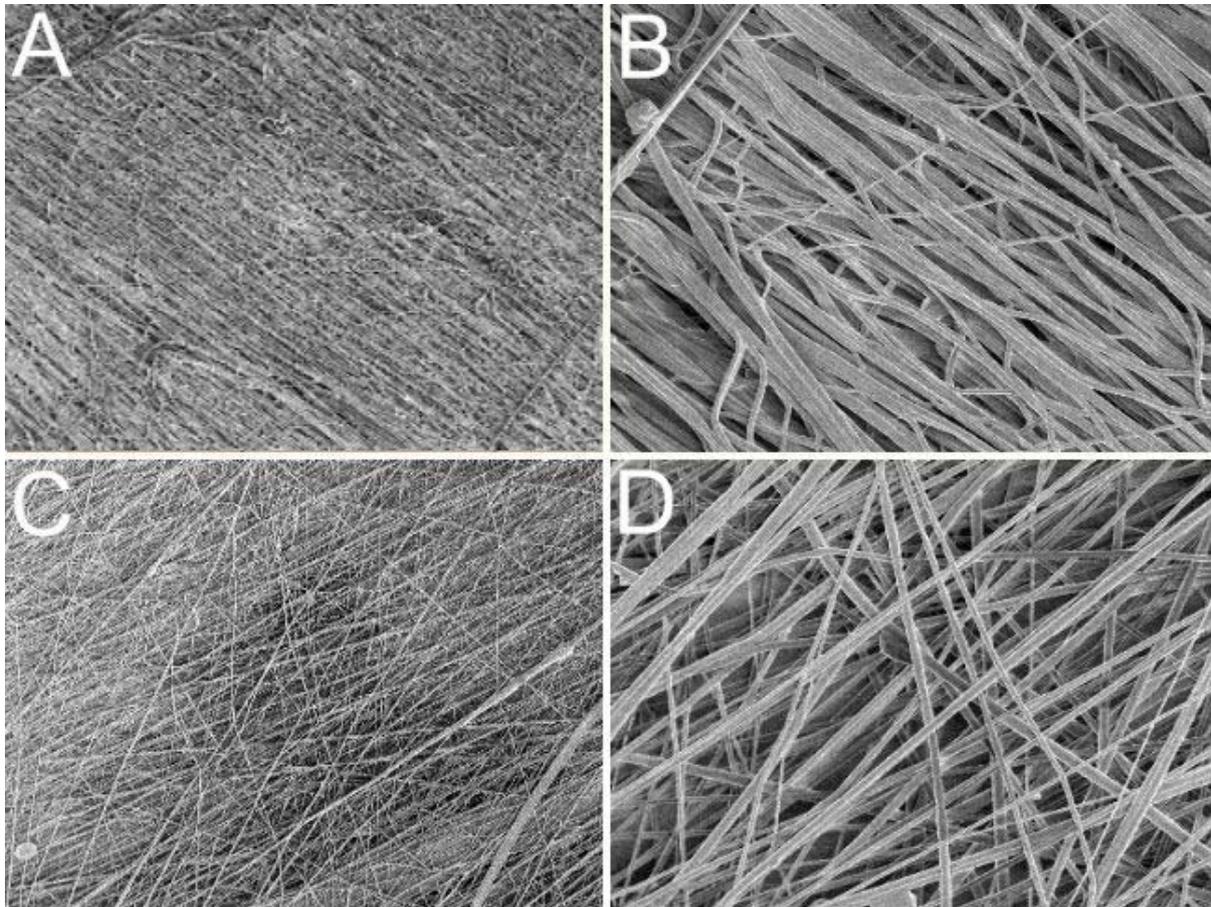


Abb. 4.17 SEM-Aufnahmen von orientierten Fasern von der rotierenden Scheibe (A und B) und Zylinder (C und D). Die Vergrößerung beträgt bei A und C x800, bei B x4500 und bei C x5000, Beschleunigungsspannung 2 kV

Die auf die rotierende Scheibe gesponnenen Fasern (Abb. 4.17 A und B) zeigen einen hohen Orientierungsgrad. Es liegen nur vereinzelt querliegende Fasern vor. Die Abweichung der Ausrichtung ist gering. Auch bei geringerer Vergrößerung ist eine Vorzugsorientierung noch zu erkennen (Abb. 4.17 A). Bei den auf die rotierende Walze gesponnenen Proben ist der Orientierungsgrad deutlich schlechter zu bewerten (Abb. 4.17 C und D). Bei der geringeren Vergrößerung ist eine Ausrichtung der Fasern kaum zu erkennen. In Abb. 4.17 D lässt sich eine Vorzugsorientierung noch erkennen, ist aber im Vergleich zu der auf die Scheibe gesponnenen Probe weniger ausgeprägt (Abb. 4.17 B).

Abschließend kann man sagen, dass das Elektrospinnen auf eine rotierende Scheibe mit einer deutlich höheren Ausrichtung der Faser und aufgrund der geringeren Kollektorfläche mit weniger Ausschußfasern verbunden ist. Die Fixierung von Glasplättchen dürfte allerdings mit Schwierigkeiten behaftet sein. Für das eigentliche Ziel, die Anwendung der Matrix im Tiermodell, ist diese Methode zu bevorzugen.

4.6.3 Zelltestung der dreidimensionalen Blendmatrices

Eine Besiedelung der dreidimensionalen Matrices mit Myoblasten der Ratte wurde bereits durchgeführt. Die Auswertung der Experimente ist aber noch nicht abgeschlossen. So kann momentan noch keine konkrete Aussage über das Einwachsverhalten der Zellen getroffen werden. Kultivierungsversuche einer geschichteten dreidimensionalen Blendmatrix in der für Tierversuche geeigneten Teflonkammer (*AV-loop*) sind bereits in der Durchführung. Falls die Ergebnisse einen positiven Verlauf zeigen, könnte die entwickelte Matrix schon bald im Tiermodell Anwendung finden.

4.7 Zusammenfassung zur Muskelgewebezüchtung

Die Entwicklung einer ausgerichteten Matrix für die *in vitro* und *in vivo* Kultivierung von Myoblasten konnte in weiten Teilen erreicht werden.

Hierzu wurde die Kompatibilität von Fasermatrices aus Kollagen mit Myoblasten der Ratte getestet. Eine prinzipielle Eignung konnte festgestellt werden. Bei der Zellkultivierung auf parallel orientierten Fasermatten wurde eine entsprechende Ausrichtung der Zellen beobachtet. Obwohl sich das Kollagensystem als geeignet erwies, musste aufgrund der Instabilität und Verfilmung der Matrix ein Materialwechsel vorgenommen werden. Die Weiterentwicklung führte zu einer Mischmatrix aus Kollagen und Poly(ϵ -caprolacton), welche die notwendige Stabilität aufwies und nicht einer Verfilmung während des Spinnvorgangs unterlag. Zuerst musste das optimale Verhältnis der beiden Polymere zueinander bestimmt werden, wobei ein möglichst hoher Kollagenanteil gewünscht wurde. Die Blendzusammensetzung von 1:1 erwies sich als geeignet. Untersuchungen zur Vernetzung der Mischfasern ergaben einen negativen Effekt auf die Myoblasten, so dass eine derartige Nachbehandlung nicht weiter vorgenommen wurde. Experimente zur Zellkompatibilität zeigten eine grundsätzliche Eignung. Auch eine Ausrichtung der Zellen konnte mit einer orientierten Blendfasermatte erreicht werden.

Zur Anwendung im Tiermodell war es notwendig eine dreidimensionale Matrix zu entwickeln. Die Verwendung einer rotierenden Rolle bzw. Scheibe als Kollektor erlaubte die Generierung einer dreidimensionalen orientierten Matrix, deren Zelltestung durchgeführt wurde, sich aber noch in der Auswertung befindet. Mit unorientierten dreidimensionalen Matrices werden ebenfalls im Moment Besiedelungsexperimente in der, für die Tierversuche angedachten, Teflonkammer durchgeführt.

Falls sich eine prinzipielle Eignung der Fasermatten in den aktuellen Versuchen ergibt, würde einer baldigen Anwendung im Tiermodell nichts mehr im Wege stehen.

5 Elektroverspinnene Polymerfasern als Trägersystem für PEI/siRNA-Komplexe

5.1 Motivation und Zielsetzung

Wie schon in der Einleitung beschrieben, stellt für die Gen- und Tumorthherapie die Applikation von siRNA (*small interfering RNA*) ein vielversprechendes Werkzeug dar. Eine Komplexierung mit Polyethylenimin (PEI) stabilisiert die sonst sehr anfällige siRNA und führt gleichzeitig zu einer gesteigerten Transfektionseffizienz. Bei der Behandlung beispielsweise von Tumoren hat sich im Tiermodell eine generelle Eignung ergeben [170-172]. Für eine letztendliche Anwendung, beispielsweise in der Tumorthherapie, der Wundheilung oder im *Tissue Engineering* wäre ein Trägersystem notwendig, um am Wirkort eine gezielte Freisetzung der therapeutischen RNA-Moleküle zu bewirken.

Polymerbasierte, nanostrukturierte Wirkstoffträger bieten, wie bereits beschrieben, eine Fülle an Vorteilen bezüglich Anreicherung im Zielgewebe und kontrollierter Freisetzung.

Die Anwendbarkeit der hochwirksamen, PEI-komplexierten siRNA würde sich durch die Immobilisierung in einem Trägersystem und einer folgenden, kontrollierten Freisetzung deutlich erhöhen. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. A. AIGNER die Machbarkeit zu prüfen, ob mit Polyethylenimin komplexierte siRNA in elektrogenesponnene Nanofasern eingebracht und zu einem späteren Zeitpunkt (evtl. nach längerer Lagerung) unter Erhalt ihrer Funktion wieder freigesetzt werden kann.

Arbeiten zur Auswertung der DNA bzw. siRNA Aktivität wurden durch S. HÖBEL und Prof. Dr. A. AIGNER vom Fachbereich Humanmedizin, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG durchgeführt.

5.2 PEI-komplexierte DNA Immobilisierung in Nanofasern

Vor der Immobilisierung von siRNA stand die Testung der Freisetzung von PEI-komplexierter DNA (Luciferase-Plasmid-DNA) aus elektrogesponnenen Nanofasern. DNA-Moleküle sind deutlich unempfindlicher gegenüber äußeren Einflüssen und vorzeitigem Abbau. Des Weiteren lässt sich die Transfektionseffizienz leichter bestimmen. Falls das Elektrospinnen und die Freisetzung in einer Zellkultur einen vollständigen Verlust der DNA-Aktivität erwiesen hätten, wären weitere Versuche nicht erfolgversprechend gewesen. Zu diesem Zweck wurde einer wässrigen Polyethylenoxid (PEO) Lösung der wasserlösliche DNA-Komplex zugegeben und zu Nanofasern mittels Elektrosponnverfahren verarbeitet. Die erzeugten Fasern wurden auf Glassubstraten gesammelt und zur Auswertung in die Gruppe von Prof. Dr. AIGNER gebracht.

Zur Auswertung der DNA Transfektion wurden Ovarialkarzinomzellen (SKOV-3) 24 h vor der Zugabe der beladenen PEO-Fasern in *six-well-plates* ausgesät und mit IMDM/10% FCS-Medium kultiviert. Die Quantifizierung der Transfektion der Luciferase-Plasmid-DNA wurde 60 h nach der Faserzugabe durch Messung der spezifischen Luciferase-Lichtemission in relativen Lichteinheiten (RLU) bestimmt.

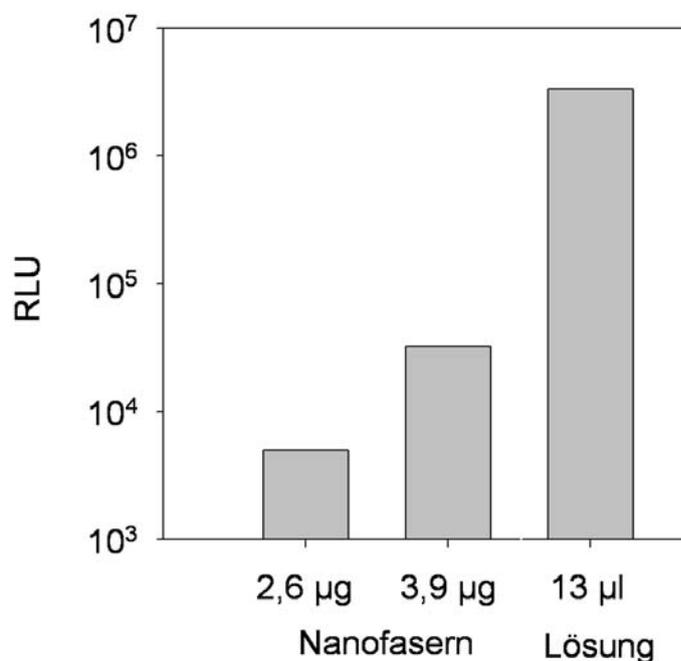


Abb. 5.1 Auswertung der DNA-Transfektion durch Messung der relativen Lichteinheiten (RLU)

In Abb. 5.1 ist das Ergebnis der DNA-Transfektion der eingesponnenen Komplexe im Vergleich zu einem freien Komplex aus Lösung dargestellt. Man kann erkennen, dass bei einer ähnlichen Menge an PEI-komplexierter DNA eine Erniedrigung der Transfektion im Vergleich zum freien Komplex zu beobachten ist. Die Signale der durch Auflösung der elektrogewebenen Fasern freigesetzten DNA zeigen eine deutliche Abhängigkeit von der immobilisierten Menge, beweisen aber eine vorhandene Transfektion. So scheinen eine Inkorporation und eine folgende Freisetzung von PEI/DNA-Komplexen unter Erhalt der Aktivität aus Nanofasern möglich zu sein. Deshalb scheint eine Verarbeitung durch die Technik des Elektrosplennens möglich.

Eine interessante Erkenntnis konnte gewonnen werden, als für sieben Tage bei 4 °C gelagerte DNA-Komplexe mit direkt elektroversponnenen bzw. aufgetauten verglichen wurden. Die Abnahme der Transfektionseffizienz war bei den in Nanofasern inkorporierten deutlich geringer (Abb. 5.2). Die Einbringung der PEI/DNA-Komplexe in eine Polymerumgebung scheint mit einer erhöhten Stabilität verbunden zu sein.

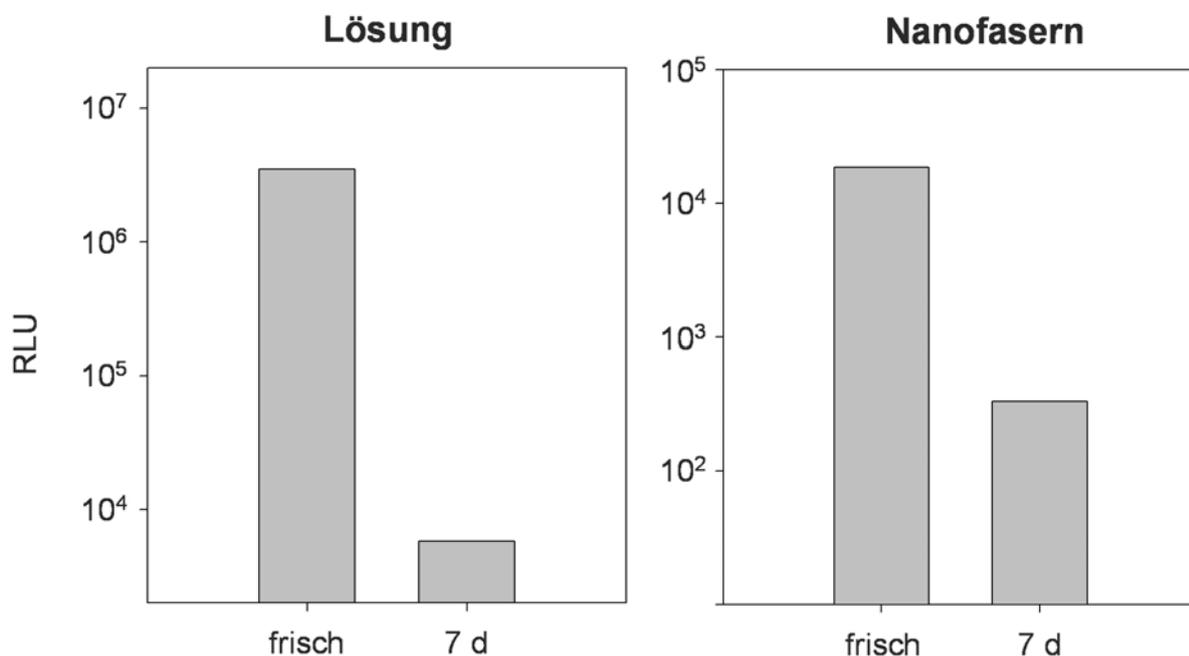


Abb. 5.2 Vergleich der DNA-Transfektion von „frischen“ und für sieben Tage kühl gelagerten Komplexen aus Lösung und aus Nanofasern

5.3 Immobilisierung PEI-komplexierter siRNA in Nanofasern

Die vorausgegangenen Einbringungsexperimente mit Plasmid-DNA und Polymerfasern zeigten eine prinzipielle Eignung des Elektrosponnverfahrens. Der nächste Schritt um eine Machbarkeit zu überprüfen stellte die Systemübertragung zu PEI-komplexierter siRNA dar. Dazu wurden wässrige Lösungen von Polyethylenoxid (PEO) und Polyvinylalkohol (PVA) mit den PEI/siRNA-Komplexen vermischt und auf Glassubstrate elektrospinnen. Zur Detektion der siRNA-Aktivität wurden stabil Luciferase-exprimierende Ovarialkarzinomzellen (SKOV-3) verwendet. Durch die Transfektion der siRNA wird das für die Luciferaseexpression verantwortliche Gen ausgeschaltet, die Intensität der Lichtemission nimmt ab.

Die verwendeten siRNAs unterschieden sich nur in ihrer Sequenz. Während die eine siRNA-Probe eine spezifische Luciferasehemmung verursachte (als siRNA 3 bezeichnet), war die andere (siRNA 2) unspezifisch, d. h. es fand keine Bindung an eine Ziel-mRNA statt. Ein Vergleich war notwendig, um toxische Einflüsse durch Polymere oder der Umwelt auszuschließen. Die Zellen wurden 24 h vor der Probenzugabe mit IMDM/10% FCS-Medium ausgesät, die Transfektion wurde über die relativen Lichteinheiten (RLU) der Luciferaseemission nach 60 - 72 h bestimmt.

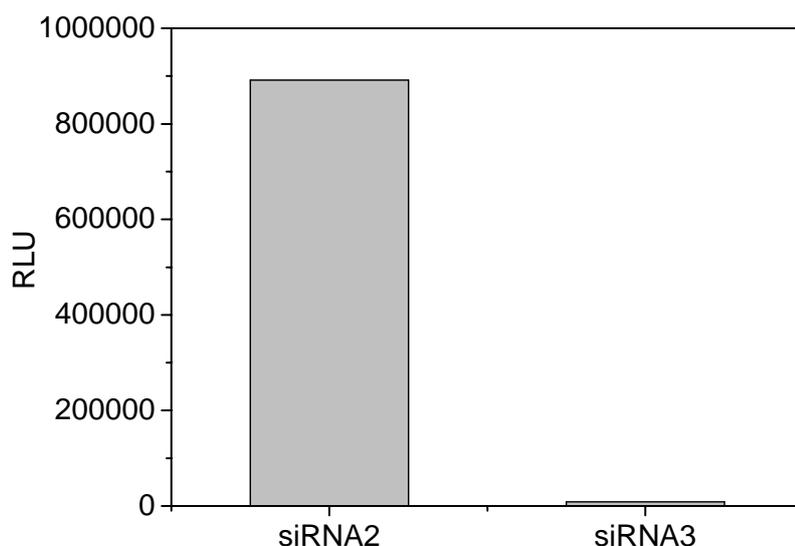


Abb. 5.3 siRNA-Transfektion mit elektrosponnenen PVA-Fasern

Bei den PVA-Fasern wurde bei einer eingesetzten Masse von 12 μg siRNA eine Signalreduktion von über 90% festgestellt und damit eine Transfektion nachgewiesen (Abb. 5.3). In diesem Fall war die eingesetzte siRNA Masse für derartige Experimente sehr groß und dementsprechend wurde eine sehr starke Signalminderung beobachtet.

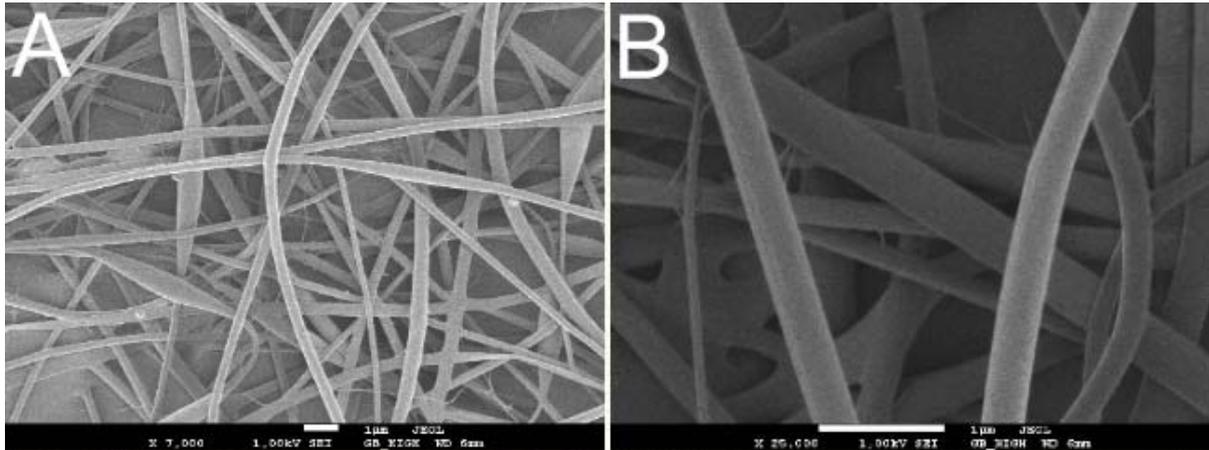


Abb. 5.4 SEM Aufnahmen der siRNA-Komplex beladenen PVA-Fasern
Maßstab entspricht 1 μm

Morphologisch betrachtet weisen die funktionalisierten Fasern keine Besonderheiten auf (Abb. 5.4). Teilweise ist das Auftreten von spindelförmigen Verdickungen zu beobachten. Der Faserdurchmesser liegt im Mittel bei 271 ± 91 nm. Die Faseroberfläche ist glatt bzw. weist keine erkennbare Strukturierung auf. Ein Anzeichen der inkorporierten siRNA-Komplexe (etwa 100 nm) ist nicht zu erkennen. Aufgrund ihrer Größe ($<$ Faserdurchmesser) scheint dies auch verständlich.

Die beladenen PEO-Fasern wurden nach vier Wochen Lagerung bei 4 °C untersucht. Dabei wurde eine errechnete Masse von 0,63 μg siRNA der Zellkultur zugegeben. Abb. 5.5 zeigt eine Abnahme der Lichtemission um etwa ein Drittel und spricht für eine erkennbare Transfektion. Bei nicht in Polymerfasern inkorporierten siRNA-Komplexen wäre eine Aktivität nach dieser Zeitdauer nicht mehr zu beobachten gewesen.

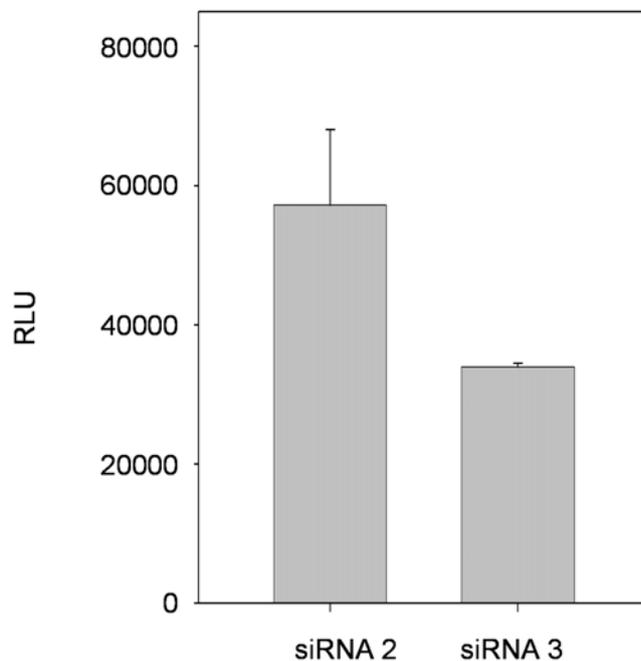


Abb. 5.5 siRNA-Transfektion mit elektrogenesponnenen PEO-Fasern nach vier wöchiger Lagerung bei 4 °C

Bisher wurden nur funktionalisierte Fasern aus wässrigen Lösungen versponnen. Für ein breites Anwendungsgebiet wäre auch das Verspinnen aus organischen Lösungsmitteln von großem Interesse. Zu diesem Zweck wurden in Glukose lyophilisierte PEI/siRNA-Komplexe mit einer Dichlormethanolösung von PEO aufgeschlämmt und versponnen. Aufgrund der inkompletten Aufnahme des Lyophilisats konnte keine genaue Aussage über die eingebrachte Masse getroffen werden. Der Ansatz der Dispergierung des wässrigen Komplexes in organischer Spinnlösung führte bei Vorexperimenten zu einem Ausfallen eines Feststoffes und wurde nicht weiter verfolgt.

Wie in Abb. 5.6 zu erkennen ist eine Signalreduktion auf etwa 75% aufgetreten. Aufgrund der relativ unbestimmten Bedingungen ist davon auszugehen, dass eine konkrete Aussage nur begrenzt möglich ist. Jedoch scheint das Verspinnen aus organischen Lösungsmitteln mit einer Verminderung der Transfektionseffizienz verbunden zu sein. Eine prinzipielle Machbarkeit ist aber wegen der beobachteten Transfektion anzunehmen.

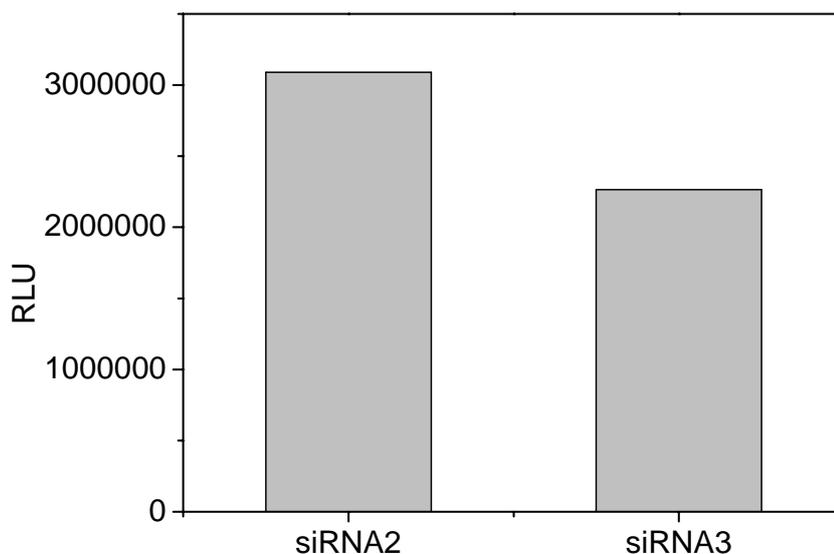


Abb. 5.6 siRNA-Transfektion mit PEO-Fasern versponnen aus Dichlormethan

Die bisher verwendeten Polymere PEO und PVA weisen ein recht schnelles Auflösungsverhalten in Wasser auf. So ist davon auszugehen, dass bereits nach wenigen Minuten bis Stunden die inkorporierten Komplexe komplett freigesetzt wurden. Um das Freisetzungsprofil zu modifizieren, wurden PEI/siRNA funktionalisierte PEO-Fasern mit einer Schicht aus Poly-*p*-xylylen (PPX) über chemische Gasphasenabscheidung (CVD, *chemical vapor deposition*) versehen. Eine retardierte BSA-Freisetzung aus PVA-Fasern konnte mit dieser Technik bereits nachgewiesen werden [117]. So wurden Beschichtungen von 50 nm und 500 nm mit PPX vorgenommen.

Eine Transfektion der PEI/siRNA-Komplexe ist bei den PPX-behandelten Fasern nicht zu beobachten (Abb. 5.7). Im Vergleich ist bei PEO-Fasern ohne Beschichtung eine Signalreduktion auf rund 36% zu erkennen. Entweder ist durch die Beschichtung die Diffusion der Komplexe dermaßen verringert, dass die abgegebene Menge innerhalb von sieben Tagen nicht für eine Transfektion ausreichte, oder eine Freisetzung wurde komplett verhindert. Grund hierfür könnten die Ausmaße des PEI-Komplexes sein, wobei eine Diffusion durch die PPX-Schicht nicht oder nur begrenzt möglich ist.

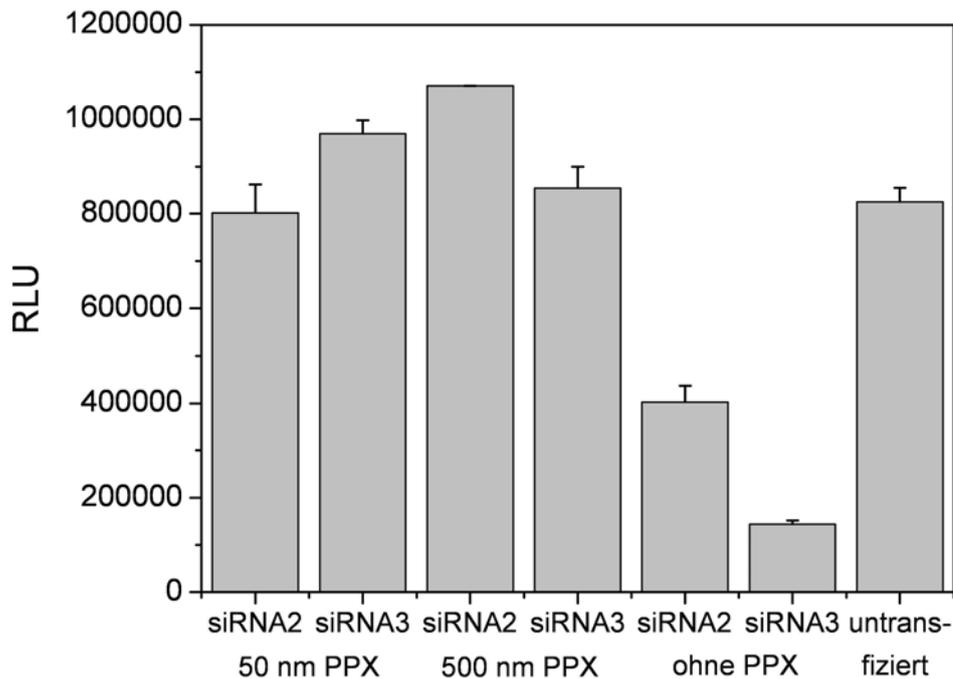


Abb. 5.7 siRNA-Transfektion mit PPX beschichteten PEO-Fasern

In Abb. 5.7 ist auch die Messung der relativen Lichteinheiten bei untransfizierten Zellen dargestellt. Bei der Gegenüberstellung mit den nicht beschichteten PEO-Fasern ist eine deutliche Signalreduktion bei den unspezifischen siRNA Proben erkennbar. Dies zeigt einen toxischen Effekt durch die Applikation der funktionalisierten, elektrogenesponnenen Fasern. Eine solche Toxizität kann durch das Faserpolymer (in diesem Fall PEO) oder durch die große Masse an eingesetzten Komplexen hervorgerufen werden. Das niedermolekulare PEI weist ab einer bestimmten Menge eine Toxizität gegenüber Zellen auf. Ein negativer Effekt von PEO auf Zellkulturen ist bei diesen geringen Dosen nicht bekannt. So muss für weitere Experimente beachtet werden, dass eine übermäßige Beladung mit PEI/siRNA-Komplexen auch von negativer Wirkung auf Zellen begleitet sein kann.

5.4 Zusammenfassung zu siRNA Trägersystemen

Eine prinzipielle Machbarkeit der Immobilisierung von PEI/siRNA-Komplexen in elektrogesponnenen polymeren Nanofasern und einer folgenden Freisetzung unter Erhalt der Wirksamkeit konnte nachgewiesen werden.

Hierzu wurden als erstes Modell Plasmid-DNA-Komplexe durch Elektrosponnen in PEO-Fasern eingebracht und die Transfektionseffizienz nach der Freisetzung bestimmt. Eine siebentägige Lagerung bei 4 °C erwies sich bei den in Fasern eingelagerten Komplexen deutlich weniger aktivitätsmindernd als bei nicht-eingesponnenen. Dieses System wurde auf PEI komplexierte siRNA, welche zur Gentherapie eingesetzt werden kann, übertragen. So konnte eine Freisetzung und Transfektion der siRNA aus, aus wässrigen und organischen Lösungsmitteln elektrogesponnenen, PEO- und PVA-Fasern beobachtet werden. Der bereits bei den DNA-Komplexen festgestellte Effekt der deutlich verringerten Aktivitätsminderung bei mehrtägiger Lagerung bei 4 °C konnte bei siRNA-Komplexen sogar noch nach vier Wochen bestätigt werden. Eine Freisetzung der siRNA war nach einer Beschichtung mit PPX nicht mehr zu beobachten und kann nicht als Ansatz für eine Verzögerung dieser dienen.

Die Möglichkeit, Nanofasern als Trägersysteme für PEI/siRNA-Komplexe zu verwenden, eröffnet eine Vielzahl von potentiellen Anwendungsgebieten in der therapeutischen Medizin. Dazu gehören z. B. die pulmonale Applikation zur Tumorthherapie und die Freisetzung von siRNA aus *Tissue Engineering* Matrices oder Wundverbänden. Zu diesem Zweck laufen zur Zeit weitere Versuche, um die Basis der anwendbaren Fasermaterialien zu erweitern und eine verzögerte bzw. kontrollierte Freisetzung der hochwirksamen Komplexe zu erhalten. Dies könnte beispielsweise durch Beschichtung mit Lipiden, Mikroverkapselung oder durch das Coelektroversponnen zu Kern-Schale-Fasern, bei geeigneter Wahl des Mantelmaterials, möglich werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Forschung und der Erkenntnisgewinn in den interdisziplinären Bereichen der regenerativen und therapeutischen Medizin wie *Tissue Engineering* und *Drug Delivery* haben in den letzten Jahren einen erheblichen Aufschwung erfahren. Gerade Verfahren der Mikro- und Nanostrukturierung von Polymeren haben hierzu einen großen Beitrag geleistet. Da der biologische Aufbau in diesen Größenordnungen stattfindet, stellt die Imitation natürlicher Strukturen und Vorgänge einen aussichtsreichen Ansatz dar.

Ziel dieser Arbeit war die Präparation von funktionalisierten und/oder strukturierten Fasern und Fasermatten für Anwendungen in der Gewebezüchtung und als Wirkstoffträger. Zu diesem Zweck wurden bestehende Systeme weiterentwickelt und neue Systeme getestet bzw. etabliert. Der Fokus lag hierbei zum einen auf der Immobilisierung und Freisetzung von Funktionsstoffen, zum anderen auf der Zellkompatibilitätstestung von Matrices aus natürlichen Polymeren und der Kultivierung von dreidimensionalen und auch parallel ausgerichteten Fasermatten.

So konnte gezeigt werden, dass das, in Zusammenarbeit mit der Orthopädie des UNIVERSITÄTSKLINIKUMS MARBURG, bereits entwickelte Matrixsystem auf Poly(L-lactid)-Basis zur Immobilisierung von Wachstumsfaktoren genutzt werden kann. Hierzu wurde eine Elektrospinanlage entwickelt, die innerhalb einer sterilen Werkbank betrieben werden kann. Bei der Kultivierung der Wachstumsfaktor-modifizierten Matrix mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) wurde ein osteoinduktiver Effekt festgestellt, obwohl eine Funktionsstofffreisetzung nicht beobachtet wurde. Die, auf gleiche Weise durchgeführte, Immobilisierung eines fluoreszenz-markierten Modellproteins wurde untersucht und kann als mögliches Modell für den inkorporierten Wirkstoff dienen.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie vom Fachbereich Humanmedizin der PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG wurde die prinzipielle Machbarkeit zur Immobilisierung und Freisetzung von therapeutisch hochaktiven PEI/siRNA-Komplexen in und aus elektroverspinnenen Polymerfasern nachgewiesen. Als erstes Modell wurden PEI/DNA-Komplexe, welche verglichen mit siRNA eine höhere Stabilität aufweisen, in PEO-Fasern eingebracht und die Zelltransfektion nach der Freisetzung bestimmt. Dieses System wurde auf PEI komplexierte siRNA übertragen. So konnte eine Freisetzung und Transfektion der siRNA aus, aus wässrigen und organischen Lösungsmitteln elektroverspinnenen, PEO-

und PVA-Fasern beobachtet werden. Bei 4 °C gelagerten immobilisierten PEI/siRNA-Komplexen wurde, im Vergleich zu nicht inkorporierten, eine erhöhte Transfektion festgestellt. Nach einer Faserbeschichtung mit PPX konnte eine Freisetzung der Komplexe nicht mehr beobachtet werden. Dieser Weg kann dementsprechend nicht als Ansatz für eine verzögerte Freisetzung dienen.

Folglich hat es sich bestätigt, dass durch Elektrospinnen erzeugte Polymerfasern in verschiedenen Systemen als Wirkstoffträger dienen können und die Leistungsfähigkeit der Funktionsstoffe auch nach der Freisetzung erhalten blieb.

Weiterhin konnte für *Tissue Engineering* Anwendungen, in Zusammenarbeit mit der Orthopädie des UNIVERSITÄTSKLINIKUMS MARBURG und der Plastisch und Handchirurgischen Klinik des UNIVERSITÄTSKLINIKUM ERLANGEN, eine Matrix auf Basis des natürlichen Strukturproteins der EZM, Kollagen Typ I, entwickelt und etabliert werden. Eine prinzipielle Eignung des Materials als *Scaffold* für die Kultivierung mit hMSC und Myoblasten der Ratte wurde beobachtet. Bezüglich der mesenchymalen Stammzellen wurden eine osteogene Induktion und ein verbessertes Zellwachstum nachgewiesen. Aufgrund von unzureichender Stabilität und Anwendbarkeit der Kollagenmatrix wurde ein Wechsel zu Mischmatrices von Kollagen mit PLLA und PCL vorgenommen. Eine grundsätzliche Eignung der Blendfasern wurde sowohl bei hMSC mit PLLA und PCL als auch bei Myoblasten mit PCL festgestellt. Genaue Aussagen können wegen den teilweise noch momentan laufenden Experimenten und deren Auswertungen nicht getroffen werden.

Ein weiterer Punkt im Fokus dieser Arbeit war die Präparation von dreidimensionalen und auch parallel ausgerichteten Fasermatten zur *in vitro* und auch *in vivo* Zellkultivierung. So wurde, in Zusammenarbeit mit der Orthopädie des UNIVERSITÄTSKLINIKUM MARBURG, das bereits existierende System zur dreidimensionalen Matrixbesiedelung im Perfusionssystem mit hMSC getestet. Untersuchungen der Porengrößen und deren Verteilung wurden an modifiziert gesponnenen (d. h. ein Aluminiumlochblech wurde als Gegenelektrode verwendet), strukturierten Matrices im Vergleich zu unmodifizierten vorgenommen. Es konnte eine Tendenz zu größeren Poren durch die Modifizierung festgestellt werden. Eine dreidimensionale Besiedelung mit hMSC wurde direkt, durch Anfärbung von Paraffinschnitten, und indirekt über die Matrixexpression, durch SEM-Aufnahmen an einem Gefrierbruch, nachgewiesen. In Zusammenarbeit mit der Plastisch und Handchirurgischen Klinik des UNIVERSITÄTSKLINIKUMS ERLANGEN, werden im Moment dreidimensionale

Blendmatrices, auch mit parallel ausgerichteten Fasern, besonders im Hinblick auf eine Anwendung im Tiermodell (*AV-loop*), untersucht. Eine prinzipielle Eignung von orientierten Fasern zur parallelen Ausrichtung von Myoblasten wurde an zweidimensionalen Kollagen- und Blendmatrices nachgewiesen.

Mit dieser Arbeit wurde ein wesentlicher Schritt für die weitere Entwicklung von *Tissue Engineering* Matrices gemacht. Durch die nachgewiesene Möglichkeit zur Einbringung von Wirkstoffen und Wachstumsfaktoren im Besonderen ist es in Zukunft denkbar, Fasermatrices aus mehreren verschiedenen Polymerfasern zu generieren und so eine sequentielle Freisetzung, abgestimmt auf die Bedürfnisse der Zellen, von Funktionsstoffen zu erhalten. Die Verwendung von Kollagen als Teil der Matrix dürfte, durch seine osteoinduktiven Eigenschaften, bei der Züchtung von Knochengewebe vorteilhaft sein. Auch die dreidimensionale Struktur der Matrix und deren homogene Besiedelung sind für eine spätere Anwendung von entscheidender Bedeutung. Hier spielt auch die Vaskularisierung eine wichtige Rolle, da eine Versorgung mit Nährstoffen in Konstrukten größeren Ausmaßes nur durch den Blutkreislauf gewährleistet werden kann. Dementsprechend ist das Tiermodellsystem zur Matrixvaskularisierung ein zukunftsweisender Ansatz.

Auch im Bereich der therapeutischen Medizin könnte, durch die Verwendung von elektrogesponnenen Polymerfasern als Trägersystem, das Anwendungsgebiet von PEI/siRNA-Komplexen erweitert werden. Dazu sollten weitere Untersuchungen bezüglich der kontrollierten Freisetzung durch beispielsweise Beschichtung mit Lipiden, Mikroverkapselung oder das Coelektrospinnen zu Kern-Schale-Fasern unternommen werden. Mögliche Einsatzmöglichkeiten sind z. B. Wundverbände, *Tissue Engineering* Matrices oder im Fall von Faserbruchstücken die pulmonale Applikation zur Tumorthherapie.

Damit eröffnet sich ein breites Anwendungsspektrum im Bereich der therapeutischen und regenerativen Medizin.

7 Experimenteller Teil

7.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

Polymere:

Pol(L-lactid) (PLLA), Resomer 210	(BOEHRINGER)
Kollagen Typ-I aus Kalbshaut	(SIGMA-ALDRICH)
Polyvinylalkohol (RS-2117, PVA)	(KURARAY SPEC. EUR.)
Polyethylenoxid (PEO), $M_w = 900.000$ g/mol	(FLUKA)
Poly(ϵ -caprolacton) (PCL), $M_N = 80.000$ g/mol	(SIGMA-ALDRICH)

Lösungsmittel:

Dichlormethan, >99,8%	(SIGMA-ALDRICH)
1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol (HFIP), >99,8%	(SIGMA-ALDRICH)
Ethanol, ≥ 99 %	(ROTH)
2-Propanol, >99,5%	(SIGMA-ALDRICH)

Reagenzien, Medien und Materialien:

[2.2]Paracyclophan	(SCS INT.)
Fluoresceinisothiocyanat-konjugiertes BSA	(SIGMA-ALDRICH)
BMP-2, rh	(RELIA TECH)
PBS-Culbecco, w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} , LE, steril	(BIOCHROM)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) , Low Glucose	(GIBCO)
Fötale Kälberserum (FCS), steril	(BIOCHROM)
Hexamethylendiisocyanat (HMDI)	(SIGMA-ALDRICH)
Glutaraldehyd, 25% in Wasser	(SERVA)
Cacodylatpuffer pH 7,4	(SERVA)
Osmiumtetroxid, 4% in Wasser	(ROCHE)
Parafilm® M	(ROTH)
Silizium- <i>Wafer</i> (Dopand: Bor, Dicke: 0,7 mm)	(SILTRONIC AG)

7.2 Präparation der *Tissue Engineering*-Matrices

7.2.1 Elektrosponnen der Faserproben auf Glasplättchen

Die Elektrosponnapparatur wurde zuerst mit alkoholischer Lösung sorgfältig gereinigt und desinfiziert. Die zu bespinnenden Glasplättchen (Durchmesser = 16 mm) wurden auf eine desinfizierte Glasplatte der Ausmaße 20 x 20 cm gelegt, welche auf der Gegenelektrode auflag. Die zu verspinnende Lösung wurde in einer ein Milliliter-Spritze gelagert. Als Spinndüse dienten Kanülen mit einem Durchmesser von 0,45, 0,6 oder 0,9 mm, deren Ende zuvor abgebrochen und glattgeschliffen wurde. Die Spinnparameter wurden entsprechend der Umwelteinflüsse (Temperatur, rel. Luftfeuchtigkeit) so gewählt, dass ein einheitliches Spinnen gewährleistet war. Der Elektrodenabstand war meist bei ca. 15 cm. Folgend wurde die abgelegte Matrix auf den Glasplättchen in der sterilen Werkbank fixiert. Dazu wurde PLLA-Lösung (4 wt.%) rundherum und an drei Punkten des Substrats aufgetragen. Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde auf dazugelegte Siliziumträger oder Aluminiumfolie gesponnen.

7.2.2 Modifiziertes Elektrosponnen der Faserproben

Zur Generierung von dreidimensionalen *Scaffolds* wurden die Fasern auf ein Aluminiumlochblech gesponnen, von dem die erzeugte Matte abgezogen und auf Glassubstrate fixiert wurde.

Im Fall der Fasermatten mit Vorzugsorientierung wurde auf eine rotierende Rolle mit fixierten Glasträgern gesponnen oder auf eine rotierende Scheibe. Es wurde bei Rotationen von 3500 bzw. 1500 bis 2200 pro Minute gearbeitet. Der Kollektorabstand lag zwischen 4 und 10 cm, aufgrund des geringeren Abstands wurden um bis zu 6 kV niedrigere Spannungen verwendet als beim nicht modifizierten Elektrosponnen.

7.2.3 Elektrosponnen der verschiedenen Polymere

Die Spinnlösungen der verschiedenen Konzentrationen wurden über nacht gerührt bis eine homogene Lösung entstanden war. Kollagenhaltige Lösungen wurden bei 4 °C gelagert.

Poly(L-lactid) wurde aus einer 4 wt.% Lösung in Dichlormethan bei einer Spannung von ca. 9 kV und einem Abstand von 12 - 15 cm versponnen.

Für die Inkorporierung von BMP-2 und FITC-BSA wurden der organischen PLLA-Lösung, die wässrigen Proteinlösungen (BMP-2 ca. 14 wt.%, FITC-BSA 2 wt.%) im Verhältnis 1:10 bzw. 1:8,5 zugegeben und durch einen Kreisschüttler (2500 rpm) dispergiert. Die Dispersionen wurden mit der Spinnapparatur in der sterilen Werkbank auf Glassubstrate versponnen (eine genaue Spannung kann Mangels Anzeige nicht angegeben werden).

Kollagen Typ-I wurde bei verschiedenen Konzentrationen zwischen 10 – 80 mg/mL aus HFIP versponnen. Für die Zellversuche wurden Lösungen mit 50 mg/mL Kollagen benutzt. Die angelegte Spannung betrug etwa 16 kV bei einem Elektrodenabstand von etwa 14 cm. Besonders bei hoher Luftfeuchtigkeit war ein Verfilmen der Matrix schon nach kurzen Spindauern von etwa einer Stunde zu beobachten.

Der **PLLA/Kollagen-Blend** des Massenverhältnisses 1:1 wurde aus einer HFIP-Lösung mit einer Gesamtpolymerkonzentration von 53 mg/mL bei einem Abstand von 18 cm und einer Spannung von 11 kV versponnen.

Der **PCL/Kollagen-Blend** (Massenverhältnis 1:1) wurde bei verschiedenen Konzentrationen von 30 – 120 mg/mL aus HFIP verarbeitet. Die Spannung betrug ca. 16 kV und der Abstand ca. 15 cm. Für die Zellexperimente mit dreidimensionalen Matrices wurde die Polymerkonzentration von 80 mg/mL benutzt.

7.2.4 Vernetzung der Polymerfasern auf Kollagenbasis

Es wurden verschiedene Verfahren zur Vernetzung angewandt:

Die **Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (UV)** wurde in einer abgeschlossenen Kammer bei einem Maximum der Strahlungsintensität bei ca. 350 nm und einer Leistung von 1,89 W/cm² durchgeführt. Es wurden verschieden Bestrahlungszeiten im Bereich von Stunden vorgenommen. Es wurden 12 UV-Leuchtstoffröhren der Marke OSRAM Eversun 40W-79K

und zur Bestimmung der Intensität eine Photodiode (HAMAMATSU S 1227-1010BQ) mit einem KEITHLEY 485 Autoranging Picometer verwendet.

Die Behandlung mit **Glutaraldehyd (GTA)** wurde in einem Exsikkator durchgeführt. Dazu wurden die Faserproben für eine Dauer von bis zu 24 h GTA-Dampf ausgesetzt und anschließend je dreimal mit Ethanol und PBS gewaschen.

Das Vernetzen mit **Hexamethylen-diisocyanat (HMDI)** wurde durch Einlegen der Proben in HMDI-Lösung (10 % (v/v)) in 2-Propanol für eine Stunde durchgeführt. Anschließend wurde mit 2-Propanol und Wasser gewaschen und die Fasern über Nacht bei 50 °C im Ofen getrocknet.

Die Behandlung der Proben mit dem **Dehydrothermalverfahren (DHT)** wurde in einem Ofen bei einem Druck von 1,5 mbar vorgenommen. Dazu wurde die Temperatur für eine Stunde bei RT gehalten und anschließend mit einer Heizrate von 30 °C/h auf 110 °C erhöht. Diese Temperatur wurde für 120 h gehalten bevor auf RT abgekühlt wurde.

7.3 Präparation der DNA und siRNA modifizierten Fasern

Die PEI-komplexierten Nukleinsäuren (DNA und siRNA) wurden von Prof. AIGNER zur Verfügung gestellt und nach AIGNER et al. präpariert [173]. Die Komplexe wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Elektrospinnapparatur wurde zuerst mit alkoholischer Lösung sorgfältig gereinigt und desinfiziert. Die zu bespinnenden Glasplättchen (Durchmesser = 16 mm) wurden auf eine desinfizierte Glasplatte der Ausmaße 20 x 20 cm gelegt, welche auf der Gegenelektrode auflag. Die zu verspinnende Lösung wurde in einer ein Milliliter-Spritzen gelagert. Als Spinndüse dienten Kanülen mit einem Durchmesser von 0,45 mm, deren Ende zuvor abgebrochen und glattgeschliffen wurde.

7.3.1 Herstellung von PEO-Fasern mit PEI/DNA-Komplexen

Zur Immobilisierung wurden 165 µg der PEI/DNA-Komplexe gelöst in 100 µL HEPES (10 mM und 150 mM NaCl) aufgetaut und zu 200 µL einer 6 wt.%igen PEO/Wasser-Lösung gegeben. Nach der Vermischung mit einem Kreisschüttler wurde die Spinnlösung bei einer Spannung von ca. 17 kV und einem Abstand von 14 cm auf Glassubstrate versponnen. Die Flußrate betrug 0,2 mL/h.

7.3.2 Herstellung von PEO-Fasern mit PEI/siRNA-Komplexen

Zur Immobilisierung wurden 165 µg der PEI/siRNA-Komplexe (sowohl der Luciferase-spezifischen, als auch der unspezifischen siRNA) gelöst in 100 µL HEPES (10 mM und 150 mM NaCl) aufgetaut und zu 200 µL einer 6 wt.%igen PEO/Wasser-Lösung gegeben. Nach der Vermischung mit einem Kreisschüttler (2500 rpm) wurde die Spinnlösung bei einer Spannung von ca. 17 kV und einem Abstand von 14 cm auf Glassubstrate versponnen. Die Flußrate betrug 0,2 mL/h.

Bei den aus Dichlormethan gesponnenen Fasern wurden die mit Glukose lyophilisierten PEI/siRNA-Komplexe mit einer PEO/DCM-Lösung der Konzentration 1 wt.% aufgeschlämmt. Die erhaltene Lösung wurde bei 7,5 kV und einem Abstand von ca. 14 cm verarbeitet und auf Glassubstrate aufgebracht.

7.3.3 Herstellung von PVA-Fasern mit PEI/siRNA-Komplexen

Zur Immobilisierung wurden 165 µg der PEI/siRNA-Komplexe (sowohl der Luciferase-spezifischen, als auch der unspezifischen siRNA) gelöst in 100 µL HEPES (10 mM und 150 mM NaCl) aufgetaut und zu 200 µL einer 12 wt.%igen PVA/Wasser-Lösung gegeben. Nach der Vermischung mit einem Kreisschüttler (2500 rpm) wurde die Spinnlösung bei einer Spannung von ca. 21 kV und einem Abstand von 14 cm auf Glassubstrate versponnen. Die Flußrate betrug 0,15 mL/h.

7.3.4 PPX-Beschichtung durch Chemische Gasphasenabscheidung

Für die PPX-Beschichtung der PEI/siRNA-Komplex modifizierten PEO-Fasern wurde der Beschichter Labcoater 1 PDS 2010 der Firma SPECIALTY COATING SYSTEMS zur chemischen Gasphasenabscheidung (CVD, *chemical vapor deposition*) verwendet. Die Fasermatten wurden an einer gebogenen Metallstange fixiert, welche am Boden der Beschichtungsapparatur befestigt wurde. Mit einer [2.2]Paracyclophan-Einwaage von 100 mg wurden etwa 50 nm und mit 1 g wurden ca. 500 nm dicke PPX-Beschichtungen erzeugt. Die Schichtdicken wurden an beigelegten Objektträgern durch ein Oberflächenprofilometer (DEKTAK) bestimmt.

7.4 Zellkulturen

7.4.1 Zellkulturen mit hMSC

Die verwendeten humanen mesenchymalen Stammzellen wurden entsprechend der Vorgehensweise von PITTENGER et al. isoliert und kultiviert [55]. Die Aussaat auf den Fasermatrizes wurde in einer Dichte von 3×10^4 Zellen/cm² vorgenommen. Das Standard- bzw. Wachstumsmedium war DMEM mit Zugabe von 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin. Zur Induzierung der osteogenen Differenzierung wurde das Medium um 0,1 µM Dexamethason, 0,05 mM Ascorbinsäure-2-Phosphat und 10 mM Glycerolphosphat (alles von SIGMA-ALDRICH) erweitert. Ein Mediumwechsel fand alle zwei bis drei Tage statt.

Am Ende der Kulturdauer wurde eine Zellfixierung mit eiskaltem Aceton/Methanol (1:1) vorgenommen.

Immunfluoreszenzfärbung

Die fixierten Proben wurden mit PBS gewaschen und mit den primären Antikörpern gegen Osteokalzin (BP710, von ACRIS), Kollagen-I (Ab6308, von ABCAM), Osteopontin (Ab8448, von ABCAM) inkubiert. Nach einem weiteren Waschgang mit PBS wurde der sekundäre Antikörper (cy-2 und cy-3-konjugiert von DIANOVA) zugegeben. Danach wurde für 30 Minuten DAPI zugegeben und anschließend mit PBS gewaschen.

ELISA

Osteoprotegerin wurde durch ein OPG-ELISA-Kit (von IMMUNDIAGNOSTIK AG) und BMP-2 durch ein BMP-2-ELISA-Kit (von R&D SYSTEMS), nach Anleitung des Herstellers durchgeführt, bestimmt.

PCR-Analyse

Zur Analyse der Genexpression wurde RNA aus den kultivierten Zellen mit einem RNeasy Mini Kit (von QIAGEN) nach Anleitung des Herstellers extrahiert und spektroskopisch quantifiziert.

7.4.2 Zellkulturen mit primären Myoblasten

Die verwendeten primären Rattenmyoblasten wurden von Lewis-Ratten nach der beschriebenen Vorgehensweise von BACH et al. isoliert [210]. Das Standard- bzw. Wachstumsmedium war DMEM mit Zugabe von 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin. Ein Mediumwechsel fand alle drei Tage statt.

Am Ende der Kulturdauer wurde eine Zellfixierung mit Methanol (-20 °C) vorgenommen.

Blendmatrixvorbehandlung

Die Blendmatrices wurden vor der Besiedelung mit Myoblasten für 24 h in Ethanol eingelegt und anschliessend mit FCS für zwei Stunden inkubiert.

Immunfluoreszenzfärbung

Die fixierten Proben wurden mit PBS gewaschen und mit dem Primärenantikörper gegen MyoD (von SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC.) inkubiert. Nach einem weiteren Waschgang mit PBS wurde der sekundäre Antikörper (cy-3-konjugiert IgG) zugegeben. Danach wurde für 30 Minuten DAPI zugegeben und anschließend mit PBS gewaschen.

7.4.3 Zelltransfektion der DNA und siRNA

Die zur Auswertung benutzen Ovarialkarzinomzellen (SKOV-3, von ATCC) wurden mit IMDM mit einer Zugabe von 10 % FCS kultiviert. Die stabil Luciferase-exprimierenden SKOV-3-Zellen wurden nach AIGNER et al. präpariert [170].

7.4.4 Zellfixierung zur Elektronenmikroskopie

Die Proben wurden mit PBS gewaschen und für 2 h mit Cacodylatpuffer und GTA fixiert. Anschließend wurde Osmiumtetroxidlösung (1% in Wasser) für eine Stunde die Sekundärfixierung vorgenommen und nochmals mit PBS gewaschen. Mit einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Proben langsam entwässert. Es folgte eine Trocknung in der Kritischen-Punkt-Kammer. Nun konnten die Proben auf Haltern fixiert und mit Kohlenstoff und Gold bedampft werden.

7.5 Verwendete Geräte

7.5.1 Optische Mikroskopie

Es wurden die Mikroskope des Typs UnivaR der Fa. REICHERT und des Typs Laborlux S und Labovert von Leitz zur optischen Mikroskopie verwendet. Mittels Adapter-Optik konnte eine Digitalkamera der Fa. NIKON, Modell Coolpix 995 angebracht werden.

Des Weiteren wurden die Fluoreszenzmikroskope des Typs DMR-X und für die Auswertungen der Immunfluoreszenz ein DM5000 der Fa. LEICA genutzt.

7.5.2 Rasterelektronenmikroskopie (SEM)

Es wurden zwei unterschiedliche Rasterelektronenmikroskope verwendet.

Zum einen ein S-4100 der Fa. Hitachi, zum anderen ein JSM-7500F der Fa. JEOL mit Kryotransfersystem der Fa. GATAN. Die SEM-Proben wurden auf Siliziumträgern präpariert und mit entsprechenden Klebestreifen auf dem Probenträger fixiert.

Für Aufnahmen mit dem S-4100 wurde eine Bedampfung mit Kohlenstoff und Gold vorgenommen. Die Beschleunigungsspannung war probenabhängig zwischen 3 und 10 kV.

Die Kryo-Transfereinheit erlaubt, durch externes Schockgefrieren mit unterkühltem Stickstoff, das Betrachten von wässrigen Zell-Proben. Die Probenkammer und die Transfer-Einheit, die einen Probenmanipulator für Gefrierbrüche enthält und eine Bedampfung der Probe mit Platin erlaubt, sind mit flüssigem Stickstoff gekühlt, welcher für konstant tiefe Temperaturen sorgt. Eine Beschleunigungsspannung von 2 kV wurde verwendet.

Die Auswertung der Faserdurchmesser erfolgte mit der Software „ImageJ“ und „Origin“.

7.5.3 Kontaktwinkelmessungen

Die Kontaktwinkel von Fasermatten wurden mit einem Gerät des Typs Krüss G 10 und der Software „Sca 20“ von DATA PHYSICS bestimmt.

7.5.4 Porometer

Zur Bestimmung der Porengrößen und deren Verteilung wurde ein Porometer des Typs AEXL1200 der Fa. PMI, mit mitgelieferter Software, verwendet. Der meßbare Porenbereich lag zwischen 0,013 bis 500 µm. Für die Messung wurde ein perfluorierter Kohlenwasserstoff („Galwick“ der Firma PMI) als das benetzende Fluid eingesetzt.

8 Literaturverzeichnis

- [1] D.H. Reneker, I. Chun, *Nanotechnology* **1996**, 7, 216.
- [2] C. Huang, S. Chen, C. Lai, D.H. Reneker, H. Qiu, Y. Ye, H. Hou, *Nanotechnology* **2006**, 17, 1558.
- [3] A. Formhals, DRP 584801, **1929**.
- [4] P.K. Baumgarten, *J. Colloid Interface Sci.* **1971**, 36, 71.
- [5] L. Larrondo, R. St. John Manley, *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* **1981**, 19, 909.
- [6] L. Larrondo, R. St. John Manley, *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* **1981**, 19, 921.
- [7] L. Larrondo, R. St. John Manley, *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* **1981**, 19, 933.
- [8] G. Binnig, H. Rohrer, C. Geber, E. Weibel, *Physical Review Letters* **1982**, 49, 57.
- [9] G. Binnig, C. Quate, C. Geber, *Physical Review Letters* **1986**, 56, 930.
- [10] S. Ramakrishna, *An introduction to electrospinning and nanofibers* (World Scientific, New Jersey, **2005**).
- [11] J. Doshi, D.H. Reneker, *J. Electrostat.* **1995**, 35, 151.
- [12] Z. Huang, Y. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna, *Compos. Sci. Technol.* **2003**, 63, 2223.
- [13] D. Li, Y. Xia, *Adv. Mater.* **2004**, 16, 1151.
- [14] W.E. Teo, S. Ramakrishna, *Nanotechnology* **2006**, 17, R89.
- [15] A. Greiner, J.H. Wendorff, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, 5670.
- [16] A. Holzmeister, *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg, **2006**.
- [17] G. Taylor, *Proc. R. Soc. London, Series A* **1964**, 258, 383.
- [18] Y.M. Shin, M.M. Hohman, M.P. Brenner, G.C. Rutledge, *Polymer* **2001**, 42, 9955.
- [19] T. Han, D.H. Reneker, A.L. Yarin, *Polymer* **2007**, 48, 6064.
- [20] Y. Dzenis, *Science* **2004**, 304, 1917.
- [21] S.L. Shenoy, W.D. Bates, H.L. Frisch, G.E. Wnek, *Polymer* **2005**, 46, 3372.
- [22] H. Fong, I. Chun, D.H. Reneker, *Polymer* **1999**, 40, 4585.
- [23] J. Zeng, X. Xu, X. Chen, Q. Liang, X. Bian, L. Yang, X. Jing, *Journal of Controlled Release* **2003**, 92, 227.
- [24] T. Jarusuwannapoom, W. Hongrojjanawiwat, S. Jitjaicham, L. Wannatong, M. Nithitanakul, C. Pattamaprom, P. Koombhongse, R. Rangkupan, P. Supaphol, *Eur. Polym. J.* **2005**, 41, 409.
- [25] M.M. Demir, I. Yilgor, E. Yilgor, B. Erman, *Polymer* **2002**, 43, 3303.
- [26] S. Megelski, J.S. Stephens, D.B. Chase, J.F. Rabolt, *Macromolecules* **2002**, 35, 8456.

- [27] X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B.S. Hsiao, B. Chu, *Polymer* **2002**, 43, 4403.
- [28] S. Zhao, X. Wu, L. Wang, Y. Huang, *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, 91, 242.
- [29] S. Koombhongse, W. Liu, D.H. Reneker, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **2001**, 39, 2598.
- [30] M. Bognitzki, W. Czado, T. Frese, A. Schaper, M. Hellwig, M. Steinhart, A. Greiner, J.H. Wendorff, *Adv. Mater.* **2001**, 13, 70.
- [31] M. Vogt, *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg, **2006**.
- [32] M. Bognitzki, T. Frese, M. Steinhart, A. Greiner, J.H. Wendorff, A. Schaper, M. Hellwig, *Polym. Eng. Sci.* **2001**, 41, 982.
- [33] C.L. Casper, J.S. Stephens, N.G. Tassi, D.B. Chase, J.F. Rabolt, *Macromolecules* **2004**, 37, 573.
- [34] J.A. Matthews, G.E. Wnek, D.G. Simpson, G.L. Bowlin, *Biomacromolecules* **2002**, 3, 232.
- [35] R. Dersch, *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, **2006**.
- [36] R. Dersch, T. Liu, A.K. Schaper, A. Greiner, J.H. Wendorff, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2003**, 41, 545.
- [37] A. Holzmeister, M. Rudisile, A. Greiner, J.H. Wendorff, *Eur. Polym. J.* **2007**, 43, 4859.
- [38] D. Sun, C. Chang, S. Li, L. Lin, *Nano Letters* **2006**, 6, 839.
- [39] J. Belardi, *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg, **2007**.
- [40] R. Langer, J. Vacanti, *Science* **1993**, 260, 920.
- [41] C. Vacanti, *J Cell Mol Med* **2006**, 10, 569.
- [42] C.A. Vacanti, J.P. Vacanti, *Surgical Technology International* **1991**, 43.
- [43] C.T. Laurencin, A.M.A. Ambrosio, M.D. Borden, J.A.J. Cooper, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **1999**, 1, 19.
- [44] O.E. Teebken, T. Kofidis, P. Akhyari, A. Haverich, *Zentralbl Chir* **2007**, 132, 236.
- [45] R. Marquardt, K. Schürle "Regenerative Medizin: Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)", **2005**.
- [46] J.R. Fuchs, B.A. Nasser, J. Vacanti, *Ann Thorac Surg* **2001**, 72, 577.
- [47] Y. Ikada, *J. R. Soc. Interface* **2006**, 3, 589.
- [48] J.P. Vacanti, R. Langer, *Lancet* **1999**, 354 Suppl I, SI32.
- [49] A.J. Friedenstein, I.I. Piatetzky-Shapiro, K. Petrakova, *J Embryol Exp Morphol* **1966**, 16, 381.
- [50] A.J. Friedenstein, R.K. Chailakhyan, N.V. Latsinik, A.F. Panasyuk, I. Keiliss-Borok, *Transplantation* **1974**, 17, 331.

- [51] S.J. Morrison, N.M. Shah, D.J. Anderson, *Cell* **1997**, 88, 287.
- [52] C.M. Digirolamo, D. Stokes, D. Colter, D.G. Phinney, R. Class, D. Prockop, *Br J Haematol* **1999**, 107, 275.
- [53] D.C. Colter, R. Class, C.M. DiGirolamo, D.J. Prockop, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97, 3213.
- [54] G.G. Wulf, B. Chapuy, L. Trumper, *Med Klin* **2006**, 101, 408.
- [55] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, D. Marshak, *Science* **1999**, 284, 143.
- [56] I.L. Weissman, *Science* **2000**, 287, 1442.
- [57] J. Beier, *Dissertation*, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, **2004**.
- [58] J.P. Bilezikian, *Principles of bone biology* (Academic Press, San Diego, **1996**).
- [59] H. Dobnig, R.T. Turner, *Endocrinology* **1995**, 136, 3632.
- [60] <http://depts.washington.edu/bonebio/ASBMRed/cells.html> (15.05.2008).
- [61] L.C.U. Junqueira, J. Carneiro, T.H. Schiebler, *Histologie* (Springer, Berlin, **1996**).
- [62] C.A. Rockwood, D.P. Green, *Rockwood and Green's fractures in adults*, Vol. 1 (Lippincott- Raven, Philadelphia, **1996**).
- [63] M.P. Lynch, C. Capparelli, J.L. Stein, G.S. Stein, J.B. Lian, *J. Cell. Biochem.* **1998**, 68, 31.
- [64] M.A. Attawia, K.M. Herbert, K.E. Uhrich, R. Langer, C.T. Laurencin, *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, 48, 322.
- [65] M.J. Somerman, L.W. Fisher, R.A. Foster, J.J. Sauk, *Calcif. Tissue Int.* **1988**, 43, 50.
- [66] B.S. Noble, J. Reeve, *Mol. Cell. Endocrinol.* **2000**, 159, 7.
- [67] E.A. Cowles, M.E. DeRome, G. Pastizzo, L.L. Brailey, G.A. Gronowicz, *Calcif. Tissue Int.* **1998**, 62, 74.
- [68] C. Gundberg, *Clin Lab Med* **2000**, 20, 489.
- [69] C.M. Gundberg, A.C. Looker, S.D. Nieman, M.S. Calvo, *Bone (N. Y., NY, U. S.)* **2002**, 31, 703.
- [70] L.C. Hofbauer, C. Shui, B.L. Riggs, C.R. Dunstan, T.C. Spelsberg, T. O'Brien, S. Khosla, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 280, 334.
- [71] N. Ulfing, *Kurzlehrbuch Histologie* (Thieme, Stuttgart, **2003**).
- [72] C.J. Koh, A. Atala, *J. Am. Soc. Nephrol.* **2004**, 15, 1113.
- [73] M. Li, M.J. Mondrinos, M.R. Gandhi, F.K. Ko, A.S. Weiss, P.I. Lelkes, *Biomaterials* **2005**, 26, 5999.
- [74] K.S. Rho, L. Jeong, G. Lee, B. Seo, Y.J. Park, S. Hong, S. Roh, J.J. Cho, W.H. Park, B.

- Min, *Biomaterials* **2006**, 27, 1452.
- [75] Y. Zhang, H. Ouyang, C.T. Lim, S. Ramakrishna, Z. Huang, *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials* **2005**, 72B, 156.
- [76] G.E. Wnek, M.E. Carr, D.G. Simpson, G.L. Bowlin, *Nano Letters* **2003**, 3, 213.
- [77] K. Ohkawa, D. Cha, H. Kim, A. Nishida, H. Yamamoto, *Macromolecular Rapid Communications* **2004**, 25, 1600.
- [78] P. Kulpinski, *Journal of Applied Polymer Science* **2005**, 98, 1855.
- [79] C. Kim, M.W. Frey, M. Marquez, Y.L. Joo, *Journal of Polymer Science Part B* **2005**, 43, 1673.
- [80] I.H. Liu, Y. Hsieh, *Journal of Polymer Science Part B* **2002**, 40, 2119.
- [81] E. Kenawy, G.L. Bowlin, K. Mansfield, J. Layman, D.G. Simpson, E.H. Sanders, G.E. Wnek, *Journal of Controlled Release* **2002**, 81, 57.
- [82] H. Yoshimoto, Y.M. Shin, H. Terai, J.P. Vacanti, *Biomaterials* **2003**, 24, 2077.
- [83] J. Venugopal, L.L. Ma, T. Yong, S. Ramakrishna, *Cell Biol Int* **2005**, 29, 861.
- [84] Y.Z. Zhang, X. Wang, Y. Feng, J. Li, C.T. Lim, S. Ramakrishna, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 1049.
- [85] E.D. Boland, T.A. Telemeco, D.G. Simpson, G.E. Wnek, G.L. Bowlin, *J Biomed Mater Res Part B* **2004**, 71, 144.
- [86] Y. You, B. Min, S.J. Lee, T.S. Lee, W.H. Park, *Journal of Applied Polymer Science* **2005**, 95, 193.
- [87] S.A. Riboldi, M. Sampaolesi, P. Neuenschwander, G. Cossu, S. Mantero, *Biomaterials* **2005**, 26, 4606.
- [88] J.J. Stankus, J. Guan, K. Fujimoto, W.R. Wagner, *Biomaterials* **2005**, 27, 735.
- [89] J. Guan, J.J. Stankus, W.R. Wagner, *J. Controlled Release* **2007**, 120, 70.
- [90] S.A. Riboldi, N. Sadr, L. Pignini, P. Neuenschwander, M. Simonet, P. Mognol, M. Sampaolesi, G. Cossu, S. Mantero, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2008**, 84A, 1094.
- [91] W. Li, C.T. Laurencin, E.J. Caterson, R.S. Tuan, F.K. Ko, *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, 60, 613.
- [92] X. Zong, S. Ran, K. Kim, D. Fang, B.S. Hsiao, B. Chu, *Biomacromolecules* **2003**, 4, 416.
- [93] X. Zong, H. Bien, C. Chung, L. Yin, D. Fang, B.S. Hsiao, B. Chu, E. Entcheva, *Biomaterials* **2005**, 26, 5330.
- [94] L.I. Ramdhanie, S.R. Aubuchon, E.D. Boland, D.C. Knapp, C.P. Barnes, D.G. Simpson, G.E. Wnek, G.L. Bowlin, *Polymer Journal* **2006**, 38, 1137.

- [95] C.Y. Xu, R. Inai, M. Kotaki, S. Ramakrishna, *Biomaterials* **2004**, 25, 877.
- [96] X.M. Mo, C.Y. Xu, M. Kotaki, S. Ramakrishna, *Biomaterials* **2004**, 25, 1883.
- [97] I.K. Kwon, S. Kidoaki, T. Matsuda, *Biomaterials* **2005**, 26, 3929.
- [98] K.E. Park, H.K. Kang, S.J. Lee, B. Min, W.H. Park, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 635.
- [99] M. Peesan, R. Rujiravanit, P. Supaphol, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **2006**, 17, 547.
- [100] J.R. Venugopal, Y. Zhang, S. Ramakrishna, *Artificial Organs* **2006**, 30, 440.
- [101] E. Schnell, K. Klinkhammer, S. Balzer, G. Brook, D. Klee, P. Dalton, J. Mey, *Biomaterials* **2007**, 28, 3012.
- [102] S. Srouji, T. Kizhner, E. Suss-Tobi, E. Livne, E. Zussman, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2008**, 19, 1249.
- [103] I.K. Kwon, T. Matsuda, *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2096.
- [104] W. He, T. Yong, W.E. Teo, Z. Ma, S. Ramakrishna, *Tissue Engineering* **2005**, 11, 1574.
- [105] W. Meng, S. Kim, J. Yuan, J.C. Kim, O.H. Kwon, N. Kawazoe, G. Chen, Y. Ito, I. Kang, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2007**, 18, 81.
- [106] Z. Chen, X. Mo, F. Qing, *Mater. Lett.* **2007**, 61, 3490.
- [107] M. Li, M.J. Mondrinos, X. Chen, M.R. Gandhi, F.K. Ko, P.I. Lelkes, *Journal of Biomedical Materials Research, Part A* **2006**, 79A, 963.
- [108] S.J. Lee, J.J. Yoo, G.J. Lim, A. Atala, J. Stitzel, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2007**, 83A, 999.
- [109] Y.Z. Zhang, J. Venugopal, Z. Huang, C.T. Lim, S. Ramakrishna, *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2583.
- [110] W. He, Z. Ma, T. Yong, W.E. Teo, S. Ramakrishna, *Biomaterials* **2005**, 26, 7606.
- [111] Y. Duan, Z. Wang, W. Yan, S. Wang, S. Zhang, J. Jia, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **2007**, 18, 1153.
- [112] C.P. Barnes, S.A. Sell, E.D. Boland, D.G. Simpson, G.L. Bowlin, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, 59, 1413.
- [113] K. Kanawung, K. Panitchanapan, S. Puangmalee, W. Utok, N. Kreua-Ongarjnucool, R. Rangkupan, C. Meechaisue, P. Supaphol, *Polym. J.* **2007**, 39, 369.
- [114] Y. Hong, K. Fujimoto, R. Hashizume, J. Guan, J.J. Stankus, K. Tobita, W.R. Wagner, *Biomacromolecules* **2008**, 9, 1200.
- [115] J. Zeng, L. Yang, Q. Liang, X. Zhang, H. Guan, X. Xu, X. Chen, X. Jing, *Journal of Controlled Release* **2005**, 105, 43.
- [116] H. Jiang, Y. Hu, Y. Li, P. Zhao, K. Zhu, W. Chen, *Journal of Controlled Release* **2005**,

- 108, 237.
- [117] J. Zeng, A. Aigner, F. Czubyko, T. Kissel, J.H. Wendorff, A. Greiner, *Biomacromolecules* **2005**, 6, 1484.
- [118] X. Xu, Q. Yang, Y. Wang, H. Yu, X. Chen, X. Jing, *European Polymer Journal* **2006**, 42, 2081.
- [119] Huang Zheng-Ming; He Chuang-Long; Yang Aizhao; Zhang Yanzhong; Han Xiao-Jian; Yin Junlin; Wu Qingshen, *J Biomed Mater Res A* **2006**, 77, 169.
- [120] A. Greiner, J.H. Wendorff, A.L. Yarin, E. Zussman, *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**, 71, 387.
- [121] Y.K. Luu, K. Kim, B.S. Hsiao, B. Chu, M. Hadjiargyrou, *Journal of Controlled Release* **2003**, 89, 341.
- [122] S.Y. Chew, J. Wen, E.K.F. Yim, K.W. Leong, *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2017.
- [123] C.L. Casper, W. Yang, M.C. Farach-Carson, J.F. Rabolt, *Biomacromolecules* **2007**, 8, 1116.
- [124] J.S. Choi, K.W. Leong, H.S. Yoo, *Biomaterials* **2007**, 29, 587.
- [125] C. Li, C. Vepari, H. Jin, H.J. Kim, D.L. Kaplan, *Biomaterials* **2006**, 27, 3115.
- [126] H. Nie, B.W. Soh, Y. Fu, C. Wang, *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, 99, 223.
- [127] Y. Fu, H. Nie, M. Ho, C. Wang, C. Wang, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, 99, 996.
- [128] S. Sell, C. Barnes, M. Smith, M. McClure, P. Madurantakam, J. Grant, M. McManus, G. Bowlin, *Polymer Int.* **2007**, 56, 1349.
- [129] W. Li, R. Tuli, X. Huang, P. Laquerriere, R.S. Tuan, *Biomaterials* **2005**, 26, 5158.
- [130] Y.M. Shin, H. Yoshimoto, J.P. Vacanti, *Tissue Engineering* **2004**, 10, 33.
- [131] H.J. Jin, J. Chen, V. Karageorgiou, G.H. Altman, D.L. Kaplan, *Biomaterials* **2004**, 25, 1039.
- [132] U. Boudriot, R. Dersch, B. Goetz, P. Griss, A. Greiner, J.H. Wendorff, *Biomedizinische Technik* **2004**, 49, 242.
- [133] U. Boudriot, B. Goetz, R. Dersch, A. Greiner, J. Wendorff, *Macromolecular Symposia* **2005**, 225, 9.
- [134] Y.V. Shih, C. Chen, S. Tsai, Y.J. Wang, O.K. Lee, *Stem Cells* **2006**, 24, 2391.
- [135] K. Fujihara, M. Kotaki, S. Ramakrishna, *Biomaterials* **2005**, 26, 4139.
- [136] H.W. Kim, J.H. Song, H.E. Kim, *Adv. Funct. Mat.* **2005**, 15, 1988.
- [137] L. Moroni, R. Licht, J. De Boer, J.R. De Wijn, C.A. Van Blitterswijk, *Biomaterials* **2006**, 27, 4911.
- [138] J. Venugopal, P. Vadgama, T.S.S. Kumar, S. Ramakrishna, *Nanotechnology* **2007**, 18,

055101.

- [139] J. Venugopal, S. Low, A.T. Choon, T.S.S. Kumar, S. Ramakrishna, *J Mater Sci: Mater Med* **2008**, 19, 2039.
- [140] H. Nie, C. Wang, *J. Controlled Release* **2007**, 120, 111.
- [141] Y. Mohammadi, M. Soleimani, M. Fallahi-Sichani, A. Gazme, V. Haddadi-Asl, E. Arefian, J. Kiani, R. Moradi, A. Atashi, N. Ahmadbeigi, *Int. J. Artif. Organs* **2007**, 30, 204.
- [142] B.M. Baker, A.O. Gee, R.B. Metter, A.S. Nathan, R.A. Marklein, J.A. Burdick, R.L. Mauck, *Biomaterials* **2008**, 29, 2348.
- [143] N.F. Huang, S. Patel, R.G. Thakar, J. Wu, B.S. Hsiao, B. Chu, R.J. Lee, S. Li, *Nano Lett.* **2006**, 6, 537.
- [144] A. Huber, A. Pickett, K.M. Shakesheff, *Eur. Cells Mater.* **2007**, 14, 56.
- [145] J.S. Choi, S.J. Lee, G.J. Christ, A. Atala, J.J. Yoo, *Biomaterials* **2008**, 29, 2899.
- [146] I.S. Lee, O.H. Kwon, W. Meng, I.K. Kang, Y. Ito, *Macromolecular Research* **2004**, 12, 374.
- [147] B. Min, L. Jeong, Y.S. Nam, J. Kim, J.Y. Kim, W.H. Park, *International Journal of Biological Macromolecules* **2004**, 34, 223.
- [148] A. Itälä, H.O. Ylänen, C. Ekholm, K.H. Karlsson, H.T. Aro, *J Biomed Mater Res Part B* **2001**, 58, 679.
- [149] M. Schindler, A. Nur-E-Kamal, I. Ahmed, J. Kamal, H. Liu, N. Amor, A.S. Ponery, D.P. Crockett, T.H. Grafe, H.Y. Chung, T. Weik, E. Jones, S. Meiners, *Cell Biochem. Biophys.* **2006**, 45, 215.
- [150] S.R. Bhattarai, N. Bhattarai, H.K. Yi, P.H. Hwang, D.I. Cha, H.Y. Kim, *Biomaterials* **2004**, 25, 2595.
- [151] F. Yang, C.Y. Xu, M. Kotaki, S. Wang, S. Ramakrishna, *J Biomater Sci Polym Ed* **2004**, 15, 1483.
- [152] R. Dersch, M. Steinhart, U. Boudriot, A. Greiner, J.H. Wendorff, *Polymers for Advanced Technologies* **2005**, 16, 276.
- [153] C.H. Lee, H.J. Shin, I.H. Cho, Y. Kang, Kim I A; Park, K. Park, J. Shin, *Biomaterials* **2005**, 26, 1261.
- [154] Folkman J; Long D, *J Surg Res* **1964**, 4, 139.
- [155] R. Langer, J. Folkman, *Nature* **1976**, 263, 797.
- [156] R. Langer, *Nature* **1998**, 392, 5.
- [157] E.R. Edelman, L. Brown, J. Taylor, R. Langer, *J. Biomed. Mater. Res.* **1987**, 21, 339.

- [158] N.A. Peppas, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1997**, 2, 531.
- [159] M. Goldraich, J. Kost, *Clin. Mater.* **1993**, 13, 135.
- [160] G. Chen, A.S. Hoffman, *Macromol. Chem. Phys.* **1995**, 196, 1251.
- [161] R. Yoshida, K. Uchida, Y. Kaneko, K. Sakai, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano, *Nature* **1995**, 374, 240.
- [162] K. Park, *Controlled drug delivery* (American Chemical Society, Washington, DC, **1997**).
- [163] Crowder Timothy M; Rosati Jacky A; Schroeter Jeffry D; Hickey Anthony J; Martonen Ted, *Pharm Res* **2002**, 19, 239.
- [164] U. Pison, T. Welte, M. Giersig, D. Groneberg, *Eur J Pharmacol* **2006**, 533, 341.
- [165] R.L.J. Harris, D. Fraser, *Am Ind Hyg Assoc J* **1976**, 37, 73.
- [166] Deutsche Forschungsgemeinschaft "*Entwicklung der Gentherapie: Stellungnahme der Senatskommission für Grundsatzfragen der Genforschung*", **2006**.
- [167] M.W. Vaughn, R. Martienssen, *Science (Washington, DC, U. S.)* **2005**, 309, 1525.
- [168] Y. Chiu, A. Ali, C. Chu, H. Cao, T.M. Rana, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 1165.
- [169] S.M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, 411, 494.
- [170] B. Urban-Klein, S. Werth, S. Abuharbeid, F. Czubayko, A. Aigner, *Gene Ther.* **2005**, 12, 461.
- [171] A. Aigner, *J. Biomed. Biotechnol.* **2006**, page not given.
- [172] B. Urban-Klein, S. Werth, M. Grzelinski, S. Abuharbeid, T. Martens, K. Lamszus, F. Czubayko, A. Aigner, *Proc Amer Assoc Cancer Res* **2005**, 46, page not given.
- [173] S. Werth, B. Urban-Klein, L. Dai, S. Hoebel, M. Grzelinski, U. Bakowsky, F. Czubayko, A. Aigner, *Journal of Controlled Release* **2006**, 112, 257.
- [174] A. Aigner, *Journal of Biotechnology* **2006**, 124, 12.
- [175] S.M. Richardson, J.M. Curran, R. Chen, A. Vaughan-Thomas, J.A. Hunt, A.J. Freemont, J.A. Hoyland, *Biomaterials* **2006**, 27, 4069.
- [176] F. Yang, R. Murugan, S. Wang, S. Ramakrishna, *Biomaterials* **2005**, 26, 2603.
- [177] D.K. Gilding, A.M. Reed, *Polymer* **1979**, 20, 1459-64.
- [178] J.E. Bergsma, W.C. de Bruijn, F.R. Rozema, R.R.M. Bos, G. Boering, *Biomaterials* **1995**, 16, 25.
- [179] Y. Kinoshita, M. Kirigakubo, M. Kobayashi, T. Tabata, K. Shimura, Y. Ikada, *Biomaterials* **1993**, 14, 729.
- [180] Z. Jun, H. Hou, A. Schaper, J.H. Wendorff, A. Greiner, *e-Polymers* **2003**, 9.

- [181] R. Inai, M. Kotaki, S. Ramakrishna, *Nanotechnology* **2005**, 16, 208.
- [182] R.G. Flemming, C.J. Murphy, G.A. Abrams, S.L. Goodman, P.F. Nealey, *Biomaterials* **1999**, 20, 573.
- [183] A. von Bubnoff, K.W.Y. Cho, *Dev Biol* **2001**, 239, 1.
- [184] P. Ducy, G. Karsenty, *Kidney Int.* **2000**, 57, 2207.
- [185] M. Urist, *Science* **1965**, 150, 893.
- [186] S.D. Boden, T.A. Zdeblick, H.S. Sandhu, S. Heim, *Spine* **2000**, 25, 376.
- [187] H.D. Zegzula, D.C. Buck, J. Brekke, J.M. Wozney, J. Hollinger, *J Bone Joint Surg Am* **1997**, 79, 1778.
- [188] T.A. Zdeblick, A.J. Ghanayem, A.J. Rapoff, C. Swain, T. Bassett, M.E. Cooke, *Spine* **1998**, 23, 758.
- [189] S. Maretschek, A. Greiner, T. Kissel, *Journal of Controlled Release* **2008**, 127, 180.
- [190] D. Hussain, *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg, **2006**.
- [191] M. Van der Rest, R. Garrone, *FASEB J.* **1991**, 5, 2814.
- [192] S. Ricard-Blum, F. Ruggiero, M. van der Rest, *Top. Curr. Chem.* **2005**, 247, 35.
- [193] http://bp0.blogger.com/_DZH2cmCoois/ReNPiO4z8WI/AAAAAAAAABGg/J3Q8wQdmL1Q/s1600-h/collagen_triple_helix.jpg (05.05.2008).
- [194] E.D. Boland, J.A. Matthews, K.J. Pawlowski, D.G. Simpson, G.E. Wnek, G.L. Bowlin, *Front. Biosci.* **2004**, 9, 1422.
- [195] D.R. Cooper, R.J. Davidson, *Biochem. J.* **1965**, 97, 139.
- [196] E. Bottoms, C.W. Cater, S. Shuster, *Nature* **1966**, 211, 97.
- [197] M.E. Nimni, D. Cheung, B. Strates, M. Kodama, K. Sheikh, *J. Biomed. Mater. Res.* **1987**, 21, 741.
- [198] E. Fujimori, *FEBS Lett.* **1988**, 235, 98.
- [199] K.S. Weadock, E.J. Miller, L.D. Bellincampi, J.P. Zawadsky, M.D. Dunn, *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, 29, 1373.
- [200] L.D. Bellincampi, M.G. Dunn, *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, 63, 1493.
- [201] J.E. Gough, C.A. Scotchford, S. Downes, *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, 61, 121.
- [202] L.H.H. Olde Damink, P.J. Dijkstra, M.J.A. Van Luyn, P.B. Van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **1995**, 6, 460.
- [203] C.W. Lan, F.F. Wang, Y.J. Wang, *J Biomed Mater Res A* **2003**, 66, 38.
- [204] E. Sachlos, J.T. Czernuszka, *European Cells and Materials* **2003**, 5, 29.
- [205] A.D. Bach, A. Arkudas, J. Tjiawi, E. Polykandriotis, U. Kneser, R.E. Horch, J. Beier, *J Cell Mol Med* **2006**, 10, 716.

- [206] L. Huang, K. Nagapudi, R.P. Apkarian, E.L. Chaikof, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **2001**, 12, 979.
- [207] S. Zhong, W.E. Teo, X. Zhu, R. Beuerman, S. Ramakrishna, L.Y.L. Yung, *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2998.
- [208] M.V. Jose, K. Johnson, V. Thomas, D. Dean, *Polym. Prepr.* **2007**, 48, 988.
- [209] A. Theron, E. Zussman, A.L. Yarin, *Nanotechnology* **2001**, 12, 384.
- [210] A.D. Bach, J.P. Beier, G.B. Stark, *Cell Tissue Res* **2003**, 314, 263.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	-	Grad Celsius
µg	-	Mikrogramm
µm	-	Mikrometer
Abb.	-	Abbildung
AP	-	alkalische Phosphatase
BSA	-	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
cm	-	Zentimeter
d	-	Durchmesser
DAPI	-	4',6-Diamidino-2-phenylindol (Fluoreszenzfarbstoff)
DCM	-	Dichlormethan
DHT	-	Dehydrothermalverfahren
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dsRNA	-	<i>double-stranded</i> RNA
EZM	-	extrazelluläre Matrix
FCS	-	fötale Kälberserum
FDA	-	Food and Drug Administration (Zulassungsbehörde der USA)
FITC	-	Fluoresceinisothiocyanat
FITC-BSA	-	Fluoresceinisothiocyanat-konjugiertes BSA
GTA	-	Glutaraldehyd
h	-	Stunde(n)
HFIP	-	Hexafluoroisopropanol
HMDI	-	Hexamethyldiisocyanat
hMSC	-	humane mesenchymalen Stammzellen
K	-	Kelvin
kV	-	Kilovolt
mg	-	Milligramm
mL	-	Milliliter
mRNA	-	<i>messenger RNA</i>
MSC	-	mesenchymalen Stammzellen

nm	-	Nanometer
NSF	-	National Science Foundation
OC	-	Osteokalzin
OP	-	Osteopontin
OPG	-	Osteoprotegerin
PBS	-	Phosphat-gepufferte Saline
PCL	-	Poly(ϵ -caprolacton)
PEI	-	Polyethylenimin
PEO	-	Polyethylenoxid
PEVA	-	Polyethylen- <i>co</i> -vinylacetat
PLLA	-	Poly(<i>L</i> -lactid)
PVA	-	Polyvinylalkohol
RISC	-	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLU	-	relative Lichteinheiten
RNA	-	Ribonukleinsäure
SEM	-	Rasterelektronenmikroskop
siRNA	-	<i>small interfering RNA</i>
TE	-	<i>Tissue Engineering</i>
THF	-	Tetrahydrofuran
wt. %	-	Gewichtsprozent
% (w/v)	-	Gewicht pro Volumen Prozent (1% (w/v) entspricht 10 mg/mL)

9.2 Veröffentlichungen, Tagungen, Messen und Auslandsaufenthalte

Veröffentlichungen:

Structurally and chemically heterogeneous nanofibrous nonwovens via electrospinning

A. HOLZMEISTER, M. RUDISILE, A. GREINER, J.H. WENDORFF

European Polymer Journal 2007, 43, 4859

The role of osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in the pathogenesis of particle induced aseptic loosening – An in-vitro study

M.D. SCHOFER, S. FUCHS-WINKELMANN, A. KESSELER-THÖNES, M. RUDISILE, CH. WACK,
J.R.J. PALETTA, U. BOUDRIOT

eingereicht

Tagungsteilnahmen:

Informationstag: Aktuelle Implantatentwicklung – Funktionalisierung von Materialien

(DECHEMA, Frankfurt am Main, 15.02.2006)

nano.tage 2006 – Nanotechnologie: Verstehen und Erleben

(München, 03.-04.05.2006)

Materialforschungstag Mittelhessen 2006

(Rauischholzhausen, 30.06. 2006)

Chemical Nanotechnology Talks VII

(Frankfurt am Main, 23.-25.10.2006)

„Development of electrospun matrix structure for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells“

R. DERSCH, CH. WACK, M. RUDISILE, U. BOUDRIOT, A. SCHAPER, S. FUCHS, A. GREINER,
J.H. WENDORFF (Poster)

Materialforschungstag Mittelhessen 2007

(Rauischholzhausen, 06.07.2007)

Messeteilnahmen:

1. Nanotechnologieforum Hessen

(Hanau 17.11.2004)

Fachbereich Chemie, Arbeitsgruppen Makromolekulare Chemie,
PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG

Nano Solutions 2005

(Köln, 08.-10.11.2005)

Fachbereich Chemie und Wissenschaftliches Zentrum für Materialwissenschaften,
PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG

„Methoden zur Herstellung nanostrukturierter Kunststoffsysteme“

„Anwendungen für funktionalisierte nanostrukturierte Kunststoffsysteme“

ACHEMA 2006

(Frankfurt am Main, 15.-19.05.2006)

Fachbereich Chemie, Arbeitsgruppen Makromolekulare Chemie,
PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG

Auslandsaufenthalte:

PROBRAL mit der Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Fakultät für Pharmazie, Porto Alegre, Brasilien

Prof. Dr. P. PRANKE

(11.07.-08.08.2007 und voraussichtlich 21.07.-16.08.2008)

9.3 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Fasermatrices aus synthetischen und natürlichen Polymeren für Tissue Engineering und Wirkstofffreisetzung“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe, angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

9.4 Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. J.H. WENDORFF für die Betreuung dieser Arbeit, die uneingeschränkte Unterstützung und die aufmunternden Worte, falls sie notwendig waren.

Herrn Prof. A. GREINER danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herzlichster Dank gebührt auch meinen Kooperationspartnern, die diese Arbeit erst ermöglichten:

PD Dr. U. BOUDRIOT, Dr. M. SCHOFER, Dr. J. PALETTA, CH. WACK, I. LEIFELD, CH. GRÄBEDÜNKEL und S. BOCKELMANN vom Fachbereich Medizin der PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG, Dr. J. BEIER und D. KLUMPP von der Plastisch und Handchirurgischen Klinik des UNIVERSITÄTSKLINIKUMS ERLANGEN, sowie Prof. Dr. A. AIGNER und S. HÖBEL vom Fachbereich Humanmedizin, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG gebührt mein Dank für eine unkomplizierte und fruchtbare Zusammenarbeit, in angenehmer und freundlicher Atmosphäre.

R. DERSCH gebührt besonderer Dank für die Hilfestellung bei der Einarbeitung in das *Tissue Engineering* und auch bei sonstigen fachlichen und nicht-fachlichen Fragen.

Besonderer Dank gilt auch R. SÜTTERLIN und D. HUSSAIN, die im Zuge ihrer Diplomarbeit einen großen Beitrag zu meiner Arbeit geleistet haben.

Den Mitarbeitern der Werkstätten möchte ich besonders danken, da durch ihre hervorragenden Leistungen beim Bau und der Reparatur von Elektrospinnapparaturen eine erfolgreiches Arbeiten und Forschen erst ermöglicht wurde.

Der Arbeitsgruppe GREINER danke ich für die gute Zusammenarbeit, besonders sei hier M. THIEME und M. GENSHEIMER für ihre Hilfe bei der Fluoreszenzmikroskopie und der IR-Spektroskopie erwähnt.

Dr. A. SCHAPER, M. HELLWIG und D. HUSSAIN danke ich für die oft sehr zeitaufwendige Hilfe bei der Elektronenmikroskopie.

Für die Einarbeitung in die Heißpresse und den PPX-Beschichter, sowie seiner geduldigen Art möchte ich M. STASIAK herzlich danken.

Besonderer Dank gebührt den Korrekturlesern dieser Arbeit, zu ihnen gehören:

R. DERSCH, A. HOLZMEISTER, M. STASIAK, J. BEIER und CH. WACK.

Bei R. DONNER und E. WASCHK bedanke ich mich für ihre Unterstützung bei der Erledigung organisatorischer Angelegenheiten und dem unkomplizierten Umgang.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe WENDORFF danke ich herzlich für das kollegiale Miteinander und ein durchweg angenehmes Arbeitsklima. Im Besonderen danke ich meinen Bürokollegen S. SCHLITT, A. HOLZMEISTER, B. MATHES und N. FÜCHTJOHANN für viele unterhaltende, interessante und auch aufheiternde Worte.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen ehemaligen Mitbewohnern: Stephan, Christine, Tarik, Verena, Paul, Linda, Christina, Alex und Leens. Das Zusammenleben mit euch habe ich sehr genossen und es hat für den nötigen Abstand und Ausgleich zum Studium gesorgt.

Herzlichen Dank gilt auch meinen langjährigen Freunden und Kommilitonen Max, Hörman, Felix, Stasi, Nuri, Rainer, Steffi, Babsi, Daniel, Runa, Daniel, Ralph und alle nicht aufgeführten, die meine Zeit in Marburg begleitet und bereichert haben.

Ganz, ganz lieben Dank geht an dich Yasmin, für deine liebevolle, verständnisvolle und unterstützende Art und dass es dich gibt.

Und natürlich meinen Eltern gebührt besonders herzlichen Dank für die Freiheit, die sie mir in meiner Lebensgestaltung ließen, und mich immer liebevoll und vertrauensvoll unterstützt haben.