

# **DOKTORARBEIT**

(Dissertation)

## **ENTWICKLUNG VON POLYMERFASER-SYSTEMEN IN KÜNSTLICHE, BIOMIMETISCHE, POLYLACTID BASIERTE, ULTRA-HOCH PORÖSE SCHWÄMME FÜR ANWENDUNGEN IN DER LEBER-GEWEBEZUCHT**

zur Erlangung des Doktorgrades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

an der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und

Naturwissenschaften (BayNAT)

Universität Bayreuth

vorgelegt von

**M. Sc. Michael Mader**

aus Maisach

Bayreuth, Mai 2020





Die vorliegende Arbeit wurde von August 2015 bis Oktober 2019 am Lehrstuhl der Makromolekularen Chemie II (MCII) der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften an der Universität Bayreuth, unter der Betreuung von Professor Dr. Andreas Greiner angefertigt.

Alle genannten Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Greiner und im Bayreuther Zentrum für Kolloide und Grenzflächen (BZKG) der Universität Bayreuth durchgeführt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 10.08.2020

Zulassung durch das Leitungsgremium: 23.09.2020

Wissenschaftliches Kolloquium: 11.02.2021

Amtierender Direktor: Prof Dr. Markus Lippitz

Prüfungsausschuss:

|                               |               |
|-------------------------------|---------------|
| Prof. Dr. Andreas Greiner     | (Gutachter)   |
| Prof. Dr. Ruth Freitag        | (Gutachterin) |
| Prof. Dr. Birgit Weber        | (Vorsitz)     |
| Prof. Dr. Hans-Werner Schmidt |               |

## **Inhaltsverzeichnis**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Vorwort – Ziele und Strategie</b>  | <b>1</b>  |
| <b>Zusammenfassung</b>  | <b>1</b>  |
| <b>Preface – Aims and Strategy</b>  | <b>5</b>  |
| <b>Summary</b>  | <b>5</b>  |
| <br>  |           |
| <b>1 Einführung</b>   | <b>8</b>  |
| <b>1.1 Motivation</b>   | <b>8</b>  |
| <br>  |           |
| <b>1.2 Gewebezücht / Tissue Engineering</b>   | <b>9</b>  |
| <br>  |           |
| <b>1.3 Gewebezücht relevante Zellträger Eigenschaften</b>                           | <b>10</b> |
| 1.3.1 Biochemische Faktoren   | 11        |
| 1.3.2 Physikalische Faktoren  | 13        |
| <br>  |           |
| <b>1.4 Polymerbasierte künstliche Zellträger</b>                                    | <b>15</b> |
| <br>  |           |
| <b>1.5 Herstellungsverfahren von Polymerfaser-Schwämmen</b>                         | <b>17</b> |
| 1.5.1 Thermisch induzierte Selbst-Agglomeration (TISA) oder Phasenseparation (TIPS) | 17        |
| 1.5.2 Selbstorganisierende Polymerfaser Gefriertrocknung (SANFD)                    | 19        |
| <br>  |           |
| <b>1.6 Einzelschritte und Systemdynamik der Polymerfaser-Schwamm Herstellung</b>    | <b>22</b> |
| 1.6.1 Systemdynamik von Polymerfaser-Schwamm Zellträgersystemen                     | 22        |
| 1.6.2 Material Wahl – Polylactid  | 23        |
| 1.6.3 Elektrospinnen – Herstellung von abbaubaren Polymerfasern                     | 25        |
| 1.6.4 Faser-Schnitt – Herstellung von Faserdispersionen                             | 26        |
| 1.6.5 Gefriertrocknung – Herstellung roher Polymerfaser-Schwämme                    | 30        |
| 1.6.6 Thermische Vernetzung – Erzeugen elastischer Polymerfaser-Schwämme            | 36        |
| <br>  |           |
| <b>1.7 Strategien zur Modifizierung von Trägersystemen</b>                          | <b>37</b> |
| 1.7.1 Biomodifizierung von Zellträgersystemen                                       | 37        |
| 1.7.2 Galaktosylierung von Trägersystemen   | 38        |

---

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| <b>2</b>   | <b>Kumulativer Teil der Dissertation</b>   | <b>41</b>  |
| <b>2.1</b> | <b>M1 - Entwicklung ultra-poröser, elastischer Polylactid/Polycaprolacton Schwämme für die Gewebezücht - Herstellung und Charakterisierung</b> | <b>43</b>  |
| 2.1.1      | Beitragszusammensetzung / Autorenbeteiligung   | 43         |
| 2.1.2      | Zusammenfassung und Diskussion   | 44         |
| <b>2.2</b> | <b>M2 - Entwicklung biomimetischer Polylactid-Schwämme für die Leber-Gewebezücht - Biomodifizierung, Charakterisierung und Kulturanalyse</b>   | <b>49</b>  |
| 2.2.1      | Beitragszusammensetzung / Autorenbeteiligung   | 50         |
| 2.2.2      | Zusammenfassung und Diskussion   | 50         |
| <b>2.3</b> | <b>M3 - Polylactid Schwämme als Flüssigkeits- und Medikamententräger - Modifizierung, Beladung, mechanische Rückhaltung und Freisetzung</b>    | <b>55</b>  |
| 2.3.1      | Beitragszusammensetzung / Autorenbeteiligung   | 56         |
| 2.3.2      | Zusammenfassung und Diskussion   | 57         |
| <b>3</b>   | <b>Publikationen und Manuskripte</b>   | <b>62</b>  |
| <b>4</b>   | <b>Anhang - Strukturmodifizierungen von Polymerfaser-Schwämmen</b>   | <b>138</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Einleitung - Hintergrund und Techniken</b>  | <b>138</b> |
| 4.1.1      | Technik 1 - Herstellung von PLA-PFS mit gerichteter Porenstruktur  | 139        |
| 4.1.2      | Technik 2 - Porenmodifizierung von PFS durch Salzstrukturübertragung   | 140        |
| 4.1.3      | Technik 3 - Makrokanalisierung von PFS   | 142        |
| <b>4.2</b> | <b>Resümee</b>   | <b>143</b> |
| <b>5</b>   | <b>Literaturquellen</b>  | <b>145</b> |
| <b>6</b>   | <b>Ausblick</b>  | <b>159</b> |
| <b>7</b>   | <b>Danksagung</b>  | <b>162</b> |
| <b>8</b>   | <b>Eidesstattliche Versicherungen und Erklärungen</b>  | <b>164</b> |



---

**Abkürzungsverzeichnis**

|                |   |
|----------------|---|
| $\mu$ CT       | <i>Micro-computer tomography</i> (dt. Mikro-Computertomographie)  |
| CLSM           | <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> (dt. Konfokale Laser-Rastermikroskopie)                         |
| CV             | <i>Coefficient of variation</i> (dt. Variationskoeffizient)   |
| EPR            | <i>Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy</i> (dt. elektronenparamagnetische Resonanzspektroskopie) |
| ES             | <i>Electrospinning</i> (dt. Elektrospinnen)   |
| FD             | <i>Freeze-drying</i> (dt. Gefriertrocknung)   |
| Gal            | Galaktose (genau: $\alpha$ -D-Galaktose)  |
| kV             | Kilovolt  |
| $l$            | Anteil der PFS Beladung mit z.B. Öl [%]   |
| LM             | <i>Digital light microscopy</i> (dt. Digitale Lichtmikroskopie)   |
| NaAc           | Natriumacetat   |
| NMR            | <i>Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy</i> (dt. Kernspin Resonanzspektroskopie)                       |
| PAGP           | Poly(lactid)- <i>block</i> -poly(6- <i>O</i> -acryloyl- $\alpha$ -D-galactopyranose)methacrylat           |
| PFS            | <i>Polymer Fiber Sponge</i> (dt. Polymer Faser Schwamm)   |
| RR             | Reduktion von Resazurin zu Resorufin (Manuskript 2)   |
| SA             | <i>Self-assembly</i> (dt. Selbstorganisation)   |
| SANFD          | <i>Self-Assembly Nanofiber Freeze-Drying</i> (dt. Selbstorganisierende Nanofaser Gefriertrocknung)        |
| SEM            | <i>Scanning Electron Microscopy</i> (dt. Rasterelektronenmikroskopie)                                     |
| SPV            | <i>Specific pore volume</i> (dt. spezifisches Porenvolumen)   |
| TA             | <i>Thermal annealing</i> (dt. Tempern)  |
| <i>t</i> -BuOH | <i>Tert</i> -Butanol  |
| TIPS           | <i>Thermally Induced Phase Separation</i> (dt. Thermisch induzierte Phasenseparation)                     |
| TISA           | <i>Thermally Induced Self-Agglomeration</i> (dt. Thermisch Induzierte Selbst-Agglomeration)               |
| UV             | <i>ultraviolet</i> (dt.: Ultraviolett)  |
| $\rho_T$       | Trägerdichte [ $\text{mg}/\text{cm}^3$ ] (Faseranteil)  |
| $\sigma$       | Standardabweichung  |



**«WE DON'T DO SCIENCE WITH TOOLS, ...**

**WE MAKE TOOLS TO DO SCIENCE.»**

Elizabeth Hulme Berezovsky<sup>[1]</sup>

## Vorwort – Ziele und Strategie

Die dieser kumulativen Dissertation zugrundeliegenden Arbeiten widmen sich der Entwicklung und Ausarbeitung von Produktions- und Modifizierungstechniken synthetischer, abbaubarer Polymerfaser Schwämme (PFS) für pharmazeutische und Gewebezücht Anwendungen. Jedes der aus diesen Arbeiten hervorgegangenen Forschungsmanuskripte wird in der folgenden Zusammenfassung durch die Abkürzungen **M1**, **M2** bzw. **M3** in Bezug gesetzt.

## Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand zunächst darin, bekannte Konzepte der bisher nur auf anorganischen Materialien oder nicht-abbaubaren Polymeren basierenden PFS, auch mit abbaubaren Polymeren zu realisieren und für Anwendungen in der biomimetischen Gewebezücht nutzbar zu machen.

**M1)** Der Fokus wurde auf die Entwicklung von Verfahren zur Herstellung monolithischer PFS aus Polylactid (PLA) sowie Mischsystemen aus PLA und Polycaprolacton (PCL) gelegt. Die resultierenden PFS-Eigenschaften, die einzelnen Herstellungsschritte und die dafür entscheidenden Einflussfaktoren wurden systematisch variiert und analysiert. Hierzu wurden mehrere qualitative als auch quantitative Analysen herangezogen. Der Einfluss der Polymereigenschaften sowie ihre chemisch-thermische Modifizierbarkeit wurde bestimmt, um den Zusammenhang zwischen Material- und PFS-Eigenschaften identifizieren und die Grenzen der Leistungsfähigkeit der Systeme evaluieren zu können. Hierzu wurde die PFS-Integrität, Belastbarkeit und Elastizität u.a. in Abhängigkeit zur thermischen Vernetzung, eingesetzten Faserdichte und unter Einfluss unterschiedlicher Umgebungsbedingungen quantifiziert.

Um die Biokompatibilität und allgemeine Zellkultur Eignung der PFS zu evaluieren wurden statische Zellbesiedlungsexperimente durchgeführt. Zell-Verteilung, Zell-Viabilität und Zellpenetration ins Innere des PFS wurde *ex-situ* verfolgt und quantifiziert. Hierzu wurden digitale Licht- (LM), konfokale Laser-Raster- (CLSM) sowie Rasterelektronenmikroskopie (SEM) Aufnahmen angefertigt und ausgewertet. Die verwendeten, nicht-adhärenen Zellen konnten zwar nahezu ungehindert in den PFS eindringen, sich jedoch im Rahmen der Einschränkungen einer statischen Kultur nur oberflächlich vermehren. Dieser Umstand sollte später unter Einsatz einer dynamischen Kultur und durch Einführen einer chemischen PFS-Biomodifizierung ausgeglichen werden.

**M2)** Zwei verschiedene Techniken zur Biomodifizierung von PLA-Schwämmen mit Galaktose (Gal) wurden verfolgt, um daraus elektrogewebene Fasermatten und biomimetische PFS für die Leber-Gewebezücht herzustellen. Dies geschah durch Kombination von PLA mit Gal in Form eines PLA-Galaktose Copolymers (Gal-Träger). Die zunächst zu validierende Hypothese war, ob die Gal-Funktionalität des Gal-Trägers die literatur-bekannt Affinität zu Leberzellen vorweist und ob sich



diese für die Zellbesiedlung der PFS förderlich zeigt. Für die Validierung wurden PLA-Gal Fasermatten durch Mischen beider Komponenten (PLA/Gal-Träger) über Elektrosponnen (ES) hergestellt, anschließend unter statischer Kultur mit unterschiedlichen Leber-Zelltypen gegenüber Referenzsystemen validiert. Zur Validierung wurde der Einfluss der Galaktose *in-situ* und *ex-situ*, in Gegenüberstellung parallel zellkultivierter Proben aus sowohl PLA-Gal wie auch PLA basierten Referenzsystemen variabler Hydrophilie quantifiziert. Die *in-situ* und *ex-situ* Ergebnisse der Zellkultur mit PLA-Gal Fasermatten geben eine signifikant erhöhte Zellaffinität und Proliferationssteigerung gegenüber den Referenzsystemen preis. Die Rezeptor-Interaktion von Hepatozyten und Gal wurde *in-situ* durch Regulierung mit blockierenden Ionen verfolgt und so verifiziert.

Nach Validierung wurden die PLA-Gal Fasermatten zu PFS weiterverarbeitet, um ihre Eignung als Basis für die Entwicklung einer 3D Leber-biomimetischen Zelltest-Plattform auch unter dynamischer Zellkultur zu prüfen. Ein Perfusions-Bioreaktor wurde entwickelt, welcher einen PFS umschließt und eine stetige Perfusion des Schwammes ermöglicht. Im Gegensatz zu PLA-PFS, zeigen die Bioreaktor-Kultur Ergebnisse mit PLA-Gal PFS eine maßgeblich verbesserte, gleichmäßige Zellverteilung innerhalb des PFS.

Um zukünftig die für eine Galaktosylierung von PLA Fasersystemen wie das Misch-Elektrospinn Verfahren benötigte Menge an Gal-Träger Material reduzieren zu können, wurde eine Methode zur Beschichtung von PLA-Schwämmen entwickelt. Auf Grund einer unerwartet ausgeprägten Photolumineszenz des Gal-Trägers stellten sich CLSM Messungen für den Nachweis der Beschichtung und der Analyse seiner Qualität nicht nur als effizient, sondern auch als hoch vielversprechend heraus. Die spektroskopisch charakterisierte, ausgeprägte Autofluoreszenz des Gal-Trägers ermöglicht eine hochauflösende, 3D Visualisierung galaktosylierter PLA-Gal Fasern und somit des Schwamm Faser-Netzwerks unter UV-CLSM. Die Ergebnisse belegen, dass monolithische PLA-PFS erfolgreich und gleichmäßig mit dem Gal-Träger beschichtet und so nachhaltig biomodifiziert werden können.

**M3)** Monolithische PLA-PFS wurden für Untersuchungen mit pharmazeutischer Anwendungsrelevanz modifiziert, um sie zur Klärung grundlegender physikalischer und pharmazeutischer Fragestellungen einsetzen zu können. Die Weiterentwicklung der PFS beinhaltet deren Beschichtung und anschließende Beladung mit physiologisch relevanten Flüssigkeiten, wie eines in der Pharmazie gebräuchlichen Öls als Medikamententrägerflüssigkeit. Die äußere und innere PLA-PFS Oberfläche wurde mit Poly-(para-xylylen) beschichtet und charakterisiert in Bezug auf die PFS Beschichtungsqualität, den Oberflächeneigenschaften sowie der Schwamm-Medium Beladungskapazität. Es wurden genaue Analysen der mechanischen Belastbarkeit und Elastizität der PFS in trockenem Zustand sowie nach Beladung mit Öl durchgeführt. Hierbei wurden die PFS im Hinblick auf Ihre Fähigkeiten zur Öl-Rückhaltung und Wiederaufnahme nach Freisetzung unter Kompression, auch bei unterschiedlicher prozentualer Öl-Beladung, untersucht.

Unterschiedliche *in-vivo* Transplantationssituationen wurden simuliert, um die Aufnahme von

möglichen Medikamententrägerflüssigkeiten in den PFS und die Rückhaltung im Schwamm-Gerüst zu untersuchen. Im Direktvergleich wurde das Freisetzungsprofil eines Modell-Medikaments im Öl-beladenen PFS gegenüber der aus „freiem“ Öl analysiert. Mit Mikro-Computertomographie ( $\mu$ CT) und Elektronen-paramagnetischer Resonanzspektroskopie (EPR) wurden 3D Aufnahmen der Medium-Penetration in den PFS angefertigt, analysiert und quantifiziert. Mit Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) wurde das Verhalten des freien und im PFS-Gerüst gehaltenen Mediums und seiner Interaktion mit dem PFS untersucht. Unterschiede in der molekularen Relaxation und Diffusion der Flüssigkeit wurden bestimmt, um die Auswirkungen auf die Freisetzung von Medikamenten evaluieren zu können.

### **Anmerkungen zum Anhang**

Basierend auf den Ergebnissen obig zusammengefasster Arbeiten, wurden auch die Möglichkeiten zur gezielten Variation der PFS Mikro- und Makrostruktur untersucht. Drei vielversprechende, Methoden zur PFS Strukturmodifizierung wurden entwickelt, die eine sowohl zur PLA-PFS Herstellung parallel mögliche, aber auch nachträglich steuerbare PFS Porenstrukturierung erlauben. Die entwickelten Techniken lassen sich zudem frei kombinieren und sind dabei nicht auf PLA basierte PFS-Systeme beschränkt. Sie erhöhen maßgeblich die Vielfalt der PFS-Einstellungsparameter und somit die Einflussmöglichkeiten, die u.a. zur Kontrolle von Zellbesiedlungsfaktoren entscheidend sein können.



## Preface – Aims and Strategy

The underlying research works of this cumulative thesis are dedicated to the development and elaboration of production- and modification techniques for synthetic, degradable polymer fiber sponges (PFS) aiming to be used for pharmaceutical and tissue engineering applications. Each research manuscript related to this work is correlated to in the following summary, designated as **M1**, **M2**, or **M3**, respectively.

### Summary

The aim of this work was to first adapt known concepts of PFS fabrication, as yet limited to inorganic or non-degradable polymer materials, to work with degradable polymers and create biomimicking PFS scaffolds that can be used for tissue engineering (TE) applications.

**M1)** The focus was set to elaborate a fabrication technique for monolithic PFS using polylactide (PLA) and blend-systems of PLA and polycaprolactone (PCL). The resulting PFS-properties, each individual fabrication step and the correlating, most relevant impact-factors were systematically varied and analyzed. Therefore, both qualitative and quantitative analysis techniques were performed. The influence of the polymer used, its properties and chemico-thermal modifiability was determined to identify the relationship between material- and PFS-properties and evaluate the limitations and performances of the PFS produced. The PFS integrity, resilience and elasticity was quantified under varying environment conditions and in dependence on the scaffold-density used and the thermal annealing based crosslinking process applied.

In order to analyze the biocompatibility and general cell-culture applicability of these PFS systems, static cell-seeding and cell-culture experiments were performed in a cooperation work. Cell-distribution, cell-viability, and cell-penetration into PFS was traced and quantified *ex-situ*. Therefore, digital light- (LM), confocal laser-scanning- (CLSM) and electron scanning microscopy imaging (SEM) measurements were performed and evaluated. The applied (non-adherent) cells were able to infiltrate the sponge, but, due to the static culture and its cell nutrition limitations, cell-proliferation was limited to the superficial scaffold regions. This constraint was aimed to be solved by using dynamic culturing and introducing biomodifications to the PFS.

**M2)** Two different PLA sponge galactose (Gal) biomodification techniques were investigated to create electrospun PLA-Gal nonwovens and biomimetic PFS for liver-cell cultivation, by combining PLA with Gal using a PLA-Gal copolymer (Gal-carrier). The hypothesis to be validated was, whether the Gal moiety of the gal-carrier can come up with the literature-known liver-cell specific cell-affinity and to find out whether it allows to improve cell-delivery into PFS.

For the Gal-carrier validation, PLA-Gal nonwovens were produced by blending PLA and the PLA-carrier using electrospinning (ES) and applied in static culture experiments with different cell-types and nonwoven references. The validation was used to evaluate and quantify the impact of the Gal presence *in-situ* and *ex-situ*, using PLA-Gal and PLA-based reference systems of variable hydrophilicity as benchmark. The *in-situ* and *ex-situ* validation results of PLA-Gal nonwovens reveal a significant increase in hepatic cell-affinity and proliferation. The receptor interaction of hepatocytes and Gal was verified by regulating cell-interaction with receptor blocking ions, traced *in-situ*.

After validation, the PLA-Gal nonwovens were processed into PFS to prove their applicability to use them as a basis to create 3D, liver-biomimetic cell-testing platforms. Therefore, a bioreactor was designed to fully enclose the PFS and grant its steady perfusion during culture. In contrast to PLA-PFS, the bioreactor-culture of PLA-Gal PFS reveals a significantly enhanced distribution of hepatocytes within the entire PFS.

In order to reduce the amount of Gal-carrier necessary for galactosylation of PLA-fiber systems, compared to blend-ES, a PLA-PFS coating technique was developed. Due to an unexpected, strongly pronounced photoluminescence of the Gal-carrier, CLSM measurements have proven to be highly applicable to verify the presence of a PLA-Gal coating and precisely evaluate its distribution quality. The pronounced autofluorescence of the Gal-carrier was analyzed spectroscopically and allows for high-resolution UV-CLSM imaging to 3D visualize galactosylated PLA-Gal nonwoven fibers and the PFS fiber network. The results prove, that the PLA-PFS coating can be successfully and homogeneously applied, helping to create more sustainably biomodified scaffolds.

**M3)** Monolithic PLA-PFS were modified for pharmaceutical application relevant investigations aiming to clarify basic physical and pharmaceutical scientific questionings. The elaboration of the PFS includes their coating and subsequent loading with physiologically relevant media, such as a pharmaceutically commonly used oil, as possible drug-carrier fluids. The outer- and internal surface of PLA-PFS was coated with poly(para-xylylene) and characterized in detail, in regard to the achieved coating quality, the surface properties and the sponge fluid-loading capacity. Detailed analysis of the PFS' mechanical resilience and elasticity after compression in dry and oil-loaded state was performed. The PFS capability to retain and reabsorb oil after compression release was investigated, also including different grades of initial oil-loading.

Different *in-vivo* transplantation situations were simulated to allow investigating the fluid-absorption and retaining process of PFS. The release profile of a model-drug in an oil-loaded PFS compared to free fluid was investigated as well. The 3D fluid-penetration into the PFS was analyzed by micro-computer tomography ( $\mu$ CT) and electron-paramagnetic resonance spectroscopy (EPR). The behavior of free and PFS-bound fluid and its interaction with the PFS was analyzed by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). Differences in molecular relaxation and diffusion of the fluid inside PFS were evaluated and used to conclude their impact on a model drug-release from PFS.

**Annotations regarding the appendix**

Based on the results of the above summarized work, the possibilities of targeting the PFS micro- and macro structuring were investigated. Three promising techniques of PFS sponge structure modification were developed that can be used, for parallel and subsequent PFS pore structuring. The techniques significantly expand the diversity of adjusting the PFS characteristics. Additionally, the techniques are not limited to PLA based PFS systems and can be freely combined with each other. Factors that might be decisive for future cell-culture experiments.

# 1 Einführung

## 1.1 Motivation

Der menschliche Körper kann zellulär gesundes Gewebe, welches jedoch größere strukturelle Beschädigungen erfahren hat, allein nicht vollständig wiederherstellen. Zumeist behilft er sich nur mit einer rein oberflächlichen Heilung der betroffenen Bereiche, wenn die strukturelle Basis zur Wiederherstellung des Körperteils oder eines Organes fehlt. In nur verhältnismäßig wenigen Fällen können ganze Körperteile oder Organe durch ein geeignetes Spenderorgan ersetzt werden. Darüber hinaus gibt es keine etablierten Verfahren, die den Körper dabei unterstützen, große und komplexe strukturelle Beschädigungen 1:1 selbst wiederherzustellen. Auch Angebot und Nachfrage nach Transplantaten, die u.a. Kreuzproben zur Bestimmung der Wirt-Kompatibilität voraussetzen<sup>[2]</sup>, weiten sich unaufhörlich und führen zu hohen Wartezeiten. Entsprechend hoch ist die Nachfrage, universell geeignete und zugleich kostengünstige Alternativen zu erschließen. Dies hat eine Vielzahl an Arbeiten im Forschungsbereich Gewebezücht hervorgebracht, die sich der Entwicklung verschiedenster Zellträger auf Basis natürlicher sowie synthetischer Materialien widmen.<sup>[3,4]</sup> Es ist jedoch bisher nicht oder nur unter hohem Aufwand möglich<sup>[5]</sup>, große Trägersysteme nicht nur oberflächlich, sondern ortsspezifisch also ganz gezielt und vollständig mit Zellen zu besiedeln.

In dieser Hinsicht besitzen Polymerfaser Schwämme (PFS) auf Grund Ihrer einfachen Herstellung sowie flexibel einstellbaren Eigenschaften ein enormes Potential.<sup>[6-8]</sup> PFS können in allen erdenklichen Formen und Größen hergestellt werden, was auch die Regeneration von komplexen Strukturen wie einer kompletten Ohrmuschel<sup>[8]</sup> erlaubt. Gleichzeitige ist die ultra-hohe Porosität von PFS von bis zu 99,8 % eine möglicherweise entscheidende Basis dafür, auch große Proben vollständig und kontrolliert zu zellularisieren. Die bisherigen, auf nicht-abbaubare Materialien basierenden Verfahren müssen jedoch erst auf abbaubare Polymere adaptiert werden, um auch *in-vivo* Anwendungen und eine Bioassimilierung zu erlauben.<sup>[9]</sup> Darüber hinaus werden Techniken benötigt, um PFS strukturell sowie in Bezug auf Zellkompatibilität weiterentwickeln zu können, damit sie den vielfältigen Anforderungen der Gewebezücht in so vielen Anwendungssituationen wie möglich gerecht werden können. Dann können PFS flexibel und gezielt z.B. *in-vivo* als Hilfsmittel zur Unterstützung der Wiederherstellung eines beschädigten Körperteils eingesetzt oder *ex-vivo* als bioaktives Zelltestsystem etabliert werden. Wenn Schwämme erfolgreich mit lebenden gesunden oder mit z.B. Krebszellen eines bestimmten Wirts kultiviert werden können, ließen sich daraus unterschiedliche Zelltestsysteme und beliebige Replika herstellen, um sie beispielsweise zur Weiterentwicklung der Wirt-spezifischen Beurteilung von Medikamenten und Therapeutika in der personalisierten Krebsforschung<sup>[10]</sup> Anwendung finden zu lassen. Dies würde erlauben, jegliche Zellforschung mit individuellem z.B. körpereigenem Zellmaterial, untereinander identischen Zelltestsystemen und gleichzeitig Allometrie<sup>[11]</sup> unabhängig durchführen zu können, ohne direkt auf Mensch- oder Tierversuche zurückgreifen zu müssen.

## 1.2 Gewebezücht / Tissue Engineering

Der Begriff *Tissue Engineering* (TE), zu Deutsch Gewebezücht, umschreibt den Entwicklungsprozess zwei- oder dreidimensionaler, naturbasierter oder synthetischer Trägersysteme, die u.a. für Forschungen, Geweberegeneration sowie in der Medikamentenfreisetzung herangezogen werden. Die Herstellung und kontrollierte Zellularisierung künstlicher Trägersysteme in Zellträger wird dahingehend ausgearbeitet, dass zukünftig Körperteile wie Knochen, Knorpel, Sehnen, Muskeln oder Organe wie Haut, Leber, Niere, usw. künstlich nachgebildet oder regeneriert werden können. Die Gewebezücht umfasst die Entwicklung neuer oder Weiterentwicklung bestehender Materialien und Trägerkonstruktionen, von der Strukturkontrolle bis hin zur Besiedlungskontrolle in der Materialentwicklung und Zellkultivierung. Die Gewebezücht umfasst auch die Entwicklung von Möglichkeiten zur gezielten Träger-Beladung und kontrollierten Freisetzung von Medikamenten, Therapeutika oder der in der Zellbiologie relevanten Wachstumsfaktoren, auch Suppliment<sup>[12]</sup> genannt.

Die Gestaltung eines Trägersystems, also die Ausarbeitung seines material- und strukturbasierten Grundaufbaus sowie die dadurch beeinflusste biozelluläre Kompatibilität, bilden das Kernstück der Zellträger-Forschung.<sup>[3]</sup> Der Gestaltungsfreiraum der eingesetzten, potenziell vielversprechendsten Strukturen und die Biofunktionalität eingesetzter Materialien orientiert sich vorrangig an der in jedem menschlichen Gewebe und Organ vorgegebenen natürlichen Vorlage. Diese wird als nicht-zelluläre Umgebung (engl.: *extracellular matrix*, ECM) bezeichnet. Jedes Gewebe besitzt dabei einen einzigartigen Aufbau ihrer ECM, die vorrangig aus Wasser, Proteinen und Sacchariden besteht.<sup>[13]</sup> Es sind größtenteils fibrillare Strukturen mit einem Durchmesser zwischen 10 nm und mehreren Mikrometern, basierend auf u.a. Kollagen-, Fibronectin- sowie Elastin-Fibrillen.<sup>[14]</sup>

Das Ziel der Trägergestaltung ist somit nicht nur die Entwicklung einer möglichst naturgetreuen, funktionellen Imitation der ECM in Form eines künstlichen Trägers, sondern auch dessen kontrollierter Zellbesiedlung und Kultivierung. Die Notwendigkeit der Entwicklung einer Zellbesiedlungskontrolle wird in der Geweberekonstruktionsforschung mit dezellularisierten Organen deutlich.<sup>[15-17]</sup> Die Rezellularisierung untersucht ebenso grundlegende Fragestellungen zu Problemen einer gezielten Zellbesiedlung als auch einer kontrollierten Gewebe Rekonstruktionssequenz.<sup>[17]</sup> Die Lösung solch komplexer Herausforderungen kann nur mit Forschungen zur Identifizierung und Steuerung der relevanten Träger-, Material- und Zellkulturparameter gelöst werden. Die Träger-eigenschaften und somit die Trägerherstellung selbst muss sich dabei durch sowohl vielfältige Kontrollmöglichkeiten, eine flexible Anpassungsfähigkeit als auch Reproduzierbarkeit auszeichnen.

Da eine hohe Vielzahl an Trägermerkmalen und ihre zugrundeliegenden Einflussfaktoren den Prozess der Zellkultivierung beeinflussen können, wurden im folgenden Kapitel, zur Übersicht, die grundlegenden Anforderungen der Gewebezücht an die Merkmale eines Trägers zusammengefasst und erläutert. Sie sind kategorisiert in chemische, biologische und physikalisch-mechanische Merkmale und Einflussfaktoren.

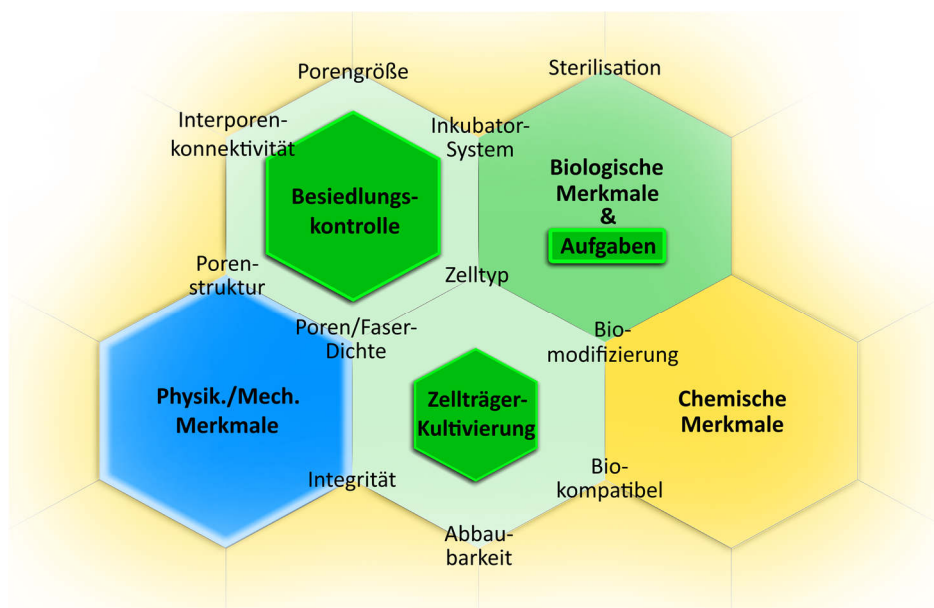


### 1.3 Gewebebezug relevante Zellträger Eigenschaften

In der Gewebebezug wird das Verhalten der Zellen auf den Zellträger und umgekehrt, im Hinblick auf den Einfluss äußerer sowie innerer Faktoren untersucht. Die äußeren Faktoren beschreiben u.a. die unmittelbare Umgebung des Zellträgers während der Kultur. Die Inneren Faktoren sind die chemischen, biologischen und physikalischen Merkmale des Zellträgers, die durch das Material und die Träger-Herstellung definiert werden. Die äußeren Faktoren sind primär von zellbiologischer Relevanz und werden daher nur grob zusammengefasst.

**Äußere Faktoren.** Während der Zellkultur werden äußere Faktoren zumeist konstant gehalten und an physiologische Grundbedingungen angenähert. Diese Bedingungen konzentrieren sich vor allem auf Temperatur, pH-Wert, Sauerstoff- sowie Kohlendioxid-Gehalt und den Bestandteilen des Nährmediums, aber auch auf die Wahl der zur Zellkultur verwendeten Inkubationstechnik<sup>[18-20]</sup>. Äußere Faktoren sind weitestgehend autark und zeichnen sich daher, sofern dem Nährmedium keine Additive wie Hormone, Botenstoffe oder Suppline hinzugefügt werden, durch eine geringe Komplexität bzw. Dynamik aus. Dies gilt nur insoweit sich die einzelnen Komponenten nicht gegenseitig beeinflussen. Dies ist z.B. der Fall, wenn Ionen oder Antikörper um die Interaktion mit einem Zellrezeptor konkurrieren (**M2**).

**Innere Faktoren.** Der komplette Verlauf der Zellträger-Entwicklung, von der Materialwahl bis zur Anwendung, ist von einer Vielzahl unterschiedlicher, innerer Faktoren gezeichnet, die einer komplexen Systemdynamik unterliegen. Dies zeigt sich daran, dass sie voneinander z.T. stark abhängig sind und sich gegenseitig beeinflussen. Dieser Einfluss kann sowohl antagonistisch oder synergistisch geprägt sein, sodass oftmals eine Balance zwischen Ihnen gefunden werden muss. In den folgenden Unterkapiteln werden die (bio)chemischen und physikalisch-mechanischen Faktoren genauer durchleuchtet, die für die Zellkultur in dieser Arbeit (**M1, M2**) fokussiert wurden (**Abb. 1**).



**Abbildung 1.** Die wichtigsten Merkmale eines PFS-Trägers für Gewebebezug Applikationen, kategorisiert in (bio)chemische (gelb), bio-zelluläre (grün) und physikalisch-mechanische Merkmale (blau).

Die gezeigten inneren Faktoren und ihre Grundlagen werden in den folgenden Kapiteln kurz definiert und mit aktuellen Arbeiten der Polymerfaser-Träger basierten Gewebezüchtung Forschung untermauert. Die jeweiligen Kapitel sind unterteilt in 1) (Bio)chemische Merkmale: Diese umfassen die Basismaterial-Eigenschaften im Hinblick auf Biokompatibilität, Abbaubarkeit, Integrität und Biomodifizierung; 2) Physikalische bzw. mechanische Merkmale: Diese umfassen die Faktoren der strukturellen und mechanischen Eigenschaften sowie der Beschaffenheit des Zellträgers, dessen Integrität vor allem durch die Fasereigenschaften und die Träger-Porosität definiert wird.

Auf Basis der dieser Arbeit zugrundeliegenden Forschung, werden die obig genannten Merkmale zusammen mit relevanten Faktoren der zellbiologischen Anforderungen an Zellträger sowie den eingesetzten Zellkultur Techniken ergänzt. Sie schließen alle inneren Faktoren der Trägerbeschaffenheit und seiner Biofunktionalität mit den äußeren Faktoren zusammenfassend ab.

### 1.3.1 Biochemische Faktoren

#### 1.3.1.1 Abbaubarkeit und Biokompatibilität – Definition

Ob sich ein Träger für die Gewebezüchtung eignet, wird durch die Eigenschaften der verwendeten Basismaterialien, die Trägerstruktur und die jeweilige Kompatibilität mit zellbiologischen Faktoren beeinflusst. Zu den wichtigsten (bio)chemischen Faktoren für die Gewebezüchtung zählen Abbaubarkeit und Biokompatibilität des Basismaterials. Sie sind entscheidend für den Kontakt und die Interaktion des Trägers mit Zellen und dem Ziel eines langfristigen Einsatzes *in-vivo* mit anschließender Bioassimilierung.<sup>[9]</sup> Dies beinhaltet im Idealfall, dass der Träger *in-vivo* vollständig durch Abbauprozesse im Körper in nicht-toxische Bestandteile wie CO<sub>2</sub>, Wasser oder Zucker abgebaut wird und möglichst weiterverwertet werden kann. Dies erlaubt es zu vermeiden, dass der Träger anschließend wieder operativ entfernt werden muss.

Unter Abbaubarkeit versteht man die Eigenschaft einer „chemischen Verbindung, unter Umweltbedingungen einem Abbau unterliegen zu können“.<sup>[12]</sup> Der Begriff Abbaubarkeit ist u.a. untergliedert in eine ortsspezifische Klassifizierung, die abhängig ist von der Anwendung bzw. Lagerung des Materials. Das Material kann biologisch, durch Einwirkung lebender Organismen, oder abiotisch, durch chemische Vorgänge (z.B. Hydrolyse) abgebaut werden.<sup>[21]</sup> Der vollständige Abbau des Materials ist notwendig, um eine vollständige Geweberegeneration zu ermöglichen, die mehr als nur eine einfache Zellvermehrung auf oder innerhalb des Trägers erfordert.<sup>[13,22]</sup>

Der Begriff Biokompatibilität beschreibt die langfristige „Verträglichkeit zwischen technischen und biologischen Systemen“, wie u.a. synthetischen Materialien, Gewebe bzw. Zellen.<sup>[12]</sup> Das heißt, dass das Material und dessen Abbauprodukte nicht zelltoxisch (zytotoxisch) sein und keine Entzündungen (Inflammation) oder sonstige negative Zell- oder Körperreaktionen wie Abstoßung auslösen dürfen. Es sollten auch möglichst keine Rückstände aus der Herstellung bzw. Verarbeitung des Zellträger Basismaterials im Träger verbleiben, da diese die Biokompatibilität ebenso negativ beeinflussen können.

### 1.3.1.2 Basismaterialien – Naturbasierte- und synthetische Polymere

Die geläufigsten in der Trägerherstellung und zur Gewebezucht eingesetzten, abbaubaren sowie biokompatiblen Polymere entstammen entweder natürlichen Ursprungs wie Kollagen<sup>[23-31]</sup>, Gelatine<sup>[32-35]</sup>, Fibrin<sup>[36-38]</sup>, Agarose<sup>[39,40]</sup>, Hyaluronsäure<sup>[32,41,42]</sup>, Alginat<sup>[40,43-45]</sup>, Chitosan<sup>[39,42,44,46-61]</sup> usw.<sup>[62]</sup>, oder sind synthetisch hergestellt, wie z.B. Polylactid (PLA)<sup>[25,26,47,63-65]</sup>, Poly( $\epsilon$ -caprolacton) (PCL)<sup>[64-68]</sup>, Poly(glycolid) (PGA)<sup>[68-70]</sup>, Poly(lactid-co-glycolid)<sup>[71,72]</sup>, usw. PLA, PGA sowie PCL und daraus hergestellten Copolymere gelten für die Entwicklung von *in-vivo* medizinischen Anwendungen als die mit am häufigsten eingesetzten synthetischen Polymere.<sup>[73-75]</sup> In der Chirurgie als abbaubarer Nähfaden oder Netzgeflecht zur z.B. Venenstabilisierung<sup>[76]</sup>, als Implantat zur Knochenfixierung<sup>[77]</sup>, als Medikamententräger-<sup>[78]</sup> oder Zellträgersystem<sup>[76]</sup>.

Das breite Anwendungsspektrum liegt u.a. an den vielfältigen Möglichkeiten zur Verarbeitung sowie in den mechanischen Eigenschaften der Polymere begründet. Diese können zur Steuerung der Integrität des Materials selbst und somit des daraus hergestellten Trägersystems gezielt modifiziert und kontrolliert werden. So lässt sich z.B. für PLA durch thermische Behandlung die Kristallinität<sup>[79]</sup> und somit die Integrität<sup>[80]</sup> des Materials und ebenso die Integrität und Elastizität des Trägers steuern<sup>[81]</sup>. Für die Herstellung von PFS liegt der Fokus darauf, dass das Basismaterial zwar eine des Fortschritts der Gewebbildung nachempfundene Abbaugeschwindigkeit vorweisen muss, aber auch die strukturelle Integrität während seiner Herstellung, Modifizierung und Zellkultivierung gewährleisten soll. Die Eigenschaften der synthetischen Polymerkomponente dient dabei aber nicht nur zur Steuerung der mechanischen und chemisch-physikalischen Eigenschaften des Trägers wie Steifigkeit, Elastizität, Integrität und Abbaubarkeit, sondern auch als Anker für Biomodifikationen.

### 1.3.1.3 (Bio)chemische Modifizierung synthetischer Trägermaterialien

Die am häufigsten zur Herstellung von Zellträgern eingesetzten Materialien sind Mischungen aus naturbasierten und synthetischen Polymeren. Dies hat den Hintergrund, dass naturbasierte gegenüber synthetischen Polymeren eine zumeist schlechtere mechanische Integrität aber dafür wesentlich bessere Biokompatibilität und Bioaffinität vorweisen.<sup>[82]</sup> Eine gezielte biochemische Modifizierung des Zellträger-Basismaterials wird daher oft zur Erweiterung der Eigenschaften des Trägers eingesetzt. Als mögliche Komponenten zur Biomodifizierung werden die natürlichen Bestandteile der ECM betrachtet, weshalb vorrangig natürliche Materialien wie z.B. Proteine oder Polysaccharide als geeignet erachtet werden.<sup>[13]</sup> Die Bioaffinität umschreibt die Fähigkeit eines Materials zur gegenseitigen Interaktion mit Zellen. Hierzu muss das Material eine funktionelle Gruppe vorweisen, die zum Zelltyp komplementär ist, also eine zur molekularen Identifizierung fähige chemische Struktur besitzt.<sup>[12]</sup> Da in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Forschungen ein Fokus auf Kompatibilität der PLA basierten PFS als Zellträger im Umgang mit Leberzellen gelegt wurde, sei hier als Beispiel die hohe Zuckerspezifität von Leberzellen (Hepatozyten)<sup>[83,84]</sup> genannt, welche später erneut aufgegriffen wird (Kap. 1.7).

## 1.3.2 Physikalische Faktoren

### 1.3.2.1 Belastbarkeit, Integrität und Porosität

Ein mit Zellen zu kultivierender Träger muss, je nach zu imitierender ECM unterschiedliche materialspezifische, also (bio)chemische und physikalisch-mechanische Eigenschaften vorweisen. Zum Zwecke der Geweberegeneration, werden Weich- (v.a. Organe) und Hartgewebe (u.a. Knorpel oder Knochen) unterschieden, ihre ECM setzt sich aus einer z.T. ortsabhängigen, unterschiedlichen ECM-Dichte<sup>[13]</sup> zusammen, die in der Trägerherstellung vereinfacht durch die Porosität des Trägers ausgedrückt wird.<sup>[85]</sup> Die Porosität wird durch die Trägerdichte  $\rho_T$  [ $\text{mg}/\text{cm}^3$ ] und das daraus resultierende Spezifische Porenvolumen (SPV [%]) des Trägers beschrieben. Eine höhere Trägerdichte kann durch höhere Material- bzw. Faserkonzentrationen realisiert werden, was zur Steigerung der Träger-StEIFigkeit führt und in einer höheren mechanischen Belastbarkeit resultiert.<sup>[6,81]</sup> Die mechanische Belastbarkeit setzt sich dabei vor allem aus den Eigenschaften des Basismaterials, für gefriergetrocknete Schwämme (aus Lösung) gewöhnlich durch die Wandstärke, für PFS durch den Faserdurchmesser<sup>[69]</sup> beschrieben, zusammen. Durch eine höhere Trägerdichte wird zwar dessen Integrität gesteigert, die Porosität jedoch wiederum gesenkt, woraufhin weniger freies Volumen für die Besiedlung mit Zellen und die Bildung von Gewebe vorab zur Verfügung steht. Der Begriff der PFS-Integrität umfasst sowohl die mechanische Belastbarkeit von PFS unter z.B. Kompression oder Scherung, aber auch den Zusammenhalt des Trägersystems, welche darüber entscheidet, ob sich das PFS-System für eine Zellkultivierung eignet oder nicht. Ein Grenzfall ist gegeben, wenn ein PFS im trockenen stabil ist, in Immersion jedoch instabil wird und der PFS z.B. während der Inkubation in wässrigem Milieu desintegriert.<sup>[81]</sup> Die Integrität entscheidet daher maßgeblich darüber, welche Techniken in der Zellkultivierung sowie PFS Verarbeitung wie z.B. Bio-modifikation eingesetzt werden können. Die Integrität kann durch chemische Vernetzung gesteigert werden, dies beeinflusst jedoch ebenfalls die Abbaubarkeit des Systems.

### 1.3.2.2 Porenstruktur und -Interkonnektivität

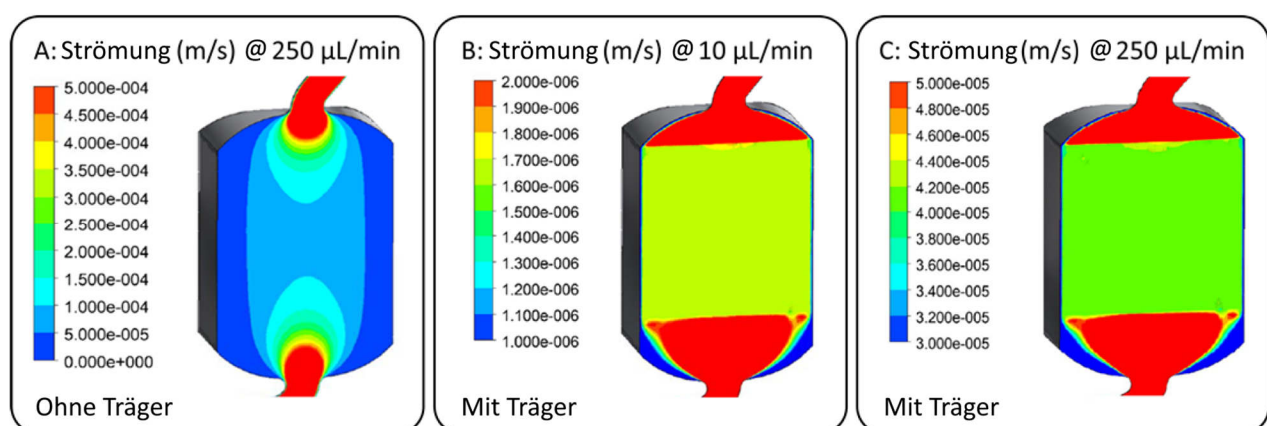
Die Porosität und ihr Einfluss auf die Gewebezucht wird durch die Faktoren Porenstruktur und Poreninterkonnektivität geprägt. Je nach zu imitierendem Organ-Typ (z.B. Leber, Niere, Blase, Atemwege) muss ein unterschiedlicher Aufbau der ECM, welcher sowohl strukturell als auch je nach Zell-Typ (z.B. Epithelial-, Muskel-, Nerven-Zellen) unterschiedlich ist, berücksichtigt werden. Zellen unterscheiden sich u.a. in ihrer Größe, Cluster-Neigung und, je nach Umgebungssituation, z.T. auch in ihrer biologischen Funktion.<sup>[86]</sup> Das als Zellträger gewählte Gerüstsystem muss dabei die Anforderungen der Zellen an die Porenstruktur möglichst genau erfüllen.<sup>[85]</sup> Der zu besiedelnde Zellträger muss flexibel gestaltet werden können, um stets möglichst ideale physikalische und strukturelle, mit der natürlichen ECM Vorlage vergleichbare Merkmale vorzuweisen.<sup>[87]</sup>

Die Zellen der menschlichen Leber setzen besondere Anforderungen an das Zellträgermaterial und seine Porenstruktur voraus. Die Porenstruktur umfasst Faktoren wie u.a. die Dimensionalität bzw.

Geometrie der Poren, ihre Größenverteilung und Interkonnektivität.<sup>[85]</sup> Hepatozyten sind adhärenente Zellen, die eine gegenseitige (Zell-Zell) oder substratspezifische (Zell-Oberfläche)<sup>[88,89]</sup> Anhaftung mit 3D Umgebungsgeometrie bevorzugen<sup>[90]</sup> und auch zum Überleben benötigen<sup>[91]</sup>.

Die Porenstruktur muss eine Penetration der Zellen in das Gerüstsystem erlauben, damit sich, im Idealfall, die Zellen im gesamten Träger verteilen können und eine vollständige Zellularisierung des gesamten Trägers erreicht werden kann.<sup>[92]</sup> Nur für eine offene und gleichmäßig verbundene Porenstruktur ist dabei ein auch tiefes und gleichmäßiges vordringen von Zellen in das künstliche Gerüst zu erwarten. Die Porenstruktur eines Trägersystem sollte hierzu ausreichend viele und ausreichend große Poren (Makroporen) und gleichzeitig keine zu hohe Dichte an Mikroporen vorweisen. Die Mikroporen werden durch die Wandporosität des Träger-Netzwerks, bzw. für faser-basierte Trägersysteme, den Faser-Faser-Abstand bestimmt. Es ist zu erwarten, dass sowohl der Anteil an Mikro- zu Makroporen, aber vor allem die mittlere Größe der Mikroporen die Poreninterkonnektivität des Systems und somit die Besiedlung eines Trägers mit Zellen stark beeinflussen.

Die Poreninterkonnektivität beeinflusst nicht nur den Zellbesiedlungsprozess, sondern auch die künstliche Nährstoffversorgung der dort ansässigen Zellen. Die Interkonnektivität der Poren des Systems muss möglichst ausgeprägt sein, damit das außerhalb des Zellträgers vorliegende Nährmedium möglichst ungehindert in den Träger diffundieren kann. Für größere Zellträger ist die Nährstoffversorgung durch die Diffusionslimitierung in einer unbewegten, statischen Kultur nicht mehr ausreichend, um tiefer als ~1mm liegende Zellen zu versorgen.<sup>[81]</sup> Für große Zellträger muss daher, als weiterer 'äußerer Faktor', eine dynamische Kultivierung eingesetzt werden, die eine künstliche, aber permanente Konvektion von Nährmedium, zumindest um den Zellträger herum, schaffen kann.<sup>[18,20]</sup> Idealerweise erfolgt die Zellkultur daher mit Hilfe eines Bioreaktors (Kap. 2.2) welcher, je nach Bioreaktor-Technik, den Zellträger auch durchgehend mit frischem Kulturmedium durchströmen, also perfundieren kann (**Abb. 2**).<sup>[19]</sup>



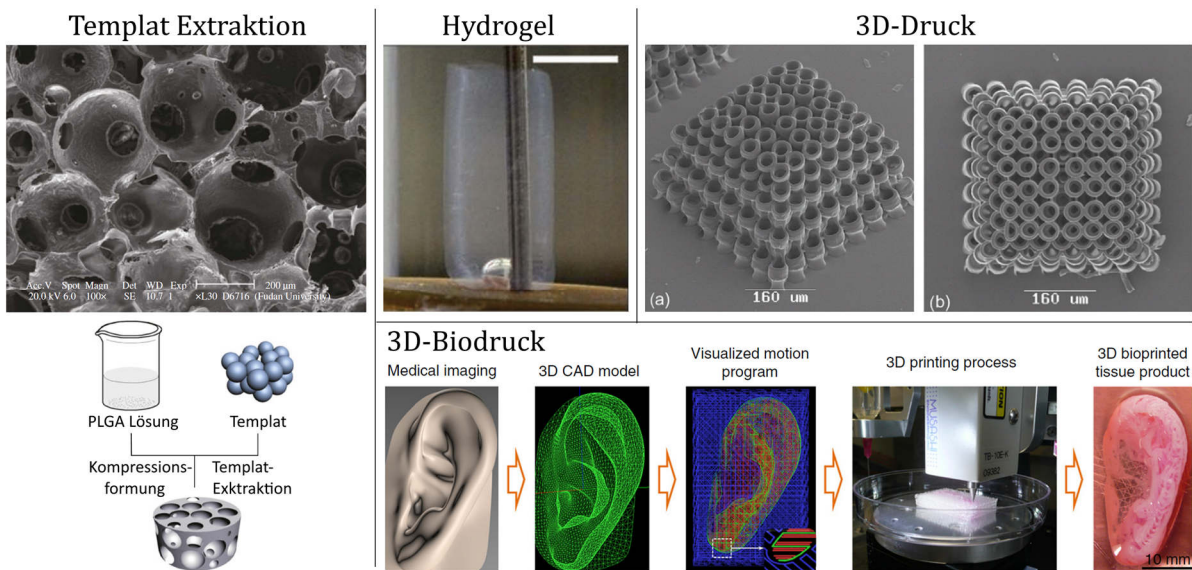
**Abbildung 2.** Analyse der Strömungsverhältnisse in einem Perfusions-Bioreaktor für unterschiedliche Fließgeschwindigkeiten. (Abbildung verwendet<sup>1</sup> aus Referenz<sup>[19]</sup>, übersetzt)

<sup>1</sup> Abgedruckt mit Genehmigung: Veröffentlicht von Mary Ann Liebert, Inc. (Open Access), © Jakob Schmid et al. 2018.



## 1.4 Polymerbasierte künstliche Zellträger

Die bekanntesten und bedeutendsten Methoden zur Herstellung abbaubarer, künstlicher Gerüstsysteme, die für einen Einsatz in der dreidimensionalen Zellforschung Potential besitzen, sind entweder natürlicher Herkunft, wie dezellularisierte Organe.<sup>[15,16,93]</sup> oder werden synthetisch hergestellt. Es existiert eine Vielzahl an Methoden und Varianten zur Herstellung synthetischer, Polymer basierter Trägersysteme. Als Basistechniken sind vor allem Templat-Extraktion<sup>[29,30,72,94-96]</sup>, Hydrogelierung<sup>[97-99]</sup>, 3D-Druck<sup>[100,101]</sup> /-Biodruck<sup>[102-104]</sup>, Elektrosponnen (ES)<sup>[37,49,70,105-110]</sup>, Gefrier-trocknung (engl.: *freeze-drying*, FD)<sup>[33,44,111,112]</sup> oder Selbstorganisation<sup>[113,114]</sup> zu nennen.



**Abbildung 3.** Beispiele polymerbasierte Trägersysteme und Basisverfahren zur Trägerherstellung. Bilder entnommen aus Referenz: Templat-Extraktion<sup>[72]</sup>, Hydrogel<sup>[115]</sup>, 3D-Druck<sup>[116]</sup>, Biodruck<sup>[104]</sup>. (Abbildungen verwendet<sup>2</sup> aus jeweilig genannter Referenz, z.T. übersetzt)

Für jede dieser Herstellungsmethoden gibt es z.T. komplexe Mischvarianten<sup>[117]</sup>, die es ermöglichen, dass z.B. selbstorganisierend strukturierende Hydrogele auch über 3D-Druck mit computergestützt konstruierten Überstrukturen hergestellt werden können.<sup>[118-120]</sup> Mischtechniken erlauben die Vorteile unterschiedlicher Techniken gezielt synergistisch zu kombinieren, um für die Gewebezüchtung neue, ggf. flexiblere Herstellungstechniken und Träger-Eigenschaften entwickeln zu können.<sup>[81,121]</sup>

Im Folgenden sind, zur Übersicht, die in der Zellträger-Forschung am weitesten verbreiteten und am häufigsten verwendeten Basisverfahren zur Trägerherstellung zusammengestellt (**Tab. 1**). Sie gibt Einblick in die enorme Bandbreite bisher veröffentlichter Trägersysteme. Es werden Varianten und Eigenschaften der Träger und ihrer Herstellung, den dieser Arbeit zugrundeliegenden Merkmalen von PLA-basierten PFS<sup>[81]</sup> gegenübergestellt. Die ausgewählten Beispiele legen den Fokus auf einen Literaturvergleich mit PLA-basierten, hochporösen Trägern und den für die Zellkultur entscheidenden Faktoren zur Steuerung der Porosität, Porenstruktur, Trägerdichte, sowie Vor-/Nachteile bzw. Limitierungen der jeweiligen Herstellungstechnik.

<sup>2</sup> Abgedruckt mit Genehmigung: Referenz<sup>[72]</sup> © 2012 The Royal Society | Referenz<sup>[115]</sup> (*Open Access*) © S. M. Chin et al. 2018, | Referenz<sup>[116]</sup> Veröffentlicht von Elsevier Ltd., © 2010 Acta Materialia Inc. | Referenz<sup>[104]</sup> © 2016, Springer Nature.

**Tabelle 1.** Übersicht und Beispiele zu den wichtigsten Herstellungsverfahren von abbaubaren und hochporösen Zellträgersystemen, ihren Eigenschaften, die verfahrensrelevanten technischen und materiellen Hintergründe, sowie Trägerspezifische Vor- und Nachteile in Bezug auf Gewebezücht Anwendungen.

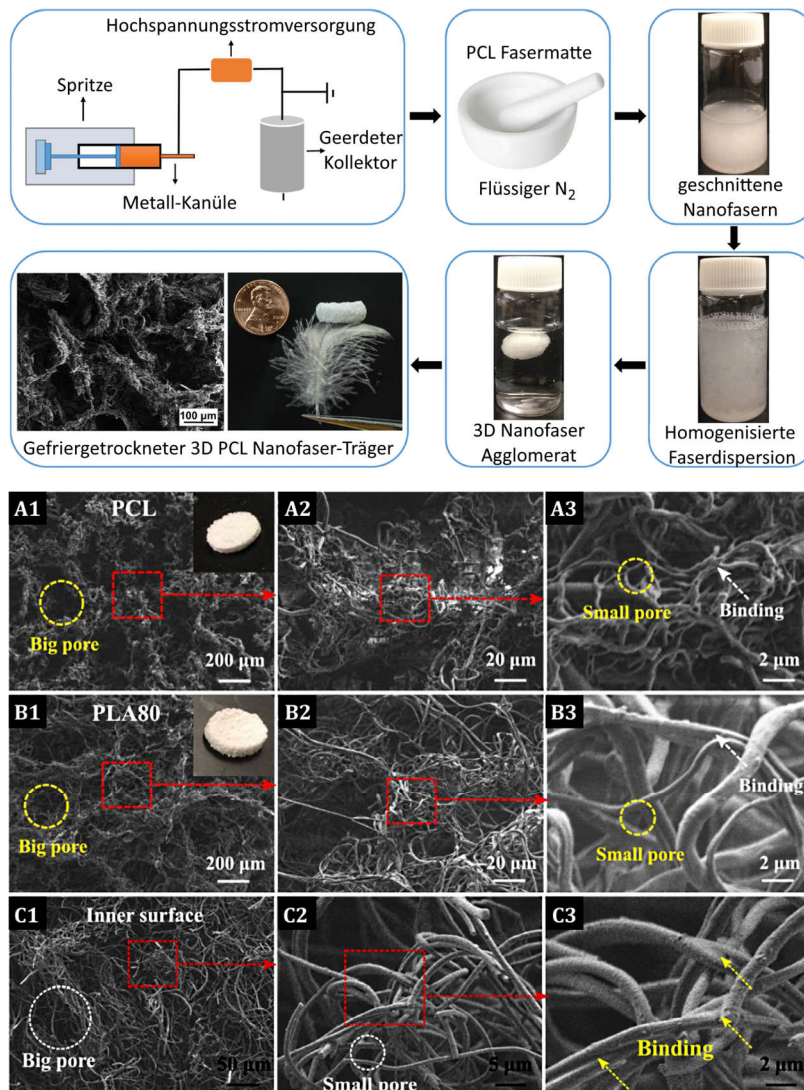
| Träger-Technik                               | Porosität  | Faser- /Wandstärke D, Porengröße P  | Hintergrund bzw. Basis-Technik  | Vernetzung des Trägers?  | Einsetzbare Polymere  | Vorteile  | Nachteile  |
|--|--|---|---|--|---|---|--|
| <b>Hydrogelierung</b>                        | < 94% <sup>[99]</sup>  | D: 10-30 µm; P: 100-300 µm (Kollagen) <sup>[99]</sup>   | Quellung von leicht vernetzten (kovalent, ionisch, physikalisch) Polymeren.   | Chemische oder physikalische Licht- oder Laserbasierte Vernetzung.                               | Naturbasiert: Gelatine, Fibrin, Alginat, Agar, ...<br>Synthetisch: PEG, PCL, PAA, PEO, PVA, ... | Zum Teil injizierbar und mit Zellen vor Gefrierung dispergierbar  | Schwach ausgeprägte mechanische Eigenschaften.<br>Biokompatibilität z. T. problematisch <sup>[100]</sup>                   |
| <b>Templat-Extraktion</b>                    | < 97% (PLGA) <sup>[72]</sup><br>< 96% (PLA) <sup>[123]</sup>                   | P: 40-450 µm (Kollagen) <sup>[72]</sup><br>D: 6(±4)-80(±30); P: 170-440 (±60) µm <sup>[123]</sup> | Verarbeitung von Templat-Dispersionen. Selbstorganisation des Templates in der Matrix. Extraktion der löslichen Templat-Komponente aus z.B. Polymer-Matrix. | Abhängig von Templat und Polymematrix. In der Regel keine Vernetzung notwendig.                  | Kollagen, Gelatine, Chitosan; PLA, PGA, PLGA, PCL, ...  | Templat ermöglicht Porenstrukturierung, Porosität durch Templat-Anteil steuerbar.                                       | Salz-/Poren-/Strukturverteilung und Homogenität schwer zu steuern. Wandstärke schwer zu kontrollieren. <sup>[94, 72]</sup> |
| <b>3D-Druck</b>                              | PLA:<br>< 60% (FFF) <sup>[150]</sup><br>73% (SLA) <sup>[104]</sup>             | D: 360 µm, P: 300-700 µm <sup>[150]</sup><br>D: 125 µm, P: 170-240 µm <sup>[104]</sup>            | CAD gesteuerte additive Fertigung: Polymer Filamente, Pulver, Lösungen, ... mit u.a. Templat-Extraktion kombinierbar (Porosität bis 94% <sup>[103]</sup> ). | Chemisch- oder physikalisch, Licht- oder Laserbasiert.   | PLA <sup>[150]</sup> , PLGA <sup>[103]</sup> , PVA, ...   | Rapid-prototyping: Hoch präzise, genau einstellbare und reproduzierbare Strukturen.                                     | Niedrige Druck-Auflösung. Auflösung stark abhängig von Drucktechnik und Düsensystem.                                       |
| <b>3D Bio-Druck</b>                          | > 60 nm <sup>[107]</sup>   |   | 3D-Druck von z.B. Hydrogelen und Polymeren.   | Vernetzung während oder nach dem Druck möglich. Hohe Material-/ Struktur-integritätsabhängigkeit | siehe Hydrogele   | Komplexe Strukturen herstellbar. Nanostrukturen druckbar (SLA). <sup>[107]</sup>  | Wenige Materialien geeignet. Hydrogeleigenschaften limitieren Druckbarkeit und Modellintegrität.                           |
| <b>Elektrospinnen (ES)</b>                   | 84-89% <sup>[112]</sup> (PCL)  | D: 2-10 µm, P: 10-40 µm <sup>[112]</sup>  | Herstellung von Nano- und Mikrofasern durch Anlegen einer Hochspannung an Polymer-Lösungen /-Schmelzen.   | Je nach Anwendungsgebiet idR. nicht notwendig.   | Nahzu jedes (lösliche) Polymer verarbeitbar   | Ausrichtung der Fasern steuerbar. Hohe Vielfalt an Faserstrukturen und mikroporöse Fasern herstellbar.                  | Poren/Porosität kaum steuerbar. Spinnbarkeit stark von Material und Lösemittelsystem abhängig.                             |
| <b>Gefrier Trocknung (FD)</b>                | 82 - 91% (PLA) <sup>[116]</sup> (16 -10 mg/cm <sup>3</sup> ) <sup>[116]</sup>  | D: 1-3 µm, P: 2-15 µm (flüssig-flüssig Phase separation) <sup>[116]</sup>                         | Lösemittel-Kristallisation gesteuerte Strukturierung einer Polymer-Matrix. Lösemittelkristalle (z.B. Wasser) werden durch Sublimationstrocknung entfernt.   | Je nach Porosität und Polymersystem. Nach Phase separation idR. Keine Vernetzung notwendig.      | Kollagen, Gelatine, Chitosan, PLA, ... In der Regel Mischungen                                  | Struktur (nur) über Lösemittelkristallbildung (und Phase separation) steuerbar.   | Komplexe Strukturkontrolle. Meist nicht multidirektional offenporig. Kleine Porengrößen.                                   |
| <b>Selbstorganisation (SA)</b>               | < 93% <sup>[119]</sup> (PLA)   | D: 0,15-0,25 µm, P: < 0,5 µm <sup>[119]</sup>   | Faser-Herstellung durch Selbstorganisation (u.a. Phase-separation) und Gefrier Trocknung.   | Durch molekulare Selbstorganisation idR. keine Vernetzung notwendig.                             | PLA <sup>[119]</sup> , Zellulose <sup>[120]</sup>   | Sehr feine und gleichmäßige Strukturen zu erhalten.   | Nanostrukturen zeigen sehr schwach ausgeprägte mechanische Eigenschaften, hohes Schrumpfverhalten, Poren sehr klein.       |
| <b>Polymerfaser-Schwämme (SANFD-Technik)</b> | 92 - 99,7% (PLA) <sup>[81]</sup> (100 - 4 mg/cm <sup>3</sup> ) <sup>[81]</sup> | D: 1-2 µm, P: 10-200 µm (breite Verteilung)   | Faser-Herstellung über Elektrospinnen, Faser-Selbstorganisation in Dispersion und Gefrier Trocknung.  | Thermisch (Oberflächen-Molekulare Verschlaufung) und/oder physikalisch (Verklebung).             | PLA, PLA/PCL <sup>[81]</sup>  | Komplexe Strukturen herstellbar. Porosität präzise und flexibel einstellbar. Uneingeschränkte Poren-Interkonnektivität. | Tempern notwendig. Schwach ausgeprägte mechanisch Eigenschaften ultra-poröser Systeme.                                     |
| <b>Polymerfaser-Schwämme (TISA-Technik)</b>  | < 96% <sup>[128]</sup> (PCL)   | W: 1-2 µm, P: 0-300 µm <sup>[128]</sup> 41-63 mg/cm <sup>3</sup>                                  | Faser-Herstellung über ES, Thermisch induzierte Faser-Selbstorganisation und Gefrier Trocknung.   | Durch Selbstorganisation keine Vernetzung notwendig.   | TISA: PCL <sup>[128]</sup> , PLA/PCL <sup>[64]</sup>  | Poröse Struktur mit breiter Porenverteilung.  | Schrumpfverhalten und somit Materialeigenschaften schwer zu steuern. Porenverteilung ungleichmäßig. Mikroporen zu klein.   |
|  |  |   |   |  | PLA/Gelatine <sup>[35]</sup>  | Erfolgreiche Knorpelregeneration.   | Großteil der Poren sehr klein, Träger-Dichte sehr hoch.  |

## 1.5 Herstellungsverfahren von Polymerfaser-Schwämmen

Im Folgenden werden die relevantesten Verfahren zur PFS-Herstellung aus ES-Fasern differenziert, um Vor- sowie Nachteile der jeweiligen Technik und den Trägermerkmalen aufzuzeigen.

### 1.5.1 Thermisch induzierte Selbst-Agglomeration (TISA) oder Phasenseparation (TIPS)

Die Arbeitsgruppe um H. Fong hat mehrere Arbeiten veröffentlicht, die eine PFS Herstellung von ES-Einzelfasern aus Dispersion durch entweder thermisch induzierte Selbst-Agglomeration (engl.: *thermally induced self-agglomeration*, TISA, **Abb. 4**) und als alternative dazu, durch thermisch induzierte Phasenseparation (engl.: *thermally induced phase separation*, TIPS) realisieren (**Abb. 5**).



**Abbildung 4.** Verarbeitungsschritte der Thermisch Induzierten Selbst-Agglomeration (TISA)<sup>[122]</sup> und SEM Aufnahmen darüber hergestellter PFS aus (A) PCL<sup>[65]</sup>, (B) PLA/PCL<sup>[65]</sup>, sowie (C) PLA/CA<sup>[123]</sup>. (Abbildungen verwendet<sup>3</sup> aus jeweilig genannter Referenz, z.T. übersetzt)

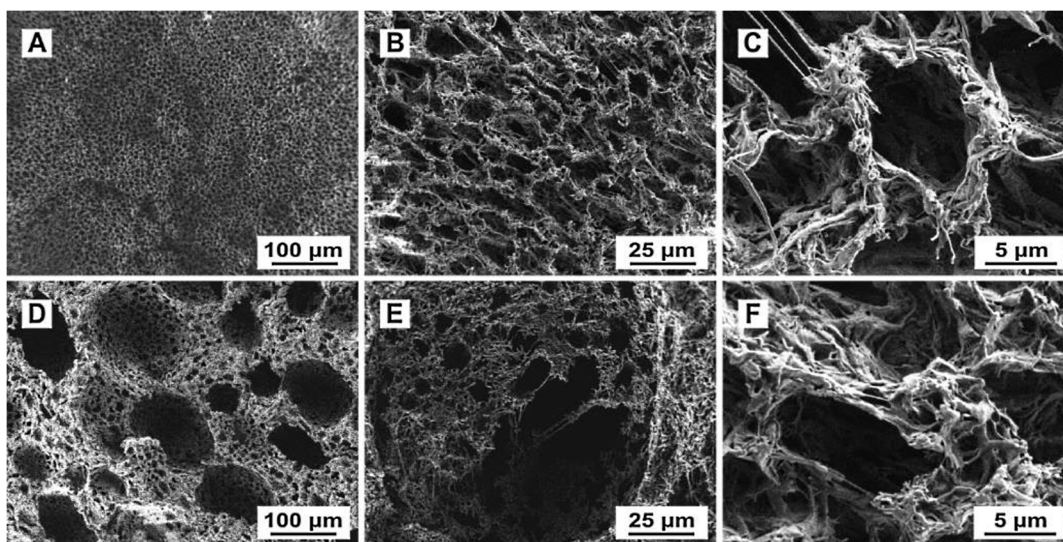
TISA- bzw. TIPS-PFS wurden bisher bereits aus PCL<sup>[122]</sup>, PLA/PCL<sup>[64,65]</sup>, PCL/Hyaluronsäure<sup>[66]</sup> und PCL/Celluloseacetat (PCL/CA)<sup>[123]</sup> gefertigt und als Basis für Knochenbildung<sup>[64]</sup> untersucht.

<sup>3</sup> Abgedruckt mit Genehmigung: Referenz<sup>[122]</sup> © 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA | Referenz<sup>[65]</sup>,<sup>[123]</sup> © 2018 Elsevier B.V.



In der vollständig manuellen Verarbeitung der ES-Polymerfasern zu Einzelfasern unter Einsatz von flüssig-N<sub>2</sub>, müssen die zerkleinerten Fasern und Fasermattenstücke mehrmals eine aufwendige Größentrennung (Sieben) durchlaufen, um eine ausreichende Menge an zur Weiterverarbeitung geeigneter Fasern zu erhalten (s. Referenz<sup>[122]</sup>, SI-Information). Durch die zur PFS Bildung genutzte thermisch induzierte Faseragglomeration lassen sich die Trägereigenschaften wie Größe, Dichte und Faserverteilung nur indirekt und somit schwer kontrollieren. Die gebildete Struktur ist stark abhängig von der verwendeten Temperatur und Agglomerationslaufzeit. TISA-PFS zeichnen sich daher durch eine ungleichmäßige Porengrößen- sowie Faserdichte-Verteilung aus (**Abb. 4**).

TIPS-PFS weisen eine sehr gleichmäßig Porenstruktur auf, mit einer hohen Anzahl an kleinen Makroporen (ca. 10 µm). Die TIPS-Technik muss jedoch mit Templat-Extraktion kombiniert werden, um auch für die Gewebezücht relevante große Makroporen (bis 250 µm) zu erzeugen (**Abb. 5**).



**Abbildung 5.** SEM-Aufnahmen repräsentativer Polymerfaserbasierte Schwämme hergestellt über (A-C) TIPS und (D-E) TIPS/Templat. (Abbildungen verwendet<sup>4</sup> aus Referenz<sup>[122]</sup>)

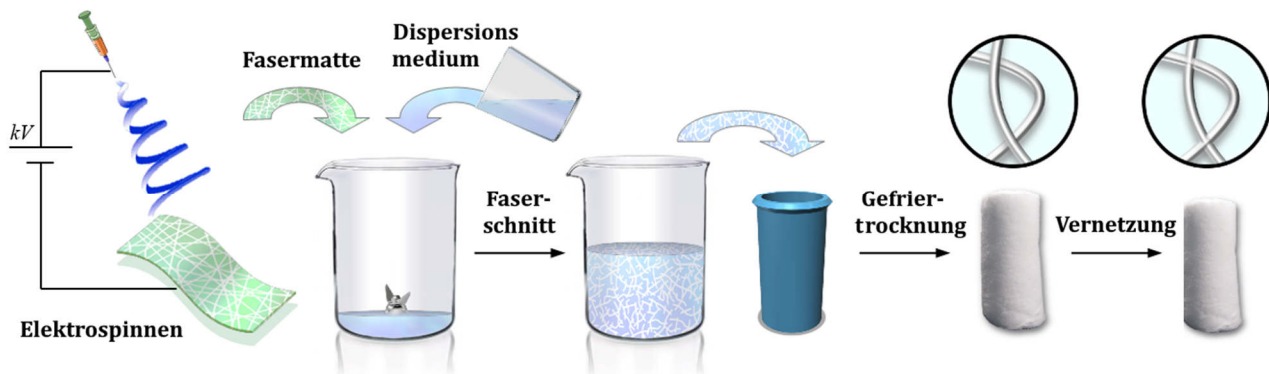
Die Kombination mit Templaten ist jedoch mit mehreren Nachteilen verbunden,<sup>[122]</sup> dazu gehören: 1) Schwierigkeiten in Waschprozess zum Entfernen der Template, welcher nicht immer vollständig abläuft. 2) Die Verdichtung der Fasern im übrigen System (**Abb. 5, D**) mit negativem Einfluss auf die Poreninterkonnektivität des gesamten Schwamms. 3) Die stark in Abhängigkeit zur Templat-Konzentration stehende Porosität des Trägers mit, bei diesen Bedingungen, hohen Einschränkungen in der Templat-Verteilung die zur Inhomogenität und Destabilisierung des Systems führen können.

Die hohe Trägerdichte, der durch TIPS oder TISA hergestellten PFS, eignet sich daher primär für Anwendungen mit hoher mechanischer Beanspruchung, die zudem eine niedrige Porosität des Trägers voraussetzen, wie die Kochen-/Knorpel Gewebezücht. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Eigenschaften der über TIPS oder TISA hergestellten PFS und die hohen Einschränkungen zur Steuerung der Porosität bzw. Porenstruktur, eine vollständige Zellularisierung stark erschweren und auf Grund der niedrigen Poreninterkonnektivität sogar z.T. unterbinden könnten.

<sup>4</sup> Abgedruckt mit Genehmigung: © 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

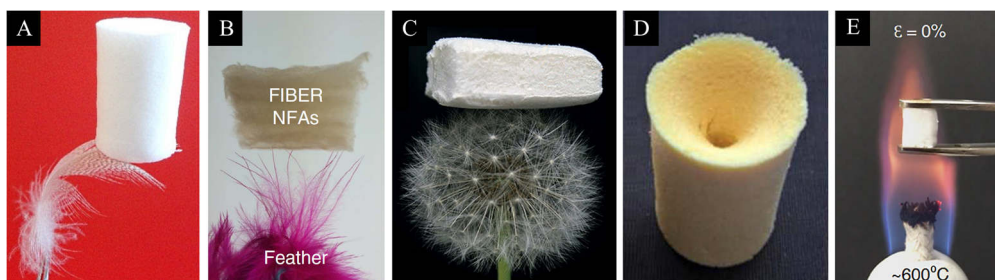
### 1.5.2 Selbstorganisierende Polymerfaser Gefriertrocknung (SANFD)

Durch einen auf Selbstorganisation basierenden Polymerfaser Gefriertrocknungsprozess (engl.: *self-assembly nanofiber freeze-drying*, SANFD) können PFS-Trägersysteme mit hoher Flexibilität und Porosität (>99,8%) aus ES-Fasern hergestellt werden. Die Grundlagen der SANFD-Technik wurden parallel von deutschen und chinesischen Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Basismaterialien gelegt, einem *Tri*-block Copolymer basierend auf Poly(acrylat)<sup>[6]</sup> und einen Faser-Mischsysteme aus SiO<sub>2</sub> und Poly(acrylonitril benzoxazin)<sup>[8]</sup>. Die PFS werden aus ES-Fasermatten hergestellt, indem diese zunächst geschnitten, homogen mit einem Mixer oder durch Dispergieren zerkleinert, gefriergetrocknet und falls nötig<sup>[6]</sup> durch thermische Vernetzung fixiert werden (**Abb. 6**).



**Abbildung 6.** Verarbeitungsschritte der PFS-Herstellung nach SANFD. (Abbildung verwendet<sup>5</sup> aus Referenz<sup>[81]</sup>)

Mit der SANFD-Technik wurden bisher PFS aus Poly(imid)<sup>[125]</sup> (PI), Poly(acrylonitril)<sup>[126]</sup> (PAN), Pullulan/Poly(vinylalkohol)<sup>[127]</sup>, PAN/PI/Kohlenstoff-Nanoröhren<sup>[128]</sup>, Alm-Borosilikat und SiO<sub>2</sub><sup>[129]</sup>, PLA/Gelatine/Apatit<sup>[63]</sup>, PCL/Polyethylenglykol/PCL<sup>[130]</sup> und Poly(para-xylylen)<sup>[131-133]</sup> (PPX) durch Beschichtung über Gasphasenabscheidung<sup>[134]</sup> gefertigt (**Abb. 7**).

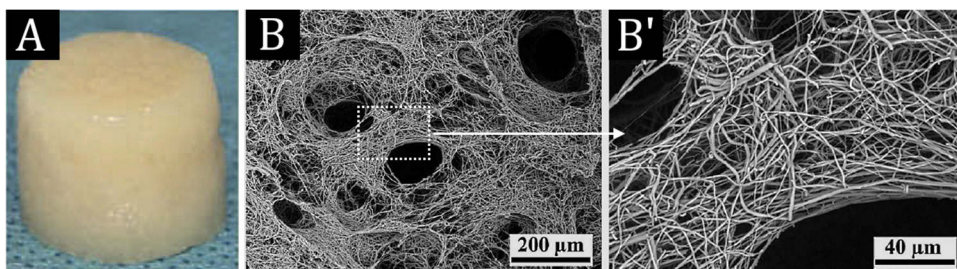


**Abbildung 7.** Polymerfaser-Schwämme hergestellt mit der SANFD-Technik aus elektrogewebenen Fasern eines (A) Poly(acrylat)<sup>[6]</sup> basiertes *Tri*-block Copolymer (B) SiO<sub>2</sub> und Poly(acrylonitrilbenzoxazin)<sup>[8]</sup>, (C) Pullulan/Poly(vinylalkohol)<sup>[124]</sup>, (D) Poly(imid)<sup>[125]</sup> und (E) Aluminium-Borosilikat/SiO<sub>2</sub><sup>[129]</sup>. (Abbildung verwendet<sup>5</sup> aus jeweiliger Referenz)

Die Arbeiten unterscheiden sich lediglich in den für den Träger eingesetzten Basismaterialien sowie dem letzten Schritt der PFS Vernetzung, welche entweder thermisch<sup>[34,127,130,135]</sup> oder chemisch<sup>[35,63]</sup>

<sup>5</sup> Abgedruckt mit Genehmigung (angepasst/übersetzt): Referenz<sup>[81]</sup> © 2018 American Chemical Society. Abgedruckt mit Genehmigung (angepasst). | Referenz<sup>[6]</sup> (*Open Access*) © 2015 Die Autoren, Published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, | Referenz<sup>[8]</sup> © 2014, Springer Nature | Referenz<sup>[124]</sup> © 2017 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, | Referenz<sup>[125]</sup>, © Die Autoren, einige Rechte vorbehalten; exklusiver Lizenznehmer AAAS. Vertrieb unter CC BY-NC 4.0-Lizenz.

erfolgt. Die hergestellten Träger bieten hohes Potential sowie außergewöhnliche Eigenschaften als Funktionsmaterial<sup>[136]</sup> zur Öl-H<sub>2</sub>O Trennung<sup>[135]</sup> als Träger für Katalysatoren<sup>[137]</sup>, Medikamente<sup>[138]</sup>, sowie für thermische, elektrische wie auch akustische Isolation und Flammschutz-Anwendungen<sup>[129]</sup>. Die Vorteile von SANFD liegen darin, dass sich die Eigenschaften der elastischen PFS präzise einstellen und kontrollieren lassen. So ist es z.B. möglich, auf gezielte strukturelle Ähnlichkeiten der ECM Vorlage einzugehen und PFS mit definierten und vor allem reproduzierbaren Merkmalen herzustellen. Die SANFD-Technik erlaubt, durch gezielte Kristallisation des Dispersionsmediums, den Aufbau der Porenstruktur zu modifizieren.<sup>[139]</sup> PFS können zudem in beliebiger Größe, Form und Gestalt hergestellt werden.<sup>[8]</sup> Die Vernetzung kann dabei auch unter relativ 'sanften' Bedingungen erfolgen, sodass, je nach Basismaterial, auch eine kurze Temperierung bei 60 °C (**M1**) ausreicht.<sup>[81]</sup> Mit Hilfe der SANFD-Technik wurde auch die Herstellung abbaubarer PFS auf Basis von PLA/Gelatine<sup>[34,35]</sup> realisiert (**Abb. 8, A**) und für Gewebezücht Forschungen eingesetzt. Durch die Mischung von PLA mit naturbasierten Polymeren wie Gelatine kann die Hydrophilie und Zellaffinität eines Zellträgers gesteigert werden (Kap. 1.7.1). Das Mischverfahren kommt jedoch auf Grund der Löslichkeit von Gelatine nicht ohne zusätzliche, z.T. gesundheitlich bedenkliche chemische<sup>[35,63]</sup> und/oder radikale Vernetzungsstrategien mit hohen Temperaturen<sup>[140]</sup> von bis zu 180-190 °C<sup>[34,63]</sup> aus. Die erhaltenen Strukturen zeichnen sich durch eine ungleichmäßige Faserverteilung aus (**Abb. 8, B**), welche größtenteils aus sehr engmaschigen Mikroporen (~1-5 µm) und vereinzelt, scheinbar zufällig auftretenden Makroporen (10-200 µm) besteht. Erstere besitzen eine vergleichbare Dichte wie ES-Fasermatten, was sich in einer oberflächlichen Zellbesiedlung der Träger aus PLA/Gelatine<sup>[35]</sup> wie auch PLA/Gelatine/Hyaluronsäure<sup>[34]</sup> PFS widerspiegelt.



**Abbildung 8.** Struktur von PLA/Gelatine PFS. (A) Photographie<sup>[35]</sup> und (B) SEM-Aufnahme.<sup>[34]</sup> (Abbildung verwendet<sup>6</sup> aus jeweiliger Referenz)

Neben den der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Forschungen existierten bisher keine alternativen Verfahren mit vergleichbarer Flexibilität zur SANFD-Technik, die zur Herstellung von PFS aus rein synthetischen Materialien eingesetzt wurden und keine chemische Vernetzung benötigen. Ein allgemeiner Nachteil aller synthetischen Herstellungstechniken ist weiterhin, dass der Träger sich zur Sterilisierung eignen<sup>[141,142]</sup> und nachträglich mit Zellen besiedelt werden muss.<sup>[143]</sup> Die einzelnen Schritte zur Herstellung von PFS nach SANFD werden im Folgenden zusammengefasst

<sup>6</sup> Abgedruckt mit Genehmigung: Referenz<sup>[35]</sup> © 2016 Elsevier B.V. | Referenz<sup>[34]</sup> © 2016, American Chemical Society.

und genauer durchleuchtet. Der Überblick aller ihr zugrundeliegenden Verfahren greift wichtige Aspekte der Systemdynamik der einzelnen PFS-Herstellungs- und -Verarbeitungsschritte auf.

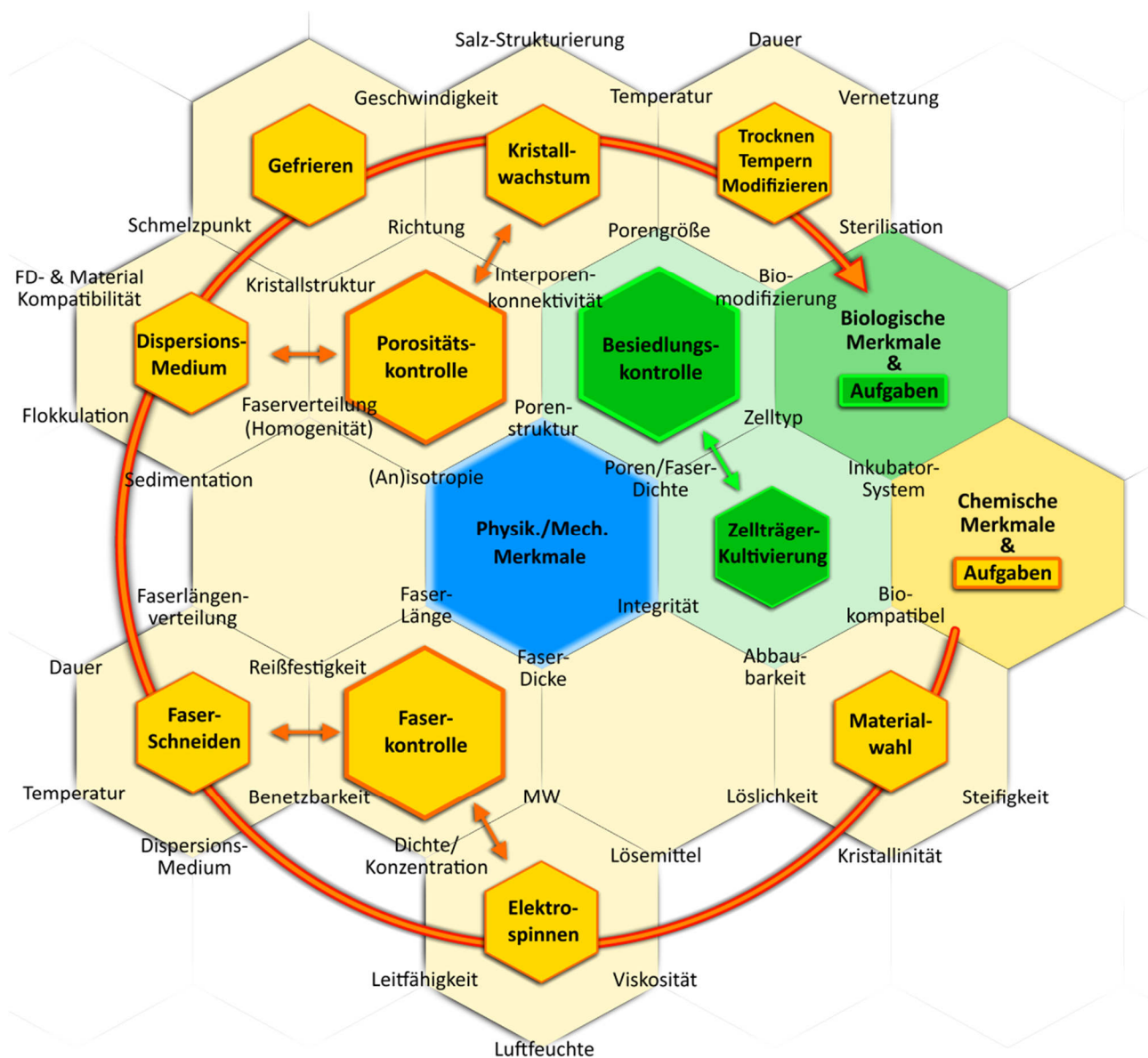


## 1.6 Einzelschritte und Systemdynamik der Polymerfaser-Schwamm Herstellung

### 1.6.1 Systemdynamik von Polymerfaser-Schwamm Zellträgersystemen

In diesem Kapitel wird die Systemdynamik aller für die PFS-Herstellung nach SANFD beteiligten Einzelschritte und ihrer Zusammenhänge erläutert (**Abb. 9**), um die (Bio)chemischen (Kap. 1.3.1) sowie physikalischen Einflussfaktoren (Kap. 1.3.2) und die Möglichkeiten zur Kontrolle der ES-Fasern, PFS-Träger Porosität und Zellbesiedlung zusammenzufassen.

Die Verarbeitung des Polymers zu PFS umfasst mehrere Einzelschritte: Materialwahl, ES, Faser-Schnitt, Gefrieren, Gefriertrocknen, Vernetzung und (Bio)Modifikationen sowie ggf. Strukturmodifikationen (Anhang). Jeder Einzelschritt umfasst dabei wieder eigene Einflussfaktoren, welche zusammen die spätere Zellträgerbeschaffenheit und dessen physikalisch-mechanische Eigenschaften, also die PFS-Merkmale abbilden.



**Abbildung 9.** Systemdynamik der PFS-Herstellung nach SANFD. Alle Hauptschritte (Hexagon-Zentrum) und Einflussfaktoren (Hexagon-Ecke), von der Materialwahl bis zur Zellkultivierung, sind eingeteilt in (gelb) chemische, (grün) biologische und (blau) physikalische PFS Träger-Merkmale.

Die Faktoren der einzelnen Herstellungsschritte und ihr Einfluss auf die Trägerbeschaffenheit kann mitunter stark voneinander abhängig sein. Die Abhängigkeit kann entweder antagonistisch oder synergistisch die aus den Faktoren resultierende Beschaffenheit des Trägersystems und somit die Merkmale des Zellträgers prägen. Ein Beispiel für einen antagonistischen Zusammenhang ist die gewählte Faserdichte auf die Träger-Porosität und Integrität: Die Materialintegrität ist ein für die Zellkultivierung und die Zellträger-Anwendung wichtiges physikalisches Merkmal (Kap. 1.3.2). Durch die Faserdichte kann die Integrität des Trägers leicht gesteuert werden, sie beeinflusst aber auch andere Eigenschaften. Eine hohe Faserdichte steigert die mechanische Belastbarkeit, senkt jedoch die mittlere Porengröße und somit die Porosität (Poren-Größe, -Struktur, -Interkonnektivität) des Trägers, welche die Penetration von Zellen beeinflusst (Kap. 1.3.1).

Um die Komplexität der Experimente zur z.B. Bestimmung der mechanischen Belastbarkeit des Trägersystem oder seiner Zellkultivierung niedrig zu halten und Vergleichsbedingungen zu schaffen, müssen die inneren Faktoren systematisch variiert werden. Nur so können die von Ihnen ausgehenden Einflüsse z.B. auf den Zellbesiedlungsprozess unabhängig voneinander analysiert werden. Dies gilt z.B. für die vom gewählten Träger-Basismaterial oder der Struktur ausgehende Einflüsse die parallel mit unterschiedlichen Zelltypen derselben Serie und ergänzenden Replika, unter statischer (**M1**) oder dynamischer Kultur (**M2**) untersucht werden können.

### 1.6.2 Material Wahl – Polylactid

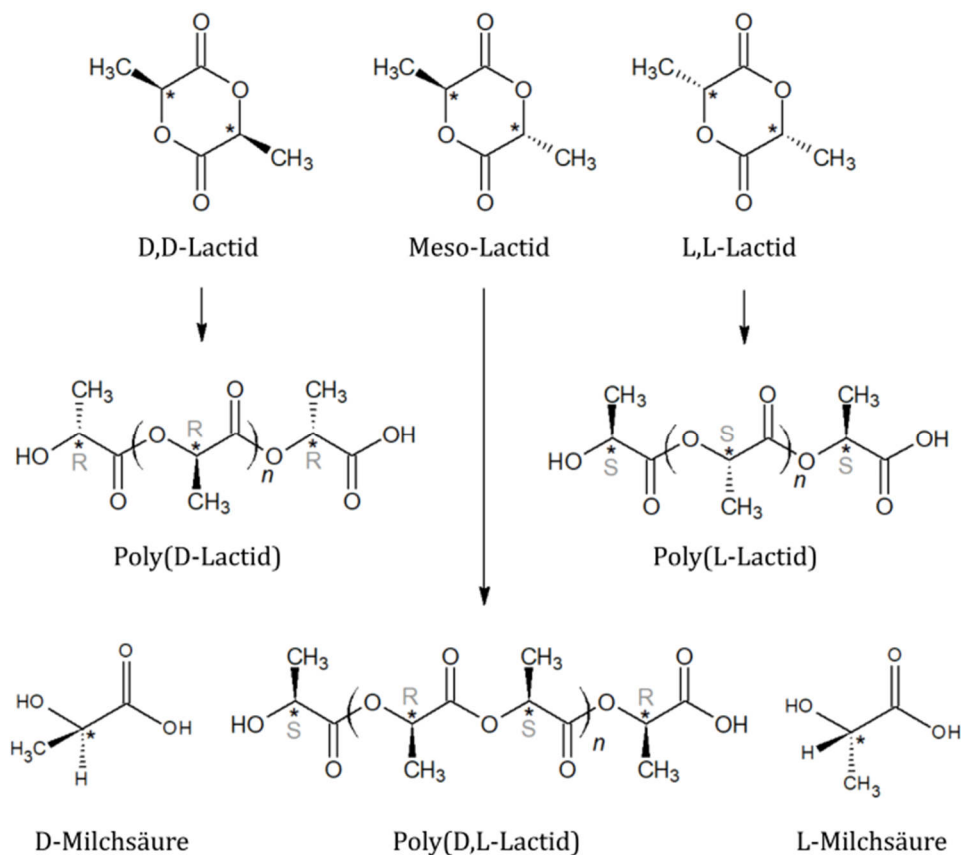
Die wichtigsten Eigenschaften von PLA basieren sowohl auf den für die Zellkultivierung relevanten biochemischen Merkmalen Biokompatibilität und Abbaubarkeit (Kap. 1.3.2), aber auch auf die chemischen Eigenschaften und die daraus resultierende Verarbeitbarkeit von PLA. Dazu zählen Verfahren unter Einsatz thermoplastischer Methoden wie Spritzguss, Blasformen, Folienherstellung, Schmelzextrusion durch z.B. 3D-Druck<sup>[144]</sup>, Schmelzelektrospinnen<sup>[145]</sup> usw.<sup>[146]</sup>; und Methoden unter Verwendung der Löslichkeit von PLA zur Faserherstellung<sup>[147]</sup>, Partikelherstellung, Phasen-separation<sup>[148]</sup>, Gefriertrocknen<sup>[139]</sup>, Schäumen<sup>[149]</sup> und Selbstorganisation<sup>[113]</sup>, usw.

Es ist anzumerken, dass unter Einsatz von thermoplastischen- oder lösemittelbasierten Methoden zu berücksichtigen ist, dass die Verarbeitung mit einem thermisch- oder hydrolytisch<sup>[150]</sup> gesteuerten Abbau, aber auch einem Umstrukturierungsprozess von PLA einhergehen kann.<sup>[146]</sup> Diese Faktoren bestimmen die Material- und somit die späteren PLA-PFS Eigenschaften. Sie werden durch chemische bzw. makromolekulare Faktoren beeinflusst, die im Folgenden kurz erläutert werden.

### Stereoisomerie und Kristallinität

Es existieren mehrere unterschiedliche PLA Varianten, welche auf die Stereoisomerie des chiralen Lactid-Moleküls (**Abb. 10**, oben), dem Baustein der PLA Polymerkette zurückzuführen sind. Je nach Ausrichtung der Methylgruppe der Wiederholungseinheit des Polymers (**Abb. 10**, Mitte) liegt PLA entweder z.B. isotaktisch als kristallines PLLA bzw. PDLA vor; oder als Mischung aus beiden, z.B. ataktisch als amorphes PDLLA (**Abb. 10**, unten).<sup>[151]</sup> Die Taktizität, welche entweder isotaktisch (Nur

R/S) (**Abb. 10**, Mitte), ataktisch (zufällig R/S) oder syndiotaktisch (alternierend R/S) sein kann (**Abb. 10**, unten), bestimmt auch die maximal erreichbare Kristallinität des verwendeten PLA.<sup>[151]</sup>



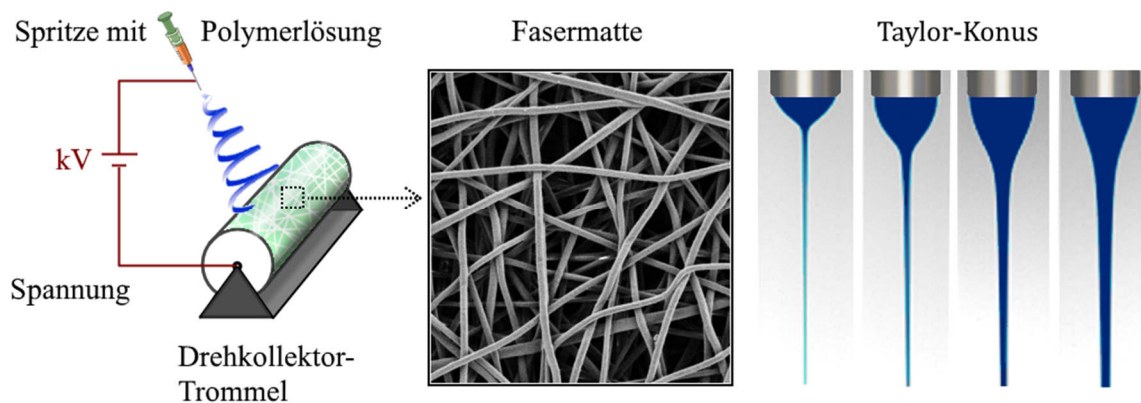
**Abbildung 10.** Chemische Struktur der Lactid-Diastereomere sowie den Polymeren PDLA, PLLA und PDLLA hergestellt aus den beiden D,D- bzw. L,L-Lactid Enantiomeren bzw. Meso-Lactid.

Die unterschiedlichen Taktizitäten führen aber auch generell zu Unterschieden in den mechanischen Eigenschaften von PLA und beeinflussen neben dessen Kristallinität<sup>[80]</sup>, auch Abbaubarkeit<sup>[150]</sup>, Löslichkeit, Schmelzpunkt und Glaspunkt.<sup>[151]</sup> Die Taktizität ist daher nicht nur besonders wichtig für die ES-Verarbeitung von PLA zu Polymerfasern (Kap. 1.6.3) sowie den Schneide-Prozess (Kap. 1.6.4), sondern auch für nahezu alle darauffolgenden Prozesse (Vernetzung, Modifizierung) der Verarbeitung damit hergestellter Trägersysteme.

Die Steifigkeit des Polymers ist neben dem E-Modul und der Reißdehnung eine der wichtigsten mechanischen Eigenschaften von PLA und daraus hergestellter Polymerfasern<sup>[79]</sup>. Sie werden maßgeblich durch die Kristallinität beeinflusst und sind entscheidend für die 'Faser-Kontrolle' in der PFS-Entwicklung (**Abb. 9**), vor allem im Schneide-Prozess (Kap. 1.6.4). Der im Produkt vorherrschende Grad der Kristallinität ( $\alpha$ ) wird entweder über die thermische Vorgeschichte, die Verarbeitung oder thermische Nachbehandlung gesteuert (**M1**).<sup>[79]</sup> Das Molekulargewicht beeinflusst die Viskosität und somit die generelle Spinnbarkeit des PLA-Polymers.<sup>[152]</sup>

### 1.6.3 Elekterspinnen – Herstellung von abbaubaren Polymerfasern

Die Herstellung von Mikro- bzw. Nano-Fasern durch Elekterspinnen (ES) ist der erste Aspekt der Systemdynamik zur Faser-Kontrolle in der PFS-Herstellung. ES umfasst die Verarbeitung eines entweder thermoplastischen Polymers aus der Schmelze (Schmelz-ES), oder eines gelösten Polymers aus Lösung (**Abb. 11**) und Varianten davon.<sup>[153]</sup> Mit Überschreiten der Energie der Oberflächenspannung durch gezielte Anpassung der angelegten elektrischen Spannung wird über einen Taylor-Konus (**Abb. 11**, rechts) ein von der Oberfläche der Polymerlösung ausgehender Flüssigkeitsstrahl gebildet, welcher im Verlauf seines Weges bis zum Kollektor trocknet und dort als Fasermatte einer Endlosfaser aufgefangen wird. Durch die Verarbeitung von PLA über ES werden ähnlich wie durch Abschrecken aus der Schmelze hoch amorphe Strukturen gebildet. Durch ES können nahezu alle löslichen Polymere in Endlosfasern mit einem Durchmesser von wenigen Nanometern bis mehreren Mikrometern realisiert werden.



**Abbildung 11.** Der Elekterspinnprozesses zur Herstellung von Polymer-Fasermatten. Schematischer Aufbau zur (links) Illustration des Spinnvorganges, (mittig) elektronenmikroskopische Aufnahme von elektrogessponnenen PLA-Fasermatte; (rechts) Schema: flussratenabhängiger Taylor-Konus.

#### Elekterspinn-Einflussparameter und Techniken

Der Spinnprozess aus Lösung ist abhängig von unterschiedlichen Variablen:<sup>[153]</sup>

- 1) Polymer: Löslichkeit, Molekulargewicht, Ladung, Konzentration, usw.
- 2) Lösemittel: Polarität, Dampfdruck, Leitfähigkeit, usw.
- 3) Eigenschaften der Polymerlösung: Homogenität, Rheologie, Leitfähigkeit, Viskosität, usw.
- 4) Spinn-Umgebung: Relative Luftfeuchte, Temperatur, Spindistanz zum Kollektor, usw.

ES bietet durch die zur Verfügung stehende Bandbreite möglicher Lösemittelsysteme<sup>[154]</sup> Kontrolle über den Faserdurchmesser<sup>[155]</sup>, ihre Mikro-<sup>[156]</sup> und Makro-Struktur<sup>[157]</sup> sowie Fasergeometrie<sup>[158]</sup> eine Vielzahl an Steuerungsmöglichkeiten zur Variation der Nanostrukturierung von Faser basierten Trägersystemen.<sup>[159]</sup> Die Fasern werden in der Regel in Form von Fasermatten auf einem Kollektor gesammelt, wobei Fasermatten je nach Kollektorsystem<sup>[105,160]</sup> sowie verwendeter Parameter unterschiedliche Faserorientierungen<sup>[157]</sup> aufweisen können. Weitere ES-Varianten basieren z.B. auf dem Einsatz von Dispersionen<sup>[161]</sup>, Emulsionen<sup>[162]</sup> oder dem Einsatz komplexer Düsensysteme<sup>[161,163]</sup>.



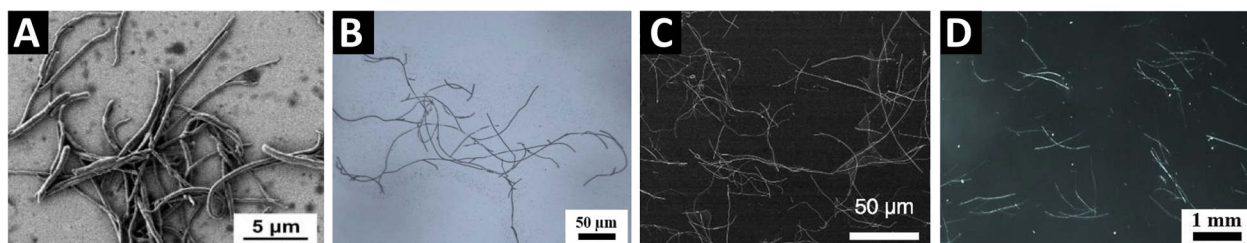
## 1.6.4 Faser-Schnitt – Herstellung von Faserdispersionen

Der Schnittprozess von elektrogenesponnen Mikrofasern ist der zweite Aspekt der Systemdynamik zur Faser-Kontrolle in der Schwammherstellung. Er umfasst den Schnittprozess von ES-Fasermatten in homogene Faserdispersionen für die Gefriertrocknung zu PFS.

### 1.6.4.1 Verfahren zur Herstellung von kurzen Nano- und Mikrofasern

Der Schnittprozess in der Herstellung von PFS basiert stets auf der Vorzerkleinerung der Vorstufe, der ES-Fasermatte, und ihrer anschließenden Dispergierung in Einzelfasern. Als Vorstufe sind neben ES-Fasermatten auch thermisch gestreckte, elektrogenesponnene Faserbündel<sup>[126]</sup> verwendbar.

Der Schneidprozess in einzelne Fasern erfolgt entweder durch Mahlen<sup>[64,122]</sup>, Mixen<sup>[6,81]</sup> oder Dispergieren<sup>[8,135]</sup> (**Abb. 12**). Diese Techniken resultieren jedoch alle etwa gleichermaßen in einer breiten Faserlängenverteilung mit einem hohen Variationskoeffizient (CV), also einem prozentualen Anteil der Standardabweichung zur mittleren Faserlänge, von ca. 70-90 %<sup>[8,126]</sup>. Eine alternative Methode zur Herstellung von kurzen Nano- bzw. Mikrofasern aus PLA basiert z.B. auf Scherstreckung von Polymerlösungen (CV 73%)<sup>[164]</sup>. In wenigen Fällen erlaubt der ES-Prozess selbst die direkte Herstellung von kurzen Polymerfasern aus z.B. Zelluloseacetat<sup>[165,166]</sup>. Als Steuerungsmöglichkeit dient hierbei die Flussrate bzw. angelegte Spannung, oder der Einsatz von geladenen Nanopartikeln. Die so hergestellten Fasern besitzen jedoch, durch die dabei wirkende Streckung der Einzelfaser, einen sehr ungleichmäßigen Durchmesser entlang der Faser.



**Abbildung 12.** Einzelfaser-Aufnahmen nach A) Mahlen<sup>[122]</sup>, B) Mixen<sup>[126]</sup>, C) Dispergieren<sup>[135]</sup>, D) Cryo-Schnitt<sup>[126]</sup> hergestellt aus (A-C) elektrogenesponnenen Fasermatten und (D) Faserbündeln. (Abbildung verwendet<sup>7</sup> aus jeweiliger Referenz)

Die gezielte Herstellung von gleichmäßigen Fasern mit definierter Länge und Durchmesser sowie zugleich jeweils schmaler Größenverteilung ist anspruchsvoll, aber z.B. durch Cryo-Schnitt von elektrogenesponnenen und thermisch gestreckten Faserbündeln ebenfalls möglich.<sup>[126]</sup> Auf diese Weise können definierte Faserlängen mit einem CV von 15 % hergestellt werden. Im Vergleich zu den anderen Techniken ist der nur geringe Durchsatz die Haupt-Einschränkung des Verfahrens. Die so hergestellten Fasern sind dafür ideal, um den Einfluss der Faktoren Faser-Länge, Durchmesser sowie Dispersität auf die mechanischen Eigenschaften von PFS zu analysieren.<sup>[126]</sup>

<sup>7</sup> Abgedruckt mit Genehmigung: Referenz<sup>[122]</sup>, © 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA | Referenz<sup>[126]</sup> (Open Access) © 2020 X. Liao et al., Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA | Referenz<sup>[135]</sup> © 2015, American Chemical Society.

### 1.6.4.2 Einflussfaktoren der Faser-Dispergierung

Eine Vielzahl unterschiedlicher Einflussfaktoren bestimmen den Verlauf des Schnittprozesses von Fasermatten mit einem Mixersystem und die dabei erhaltene Homogenität, Faserlänge und Dispersität. Zu den Parametern, die für die weitere Verarbeitung von elektrogesponnenen PLA Fasermatten zu Faserdispersionen wichtig sind, zählen A) Material- und Umgebungsfaktoren, sowie B) Dispersionsmedium- und Stabilitätsfaktoren:

|   |                        |   |
|---|------------------------|---|
| A | Mechanisch:            | Faser-Durchmesser, Material-Härte, -Steifigkeit, -Reißdehnung, usw.           |
|   | Materialchemisch:      | Glaspunkt, Benetzbarkeit, Dichte, usw.  |
|   | Umgebung:              | Schnitt-Temperatur, -Dauer, -Umdrehungsgeschwindigkeit, usw.                  |
| B | Dispersionsstabilität: | Homogenität, Flockulation, Sedimentation, Blasenbildung, usw.                 |
|   | Dispersionsmedium:     | Polarität, Dichte, Kristallitgröße und Rheologie teil-gefrorener Systeme usw. |
|   | Rheologie:             | Faser-Länge, -Konzentration, -Flexibilität, usw.                              |

Im Schnitt-Prozess wird die über ES hergestellte Fasermatte in zunächst kleinere Stücke und anschließend möglichst vollständig in Einzelfasern dispergiert. Hierauf üben alle obig genannten Einflussfaktoren einen Beitrag aus. Das korrekte Zusammenspiel und das Finden einer Balance zwischen diesen Faktoren entscheidet über die späteren Eigenschaften der Faserdispersion. Die Qualität der geschnittenen Fasern und somit der Faserdispersion beeinflussen die Qualität des Schwammes. Die wichtigsten Faktoren und Zusammenhänge werden im Folgenden erläutert.

### 1.6.4.3 Material- und Umgebungsfaktoren

Der Erfolg des Schnittprozesses ist maßgeblich von den mechanischen Eigenschaften (Härte, Steifigkeit, Reißdehnung usw.) des Materials, z.B. des verarbeiteten Polymers (Kap. 1.6.2) und daraus hergestellter Fasern abhängig. Im Folgenden werden die wichtigsten Faktoren anhand von Beispielen erläutert. Der hergestellte Faserdurchmesser und die Kristallinität des PLA haben Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Einzelfasern, der Fasermatte und ihrer Fasermattenstruktur.<sup>[167]</sup> Der Schnittprozess wird somit auch durch das zur Herstellung der Fasermatte verwendete Kollektorsystem und u.a. der Verteilung der Faserorientierung<sup>[168]</sup>, dem Molekulargewicht und der Kristallinität<sup>[169]</sup> des Polymers nach z.B. thermischer Behandlung oder Streckung bestimmt, sodass sehr viele Faktoren den mechanischen Schnittprozess prägen. Sie bestimmen Schnitt-Dauer, den Erfolg des Schnittprozesses und die spätere Qualität der Dispersion.

Eine Gewichtung der Einflussfaktoren ist dadurch auch neben wenigen Auffälligkeiten, die sich aus dem Schneide-Prozess ableiten lassen, enorm erschwert. Neben Materialunterschieden hat auch die Benetzbarkeit der Fasermatte durch das Dispersionsmedium sowie die Umgebungstemperatur einen merklichen Einfluss auf den Schnittprozess. Dieser ist für Polyacrylat basierte Fasermatten in Dioxan in weniger als einer Minute abgeschlossen.<sup>[6]</sup> PLA-Fasern mit identischem Faser-Durchmesser und als Fasermatte mit nahezu identischer Strukturierung zum Polyacrylat-System, müssen unter analogen

Bedingungen (in tBuOH/H<sub>2</sub>O) mindestens 20-60 Minuten geschnitten werden, um eine vergleichbare Dispergierung zu erreichen.<sup>[81]</sup> Hydrophilierte PLA-Fasermatten sind in tBuOH/H<sub>2</sub>O in unter fünf Minuten Schnittzeit bereits homogen dispergiert (**M2**).

Der Schnittprozess von Fasern hergestellt aus PLA (Reißdehnung <10 %) ist gegenüber von Polymeren wie PCL (Reißdehnung 600 %)<sup>[170]</sup> wesentlich einfacher. Dies zeigt sich spätestens daran, dass sich elektrogesponnene und somit amorphe PCL-Fasermatten bei Raumtemperatur in tBuOH/H<sub>2</sub>O Lösung wie zähes Gummi verhalten und den Schnitt vollständig unterbinden. Dies kann nur durch tiefe Temperaturen und Verminderung der makromolekularen Beweglichkeit verhindert werden. Der Zerkleinerungsprozess von PCL-Fasermatten ist unter tief-kalten Bedingungen sogar über Mahlen möglich (Kap. 1.5.1).<sup>[122]</sup>

#### **1.6.4.4 Wahl des Dispersionsmediums und Stabilitätsfaktoren**

Es kann nur ein gleichmäßiger PFS gebildet werden, wenn die Faserdispersion über den Zeitraum der Zugabe in den Gefriertrocknungsbehälter und der vollständigen Kristallisation des Mediums während des Einfrierens stabil bleibt. Die Zusammensetzung des Dispersionsmediums für den Faser-Schnitt wird daher entsprechend den Eigenschaften des Fasermaterials gewählt<sup>[6,8,81]</sup> damit eine Benetzung, Dispergierung und Stabilisierung der geschnittenen Fasern möglich ist. Das Dispersionsmedium wird in Bezug auf seine Polarität und Dichte gewählt, um Flockulations- als auch Sedimentationserscheinungen durch hohe Unterschiede in Dichte sowie Polarität zwischen Faser und Medium zu vermeiden. Die genannten Faktoren werden im Folgenden genauer erläutert.

#### **Benetzbarkeit, Flockulation, Sedimentation**

Die Benetzbarkeit beschreibt die Interaktion eines Materials mit einer Flüssigkeit. Viele Faktoren bestimmen die Interaktion, welche in der Regel durch den Kontaktwinkel ausgedrückt wird. Zu den wichtigsten Faktoren gehören die Hydrophilie des Materials sowie die Polarität der Flüssigkeit. Für beide ist die Anwesenheit funktioneller Gruppen, für das Material außerdem die Topografie<sup>[171]</sup> entscheidend. Der Kontaktwinkel wird von allen Faktoren beeinflusst und zeigt ob ein Material hydrophile (wasserzuneigende), oder hydrophobe (wasserabneigende) Eigenschaften vorweist.<sup>[12]</sup> Die Materialoberfläche und ihre Benetzbarkeit beeinflusst die Neigung dispergierter Nanosysteme und somit auch von Polymerfasern zu Flockulation und Sedimentation.<sup>[172]</sup> Ist der Grad der Wechselwirkung zwischen den Fasern höher als zwischen Faser und Dispersionsmedium, tendieren die Einzelfasern zu flockulieren. Flockulation beschreibt den Prozess der Partikel-Agglomeration zu Flocken-förmigen Aggregaten, die je nach Größe und Dichteunterschied der Faser zum Dispersionsmedium zur Abscheidung, also zu Sedimentation, oder Aufschwimmen der Fasern führt.<sup>[12]</sup>

Die dispergierten Faserstücke müssen vom Dispersionsmedium benetzt und im zur Verfügung stehenden Medium gleichmäßig verteilt werden können, um homogene und reproduzierbare PFS herstellen zu können. Neben dem Prozess der Flockulation und der Abscheidung von dispergierten

Einzelfasern sind auch unvollständig zerkleinerter Fasermatten-Stücke in der Faserdispersion ein Qualitätsfaktor für den späteren PFS. Zur Vermeidung ist vorrangig die Durchmischung der Dispersion während des Schnittprozesses zu gewährleisten, daher sollte die Faserdispersion während der Schnitt-Zeit verdünnt vorliegen. Dies hat den Hintergrund, da das Dispersionsmedium sonst während des Schnittprozesses gelartige Eigenschaften erhält, wodurch die Durchmischung während der Dispergierung und die Faserlängenverteilung negativ beeinflusst werden. Dieses Verhalten ist mit den rheologischen Eigenschaften konzentrierten Fasergruppierungen zu erklären, wie im nächsten Kapitel erläutert wird.<sup>[173]</sup>

### **Rheologische Faktoren – Faserlänge und Konzentration**

Die Faserlänge sowie der CV der Längenverteilung, der im Schnitt-Prozess erhalten wird, ist entscheidend für die Eigenschaften des Schwammes.<sup>[126]</sup> Die Fasermatte muss daher im Verlauf des Schnitt-Prozesses gleichmäßig zerkleinert und dispergiert werden, denn dies erlaubt, die erhaltene Faserlängenverteilung möglichst schmal zu halten.

Der Einfluss der Faserlänge kann an einem konzeptionellen Modell zweier in Lösung vorliegender Polymerfasern erläutert werden. Die Faserlänge bestimmt die Wahrscheinlichkeit der Überlappung beider Fasern und somit die mögliche Anzahl an Kontaktpunkten, die wiederum die späteren Vernetzungspunkte im Fasergerüst des PFS bilden. Kurze Fasern können demnach ein weniger stabiles Netzwerk aufbauen und neigen eher zu Sedimentation. Es ist analog zu vergleichbaren Systemen<sup>[126]</sup> auch für PLA-Fasern anzunehmen, dass die mechanische Belastbarkeit des PFS umso höher ausfällt, je länger die Fasern sind und je mehr Vernetzungspunkte bei vergleichbarer Porenstruktur im Vernetzungsschritt (Kap. 0) gebildet werden können.

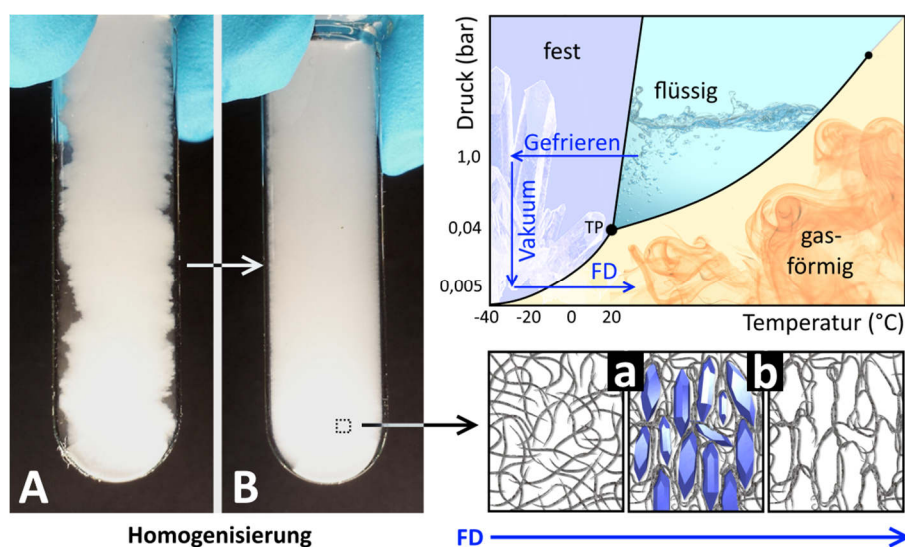
Je länger geschnitten wird, desto kürzer wird die mittlere Faserlänge und desto schmaler wird die Faserlängenverteilung.<sup>[127]</sup> Gleichzeitig müssen aber alle Fasermattenstücke vollständig dispergiert werden, um Inhomogenitäten durch Defekte zu vermeiden. Defekte sind unvollständig dispergierte Stücke der Fasermatte die sich in Form noch intakter Mattenreste, dichter Faserstränge oder Faserknäuel zeigen. Defekte beeinträchtigen die Homogenität sowie die Reproduzierbarkeit des PFS-Systems und es ist zu erwarten, dass sie auf Grund ihrer punktuell sehr hohen Faserdichte auch einen negativen Einfluss auf den Verlauf einer Zellularisierung haben. Es ist daher wichtig, die Dispergierung so lang wie nötig durchzuführen, die Schnitt-Zeit aber so kurz wie möglich zu halten.

Je länger die Fasern im Mittel sind, desto höher ist jedoch auch der zu erwartende Einfluss auf die rheologischen Eigenschaften der Faserdispersion. Diese werden vor allem durch das Aspektverhältnis der Einzelfasern, aber auch durch ihre Flexibilität (E-Modul und Trägheit) bestimmt.<sup>[173]</sup> Dicke Fasern besitzen eine niedrigere mechanische Flexibilität, die sowohl die Interaktion mit anderen Fasern, als auch die Verteilung im Dispersionsmedium bestimmt. Dickere Fasern neigen aber auch, auf Grund ihrer höheren Masse, verstärkt zu Sedimentation und gefährden so die Dispersionsstabilität und Homogenität des Systems.<sup>[173]</sup>

### 1.6.5 Gefriertrocknung – Herstellung roher Polymerfaser-Schwämme

Der Prozess der Gefriertrocknung (engl.: *freeze-drying*, FD) von Faserdispersionen umfasst mehrere zu überwachende Einzelschritte (**Abb. 13**): 1) Befüllung und kontrollierte Homogenisierung der Faserdispersion im FD-Behältnis; 2) Kontrolliertes Gefrieren und Steuerung der Kristallisation der Faserdispersion zur Porenstrukturierung; 3) Sublimation des Dispersionsmediums unter Vakuum zum Erhalt des Roh-Schwammes.

Gefriertrocknung von (v.a. PLA basierten) PFS ist ein Muss und kann bisher nicht z.B. durch einfache Trocknung an der Luft ersetzt werden, da das Schwammgerüst ansonsten vollständig kollabiert. Auch weitere Faktoren beschränken die Modifizierbarkeit von PLA-PFS, dazu zählt vor allem die Dispersionsmittelstabilität, wie sie in Löse-/Antilösemittel-Systemen in der Beschichtung von PFS zu Tragen kommt (**M2**). Die Gefriertrocknung als notwendiger, letzter Arbeitsschritt jeder PFS Verarbeitung ist daher ein wichtiger Bestandteil nicht nur der Herstellung, sondern auch der Modifizierung (**M2**; Anhang) von PFS, welcher eingehalten und genau kontrolliert werden muss.



**Abbildung 13.** Verlauf der Gefriertrocknung (FD) zur Herstellung von PFS. (1) PLA-Faserdispersion A) vor und B) nach Homogenisierung im FD-Gefäß (Glas); (2) FD-Prozess: Mit a) Gefrieren, b) Vakuumtrocknen durch Sublimation des Dispersionsmittels. Schematisch gezeigt: (rechts, oben) Temperatur-/ Druck-Verlauf der Gefriertrocknung im Phasendiagramm von *t*-BuOH<sup>[174]</sup> und (rechts, unten) Faserverteilung vor Kristallisation des Dispersionsmediums und nach Abschluss des FD-Prozesses.

Die Überwachung des Gefriertrocknungsverlaufs dient vorrangig zur Steuerung der Qualität von PFS und ihrer gezielten Porenstrukturierung, wie in den folgenden Kapiteln gezeigt und für die einzelnen Aspekte der Systemdynamik zur Porositätskontrolle diskutiert wird.

#### 1.6.5.1 Homogenisierung der Faserdispersion

Zur Gewährleistung der Qualität eines PFS ist die Homogenisierung der Faserdispersion im FD-Behälter entscheidend (**Abb. 13**). Hierbei üben die rheologischen Eigenschaften und das Verhalten der Polymerfasern in Dispersion<sup>[173]</sup> einen enormen Einfluss auf die gleichmäßige Verteilung der Fasern im FD-Behälter aus. Die Homogenität der Faserdispersion im FD-Behälter entscheidet

vorrangig, neben Faktoren wie der Dispersionsstabilität (**Kap. 1.6.4.4**), über die Gleichmäßigkeit der Faserverteilung und somit die finale Integrität des hergestellten PFS.<sup>[81]</sup>

Die rheologischen Eigenschaften 'konzentrierter Fasersysteme'<sup>[173]</sup>, dies gilt für PLA Mikrofaserverdispersionen bereits bei einer Konzentration von weniger als ca. 2 mg/cm<sup>3</sup>, resultieren in einer bevorzugt ungleichmäßigen, asymmetrischen Faserverteilung im FD-Behälter direkt nach ihrer Zugabe (**Abb. 13, A**). Die asymmetrische Verteilung kann nur durch gezielte Homogenisierung, dies sind u.a. Prozesse, wie z.B. Rühren oder Schütteln, ausgeglichen werden (**Abb. 13, B**).

Hierbei ist anzumerken, dass symmetrische Prozesse, wie sie z.B. durch den Energieeintrag eines Hochfrequenz-Rüttelinkubator erzeugt werden können, vor allem bei langfristiger Einwirkung keine gleichmäßige Verteilung der Fasern liefern. Der symmetrische Schüttelprozess führt bevorzugt wieder zur asymmetrischen Verteilung der Fasern im nahezu gesamten Behältnis, vor allem an der Grenzschicht zur Luft. Dies ist daran zu erkennen, dass die Fasern sich von der Behälterwand distanzieren und im Zentrum des Behälters konzentrieren. Die rheologischen Eigenschaften erschweren die Homogenisierung von kleinen FD-Behältern bzw. Bereichen mit schmalen Strukturen daher wesentlich. Dies gilt auch für den Einfluss von Fremdkörpern im Dispersionssystem, dazu zählen u.a. Luftblasen und Nadeln, wie sie z.B. in der Mikrokanalstrukturierung (Anhang) Einsatz finden. Mangelnde Homogenisierung führt zu ungleichmäßigen und somit destabilisierten sowie leicht brüchigen Schwammkörpern und hohem Probenausschuss.<sup>[81]</sup>

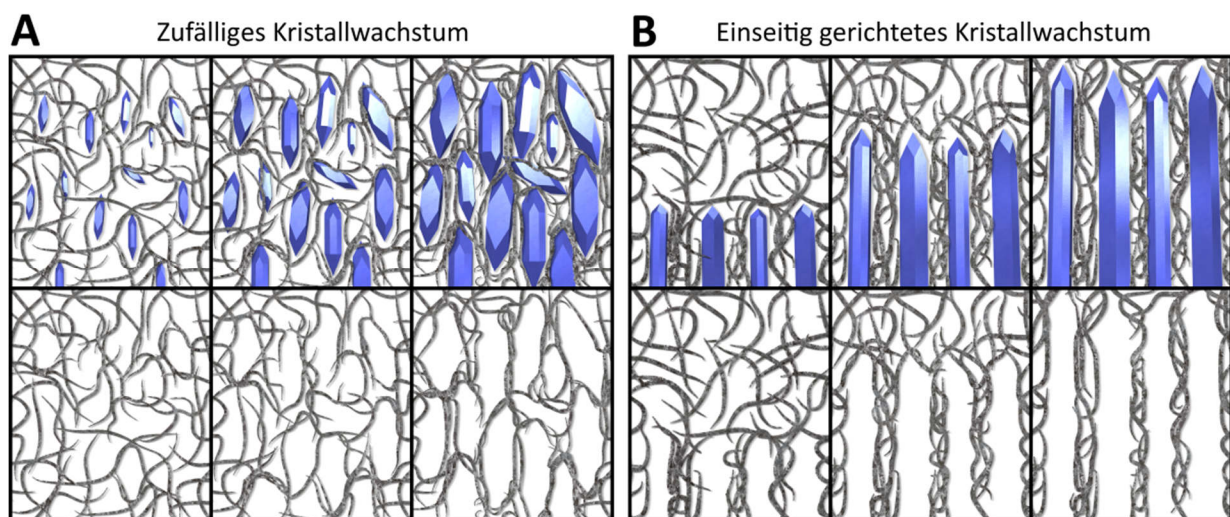


### 1.6.5.2 Porositätskontrolle in der Polymerfaser-Schwamm Herstellung

Die Wahl des Dispersionsmediums und seiner Kristallstruktur wie auch die Wahl des Temperaturgradienten sowie das Temperaturprofil im Gefrierprozess der FD bilden die wichtigsten Aspekte der Systemdynamik zur Porositätskontrolle für PFS, wie im Folgenden erläutert wird.

#### Zusammenhang zwischen Kristallwachstum- und Porenstruktur

Die Kontrolle über den Kristallisationsprozess während des Gefrierens des Dispersionsmediums erlaubt die gezielte Steuerung der Porenstrukturierung von PFS (**Abb. 14**). So kann direkt Einfluss auf die Porosität des Systems und die mechanischen Eigenschaften der PFS genommen werden. Die Steuerung des Kristallit-Wachstumsverlaufs ist vor allem zur flexiblen Anpassung des Systems, an z.B. unterschiedliche biozelluläre Anforderungen der Gewebezücht, von hoher Bedeutung (Kap. 1.3).



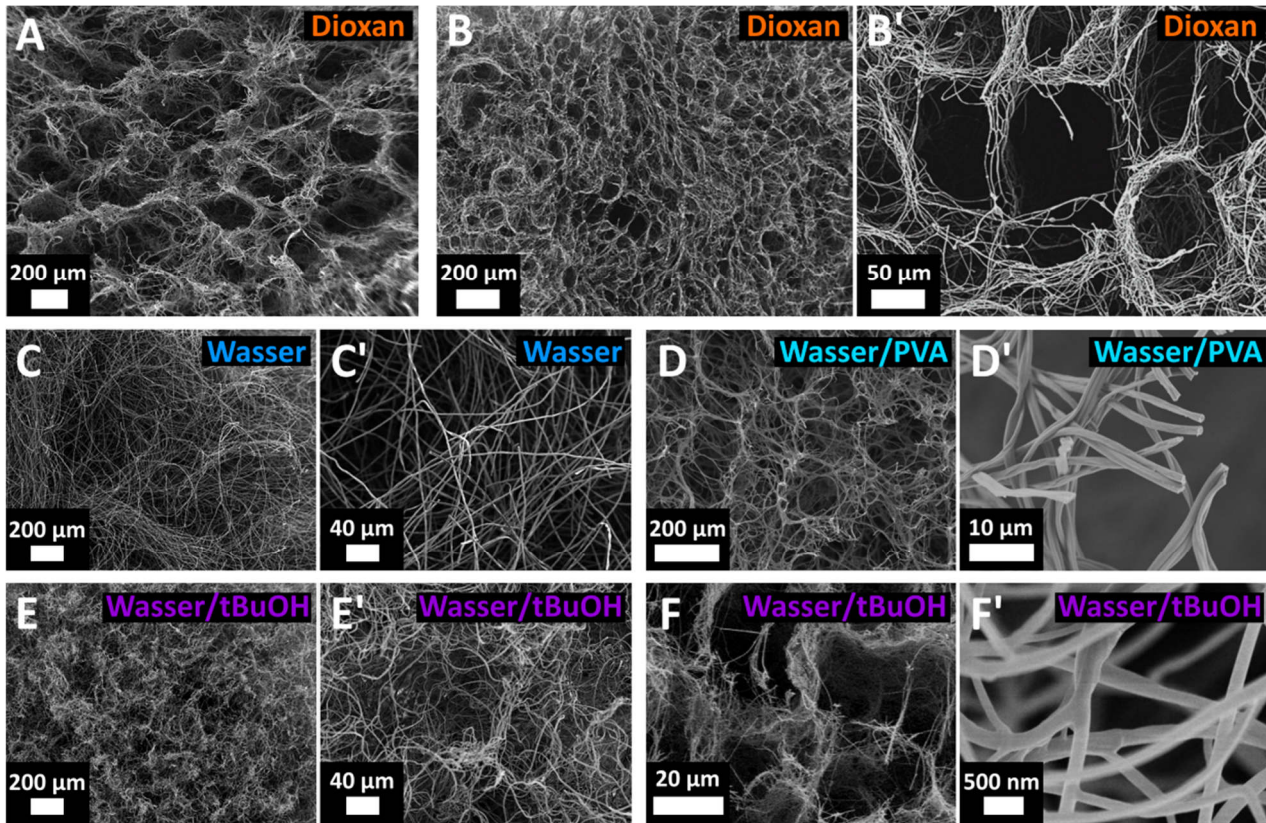
**Abbildung 14.** Porenstrukturierung von PFS in Abhängigkeit von Dispersionsmedium und Temperaturprofil. Illustration des Kristallisationsverlaufs: (oben) Fasern und Kristallite, (unten) Fasern und Poren nach Gefriertrocknung. **Fall A)** Zufälliges Kristallwachstum, wie es in der Regel bei Gefrierprozessen mit ungerichteter Kühlung des FD-Behälters eintritt. **Fall B)** Einseitig gerichtetes Kristallwachstum, typisch für Kühlung von nur einer Seite des FD-Behälters.

Zu den wichtigsten Faktoren der Porenstrukturierung gehört das verwendete Faserdispersionsmedium und die angelegte Temperatur. Sie bestimmen die Faserverteilung, Porengröße und Porenstruktur, sowie die daraus resultierende (An-)Isotropie und Poreninterkonnektivität des PFS. Je nach Dispersionssystem, Temperatureinstellung und Temperaturprofil erfolgt eine Kristallisation des Dispersionsmediums entweder zufällig bzw. multidirektional<sup>[6,81]</sup> (**Abb. 14, A**), oder gerichtet, also z.B. konzentrisch<sup>[175]</sup> oder von unten nach oben (Anhang; **Abb. 14, B**). Ohne spezielle Kontrolle der Temperatur oder des Temperaturgradienten im FD-Behälter, werden vorrangig ungerichtete Porenstrukturen gebildet (**Abb. 15**).

Darüber hinaus gibt es Möglichkeiten zur Porenstrukturierung durch Salzkristallisation. Sie erlauben eine kontrollierte Strukturierung von PFS nach Abschluss der Gefriertrocknung (Anhang).

## Wahl des Dispersionsmediums

Das Dispersionsmittel und ggf. Additive entscheiden über den Gefrierpunkt der Faserdispersion, die sich bildende Kristallstruktur und somit die Porenstruktur des späteren PFS (**Abb. 15**).



**Abbildung 15.** Einfluss des verwendeten Dispersionsmediums auf die Mikro-/Makroporenstruktur von PFS auf Basis von (A) Poly(methylacrylate-co-methylmethacrylate-co-4-methacryloyloxybenzophenone)<sup>[6]</sup>; (B) Polyacrylonitril<sup>[126]</sup>. (C, D): Poly(bis(benzimidazo)-benzophenanthrolindion)<sup>[176]</sup>. (E): PLA/PCL, hergestellt aus 1:4 H<sub>2</sub>O/*t*-BuOH<sup>[81]</sup>. (F): Polyacrylonitril/BA-a/SiO<sub>2</sub>, hergestellt aus 4:1 H<sub>2</sub>O/*t*-BuOH<sup>[8]</sup>. (Abbildungen verwendet<sup>(9)</sup> aus den jeweilig genannten Referenzen)

Für Faserdispersionen auf Basis von 1,4-Dioxan<sup>[6,126,127,132]</sup> (**Abb. 15, A, B**), Wasser/PVA<sup>[128,176]</sup> (**Abb. 15, D**), sowie 4:1 (w/w) H<sub>2</sub>O/*t*-BuOH Mischungen<sup>[8,81]</sup> (**Abb. 15, E, F**) werden ausgeprägte Porenstrukturen erhalten. In einigen Fällen wird jedoch auch keine erkennbare oder eine nur schwach ausgeprägte Porenstruktur gebildet, dies ist z.B. aus Wasser<sup>[176,177]</sup> (**Abb. 15, C**) und 1:4 (v/v) H<sub>2</sub>O/*t*-BuOH Mischungen<sup>[81]</sup> (**Abb. 15: E**) der Fall.

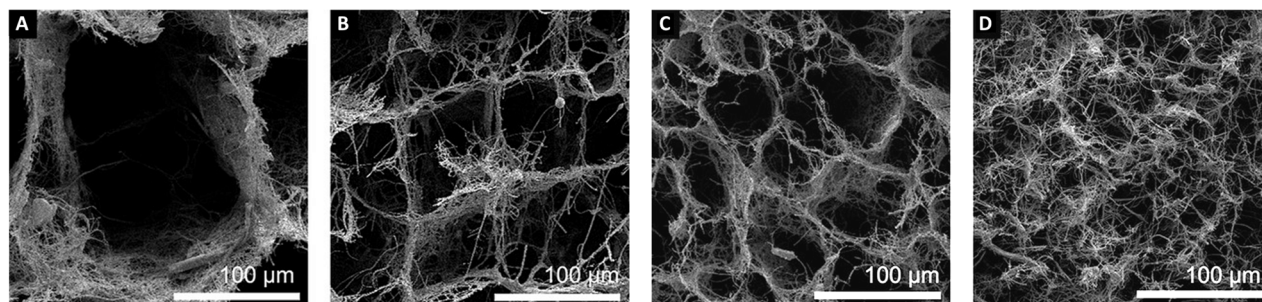
Auch der FD-Behälter, seine Größe und die Wandstärke des Materials aus dem er besteht, übt erwartungsgemäß Einfluss auf den Verlauf der Kristallbildung aus, v.a. durch Unterschiede im Temperaturgradienten innerhalb des Behälters. Dieser Faktor beeinflusst wie schnell und an welcher Position des FD-Behälters die Kristallisation eintritt. Der Temperaturkontrolle kommt daher, wie im Folgenden Kapitel gezeigt, eine Schlüsselrolle in der Porenstrukturierung von PFS zu.

<sup>8</sup> Abgedruckt (angepasst) mit Genehmigung: Referenz<sup>[81]</sup> © 2018 American Chemical Society | Referenz<sup>[6]</sup> (*Open Access*) © 2015 G. Duan et al., Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, | Referenz<sup>[8]</sup> © 2014, Springer Nature | Referenz<sup>[126]</sup> (*Open Access*) © 2020 X. Liao et al., Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA | Referenz<sup>[176]</sup> © 2018 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.



### Wahl des Temperaturprofils – Einfluss des Kristallisationsverlaufs auf die Porenstruktur

Der während der Kristallisation vorherrschende Temperaturgradient ermöglicht die Steuerung der Vorzugsrichtung des Kristallwachstums und die Kristallisationsgeschwindigkeit. Zusammen haben sie einen maßgeblichen Einfluss auf die Porengröße<sup>[127]</sup> (**Abb. 16**), wie auch die Bildung von Porenkanälen<sup>[178]</sup> zur Generierung von gerichteten Porenstrukturen (**Abb. 14**, rechts), welche im Folgekapitel erneut aufgegriffen werden.



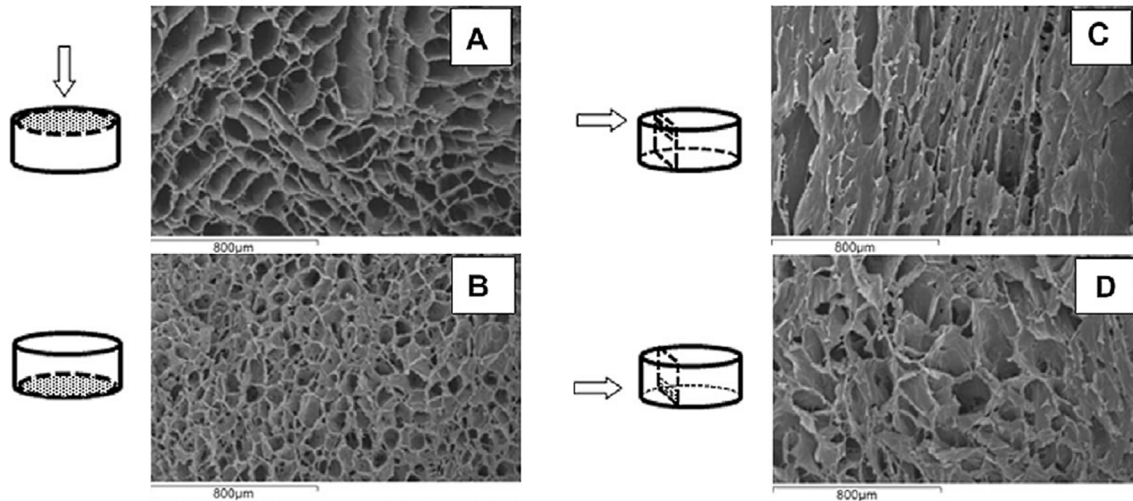
**Abbildung 16.** Einfluss der Gefrierbedingungen auf die Mikrostruktur von PFS gleicher Dichte ( $\sim 9 \text{ mg/cm}^3$ ): (A–D) aus Polysaccharid/PVA Fasern (Pullulan/PVA) hergestellt aus 1,4-Dioxan. Gefriergeschwindigkeit [ $\mu\text{m s}^{-1}$ ]: (A) 2.1, (B) 6.2, (C) 10.3, (D) 73.1. (Verwendet<sup>9</sup> aus Referenz<sup>[127]</sup>)

Eine Zunahme der mittleren Porengröße führt – bei gleichbleibender Porosität, Faserdichte und der gleichen prozentualen Maximalkompression ( $\epsilon_{Max.}$ ) – auch zur Zunahme der zur Kompression des Schwammes benötigten Kraft der Stauchung.<sup>[127]</sup> Dies ist im Hinblick auf die in der Regel relativ schwach ausgeprägten mechanischen Eigenschaften von PFS mit niedriger Faserdichte zwar positiv, im Hinblick auf TE-Anwendungen sind große Poren jedoch nicht zwangsläufig die bessere Wahl. Bei gleicher Faserdichte – durch die lediglich unterschiedliche Faserverteilung – wird für größere Poren automatisch ein kleinerer Faser-Faser Abstand gebildet, was wiederum in einer niedrigeren Poreninterkonnektivität resultiert (Kap. 1.3.2). Dies wird voraussichtlich für vor allem sehr großen Poren (**Abb. 16**, links), die eine sehr hohe Faserdichte der Porenwände zeigen, der Fall werden.

<sup>9</sup> Abgedruckt mit Genehmigung: © 2016 F. Deuber et al., Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

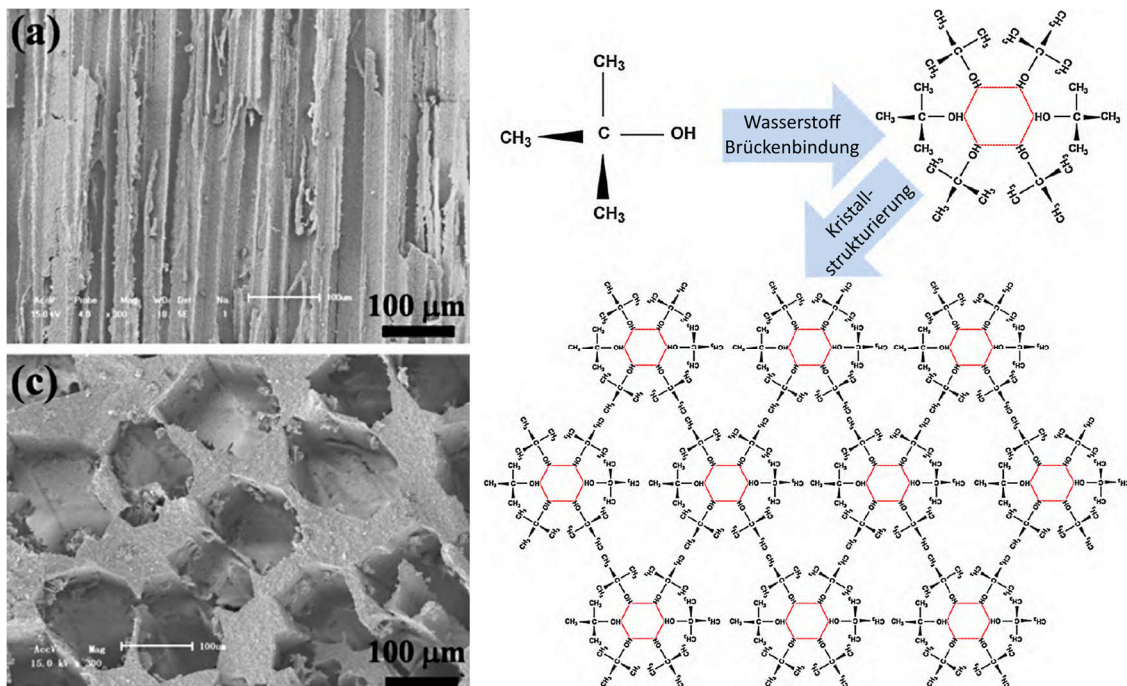
### 1.6.5.3 Unidirektionale Mikro- und Makro-Strukturierung

Durch kontrolliertes Gefrieren einer PLA-Dioxan Lösung aus einer vorgegebenen Richtung (engl. *unidirectional freezing*) ist es bereits möglich, nicht nur ausgeprägt Porenstrukturen, sondern einen kompletten Schwamm-Korpus mit durchgehenden Porenkanäle zu erzeugen (**Abb. 17**).<sup>[23]</sup>



**Abbildung 17.** SEM-Aufnahmen mit Illustration der Blickrichtung auf Kollagen-Schwämme, gefriergetrocknet aus 1,4-Dioxan und betrachtet im Jeweiligen (A, B) Proben-Querschnitt und (C, D) Proben Längsschnitt. (Abbildung verwendet<sup>10</sup> aus Referenz<sup>[23]</sup>)

Unter Einsatz eines für PLA geeigneten Dispersionsmediums wie *t*-BuOH<sup>[178]</sup> (**Abb. 18**) ist dies auch für PLA basierte PFS denkbar.



**Abbildung 18.** SEM-Aufnahmen einer gerichtet porenstrukturierten Keramik, hergestellt durch Gefrier-trocknung aus *t*-BuOH. Schema-Illustration der *t*BuOH Kristallisation unter Ausbildung hexagonaler Strukturen aus hexagonal angeordneten *t*BuOH-Kristallpackungen. (Abbildung verwendet<sup>10</sup> (übersetzt) aus Referenz<sup>[178]</sup>)

<sup>10</sup> Abgedruckt mit Genehmigung: Referenz<sup>[23]</sup> © 2011 Veröffentlicht von Elsevier Ltd. | Referenz<sup>[178]</sup> © 2010 Elsevier Ltd..

**Anmerkung:** Im Anhang (Kap. 4) sind hierzu bisher unveröffentlichte Arbeiten zur Mikro- und Makro-Porenstrukturierung von PLA basierten PFS gezeigt. Sie beinhalten die Möglichkeit zur Mikro-porenstrukturierung der PLA-Schwämme unter Verwendung von *t*-BuOH sowohl während der PFS-Herstellung durch die Kristallbildung des gefrierenden Dispersionsmediums als auch nachträglich durch Einsatz speziell kristallisierender Salze. Vor allem letzteres Verfahren ist enorm vielversprechend, da es die Möglichkeit einer mehrmaligen und nacheinander geschalteten multi-direktionalen Mikroporenstrukturierung ermöglichen kann. Auf diese Weise kann ein PFS theoretisch auch mehrmals mit einer Kristallit-Struktur durchzogen und diese Anschließend auf die PFS-Porenstruktur übertragen werden.

#### 1.6.5.4 Nebeneffekte im Gefrierprozess – Poren-Defektbildung

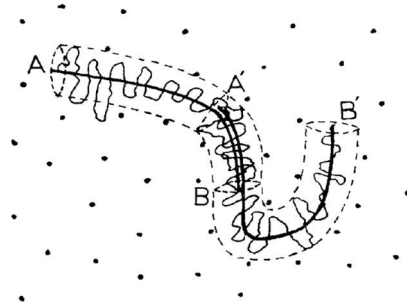
Die Qualität von PFS wird auch stark durch Poren-Defektbildung eingeschränkt: Defekte entstehend dabei sowohl durch Faktoren wie 1) Blasenbildung, z.B. während des Homogenisierens oder Gefrierens durch Änderung der Löslichkeit von Luft im gewählten Dispersionsmedium<sup>[179]</sup>, als auch durch 2) Temperaturabhängige Dichteunterschiede des Dispersionsmediums bzw. dessen Massentransports<sup>[180]</sup>. Letzterer Faktor ist in besonderem Maße zu berücksichtigen, da er während des Gefrierprozesses und je nach Wahl des Temperaturprofils einen anderen Einfluss auf die Faser-Verteilung im FD-Behälter ausübt. Dieser aus der Gefriertrocknung von Lebensmitteln bekannte Einfluss<sup>[179]</sup> führt im besten Falle nur zu einer Formänderung des Schwammes<sup>[8]</sup>. Der diffusionsgesteuerte Massentransport innerhalb einer porösen Matrix<sup>[181]</sup> kann aber auch zu großen und ungleichmäßigen Hohlräumen im Zentrum des PFS führen. Es ist anzunehmen, dass dieser Effekt bedingt durch die rheologischen Eigenschaften konzentrierter Faserdispersionen, deren Einzelfasern sich gegenseitig in ihrer Bewegungsfreiheit einschränkend und untereinander beeinflussen, weiter verstärkt wird.

#### 1.6.6 Thermische Vernetzung – Erzeugen elastischer Polymerfaser-Schwämme

Im Folgenden werden kurz die Einflüsse der Material-Wahl sowie die Auswirkungen der thermischen Behandlung auf die durch Gefriertrocknung gewonnenen Roh-Schwämme diskutiert.

Die dieser Arbeit zugrundeliegende, auf Basis synthetischer Ausgangsmaterialien (Kap. 1.3) basierende Herstellung elastischer PFS erfolgt bisher ohne den Einsatz einer chemischen Vernetzung. So kann auf aggressive und bezüglich möglicher Zelltoxizität z.T. bedenkliche, chemische Verfahren (Kap. 1.5) verzichtet werden. Zur Generierung eines elastischen PFS erfolgt stattdessen eine rein physikalische Vernetzung der Fasern durch thermische Behandlung, auch tempern genannt (engl.: *thermal annealing*, TA). Diese physikalische Vernetzung kann entweder durch Verklebung mit Hilfe eines Additivs wie PCL<sup>[81]</sup> oder durch oberflächliche, physikalische Vernetzung erfolgen. Es wird angenommen, dass letzterer Prozess auf Reptation basiert, einer thermisch getriebenen Verschlaufung der Makromoleküle an der Oberfläche der jeweilig in Kontakt tretenden Fasern.

Reptation wurde bereits 1971 als physikalischer Kriechprozess von Polymerketten eines dichten Makromolekülnetzwerks in Arbeiten von P. G. de Gennes beschrieben. Die Prozessbeschreibung wurde von M. Doi und S. F. Edwards mit Hilfe eines Kanal-Modells (**Abb. 19**) 1978 erweitert.<sup>[182,183]</sup>



**Abbildung 19.** Beschreibung der Makromolekülbewegung einer Polymerkette in einem dichten Polymernetzwerk nach dem Kanal-Modell von Doi und Edwards. (Abbildung verwendet<sup>11</sup> aus Referenz<sup>[183]</sup>)

Neben der mechanisch messbar gesteigerten Elastizität eines Roh- gegenüber eines thermisch behandelten Schwammes (**M1**), zeugt auch dessen Integrität, gegenüber einer Re-Dispergierung der Fasern z.B. nach Immersion in EtOH- oder wässrigem Medium<sup>[81]</sup>, vom Erfolg und der Qualität der physikalischen Vernetzung. Die Wahl des Materials und seiner Materialeigenschaften entscheidet ebenso wie die TA-Temperatur, oder für Mischsysteme der Gewichtsanteil der verwendeten Klebe-Komponente (**M1**), maßgeblich über das Schrumpfverhalten des Schwammkörpers während des Temperns.<sup>[81]</sup> Der Vorteil eines Mischsystems gegenüber eines Ein-Komponenten PFS zeigt sich hier in der für die Vernetzung notwendigen Temperatur und TA-Dauer. Ein monolithischer PFS muss mehr als 24h bei Temperaturen weit über der Glasübergang ( $T_g$ ) des Materials getempert werden, wohingegen unter Präsenz von geringen Mengen einer Klebekomponente eine lediglich kurzzeitige Erhitzung auf Höhe ihres Schmelzpunktes ( $T_m$ ) benötigt wird, um einen PFS, unter sonst analogen Bedingungen, mit vergleichbarer Elastizität zu generieren.<sup>[81]</sup> Die Ergebnisse zeigen auch, dass die Reptation für Mischsysteme gestört oder unterbunden sein kann, da durch Tempern unterhalb des Glaspunktes der Klebe-Komponente nicht zwangsläufig auch ein elastischer PFS hervorgeht.

## 1.7 Strategien zur Modifizierung von Trägersystemen

### 1.7.1 Biomodifizierung von Zellträgersystemen

Eine biochemische Modifizierung des Träger-Basismaterials wird zur Erweiterung der Träger-Eigenschaften verwendet, wobei vorrangig die natürlichen Bestandteile der ECM als mögliche Komponenten zur Biomodifizierung betrachtet werden (Kap. 1.3.1). Die Biomodifikation von Trägersystemen erfolgt entweder durch z.B. Mischen oder chemische, kovalente Anknüpfung einer geeigneten funktionellen Gruppe. Diese wird entweder direkt, über die Synthese des Ausgangsmaterials<sup>[184,185]</sup>, oder indirekt, durch chemisch-physikalische Verfahren eingeführt. Dazu zählt u.a. die Mischung von Polymersystemen<sup>[186]</sup> oder Beschichtung durch z.B. Schicht-für-Schicht-Verfahren<sup>[5,41]</sup>

---

<sup>11</sup> Abgedruckt mit Genehmigung: © 1978 The Royal Society of Chemistry.



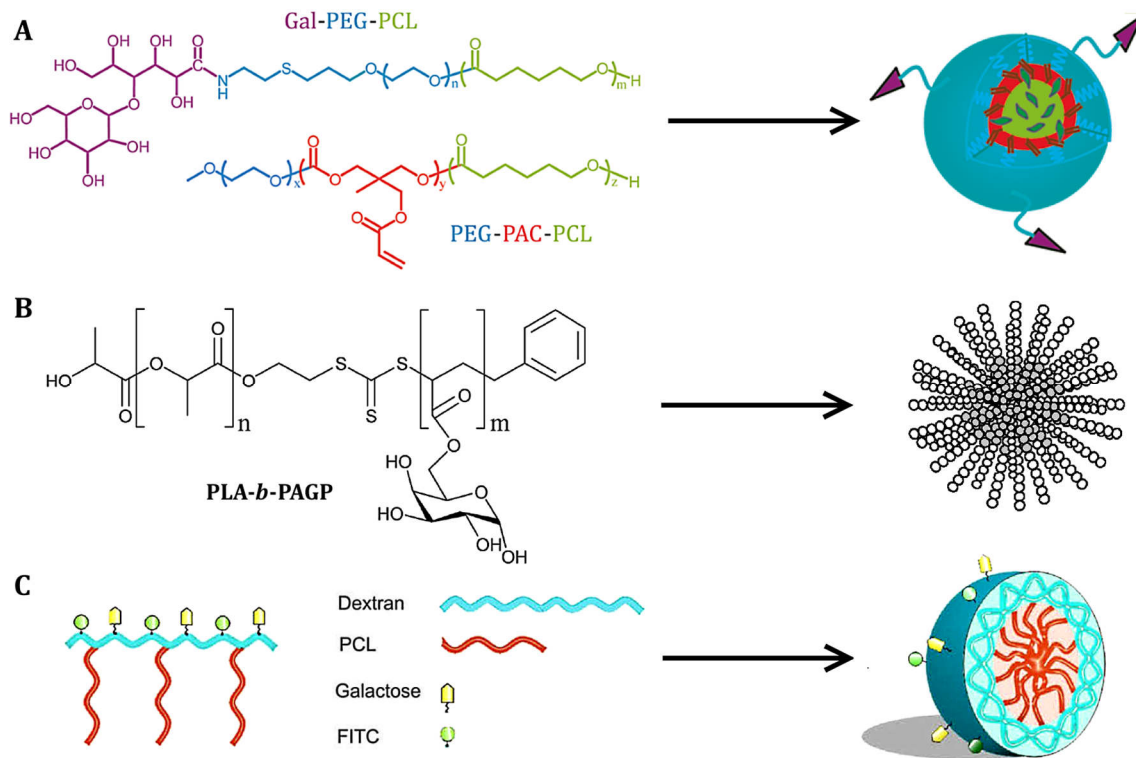
nach z.B. Oberflächenaktivierung durch Plasma<sup>[25,31,187-191]</sup>.

Eine Beschichtung ermöglicht eine auf die Oberfläche, also den Hauptinteraktionsbereich zwischen Zelle und Substrat gerichtete Modifizierung, sodass anders als im Mischverfahren, der Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des Trägers minimiert wird. Die Beschichtung stellt daher auch gegenüber Mischsystemen eine wesentlich nachhaltigere und materialschonendere Technik zur Biomodifizierung dar, da die benötigte Menge der Bio-Komponente, bei meist gleichbleibender Effizienz, signifikant reduziert werden kann. Gewebebezucht relevante Fachliteratur mit Arbeiten, die sich direkt mit biomodifizierten 3D Polymerfaser basierten Zellträgersystemen beschäftigen und in der auch eine 3D Probenanalytik des Trägers nach dessen Zellkulturierung (**M2**) herangezogen wurde, sind bisher nur selten zu finden. In den bekannten Arbeiten werden bisher vorrangig Polymermischungen zur Biomodifizierung der Trägersysteme eingesetzt<sup>[26,34,35,63]</sup>.

Galaktose (Gal) hat sich in den letzten Jahren als „essenzielle und vielversprechende“ Bio-Komponente zur Biomodifizierung von Trägersystemen herausgestellt.<sup>[91,192]</sup> Sie findet bereits weit verbreitet Einsatz in der Gewebebezucht-Forschung zur Entwicklung künstlicher Leber-ECM imitierender Trägersysteme, die helfen sollen der hohen Nachfrage nach Organ und Gewebetransplantaten Rechnung zu tragen. Die Gal befähigt die künstliche ECM zur Wechselwirkung mit Hepatozyten und fördert sowohl Zell-Adhäsion, Aktivität als auch Zell-Proliferation.<sup>[91]</sup> Durch die hohe Zuckerspezifität von Leberzellen (Hepatozyten)<sup>[83,84]</sup>, basierend auf ihren Asialoglycoprotein-Rezeptoren<sup>[192,193]</sup>, lassen sich Hepatozyten gezielt mit Gal biomodifizierten Trägersystemen ansteuern.<sup>[194]</sup> Hierbei müssen nicht zwangsläufig komplette Polymerketten vorliegen, oft reicht die Präsenz eines Gal Moleküls als Endgruppe<sup>[185,195,196]</sup> bereits aus, um einen Effekt zu erzielen.

### 1.7.2 Galaktosylierung von Trägersystemen

Die Biomodifizierung mit Gal wird auch als Galaktosylierung bezeichnet. Es existiert eine enorme Vielzahl unterschiedlicher Varianten zur direkten Synthese oder nachträglichen Galaktosylierung synthetischer Polymersysteme und eine ausführliche Literaturübersicht und Beurteilung zu verschiedenen Ansätzen der Galaktosylierung von E. Craparo und G. Cavallaro.<sup>[197]</sup> In den meisten aktuellen Arbeiten mit Gal-Trägersystemen wird die Gal direkt<sup>[33,42,43,51,184,185,195,197-200]</sup>, also parallel zur Herstellung des Polymers eingeführt. Das Potential dieser Gal-Gruppen tragenden Makromoleküle wird, vorrangig als z.B. Mizellares<sup>[184,185,197,200-202]</sup> System (**Abb. 20**), für Gen- oder Krebstherapie Anwendungen postuliert.



**Abbildung 20.** Galaktose tragende Copolymere veröffentlichter mizellerer Trägersysteme. A) Galaktose-Poly(ethylenglycol)-Poly(caprolacton) (Gal-PEG-PCL) und Poly(ethylenglycol)-*b*-Poly(acryloylcarbonat)-*b*-Poly(caprolacton) (PEG-PAC-PCL)<sup>[185]</sup>, B) Poly(lactid)-*b*-Poly(6-O-acryloyl- $\alpha$ -D-galactopyranose) (PLA-*b*-PAGP)<sup>[184]</sup>, C) Poly(caprolacton-graft-dextran)<sup>[200]</sup>. (Abbildungen verwendet<sup>12</sup> aus der jeweiligen Referenz.)

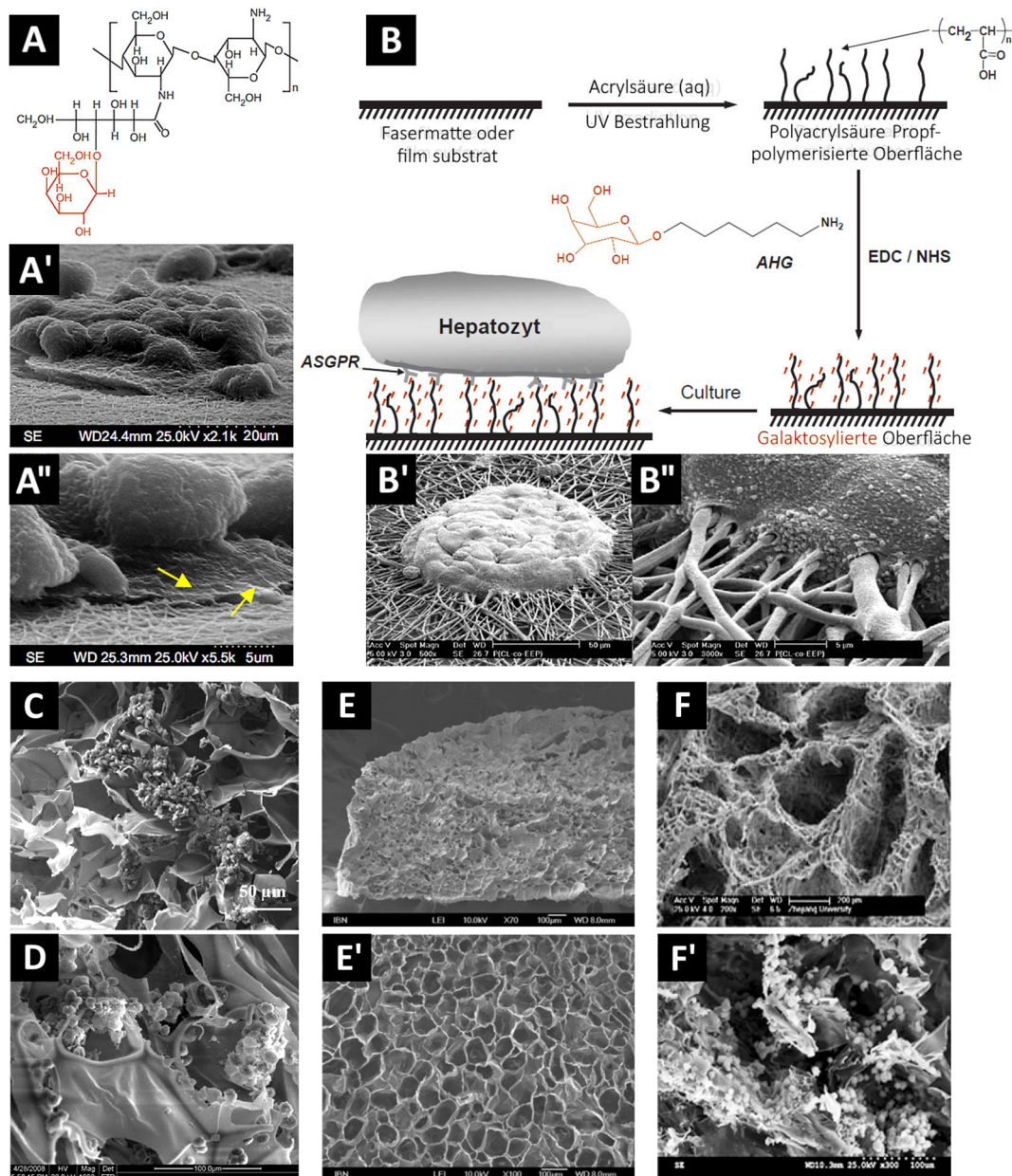
Selten werden solche galaktosylierten Polymere direkt in einen abbaubaren Polymerfaser basierten<sup>[51,203,204]</sup> (**Abb. 21, A**), oder schwammartige Träger<sup>[33,42,205-207]</sup> verarbeitet (**Abb. 21: C-E**) und für Gewebezücht Anwendungen eingesetzt (**M2**). Noch weniger Arbeiten haben eine gezielt nachträgliche Galaktosylierung schwammartiger<sup>[208]</sup> (**Abb. 21, F**) oder Polymerfaser<sup>[203,209,210]</sup> basierter Trägersysteme zur Biomodifizierung verwendet (**Abb. 21, B**).

Die nachträgliche Beschichtung von Trägersystemen mit Galaktose (**M2**) erfolgt in der Regel durch chemische, kovalente Verknüpfung und wird vorrangig zur Herstellung von zumeist 2D Trägersystemen wie z.B. Petrischalen<sup>[38,43,52,199,211]</sup> oder Fasermatten<sup>[51,209]</sup> eingesetzt. Die Beschichtung erfolgt meist durch Lufttrocknung der gelösten Komponenten, ein Verfahren, welches für PFS nicht eingesetzt werden kann (Kap. 1.6.5).

Unter Einsatz von Copolymersystemen<sup>[184]</sup> ist auch eine auf Van-der-Waals-Wechselwirkungen basierende Beschichtung denkbar.<sup>[212]</sup> Hierfür bedarf es einer entsprechenden Triebkraft damit eine homogene Beschichtung durch Oberflächenabscheidung der gelösten Komponente ausgebildet wird. Diese Triebkraft kann durch z.B. temperaturabhängige Steuerung der Löslichkeit zusammen mit einer ausreichenden Substrat-Affinität wie sie u.a. zwischen Polymeren derselben Hydrophilie oder chemischen Struktur vorliegt, erzeugt werden. Vergleichbare Triebkräfte sind für oberflächenaktive,

<sup>12</sup> Abgedruckt mit Genehmigung: Referenz <sup>[185]</sup> © 2011, American Chemical Society | Referenz <sup>[200]</sup> © 2009, American Chemical Society | Referenz <sup>[184]</sup> © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved..

zumeist amphiphile Systeme bereits aus Arbeiten im Umgang mit Mikrophasenseparation bekannt. Darin finden bereits einige PLA basierte Block-Copolymer Systeme Anwendung.<sup>[213]</sup> Die zugrundeliegenden Kräfte bieten sich auch in der Oberflächen-Biomodifizierung eines PFS an, wobei hierbei auch alle Einschränkungen der PFS berücksichtigt werden müssen. Dazu zählt die Material-Löslichkeit, das Material-Quellverhalten, die PFS-Desintegrationsstabilität und die stets obligatorische Gefriertrocknung als bisher zwingenden, letzten Verarbeitungsschritt.

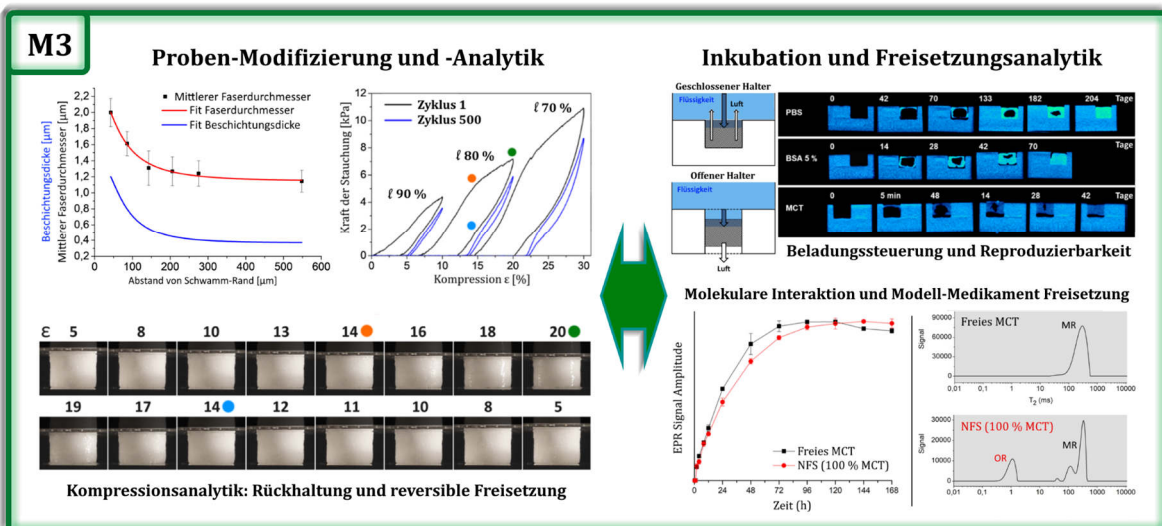
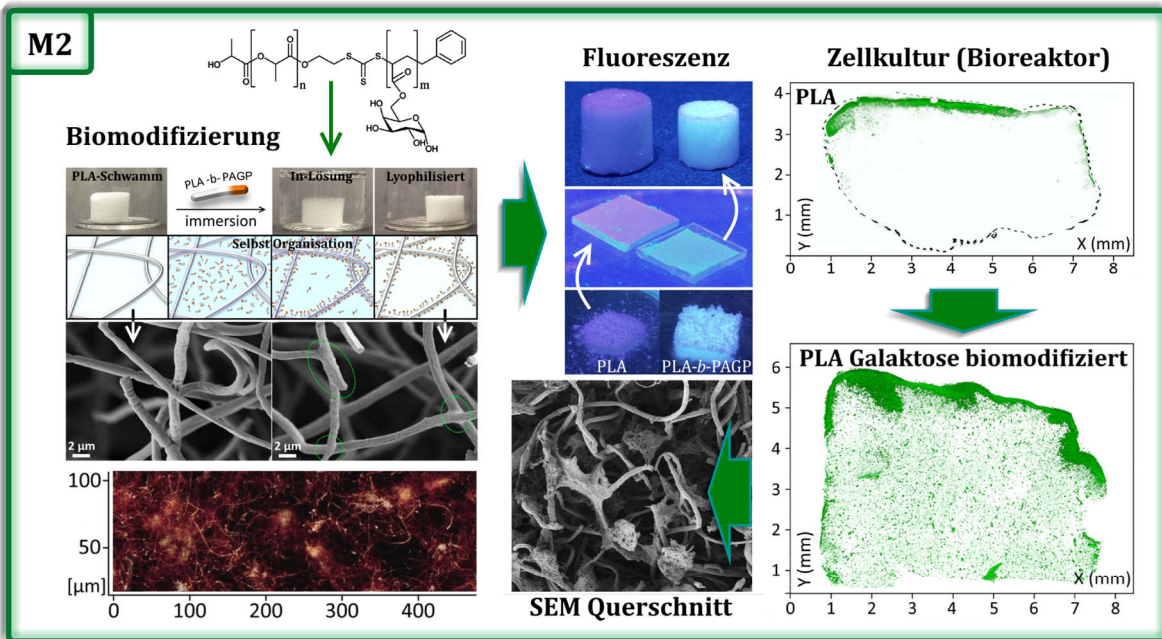
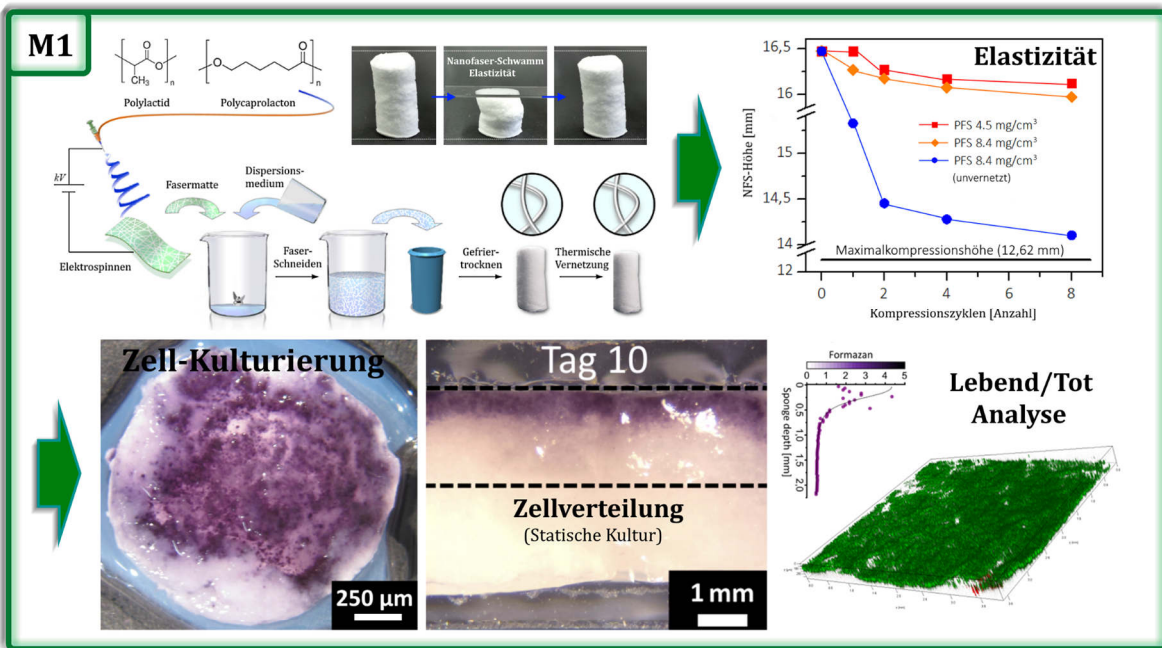


**Abbildung 21.** Bekannte galaktosylierte (oben) Polymerfaserbasierte (A, B: ES-Fasermatten) und (unten) schwammartige Trägersysteme (C-F) nach Zellkulturierung mit Hepatozyten (Ratte), hergestellt aus A) Chitosan<sup>[51]</sup>, B) PCL<sup>[209]</sup>, C) Chitosan/Gelatine<sup>[207]</sup>, D) Chitosan/Hyaluronsäure<sup>[42]</sup>, E) Cellulose<sup>[205]</sup> (ohne Zellen), F) PCL/Chitosan<sup>[208]</sup>. (Abbildungen verwendet<sup>13</sup> aus den jeweiligen Referenzen)

<sup>13</sup> Abgedruckt (angepasst) mit Genehmigung: Referenz<sup>[51]</sup> © 2009 Elsevier Ltd. | Referenz<sup>[209]</sup> (übersetzt) © 2004 Elsevier Ltd. | Referenz<sup>[207]</sup> © 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA | Referenz<sup>[42]</sup> © 2009, Springer Nature | Referenz<sup>[205]</sup> © 2011 Elsevier Ltd. | Referenz<sup>[208]</sup> © 2012, Springer Nature.



## 2 Kumulativer Teil der Dissertation





Diese Arbeit beinhaltet ein veröffentlichtes (**M1**) und zwei Manuskripte (**M2, M3**) in Vorbereitung, deren Inhalt in den folgenden Kapiteln zusammengefasst wird. Sie umfassen die Herstellung, Biomodifizierung, Charakterisierung von PLA basierten PFS, ihrer Anwendung als Trägersystem in der Zellkultivierung (**M1, M2**) sowie u.a. ihre Eigenschaften und das Verhalten unter Einsatz als Flüssigkeits- und Medikamententräger möglicher pharmazeutisch-medizinischer Anwendung (**M3**).

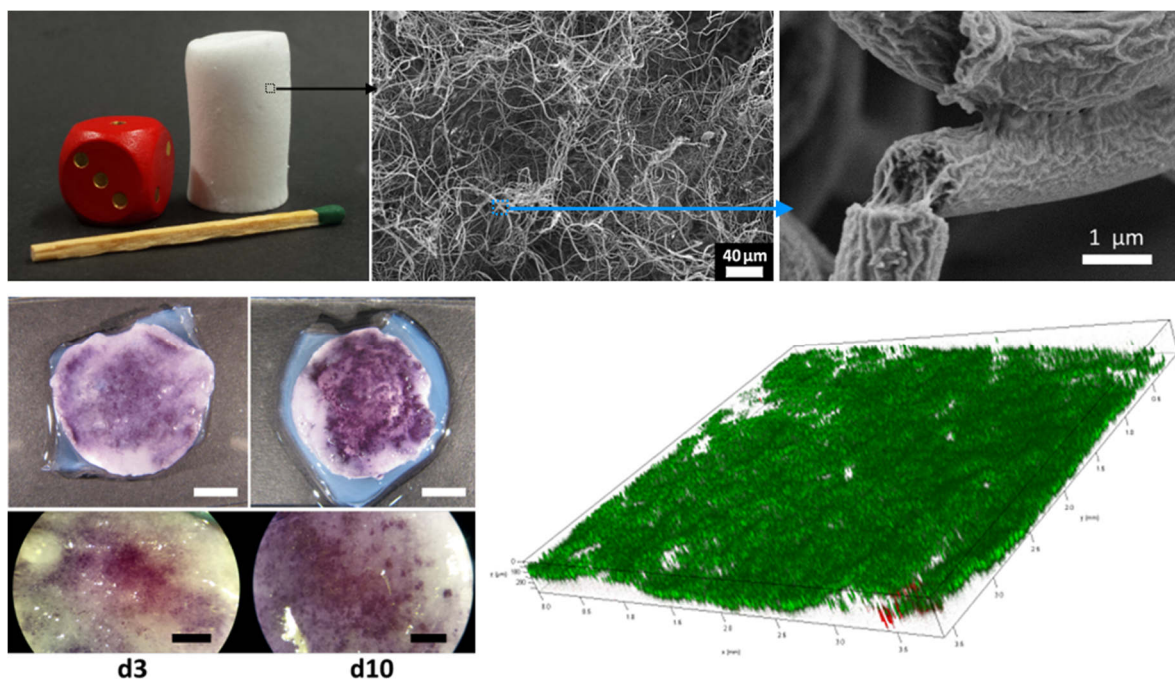
**Kapitel 2.1** umfasst die grundlegenden Entwicklungen zur Herstellung von PLA basierten PFS aus elektrogewebenen Fasern, ihrer strukturellen und mechanischen Charakterisierung sowie ersten Anwendung in Zellkulturexperimenten unter statischen, diffusionslimitierten Bedingungen.

**Kapitel 2.2** befasst sich mit der Verfahrensentwicklung zur (bio)chemischen Modifizierung von PLA-PFS, durch Galaktosylierung unter Einsatz eines PLA basierten Galaktose-Copolymer-Trägers, mit Evaluierung und Bewertung im statischen als auch dynamischen Zellkultur-Vergleich.

Weiterführende Ergebnisse, mit hoher Relevanz für zukünftige Arbeiten zur Mikro- sowie Makroporenstrukturierung sowie Mikrokanalisierung von PLA-PFS sind im Anhang (Kap. 4) zu finden.

**Kapitel 2.3** erfasst die 3D Analyse des Verhaltens von PFS gegenüber unterschiedlichen Umgebungsbedingungen und pharmazeutisch relevanten Flüssigkeiten vor, während und nach ihrer Penetration in die PFS Struktur. Die einzelnen Stadien der PFS-Flüssigkeit Interaktion werden dabei mit *in-vivo* Implantationsszenarien *in-vitro* simuliert und für mögliche Anwendungen in der Gewebezüchtung oder Medizin 3D bildgebend quantifiziert.

## 2.1 M1 - Entwicklung ultra-poröser, elastischer Polylactid/Polycaprolacton Schwämme für die Gewebezüchtung – Herstellung und Charakterisierung



Der Inhalt dieses Kapitels (inkl. der verwendeten<sup>14</sup> Abbildungen) wurde veröffentlicht in:

**M. Mader**, V. Jérôme, R. Freitag, S. Agarwal, A. Greiner, *Ultraporous, Compressible, Wettable Polylactide/Polycaprolactone Sponges for Tissue Engineering*, *Biomacromolecules*, 19(5), **2018**, 1663-1673.

### 2.1.1 Beitragszusammensetzung / Autorenbeteiligung

Alle in diesem Kapitel und dem zugehörigen Manuskript (M1) gezeigten Arbeiten, finalen Auswertungen, Abbildungen und Texte habe ich selbst durchgeführt, angefertigt bzw. verfasst, mit Ausnahme der folgenden Arbeitsschritte und Textabschnitte:

Dr. Valérie Jérôme (Bioprozesstechnik, BPT; Uni Bayreuth, UBT) hat alle zellbiologisch relevanten Schritte (Zellkultur, Färbung, Quantifizierung bis Proben-Dehydrierung), selbst durchgeführt oder die Durchführung durch Studenten (siehe unten) betreut. Sie hat die zugehörigen Textabschnitte (Materialien und Methoden Sektion) verfasst.

Rika Schneider (Technische Angestellte, Makromolekulare Chemie II) hat die MALLS-GPC Messung durchgeführt und die zugehörigen Informationen für die Materialien und Methoden Sektion beigesteuert.

Prof. Dr. Greiner, Prof. Dr. Agarwal, Prof. Dr. Ruth Freitag und Dr. Valérie Jérôme haben als Ideengeber an der Arbeit mitgewirkt und finale Korrekturen durchgeführt.

<sup>14</sup> Abgedruckt (angepasst, übersetzt) aus Referenz<sup>[81]</sup> mit Genehmigung. © 2018 American Chemical Society.

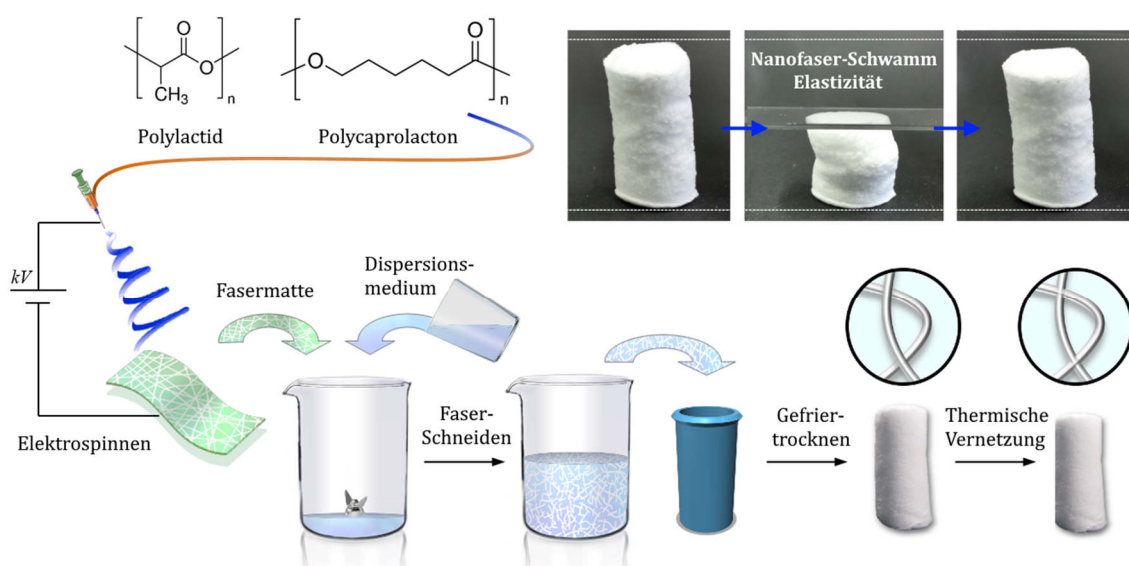
## 2.1.2 Zusammenfassung und Diskussion

Dreidimensionale (3D), synthetische, PFS besitzen eine in alle Raumrichtungen offenporige Struktur mit höchst vielversprechenden Eigenschaften für hochspezifische Anwendungen als z.B. Zellträger in der Gewebezücht. Ihre ultra-hohe Porosität, und Elastizität in Kombination mit einer hohen Flexibilität in der Herstellung erlauben es zielführend auf nahezu alle strukturellen, mechanischen und Porositätsbedürfnisse der Gewebezücht eingehen zu können. Dies wird durch frei und leicht zu kontrollierende PFS-Eigenschaften wie Träger-Dichte sowie Porenstruktur erreicht, die zur Steuerung der Porosität und somit mechanischen Belastbarkeit des PFS ausschlaggebend sind. Bisherige PFS-Herstellungsverfahren basieren jedoch auf nicht-abbaubaren Materialien, welche sich als Zellträger und der Anwendung als Transplantat in der *in-vivo* Geweberegeneration nicht eignen (Kap. 1.3.1), da z.B. keine Bioassimilierung möglich ist.

Die diesem Kapitel zugrundeliegende Arbeit hatte daher zum Ziel, eine bisher auf anorganische Materialien und Keramiken sowie nicht-abbaubare Polymere limitierte Technik zur Herstellung von PFS vollständig auf den Einsatz rein abbaubarer Polymeren zu adaptieren und für die Gewebezücht zu erschließen. Die hohe Schwierigkeit liegt u.a. in der hohen Systemdynamik der PFS-Herstellung (Kap. 1.6.1), welche stark von den Eigenschaften des verwendeten Basismaterials und allen dazugehörigen Techniken der Weiterverarbeitung abhängig ist. Das Verfahren der PFS-Herstellung und die genauen chemischen Zusammenhänge, die auf die Vernetzung der Einzelfasern zu einem elastischen Faser-Netzwerk Einfluss nehmen, sind noch nahezu unverstanden.

### Herstellung von Polyactid basierten Polymerfaser-Schwämmen

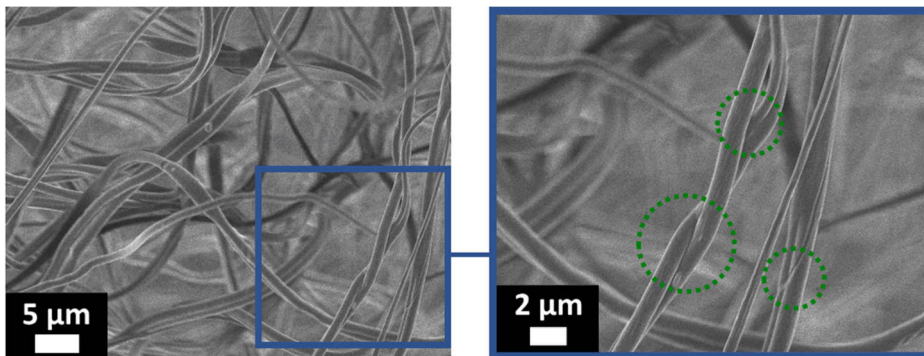
In dieser Arbeit habe ich ein Verfahren zur Herstellung monolithischer PFS aus Polyactid (PLA) sowie Polymergemisch-PFS aus Polyactid/Polycaprolacton (PLA/PCL) auf Basis einer thermisch-physikalischen Vernetzung (Tempnen) der PFS entwickelt und analysiert (**Abb. 22**).



**Abbildung 22.** Schematische Illustration der allgemeinen PFS Herstellungsschritte und Elastizität eines 9:1 (w/w) PLA/PCL PFS.

### Vernetzung von Polylactid basierten Polymerfaser-Schwämmen

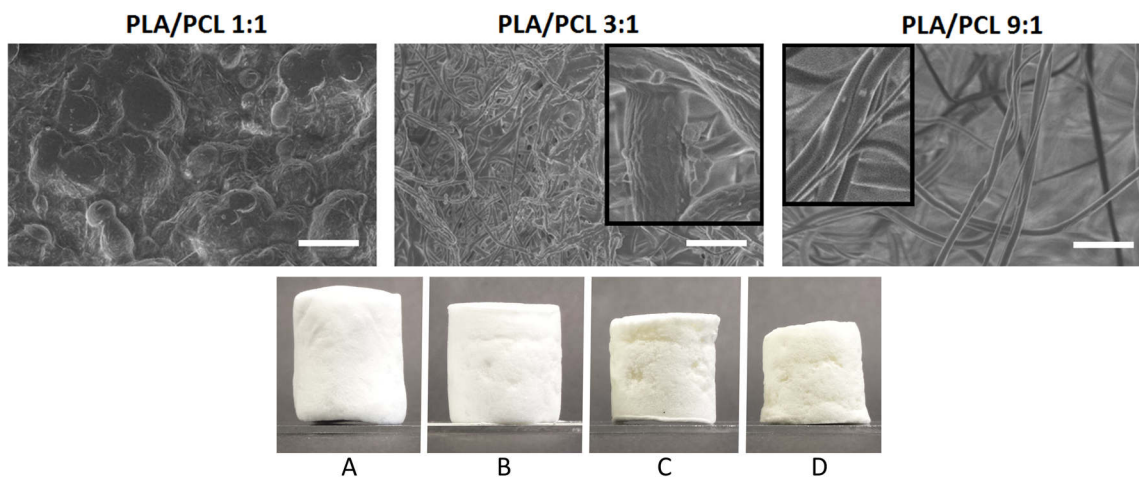
Die Herstellung eines PLA bzw. PLA/PCL PFS unterscheidet sich primär in der für die thermisch-physikalische Vernetzung benötigten Temperatur. Die jeweiligen PFS müssen entweder bei 60 °C (Schmelzpunkt PCL Komponente) für mindestens 5-10 Minuten oder bei 110 °C für mindestens 24 h getempert werden, um die in einer Fasermatte, ebenso wie in einem Roh-Schwamm (nach Gefrier-trocknung) noch nicht enthaltenen Faser-Verbrückungen zu erzeugen (**Abb. 22** sowie **Abb. 23**, Kreise). So erhält der PLA bzw. PLA/PCL PFS ein elastisches Verhalten (**Abb. 22**, oben rechts) sowie eine grundlegende mechanische Integrität.



**Abbildung 23.** (Oben) PLA/PCL Fasern nach thermischer Vernetzung (60 °C, 72 h) mit den für die Reversibilität von PFS verantwortlichen, Faser-Verbrückungsbereiche (Kreis).

Die Verknüpfungen sind in SEM-Aufnahmen für PLA/PCL leicht als Verklebungsbereiche, entstanden durch Schmelzen der PCL-Komponente, als 'Brücke' zu identifizieren, für monolithische PLA-PFS sind solche Brücken nicht zu finden. Es wird angenommen, dass für die thermische Vernetzung von PLA-PFS ein auf Reptation (Kap. 0) basierender Mechanismus zugrunde liegt.

Unterschiedliche PCL Anteile gegenüber PLA wurden für die PFS-Herstellung herangezogen und einander in Bezug auf die strukturelle Faser-Integrität nach thermischer Behandlung bei 60 °C gegenüber gestellt (**Abb. 24**, oben).



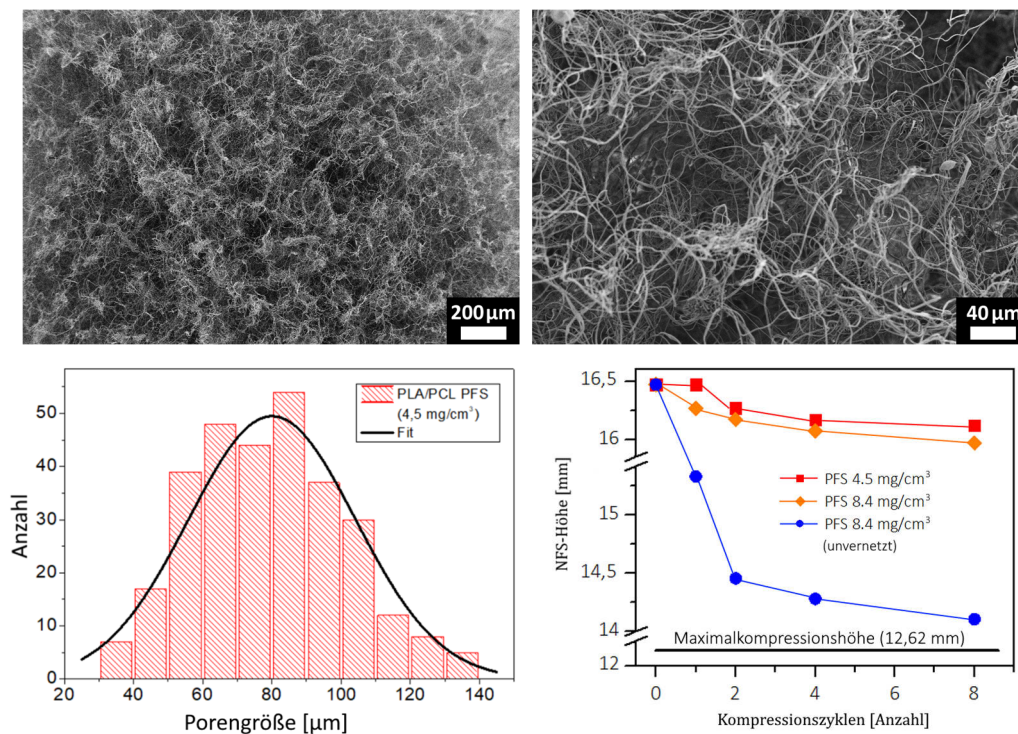
**Abbildung 24.** (Oben) PCL anteilsabhängiger Einfluss auf die strukturelle Integrität der Fasern variabler Zusammensetzung nach thermischer Behandlung (60 °C, 72 h). (Unten) Temperaturabhängiges Schrumpf-Verhalten eines 9:1 (w/w) PLA/PCL PFS nach (A) Gefrier-trocknung und (B) 60 °C, (C) 100 °C, sowie (D) 120 °C tempern. Die Skala entspricht jeweils 20 µm.



Der PCL Anteil und die Vernetzungstemperatur bestimmen dabei maßgeblich das Schrumpferhalten und somit die Qualität der PFS-Proben (**Abb. 24**, unten). Für einen PCL-Mengenanteil von 10 wt% verliert ein PLA/PCL ähnlich wie ein PLA-Schwamm lediglich 7% seines ursprünglichen Durchmessers und ca. 8 % seiner ursprünglichen Höhe, durch sowohl Gefrierdrying als auch Tempern. Dies erlaubt eine schnelle Prototypenentwicklung und einen hohen Probendurchsatz in der Herstellung, welcher für die Anforderungen an Reproduzierbarkeit und Qualität eines Trägersystems für Zellkultur-Experimente (Kap. 1.3) benötigt wird.

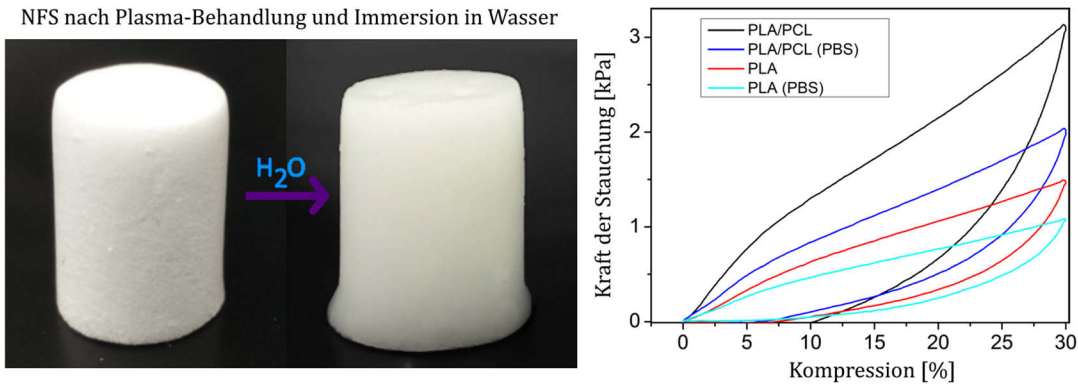
### Struktur, Porosität und mechanische Belastbarkeit

Die PFS lassen sich durch kontrollieren der Faser-Konzentration mit einer Porosität von 99,6 % bis 98 % ( $2,5$  bis  $25 \text{ mg/cm}^3$ ) herstellen. Die PFS zeigen eine gleichmäßige Faserverteilung (**Abb. 25**, oben) und schmale Porengrößenverteilung (**Abb. 25**, unten links) im PFS Querschnitt.



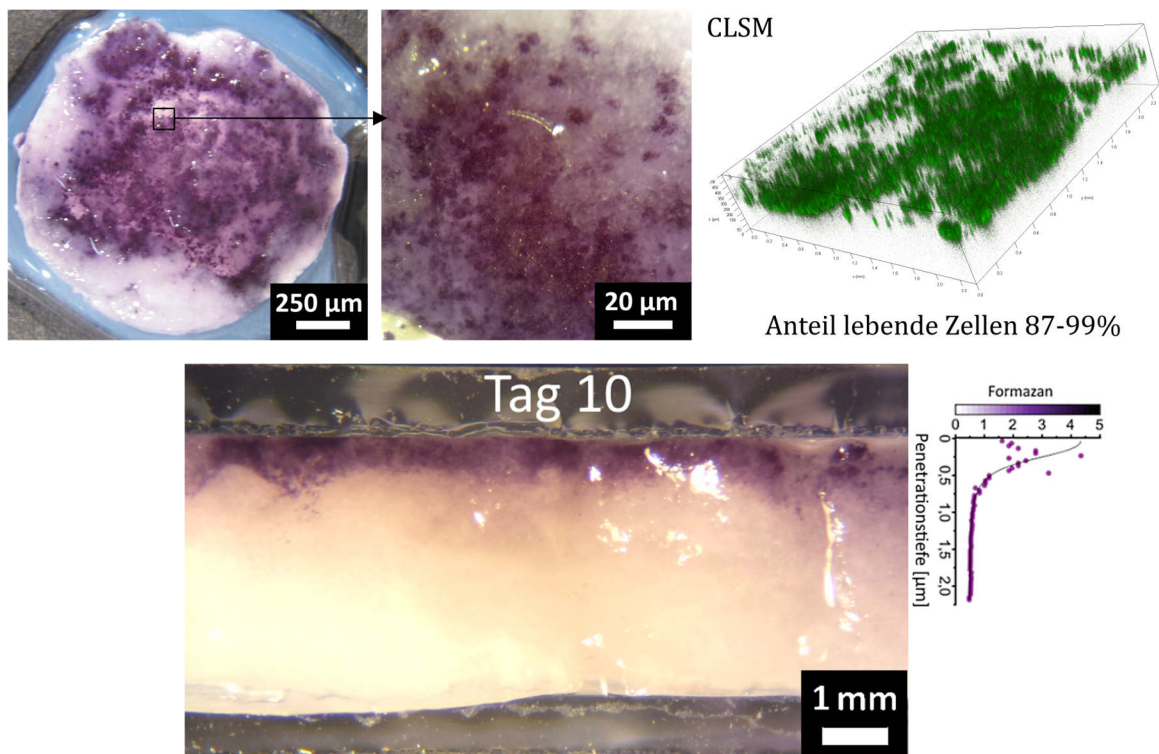
**Abbildung 25.** (Oben) Struktur eines 9:1 PLA/PCL PFS im Querschnitt, (Unten) Porengrößenverteilung und mechanische Belastbarkeit für PFS vor und nach Vernetzung sowie unterschiedlicher Faserkonzentration.

Ich habe die PFS Kristallinität nach thermischer Vernetzung, ebenso wie die Faserkonzentrations-abhängigen mechanischen Eigenschaften der PFS in trockenem sowie in wässriger Immersion unter physiologisch relevanten Bedingungen charakterisiert (**Abb. 26**).



**Abbildung 26.** PLA PFS vor und nach Plasma-Behandlung sowie Immersion in Wasser und Kompressions-experimente von PFS Schwämmen in trockenem Zustand sowie in wässriger Immersion.

Die gegenüber einer Desintegration durch physikalische Vernetzung stabilisierten PFS wurden in Kooperation mit einem Lehrstuhl der Biologie erfolgreich in statischer Zellkultur mit menschlichen T-Lymphozyten (Jurkat-Zellen) eingesetzt. Die Zelleindringtiefe (**Abb. 27**) und Viabilität (**Abb. 27**) wurde quantifiziert durch Digital-, konfokale Laser-Raster- sowie Elektronenmikroskopie. In Bezug auf Penetration und Proliferation der Zellen im PFS zeigt sich die Diffusionslimitierung der statischen Kultur als primärer Faktor entscheidend für die Einschränkungen in der Nährstoffversorgung und somit der tiefenlimitierten Vermehrung der Zellen im PFS.



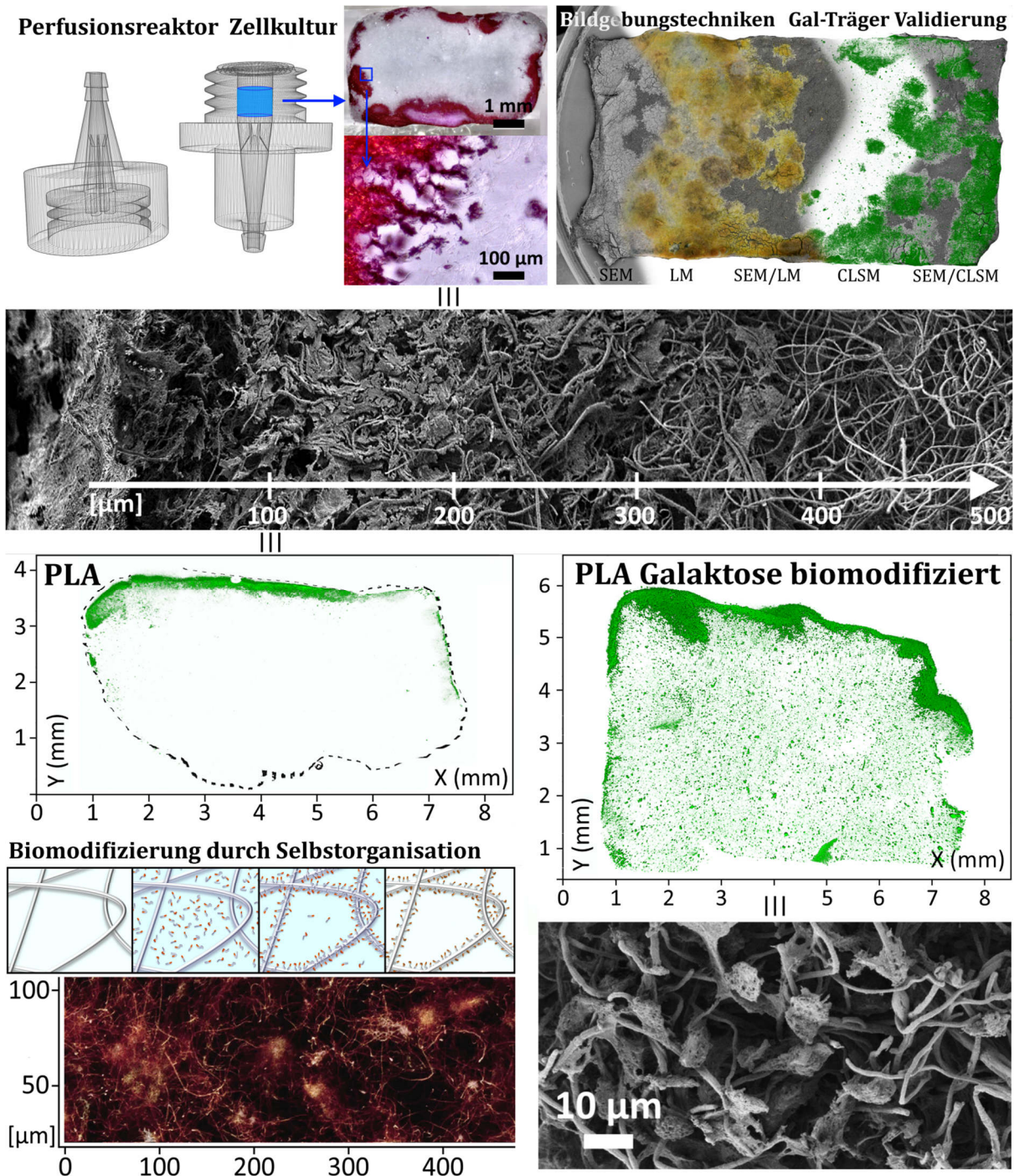
**Abbildung 27.** Jurkat Zellkulturiertes PLA/PCL PFS unter dem Mikroskop sowie am konfokalen Laser-Rastermikroskop (CLSM) zur Zell-Viabilitäts- und PFS-Penetrationsanalyse im Querschnitt.

Die Ergebnisse deuten damit bereits ein hohes Potential für eine den PFS vollständig durchziehende *in-vitro* Zellbesiedlung an, welche die Grundlage für die Entwicklung von 3D PFS-Zellträgern als Plattform für Gewebezüchtung Anwendungen bildet.





## 2.2 M2 - Entwicklung biomimetischer Polylactid-Schwämme für die Leber-Gewebezucht – Biomodifizierung, Charakterisierung und Kulturanalyse



Der Inhalt dieses Kapitels (inkl. verwendeter Abbildungen)<sup>15</sup> wurde veröffentlicht in ‘Biomacromolecules’:

**M. Mader**, M. Helm, V. Jérôme, R. Freitag, S. Agarwal, A. Greiner, *Perfusion Cultivation of Artificial Liver Extracellular matrix in Fibrous Polymer Sponges Biomimicking Scaffolds for Tissue Engineering*, Biomacromolecules, 21(10), 2020, 4094-4104.

<sup>15</sup> Abgedruckt (angepasst, übersetzt) aus Referenz<sup>[214]</sup> mit Genehmigung. © 2020 American Chemical Society.



### 2.2.1 Beitragszusammensetzung / Autorenbeteiligung

Alle in diesem Kapitel und dem zugehörigen Manuskript gezeigten Arbeiten, die finalen Auswertungen, Abbildungen und Texte habe ich selbst durchgeführt, angefertigt bzw. verfasst, mit Ausnahme der folgenden Arbeitsschritte und Textabschnitte:

Mingxia Lu (Universität Sidney, New South Wales) hat die Synthese des Polylactid-Galaktose (PLA-*b*-PAGP) Träger-Copolymers durchgeführt und die Größenausschlusschromatographie (SEC) sowie NMR Daten des Copolymers beigesteuert. Dr. Valérie Jérôme (Bioprozesstechnik, BPT; Uni Bayreuth, UBT) hat alle zellbiologisch relevanten Schritte (Kultur, Färbung, *in-situ* Spektroskopie, bis Proben-Dehydrierung), z.T. selbst durchgeführt oder die Durchführung durch Studenten (siehe unten) betreut. Sie hat die zugehörigen Textabschnitte (Materialien und Methoden Sektion) verfasst. Moritz Helm (Doktorand in BPT) hat die Gestaltung, Herstellung und Anwendung des Bioreaktorsystems im Rahmen seiner Masterarbeit an der BPT und dem Lehrstuhl Konstruktionslehre/CAD unter Betreuung von V. Jérôme und nach Absprache mit mir entwickelt. Die meisten PFS-Bioreaktor Zellkulturen hat er selbst durchgeführt, weitere im Rahmen von Praktika anderer Studenten betreut. Studenten: Mairon Trujillo Miranda hat Bioreaktor-Zellkultur Experimente unter Betreuung (V. Jérôme, M. Helm) durchgeführt. Teile der Daten der PLA-*b*-PAGP Validierung und Bioreaktor Kultur wurden von Oliver Riester (Masterarbeit in BPT), Martin Schmidt (Bachelorarbeit in BPT), Gissela Katherine Constante Ibarra (Praktikum in BPT) und Ioannis Chontzoglou (Student) beigesteuert. Lukas Weber hat unter meiner Aufsicht die Entwicklung der Experimente zur PLA-PFS Beschichtung mit PLA-*b*-PAGP im Rahmen seiner Bachelorarbeit in der MCII durchgeführt. Fluoreszenzspektroskopie Messungen, wurde von Xiaojian Liao (Doktorand) in der Makromolekulare Chemie II (MCII in UBT) durchgeführt.

Prof. Dr. Greiner sowie Prof. Dr. Agarwal (MCII), Prof. Dr. Ruth Freitag sowie Dr. Valérie Jérôme (BPT) haben in dieser Arbeit als Ideengeber mitgewirkt und finale Korrekturarbeiten durchgeführt.

### 2.2.2 Zusammenfassung und Diskussion

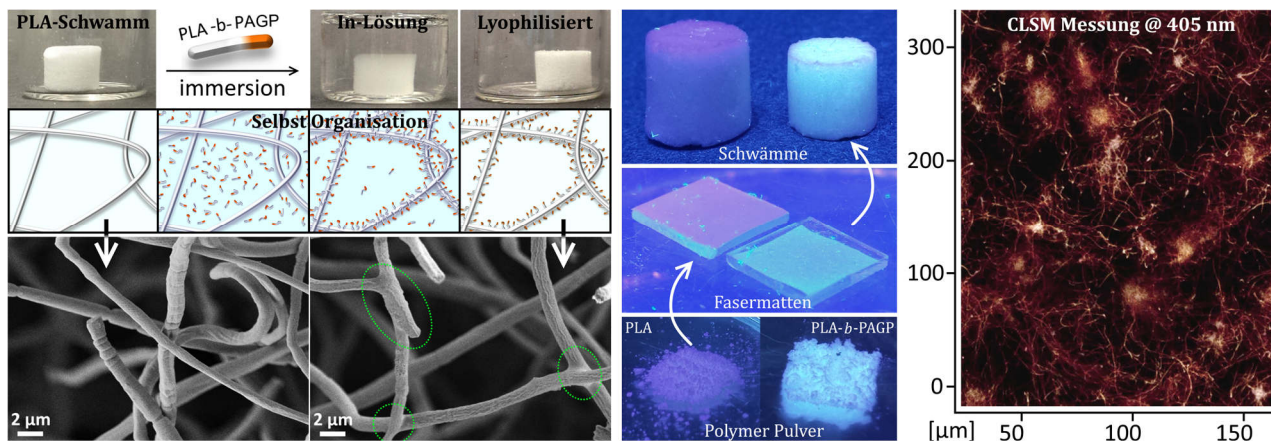
Synthetische PFS aus Polylactid (PLA) besitzen zwar die für die Gewebezücht relevanten Basis-Eigenschaften wie z.B. Abbaubarkeit und Biokompatibilität (Kap. 1.3.1.1), sie weisen jedoch keine der für die nicht-zelluläre Umgebung (ECM) natürlicher Organe typischen, biochemischen Funktionalitäten auf (Kap. 1.3.1.2). Diese sind wichtig für die Interaktion von Zellen und Substrat, im PFS repräsentiert durch die Fasern und das 3D Porengerüst, die Dimensionalität der Pore und die Porosität des durch sie aufgespannten Trägers. Vor allem in der Lebergewebezücht sind speziell diese Faktoren entscheidend für die Aktivität, Viabilität und Vermehrung der Leberzellen (Hepatozyten) in einem Zellträger (Kap.1.3.2.2).

Die diesem Kapitel zugrundeliegende Arbeit hatte daher zum Ziel, die bisher rein auf synthetischen

Polymere wie PLA basierenden PFS, durch Entwicklung von Techniken zur gezielten Bio-modifizierung (Kap. 1.3.1.3), für die Leberzell-spezifische Gewebezucht zu erweitern. Dies wurde mit zwei Techniken realisiert, basierend auf Elektrosponnen (ES, Kap. 1.7.2) und Beschichtung in Lösung, welche ohne chemische Vernetzungen auskommen. Durch den Einsatz eines Gal (Kap. 1.7.1) tragenden PLA-Copolymers wurde dabei eine zur ECM-Struktur einer Leber vergleichbare, biochemisch nachweislich förderliche Umgebung geschaffen. Unter Einsatz eines Perfusions-Bioreaktors hat sich gezeigt, dass die Biomodifizierung durch Galaktosylierung eine kontrollierte, gleichmäßige Zellbesiedlung auch ins Innere des PFS fördert bzw. erst ermöglicht.

### Biomodifizierung von Polylactid basierten Polymerfaser-Schwämmen

In dieser Arbeit habe ich zwei Verfahren zur Biomodifizierung monolithischer PFS aus Polylactid (PLA) entwickelt. Die Modifizierung erfolgt entweder durch 1) Mischen der Polymere PLA und PLA-*b*-PAGP durch ES, oder 2) nachträglich, durch Oberflächenbeschichtung von PLA PFS mit PLA-*b*-PAGP in Lösung (**Abb. 28**). Der Erfolg und die Qualität der Beschichtung (Gleichmäßige Verteilung, homogene Beschichtung) wurde am SEM und, durch die ausgeprägt Autofluoreszenz des Gal-Copolymers, auch mit Hilfe von konfokaler Laser-Rastermikroskopie (CLSM) 3D bildgebend analysiert (**Abb. 28**, rechts).

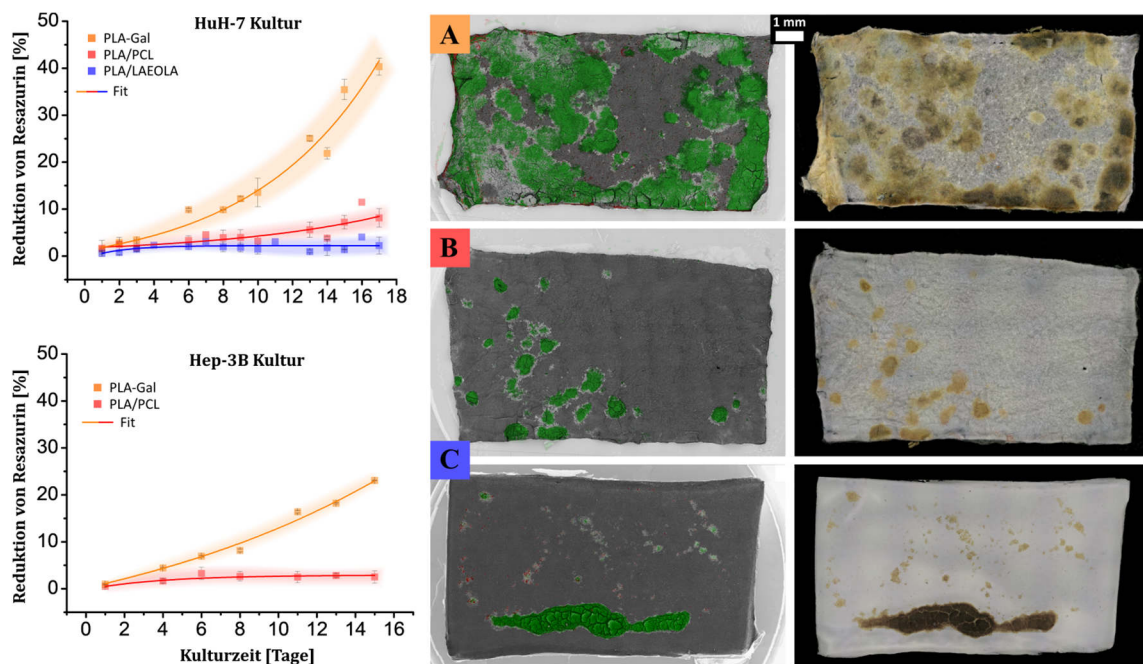


**Abbildung 28.** Links: PFS-Beschichtungsverlauf (Photographie und Illustration) und Nachweis anhand gebildeter Knotenpunkte durch SEM (grüne Kreise). Mitte: Fluoreszenzverhalten galaktosylierter Materialien, verwendet für die Faser- (Misch-ES) bzw. PFS-Herstellung (Beschichtung in Lösung), ermöglicht die Analyse der Beschichtungsqualität mit CLSM Messungen.

Während der Sterilisation von Proben unter UV-Licht (**Abb. 28**, Mitte) wurde eine ausgeprägte Autofluoreszenz des PLA-*b*-PAGP Copolymers und daraus hergestellter Funktionsmaterialien (Fasermatten und PFS) festgestellt. Diese ermöglichte es, die Verteilung des PLA-*b*-PAGP Copolymers nach Misch-Galaktosylierung mit PLA und die Qualität der Beschichtung auf PFS, nach Selbstorganisation des Copolymers in Lösung, mit hoher Auflösung am CLSM zu bestimmen. Die Autofluoreszenz wurde durch Fluoreszenzspektroskopie analysiert und 3D Absorptions-/Emissionsspektren angefertigt, um die Autofluoreszenz der individuellen Polymersysteme PLA bzw. PLA-*b*-PAGP einzeln und als Mischsystem PLA/PLA-*b*-PAGP (PLA-Gal) einander gegenüberstellen und vergleichen zu können.

## Validierung des PLA-Galaktose Copolymers durch 2D-Zellkultur Experimente

Um den Einfluss der Galaktosylierung der Funktionsmaterialien auf die Zellkultivierung validieren zu können, wurden 2D-Zellkultur Experimente durchgeführt. Sie sollten die Hypothese bestätigen, dass auch das Gal-Träger Copolymer einen wie in der Literatur postulierten Einfluss auf die Zell-Substrat-Affinität der Gal-Gruppe des Copolymers zu Hepatozyten vorweist, welche auf einer Rezeptor vermittelten Interaktion basiert. Die Auswertung erfolgt sowohl *in-situ* durch Quantifizierung eines spektroskopisch ermittelten, Zellanzahl-spezifischen Reduktionsprozesses, als auch *ex-situ* durch digitale Analyse von LM, SEM und CLSM Aufnahmen (**Abb. 29**, rechts).



**Abbildung 29.** Validierung von PLA-b-PAGP durch Analyse der Zellkultur mit (A) Gal tragenden und (B,C) Referenz Proben. Links: *In-situ* Analyse durch Quantifizierung einer Zellanzahl-spezifischen Reduktionsreaktion, Rechts: Quantifizierung der besiedelten Fläche einer Fasermatte nach Auswertung von SEM-, CLSM- (jeweils in Überlagerung gezeigt) und LM-Aufnahmen.

Um Vergleichsbedingungen zu schaffen, wurden die Proben mit zwei Referenzsystemen, einem hydrophilen und einem rein synthetischen, hydrophoben Materialsystem nach paralleler Kultur verglichen (**Abb. 29**). Für alle Proben liegt eine hohe Zell-Viabilität vor, diese liegt in Auswertungen von Langzeit- (30 Tage) als auch Kulturzeit abhängigen (3-9 Tage) Lebend/Tod Analysen im Mittel bei 84 ( $\pm 2$ ) %. Eine im Vergleich zu den Referenzsystemen durch Präsenz der Galaktose deutlich gesteigerte Zellproliferation (Faktor 6 bis 13) ist für zwei unterschiedliche Zelllinien (HuH-7, Hep-3B) mit variabler Rezeptor-Expression festzustellen.

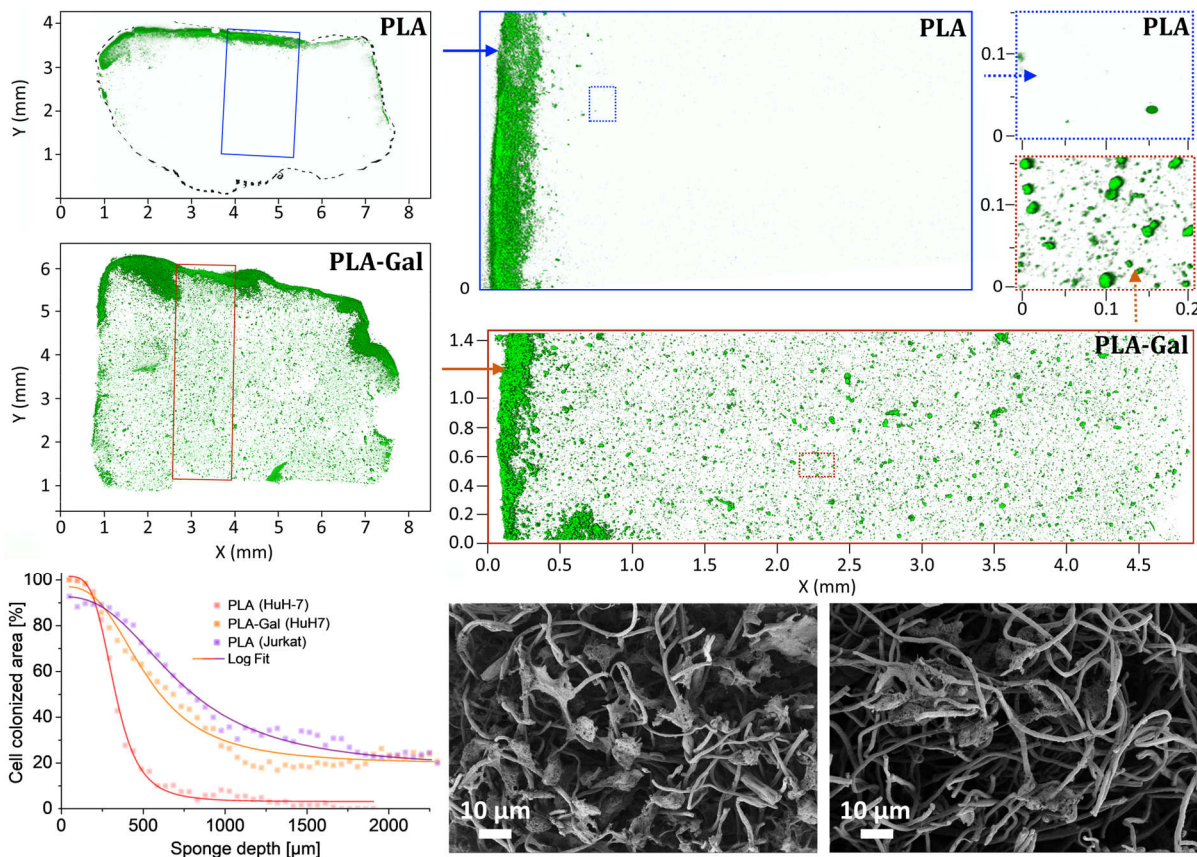
Die Ergebnisse weisen die für eine Interaktion der Gal mit den Gal-spezifischen Zell-Rezeptoren von Hepatozyten zu erwartende, deutlich messbare Steigerung der Zell-Adhäsion, -Vermehrung und -Verteilung auf der Probe auf. Als Abschluss der Validierung und weiteren Verifizierung der Ergebnisse wurde der Einfluss der durch Galaktosylierung eingebrachten Gal-Zell-Rezeptor-Interaktion zusätzlich durch Experimente mit Rezeptor blockierenden Ionen untermauert. Durch die



erfolgreiche und als reversibel bestimmte temporäre Abschirmung der Rezeptoren und somit der Zell-Gal-Substrat Interaktion wurde bestätigt, dass die Galaktosylierung erfolgreich und nachweislich fördernd für die Zellbesiedlung der Fasermatten ist und auch für daraus hergestellte PFS zu erwarten sein müsste. Diese Hypothese wurde in 3D Zellkultur-Experimenten unter Einsatz 3D-Druck Perfusions-Bioreaktors mit galaktosylierten PLA-Gal PFS untersucht.

### 3D Perfusions-Bioreaktor Zellkultur von PLA und PLA-Galaktose Schwämmen

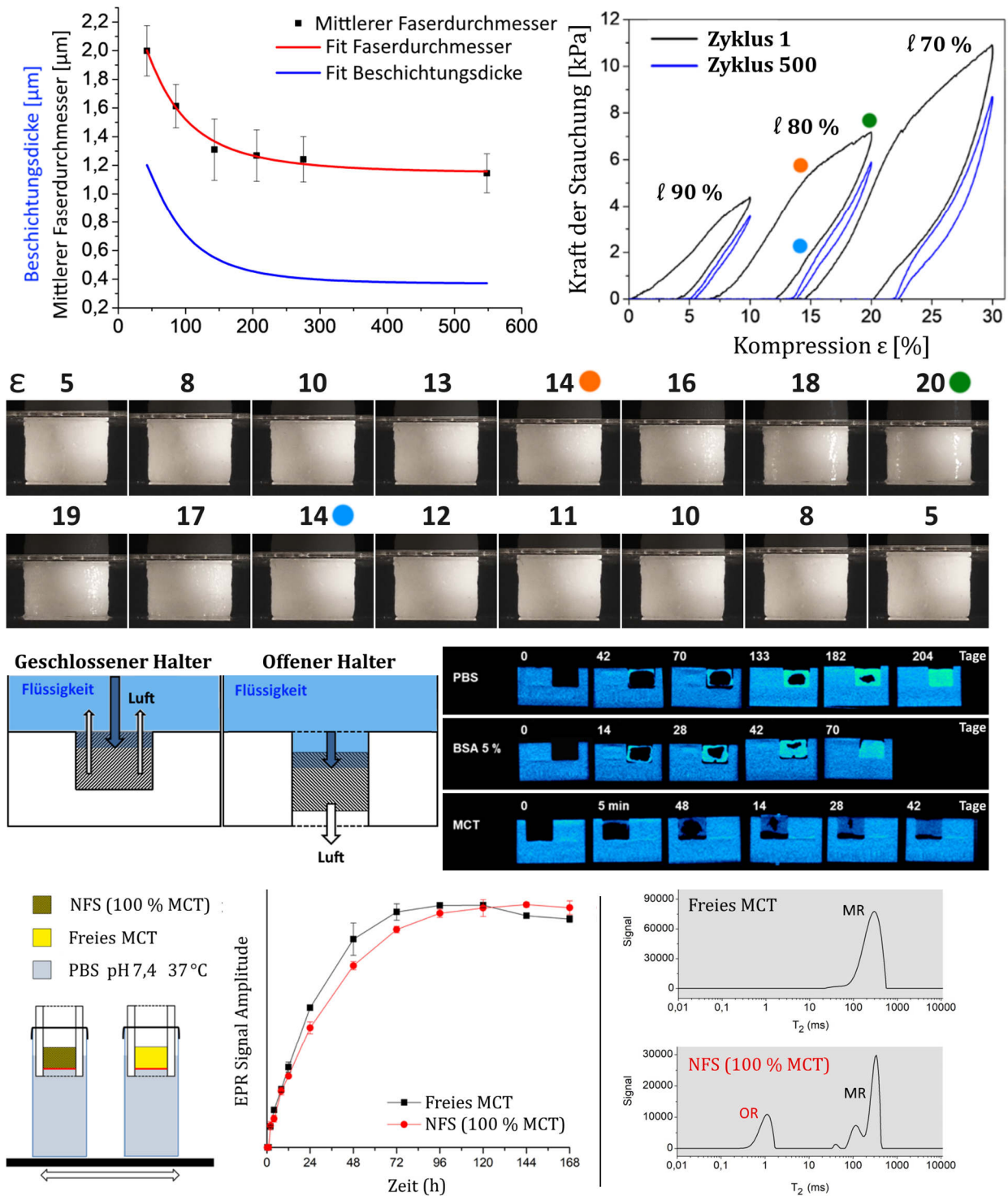
Ergebnisse mit Jurkat Zellen – zum Vergleich mit früheren Arbeiten unter statischen Bedingungen (M1) – zeigen, dass eine gleichmäßige Verteilung der nicht-adhärenen Zellen in einem PFS möglich ist. Dies ist allerdings, unter analogen experimentellen Bedingungen, für adhärenente Zellsysteme wie Hepatozyten nicht der Fall (Abb. 30, PLA). Die Zellen sammeln sich lediglich auf der Schwammoberfläche und dringen nur wenige zehntel Mikrometer in das PFS-Innere ein. Die Erwartungen aus der Validierung des PLA-*b*-PAGP Copolymers zeigen auch hier – im Vergleich zweier analog durchgeführter Kulturen mit PLA und PLA-Gal PFS (Abb. 30) – dass für galaktosylierte PFS eine deutliche Verbesserung des Zellbesiedlungsverlaufs eintritt. Der am CLSM untersuchte Probenquerschnitt der PLA-Gal PFS zeigt, dass durch Galaktosylierung eine deutliche Steigerung der Verteilung von Hepatozyten innerhalb des PFS möglich ist.



**Abbildung 30.** Perfusions-Bioreaktor Ergebnisse nach Auswertung der mit HuH-7 Zellen kultivierten PLA-PFS gegenüber galaktosylierten PLA-Gal PFS am CLSM (Zellen grün gefärbt) und am SEM (Abbildung des PFS Rand sowie Zentrums). Links unten: Gegenüberstellung Eindringtiefe nach Quantifizierung der zellbesiedelten Querschnittsflächen, inkl. Jurkat Vergleichsprobe.



### 2.3 M3 - Polylactid Schwämme als Flüssigkeits- und Medikamententräger - Modifizierung, Beladung, mechanische Rückhaltung und Freisetzung



Der Inhalt dieses Kapitels<sup>16</sup> wurde veröffentlicht im 'International Journal of Pharmaceutics':

Johanna Zech, **Michael Mader**, Daniel Gündel, Hendrik Metz, Andreas Odparlik, Seema Agarwal, Andreas Greiner and Karsten Mäder *Noninvasive characterization (EPR,  $\mu\text{CT}$ , NMR) of 3D electrospun fiber sponges for controlled drug delivery*, International Journal of Pharmaceutics: X, 2, 2020, 100055.

<sup>16</sup> Abgedruckt (angepasst, übersetzt) aus Referenz<sup>[215]</sup>. Open Access Artikel, © 2020 The Author(s). Published by Elsevier B.V.

### 2.3.1 Beitragszusammensetzung / Autorenbeteiligung

Alle in diesem Kapitel und dem zugehörigen Manuskript gezeigten Arbeiten, Auswertungen und Texte habe ich selbst durchgeführt bzw. verfasst, mit Ausnahme der folgenden Arbeitsschritte und Textabschnitte:

Johanna Zech hat als Doktorandin am 'Pharmazeutischen Institut für Technologie und Biopharmazie' (PITB) der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg (MLU) alle Experimente zur PFS Flüssigkeitsinkubation geführt und die Mikro-Computertomographie ( $\mu$ CT) Messungen zusammen mit Dr. Daniel Gündel (Klinik für Nuklearmedizin; Universitätsklinikum, MLU) koordiniert. Johanna Zech hat alle Messungen zur Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), elektronenparamagnetischen Resonanzspektroskopie (EPR), dTempol Modell-Medikamentenfreisetzung und die Messungen zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten mit Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR), z.T. unter Betreuung mit Dr. Hendrik Metz (Mitarbeiter, PITB), selbst durchgeführt. Dr. Daniel Gündel hat alle inkubierten PFS-Proben über  $\mu$ CT gemessen, ausgewertet und zusammen mit Johanna Zech analysiert. Johanna Zech hat alle Arbeiten und Auswertungen außerhalb der UBT koordiniert, die Auswertung der Ergebnisse von Dr. Daniel Gündel und die zugehörigen Texte der Materialien und Methoden Sektion zusammengefasst. Daraus hat sie einen Entwurf des Manuskripts und die Teile der Einleitung mit pharmazeutischem Hintergrund formuliert. J. Zech hat die gesamte NMR-Auswertung verfasst. Ich habe den Entwurf korrigiert, ergänzt, gekürzt, umstrukturiert sowie umformuliert und daraus das angehängte Manuskript verfasst.

Prof. Dr. Greiner sowie Prof. Dr. Agarwal (MCII); Prof. Dr. Karsten Mäder, Dr. Hendrik Metz und Dr. Daniel Gündel (PITB, MLU) haben in dieser Arbeit als Ideengeber mitgewirkt. Prof. Dr. Greiner sowie Prof. Dr. Agarwal und Prof. Dr. Karsten Mäder haben finale Änderungen und Korrekturarbeiten durchgeführt.

### 2.3.2 Zusammenfassung und Diskussion

Das Verhalten von PFS unter Einfluss z.B. in unterschiedlichen *in-vivo* oder *in-vitro* Anwendungsszenarien ist bisher kaum verstanden, ebenso wie das Verhalten von Flüssigkeiten innerhalb der PFS Struktur. Die zugrundeliegenden Fragestellungen sind dabei sowohl in PFS-Anwendungen mit pharmazeutisch-medizinischem Hintergrund (z.B. zur Freisetzungskontrolle von Medikamenten<sup>[131]</sup>, oder als *ex-vivo* Perfusionssystem<sup>[138]</sup>) mit Fragen zum Einfluss des Mediums und der Umgebung auf den PFS, als auch für die Gewebezücht-Anwendungen (Freisetzung von Botenstoffen, Wachstumsfaktoren und *in-vivo* Applikation) von hoher Relevanz. Die Quantifizierung der Messdaten erfolgt sowohl nicht-invasiv bildgebend, über Mikro-Computertomographie ( $\mu$ CT) und Resonanzspektroskopie (NMR, EPR) sowie kompressionsanalytisch durch Messung der reversiblen Flüssigkeitsfreisetzung unter linearer Stauchung flüssigkeitsbeladener PFS.

Zu den grundlegenden Aufgaben, Ziel- und Fragestellungen der im folgenden zusammengefassten Arbeit zählen:

- 1) 3D Analyse des Verlaufs der Aufnahme und Interaktion physiologisch relevanter Flüssigkeiten mit PFS unter variablen Umgebungsbedingungen aus  $\mu$ CT und EPR Messungen.
- 2) Auswertung der 3D  $\mu$ CT und EPR Daten zur Identifizierung der genauen Voraussetzungen und weiterer Möglichkeiten zur Kontrolle der Medikamenten-Freisetzung aus PFS.
- 3) Analyse der Interaktion von PFS und darin befindlicher Flüssigkeit auf molekularer Ebene: NMR-Spektroskopie Messungen der Molekül Relaxation- und Diffusionsprozesse in PFS.
- 4) Analyse der mechanischen Eigenschaften von PFS unter vollständiger und teil-Beladung mit Flüssigkeiten (Beladungskapazität, Belastbarkeit, Rückhaltung und Freisetzung).
- 5) Analyse der Freisetzung eines Modell-Medikaments (dTempol) aus PFS mit EPR-Spektroskopie: Direktvergleich der Freisetzung aus freier und in PFS-gebundener Flüssigkeit.

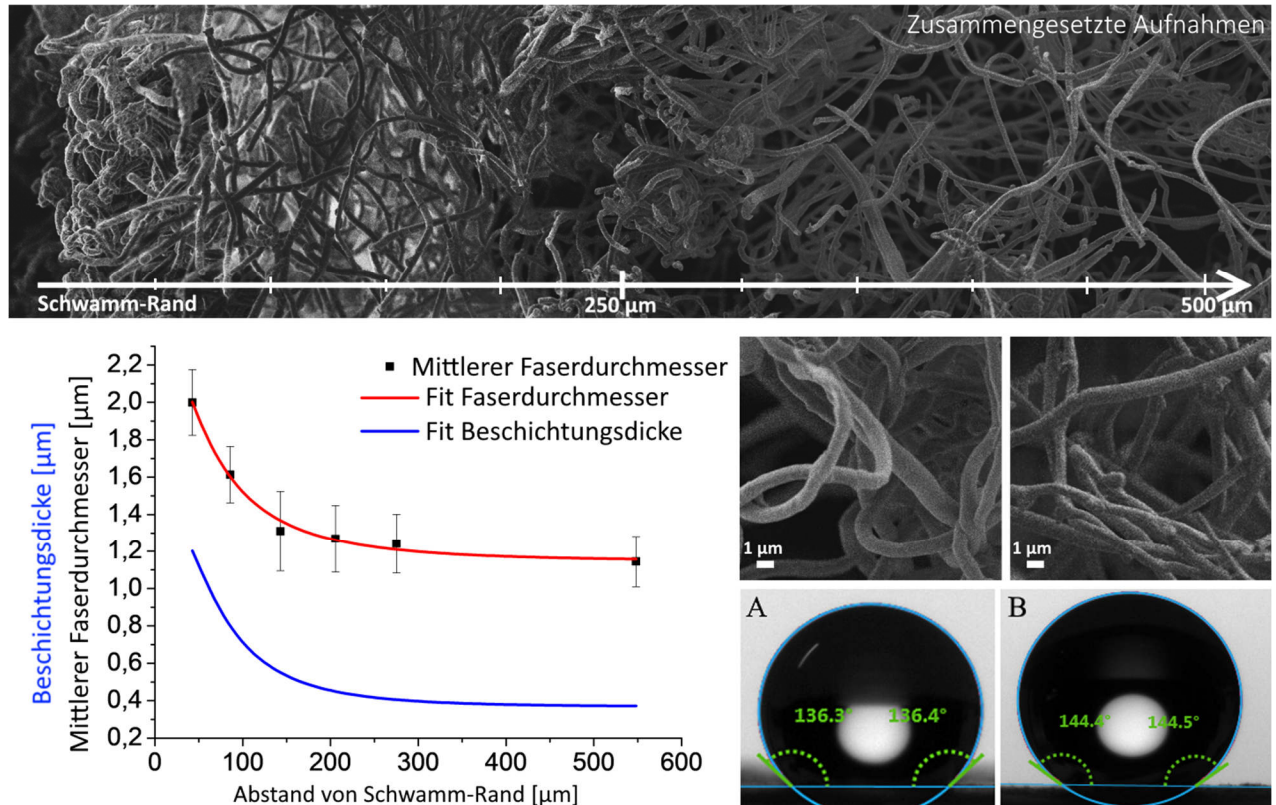
Die PFS wurden mit Poly(para-xylylen) (PPX) beschichtet, um eine gegenüber der Belastung der Schwamm-Proben während der Experimente dauerhafte strukturelle Widerstandsfähigkeit der PFS zu gewährleisten. Die nahezu nicht-invasive PFS-Beschichtung durch PPX erlaubt neben der grundlegenden strukturellen Unversehrtheit der Proben während der Experimente, die Reproduzierbarkeit und somit Glaubwürdigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten sowie die Aussagekraft der Ergebnisse auch für unbeschichtete PFS abzuleiten. Den PFS eröffnet sich dadurch zudem die Möglichkeit einer Mehrkomponenten-Beladung (Fasern und Flüssigkeit in Poren), da die PPX-Beschichtung eine aus der Literatur bekannte Freisetzungsteuerung ermöglicht<sup>[131]</sup>.

#### **Herstellung und Charakterisierung beschichteter Polymerfaser-Schwamm Proben**

Die Herstellung der PFS erfolgt analog wie in der Zusammenfassung von M1 beschrieben, die PPX-Beschichtung erfolgt durch chemische Gasphasenabscheidung (CVD) nach Pyrolyse von para-Cyclophan wie in der Literatur bereits weitläufig beschrieben.<sup>[131,138,216]</sup> Der Fokus der Probenherstellung lag in der möglichst genauen Charakterisierung der PPX-PFS und der Analyse der



Homogenität der PPX-Beschichtung nach erfolgter CVD. Hierzu wurde, durch Auswertung mehrerer zusammengesetzter SEM Aufnahmen der mittlere, PFS-tiefenabhängige Faserdurchmesser und nach Abzug des mittleren PLA-Faserdurchmessers ( $\sim 1\mu\text{m}$ ) die PPX-Schichtdicke abgeleitet (**Abb. 31**). Der Kontaktwinkel der PFS vor und nach Beschichtung mit PPX verbleibt dabei nahezu unverändert.



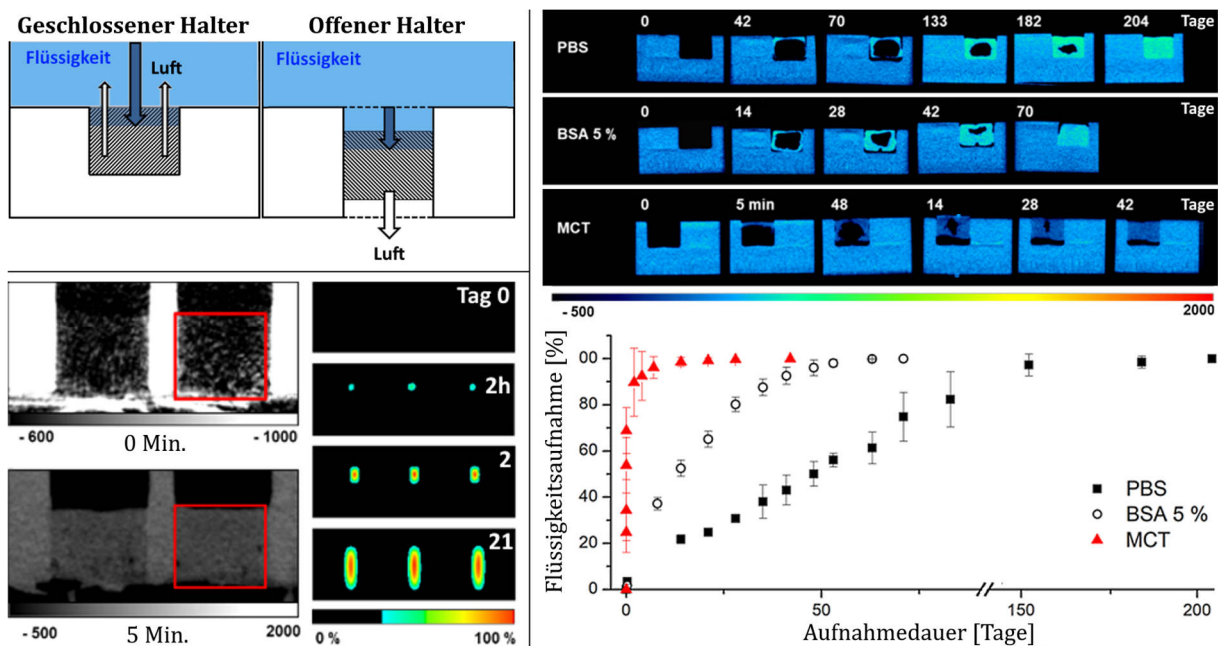
**Abbildung 31.** Schwammtiefenabhängige Auswertung der PPX-Beschichtungsdicke (Graph) durch Analyse des Faserdurchmessers in SEM Aufnahmen nach (oben) Zusammensetzen der Einzelaufnahmen. Der Kontaktwinkel (A) vor und (B) nach Beschichtung ist nahezu unverändert.

In den oberen Schichten des PFS (bis 200  $\mu\text{m}$  Tiefe) liegt eine vergleichsweise hohe Beschichtungsdicke (bis 1,2  $\mu\text{m}$ ) des PPX im Vergleich zum Schwammzentrum (400  $\mu\text{m}$ ) vor. Es wird jedoch angenommen, dass der Einfluss des Gradienten der Schichtdicke, auf Grund der weiterhin sehr hohen Porosität des Systems (99 $\rightarrow$ 98 %), vernachlässigt werden kann.

### 3D-Analyse der Aufnahme von Flüssigkeiten in Polymerfaser-Schwämme

Zur Analyse des Eindringverhaltens von Flüssigkeiten in PFS wurden spezielle Halter (**Abb. 32**, links oben) mit entweder offener oder geschlossener Probenkavität, sowie unterschiedliche Modell-Flüssigkeiten eingesetzt. Sie dienen der Simulation pharmazeutisch- bzw. physiologisch relevanter Anwendung- und Umgebungsbedingungen. Die verwendeten Flüssigkeiten sind entweder hydrophil (Phosphat gepufferter Salzlösung, PBS) oder lipophil (mittelkettige Triglyceride, MCT). Die PFS wurden in den Haltern unter einer definierten Flüssigkeitssäule zur Drucksteuerung inkubiert. Im Falle von PBS wurde mit oder ohne Einsatz von bovinem Serumalbumin (BSA) gearbeitet, um durch darin vorliegende Proteine und Wachstumsfaktoren, die PFS-Benetzbarekeit variieren zu können.

Für den geschlossenen Halter zeigt sich, je nach Flüssigkeitssystem, eine verhältnismäßig langsame, vollständige Benetzung der PFS, wobei stets eine Luftkapsel im PFS gebildet bzw. eingeschlossen wird (**Abb. 32**, rechts oben). Vor allem bestimmt durch die grundlegenden Benetzbarkeit des PFS in Abhängigkeit zur gewählten Flüssigkeit, wird die Zeitspanne bis zur vollständigen Penetration des Mediums in den PFS auch durch die Größe der gebildeten Luftkapsel bestimmt. Die Zeitspanne der über  $\mu$ CT und EPR ermittelten Flüssigkeitsaufnahme ist für PBS mit 130 bis 315 Tagen (im Mittel  $200 \pm 67$  Tage), auf Grund der sehr schlechten Benetzung des Systems, gegenüber PBS mit BSA ( $63-77$ ;  $72 \pm 5$  Tage) und MCT ( $28-42$ ;  $37 \pm 5$  Tage) hohen Schwankungen unterworfen. Weitere Einflussfaktoren sind die Benetzbarkeit des Halters (PTFE) bzw. Kapillarkräfte zwischen PFS und Halter und die Löslichkeit der Luft in der 'Fließfront' des Mediums.



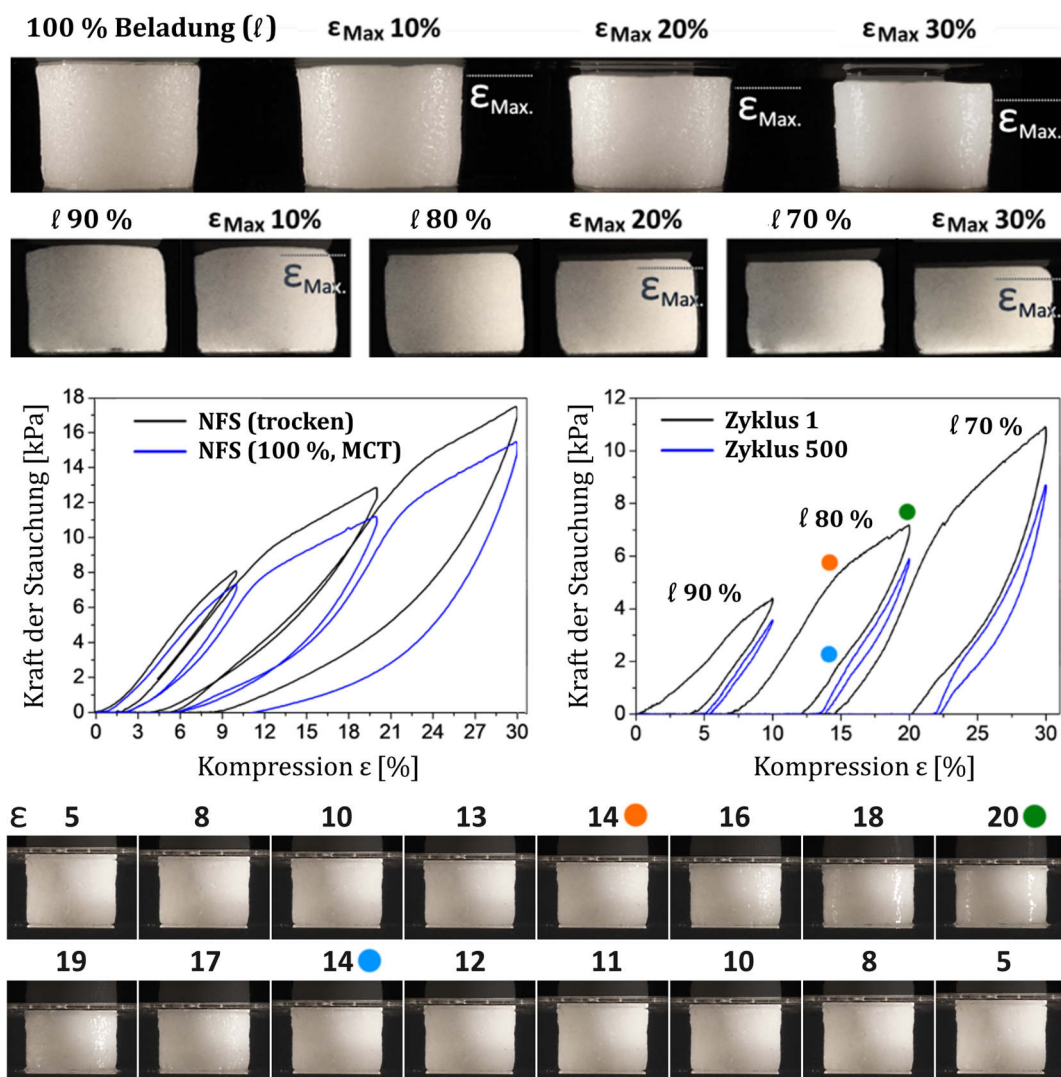
**Abbildung 32.** Analyse der 3D-Flüssigkeitsaufnahme von PFS. Links oben: Illustration der Inkubationshalter. Links unten: PFS nach Inkubation mit Öl (MCT) in einem offenen Halter. Rechts: PFS nach Inkubation im geschlossenen Halter (3D- $\mu$ CT Aufnahmen) und nach Quantifizierung als Graph.

Die Reproduzierbarkeit der Flüssigkeitsaufnahme von PBS gegenüber PBS/BSA konnte somit (im Mittel) um den Faktor 5x gesteigert werden. Für den offenen Halter (**Abb. 32**, unten links) können die Flüssigkeiten den PFS nahezu ungehindert durchdringen. Für MCT ist der Prozess bereits in wenigen Sekunden abgeschlossen, jenseits der zeitlichen Messbarkeit der  $\mu$ CT bzw. EPR Methoden. Für das PBS System ist Flüssigkeitsaufnahme nach exakt reproduzierbar 28 Tagen abgeschlossen. Das Verhalten der Flüssigkeitsaufnahme und die Aufnahmegeschwindigkeit kann somit durch Steuerung der Hydrophilie des Mediums oder der Benetzbarkeit des PFS gezielt eingestellt und reproduzierbar für mögliche Verfahren zur Medikamentenfreisetzung eingesetzt werden.

Die Auflösungslimitierung der  $\mu$ CT Messungen erlaubt keine Auskunft über den genauen Verlauf der Ölpenetration in den PFS in Bezug auf z.B. die Benetzung, oder die Reihenfolge sowie Art der Füllung von Mikro oder Makroporen des Schwammes.

### Flüssigkeit-Kapazität, -Rückhaltung und -Freisetzung aus Polymerfaser-Schwämmen

Ein PFS erlaubt, durch seine Integrität in trockenem als auch mit Flüssigkeit beladenen Zustand, den Einsatz als z.B. flüssig-beladener Medikamententräger. Die Flüssigkeit wird durch den Schwamm-Korpus exakt, auch nach mehrmaliger Kompression, in der von der PFS-Geometrie definierten Form gehalten (**Abb. 33**). Dies kann u.a. eine höhere Kontrolle der Medikamentenfreisetzung gegenüber herkömmlichen Verfahren erlauben, welche unter Einsatz einer 'freien' Flüssigkeit den Ort und die Geschwindigkeit der gezielten Freisetzung darin enthaltener Medikamente nicht oder nur schwer kontrollieren können. Bei einer maximalen Beladung des PFS (100 % Beladung, 35 g/g), gemessen als Netto Abtropfgewicht, büßt der PFS nahezu keine seiner mechanischen Eigenschaften in Bezug auf Belastbarkeit und Elastizität gegenüber unbeladenen, trockenen PFS ein (**Abb. 33**, Graph links).

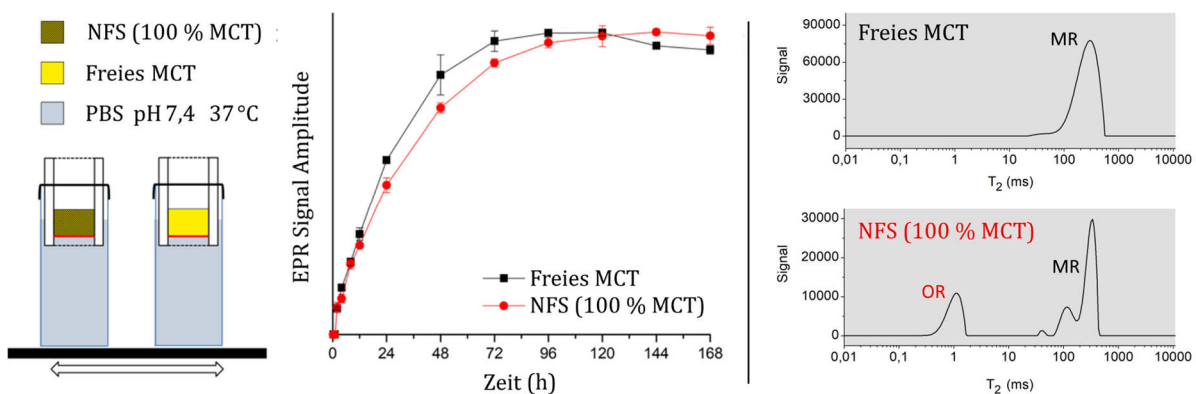


**Abbildung 33.** Kompressionsergebnisse PPX beschichteter Schwämme mit und ohne Beladung mit MCT-Öl. Oben: Links) Erster Kompressionszyklus für trockenen und vollständig beladenen PFS; Rechts) Kompression von Schwämmen unterschiedlicher Beladung bei entsprechender Maximalkompression  $\epsilon_{Max}$ . Mitte: PFS vor und nach Kompression (500 Zyklen). Unten: Kompressionsverlauf eines PFS mit 80 % Beladung zur Demonstration des reversiblen Freisetzungsvorgangs in Abhängigkeit zur Kompression  $\epsilon$  (in %). Anmerkung: Öl-Freisetzung erkennbar an glänzender PFS-Oberfläche.

Unter Kompression mit definierter Maximalkompression ( $\epsilon_{Max}$ . 10-30%) wird das aufgenommene Öl eines vollständig beladenen PFS (100 %, MCT) jedoch auch sofort freigesetzt und kann, auf Grund der limitierten Reversibilität der Elastizität des PFS, nicht mehr vollständig wiederaufgenommen werden. Unter reduzierter Beladung (90 % bis 70 %) behält der PFS seine Ausgangshöhe nahezu vollständig bei. Das Öl im PFS wird, bei entsprechender Kompression (90 % Beladung  $\rightarrow$  10 %  $\epsilon_{Max}$ , usw.) immer bei ca. 70% der angelegten Maximalkompression freigesetzt und auch nach 500 Zyklen vollständig reversibel wieder absorbiert. Der Beginn der Freisetzung ist auch mit dem Kraftverlauf der PFS-Kompressionsmessung kongruent, welcher analog zum Kurvenverlauf trockener PFS voraussichtlich den Wechsel der Kompression von Makro zu Mikroporen widerspiegelt. Unter diesen Rahmenbedingungen kann ein PFS unter Einsatz als Flüssigkeitsbeladener Medikamententräger, je nach Anwendungsbeanspruchung, die Geometrie der Flüssigkeit konstant beibehalten, solange die Kompression der Mikroporen noch nicht eingetreten ist.

### Molekulare Interaktion und Freisetzung eines Modell-Medikaments

Die Interaktion einer Flüssigkeit mit dem PFS wurde durch Bestimmung der Diffusions- und Relaxationskoeffizienten über Kernspin Resonanzspektroskopie (NMR) untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass für freies MCT-Öl lediglich Relaxationsprozesse zwischen den MCT Molekülen (**Abb. 34**, MR:  $T_2$ : 100 ms bis 1000 ms) zu finden sind. Für MCT-Öl im PFS treten hingegen zusätzlich Diffusionslimitierungen (hier nicht gezeigt) und Oberflächenrelaxationsprozesse (OR,  $T_2$ : 300 ms) auf, welche auf die Interaktion des Öls mit der PFS-Oberfläche zurückzuführen sind. Der Integrale Anteil der OR entspricht 30%, dieser Anteil steht demnach für vor allem Van-der-Waals Wechselwirkungen des Öls mit den Fasern des PFS.



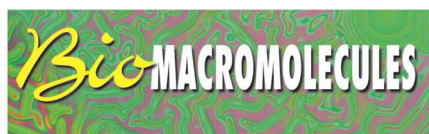
**Abbildung 34.** Links: Aufbau zur Analyse der Freisetzung eines Modell-Medikaments im Direktvergleich (Graph, Mitte) aus MCT gebunden in einem PFS (100 % Beladung) gegenüber 'freiem' MCT gleicher Geometrie. Rechts: Über NMR ermittelte Relaxationsprozesse in beiden Systemen. Mit: MR Molekülrelaxation, OR: Oberflächenrelaxation zwischen Molekül und Fasergerüst.

Der Freisetzungsverlauf beider Systeme ist, im Rahmen der experimentellen Schwankungen nahezu identisch. Somit ist trotz der im PFS durch Oberflächenrelaxationen recht ausgeprägten Wechselwirkung des MCT-Öls mit dem Fasergerüst keine signifikant durch Diffusionslimitierung eingeschränkte Freisetzung des Modell-Medikaments messbar (**Abb. 34**, Graph).



### 3 Publikationen und Manuskripte

#### M1) Manuskript veröffentlicht im Journal ‚Biomacromolecules‘.



Article

Cite This: *Biomacromolecules* 2018, 19, 1663–1673

pubs.acs.org/Biomac

## Ultraporous, Compressible, Wettable Polylactide/Polycaprolactone Sponges for Tissue Engineering

Michael Mader,<sup>†</sup> Valérie Jérôme,<sup>‡</sup> Ruth Freitag,<sup>†</sup> Seema Agarwal,<sup>†</sup> and Andreas Greiner<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Macromolecular Chemistry and Bavarian Polymer Institute, University of Bayreuth, Universitätsstrasse 30, 95440 Bayreuth, Germany

<sup>‡</sup>Process Biotechnology, University of Bayreuth, 95440, Bayreuth, Germany

#### Supporting Information

**ABSTRACT:** Ultraporous, degradable sponges made of either polylactide or of blends of polylactide/poly( $\epsilon$ -caprolactone) are prepared by freeze-drying of dispersions of short electrospun fibers and subsequent thermal annealing. The sponges feature ultrahigh porosity (99.6%), a hierarchical cellular structure, and high reversible compressibility with fast recovery from deformation in the dry as well as in the wet state. The sponge properties depend on the fiber dispersion concentration and the annealing temperature. Sponge characteristics like fiber density (2.5–20 mg/cm<sup>3</sup>), size, shape, crystallinity, mechanical strength, wettability, and structural integrity are user adjustable. Cell culture experiments were successfully performed with Jurkat cells with Confocal Laser Scanning Microscopy and MTT staining showing rapid cell proliferation. Live/Dead staining demonstrated high viability of the seeded cells. The sponge characteristics and modifications investigated and presented here reveal that these sponges are highly promising for tissue engineering applications.



#### INTRODUCTION

The use of artificial scaffolds for tissue regeneration applications has turned out to be one of the most promising methods to treat and repair structural defects of body tissues.<sup>1</sup> The research field of tissue engineering (TE) comes up with still accelerating progress in the development of diversely produced scaffolds aiming to mimic the extracellular matrix (ECM) of natural tissue.<sup>2</sup> The rapid progress that is made in scaffold and TE research takes its driving force from the substantial and still increasing need for suitable scaffold materials, as the gap between demand and supply of organs for transplantations is inexorably widening.<sup>3</sup> As basic scaffold material, the use of synthetic as well as natural polymers is possible, though synthetic polymers with higher mechanical strength have turned out to be necessary to grant a basic and long-term mechanical resilience.<sup>4,5</sup>

Various fabrication methods to generate artificial scaffolds for possible TE applications have been published,<sup>5</sup> including porogen leaching,<sup>4,6–9</sup> freeze-drying<sup>10–13</sup> (FD), and 3D printing.<sup>14</sup> Different kinds of degradable polymers can be used for scaffold production, e.g. polylactide (PLA),<sup>6,9,15</sup> poly(lactide-co-glycolide) (PLGA),<sup>6–8</sup> PLGA/Collagen,<sup>4</sup> PLA/PHBV,<sup>16</sup> poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL),<sup>6,17</sup> chitosan,<sup>18</sup> PLA/chitosan,<sup>19</sup> and cellulose systems.<sup>10–13,20</sup> By comparison, only a modest number of 3D scaffold fabrication techniques have been developed that provide a dynamic framework with high porosity, a broad user-adjustable structural and mechanical integrity in combination with chemical diversity.<sup>21</sup> Moreover, in

order to work as an artificial ECM, the scaffold has to bridge the gap between mechanical and biochemical requirements. The necessity of combining all of these aspects illustrates the current challenges in the development of a scaffold for TE applications.

The biological integrity of natural tissue, which is based on collagen fibrils as the main structural protein of the ECM, allows for global cell–substrate-communication. This feature is highly important for the arrangement of cells inside the scaffold and the process of tissue formation.<sup>22</sup> High porosity and an open scaffold structure are important to allow sufficient nutrient and waste exchange during cell proliferation and tissue formation.<sup>1</sup> These attributes have to be combined with appropriate (steady) shape, mechanical strength, and elasticity of the 3D scaffold as it has to provide mechanical resilience that can overcome local, tissue specific loading stresses even over a long period of time. Finally, the biodegradation capability is a concern and should be adapted to the speed of the *de novo* tissue formation. Thus, the synthetic scaffold system has to provide not only an appropriate mechanical resilience but also a (de)finite physiological resistance and degradation rate. In order to combine all of the aforementioned criteria, innovative techniques for material processing and modification have to be combined with novel structural designs to develop scaffolds featuring high mechanical and biochemical performance.

Received: March 12, 2018

Published: March 20, 2018



The combination of fibers in the range of micro- or nanometer scale produced by electrospinning (ES)<sup>23</sup> with a natural sponge structure is an extremely promising approach to generate a fibrillar scaffold system for target-oriented TE applications.<sup>24</sup> It may in fact be possible to imitate a natural sponge structure using polymer fibers. In this respect, recently published artificial sponge fabrication concepts using poly-(acrylonitrile-benzoxazine)/SiO<sub>2</sub>,<sup>25,26</sup> triblock poly-(acrylate),<sup>27–30</sup> and poly(imide)<sup>31,32</sup> are intriguing. An overview on 3D fiber based scaffolds published by S. Jiang on the state of the art in regard to “low-density, open cellular sponges as functional materials”<sup>21</sup> summarizes manufacturing techniques and highlights the high potential of fibrillar sponges for catalytic, electrical, biomedical, purification, and insulation applications. Unfortunately, until now, there is still lack of comparable systems based on degradable polymers in order to meet the basic criteria necessary for TE and *in vivo* applications, namely biodegradability.

PLA/gelatin fiber-based sponges with high elasticity, porosity, good mechanical properties, and cytocompatibility have been shown to be suitable for *in vivo* cartilage regeneration.<sup>33,34</sup> Until now this group has proposed two approaches to cross-link the fibers to grant structural integrity and elasticity to the PLA/gelatin sponge. The first technique relies on glutaraldehyde, a toxic cross-linking agent;<sup>34</sup> the second one is based on the direct cross-linking of gelatin by a combination of elevated temperature (190 °C) and a subsequent water treatment.<sup>35</sup>

T. Xu and H. Fong produced PCL fiber-based sponges with a porosity of >96% and fiber densities ranging from 41 to 63 mg/cm<sup>3</sup>.<sup>35</sup> Their technique makes use of the low melting point of PCL and is specified as a thermally induced nanofiber self-agglomeration (TISA). The use of these PCL sponges for *in vitro* bone regeneration was possible. However, predominantly chondrogenic instead of osteogenic differentiation of the mouse bone stem cells was observed. Only recently, Q. Yao presented the production of PLA/PCL fiber-based sponges using TISA.<sup>36</sup> Liquid nitrogen and a mortar were used to produce short individual nanofibers out of electrospun nonwovens. In order to achieve a homogeneous fiber dispersion, repeated grinding, sieving, and washing was necessary. The 3D structures were then achieved by self-assembly of the fibers in heated water.

Here we present the fabrication of degradable, highly porous, open-cellular, reversible compressible polymer fiber-based sponges (PFS) with user adjustable properties. For the first time, elastic fiber sponges completely based on PLA can be produced. The fabrication technique is derived from the cutting and freeze-drying procedure recently developed in our group.<sup>27–29</sup> It allows for rapid and easily controllable manufacturing of 3D-fibrillar scaffolds with geometries identical to the used mold. If more complex geometries are desired, the final geometry of a PFS can easily be shaped when it is placed in a frozen medium such as water, or even at room temperature using *tert*-butanol, by cutting, drilling, or grinding. Moreover, the PFS can either be produced only out of PLA, or as a blend system, e.g. using PLA/PCL, and do not have to be chemically cross-linked to gain elasticity. The degradable PFS show excellent shape stability, reversible compressibility, and bendability without structural disintegration neither in the dry state nor in the wet state and are easily recycled. The PFS are hydrophobic in their natural state but can be hydrophilized by air-plasma treatment, which is essential for cell seeding and opens up a huge variety of chemical variations.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Materials.** *tert*-Butanol (tBuOH, pur. 99.5%, Grüssing GmbH, charge 5076), polylactide (Ingeo Biopolymer PLA 4043D, NatureWorks LLC) and poly(*ε*-caprolactone) (PCL Capa 6800, Perstorp) were used as received. PCL density (1.13 g/cm<sup>3</sup>) was kindly supplied by Perstorp Holding AB (Sweden). CHCl<sub>3</sub> and MeOH were distilled before use. The D-stereoisomer content and the density of PLA (4.8%; 1.22 g/cm<sup>3</sup>, 25 °C) were kindly provided by NatureWorks LLC.

Cell culture materials and standard chemicals were from established suppliers and used as received. High quality water (Milli-Q) was produced by a Millipore unit. Culture media (RPMI 1640 with phenol red), solutions (L-Glutamine, Dulbecco's PBSIX (DPBS)) and fetal calf serum (FCS) were from Biochrom, Germany. RPMI 1640 without phenol red cell culture medium was from Gibco, Germany. 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), sodium borohydride (NaBH<sub>4</sub>), Triton X-100, and glutaraldehyde solution (grade I, 70%) were from Sigma-Aldrich, Germany. Agarose was from Bionline, Germany.

**Analytical Methods.** Differential scanning calorimetric (DSC) measurements were performed under nitrogen atmosphere using a Mettler Toledo 821c DSC system (TS0801R0 Sample Robot), which is calibrated with indium and zinc standards. The data evaluation was performed using STAR<sup>®</sup> SW 9.20a software. The samples were heated from –100 to 230 °C (10 K min<sup>–1</sup>) cooling to –100 °C (10 K min<sup>–1</sup>); a second heating was performed by heating to 230 °C (10 K min<sup>–1</sup>) and cooling to room temperature. The first heating curves were used for evaluation of the recrystallization and melting enthalpies for crystallinity calculations. The second heating curves were used for evaluating the glass transition and the melting point of the polymer blend systems.

The molecular weight of PLA and PCL used for PFS fabrication was measured by Multiple Angle Laser Light Scattering Gel Permeation Chromatography (MALLS-GPC). The system used for measuring includes four columns (PSS Polymer Standards Service GmbH), a precolumn (SDV 5 μm 8.0 × 50 mm) and three main columns (SDV 5 μm, 8.0 × 300 mm, with 1000 Å, 10000 and 100000 Å). The sample was dissolved in THF (mobile phase) mixed with toluene as the internal standard. The sample is filtrated twice, before and after passing the pump, using a 0.22 μm PTFE filter. A sample concentration of 2 mg/mL was used. Twenty microliters of the dissolved sample was injected; a flow rate of 0.8 mL/min and a measuring time of 50 min were used. The columns were stored at RT. The GPC data were analyzed by the software PSS WinGPC Unity, Build 1321.

<sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on a Bruker Ultrashield 300 operating at a frequency of 300 MHz. Deuterated-chloroform was used as solvent. MestReNova (MestreLab Research S.L., version 6.1.0-6224) was used for spectra evaluation. The deuterated chloroform solvent signal at 7.26 ppm (<sup>1</sup>H NMR) was used as internal reference. The spectroscopic analysis included accumulation of 16 measurements. The polymers were used without further purification.

Compressibility tests, for stress–strain experiments, were performed using a Zwick/Roell Z 2.5 (load sensor 20 N, compressing speed 4 mm/min, 23 °C) following DIN 53 421 for cylindrical samples. Cylindrical shaped PFS intended for testing were cut manually to achieve comparable sponges with 16 mm in height and 15 mm in diameter. Compressibility tests to analyze reversibility and percentage height loss after up to 100 cycles of compression were done manually, using a specimen holder and spacers to regulate the compression applied. The sponges were fixated to the specimen holder by double sided tape, and the height loss was measured using a Vernier caliper. All measurements were carried out at room temperature. Compressibility tests, for stress–strain experiments in 1X PBS medium and dry state, shown in the Supporting Information, were performed using a Zwick/Roell Z0.5 (load sensor 200 N, compressing speed 5 mm/min, 22 °C) following DIN 53 421 for cylindrical samples. The sponges were cut manually in frozen-medium to achieve comparable sponges with 15 mm in height and 17.5 mm in diameter.

Scanning Electron Microscopy images were recorded on a Zeiss LEO 1530 (FE-SEM, Schottky-field-emission cathode; in-lens and SE

Table 1. Sponges Used in This Work, Sorted by Order of Appearance

| Sponge No. | $\rho_{\text{PFS}}$<br>[mg/cm <sup>3</sup> ] | $\rho_{\text{FD}}$<br>[mg/mL] | $f_{\text{PCL}}$<br>[wt%] | $T_{\text{TA}}$<br>[°C] | $t_{\text{TA}}$<br>[h] | $P_{\text{calc.}}$<br>[%] | SPV<br>[cm <sup>3</sup> /g] | $\alpha$<br>[%] |
|------------|--|-------------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------|
| 1          | 5.5  | 5                             | 10                        | 60                      | 75                     | 99.5%                     | 181                         | 39              |
| 2          | 2.55   | 2                             | 10                        | 60                      | 75                     | 99.8%                     | 391                         | 39              |
| 3          | 4.5  | 4                             | 10                        | 60                      | 72                     | 99.6%                     | 221                         | 39              |
| 4          | 10.9   | 10                            | 10                        | 60                      | 72                     | 99.1%                     | 91                          | 39              |
| 5          | 4.45   | 3                             | 10                        | 60                      | 72                     | 99.6%                     | 224                         | 39              |
| 6          | 8.4  | 8                             | 10                        | not applied             |                        | 99.3%                     | 118                         | 39              |
| 7          | 4.5  | 4                             | 10                        | 60                      | 72                     | 99.6%                     | 221                         | 39              |
| 8          | 8.4  | 8                             | 10                        | 60                      | 72                     | 99.3%                     | 118                         | 39              |
| 9          |  |                               | 10                        | 60                      | 72                     | 99.6%                     | 199                         | 39              |
| 10         | 5.9  | 4                             | 10                        | not applied             |                        | 99.5%                     | 169                         |                 |
| 11         | 5  | 4                             | 10                        | 60                      | 72                     | 99.6%                     | 199                         | 39              |
| 12         |  |                               | 10                        | 60                      | 72                     | 98.8%                     | 66                          | 39              |
| 13         |  |                               | 10                        | 60                      | 72                     | 99.6%                     | 221                         | 39              |
| 14         |  |                               | 10                        | 60                      | 72                     | 99.6%                     | 221                         | 39              |
| 15         |  | 4                             | 0                         | not applied             |                        |                           |                             | 3               |
| 16         | 4.4  | 4                             | 0                         | not applied             |                        | 99.6%                     | 226                         | 3               |
| 17         | 4.9  | 4                             | 0                         | 120                     | 96                     | 99.6%                     | 203                         |                 |
| 18         | 4.4  | 4                             | 0                         | 120                     | 3                      | 99.6%                     | 226                         |                 |
| 19         | 4.6  | 4                             | 0                         | 120                     | 72                     | 99.6%                     | 217                         | 100             |
| 20a        | 4.2  | 4                             | 10                        | not applied             |                        | 99.7%                     | 237                         | 10              |
| 20b        | 4.8  | 4                             | 10                        | 60                      | 72                     | 99.6%                     | 208                         | 39              |
| 20c        | 6  | 6                             | 10                        | 120                     | 72                     | 99.5%                     | 166                         | 53              |
| 20d        | 6.8  | 6                             | 10                        | 120                     | 72                     | 99.4%                     | 146                         | 77              |
| 21a        | 4.1  | 4                             | 0                         | not applied             |                        | 99.7%                     | 243                         | 3               |
| 21b        | 6.9  | 6                             | 0                         | 120                     | 48                     | 99.4%                     | 144                         | 100             |
| 22         | 16.1   | 16                            | 0                         | 130                     | 72                     | 98.7%                     | 61                          |                 |
| 23         | 16.2   | 16                            | 10                        | 60                      | 72                     | 98.7%                     | 61                          |                 |

With:  $\rho_{\text{PFS}}$  Density of the Sponge,  $\rho_{\text{FD}}$  Density of the Fiber Dispersion Used,  $f_{\text{PCL}}$  weight fraction of PCL,  $T_{\text{TA}}$  Thermal Annealing Temperature,  $t_{\text{TA}}$  Thermal Annealing duration,  $P_{\text{calc.}}$  Calculated Porosity, SPV Calculated Specific Pore Volume,  $\alpha$  Crystallinity of the Polymer.

2 detector) at the Bavarian Polymer Institute (BPI) in Bayreuth. An accelerating voltage of 2–3 kV was used. The samples were sputtered with platinum (1.3 nm) prior to SEM imaging using a sputter coater (Cressington HR208) with a thickness controller (Cressington MTM20).

**General Procedure for Fiber Production.** The electrospinning polymer solutions for a 9:1 PLA/PCL system were prepared by dissolving PLA (6.2 g; 5.45 wt %, 7.9% w/v) and PCL (0.65 g; 0.6 wt %, 0.8% w/v) in CHCl<sub>3</sub>/MeOH<sup>37</sup> (78 mL, 3:1 v/v) in a closed glass container. The NMR spectra of PLA and PCL can be found in Figure SI-13. The solution was stirred for 2–3 h at room temperature until homogeneity was achieved. The following electrospinning conditions were used: 16 kV, 1.9 mL/h, 15.0 cm, and relative humidity 30% (23 °C) using an assembly of 2 × 4 syringes (Sterican Hypodermic needle 0.60 × 30 mm, 23G × 1.25", B. Braun Melsungen AG). The polymer fibers were collected as nonwoven on a grounded rotating drum (diameter 10 cm, length 18 cm) run at approximately 40 rpm.

**General Preparation of Electrospun Fiber Dispersions.** The electrospun fiber nonwoven was dried in vacuum at room temperature for 24 h. The nonwoven (2 g) was cut into short fibers with a blender using 4:1 H<sub>2</sub>O/tBuOH (500 mL) as dispersion medium at room temperature. Fiber dispersions with higher concentrations were prepared by centrifugation. The polymer fiber dispersions were stored in a closed PE bottle at room temperature.

**General Preparation of Polymer Sponges.** The polymer fiber dispersions were precooled in an ice bath, filled into a 3D printed cup made of PLA, or a glass cup, and sealed with Parafilm (Parafilm M, Bemis Company Inc.). The sealed cup was placed in a tailor-made freezing aid (see Supporting Information), frozen using a cooled ethanol bath (−40 °C) for 10 min, and subsequently freeze-dried (Freeze-Dryer Beta-2-16, Christ). The freeze-dried sponges were placed in a glass container and stored in a heating oven (Heraeus

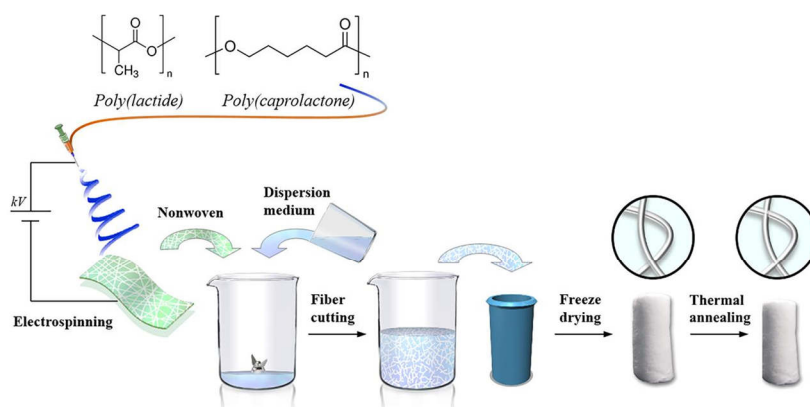
vacuotherm) between 60 and 120 °C for up to 72 h. All sponges that were referred to in this work are listed in Table 1 and numbered by order of appearance. Crystallinity calculations for each sponge can be derived from DSC results (SI: Table 1, Figure 7–9) that were done with one representative sample under equal conditions. The maximum crystallinity which is to be expected for a molecular immiscible blend was calculated from DSC results and normalized to the molecular weight based weight fraction calculated from GPC-Experiments (Figure SI-12).

**Plasma Treatment of Sponges.** Plasma treatment was performed using an Air-Plasma oven (MiniFlecto-PC-MFC, Gala Instruments, v. 2.0.9, 2009). The PFS measured were stored in open glass beakers and placed into the plasma-oven. Plasma was applied for 15 min at 20 W (Power: 25%), 100% air, and 0.5 mbar pressure.<sup>38</sup> Contact angle measurements were performed on a Drop Shape Analyzer (Krüss Advance, v1.3.1) using Milli-Q water. The experiments were performed with a 9:1 PLA/PCL sponge (TA 60 °C, 72 h) cut into flat sponge slices. For all measurements, water droplets of 8  $\mu$ L volume were used.

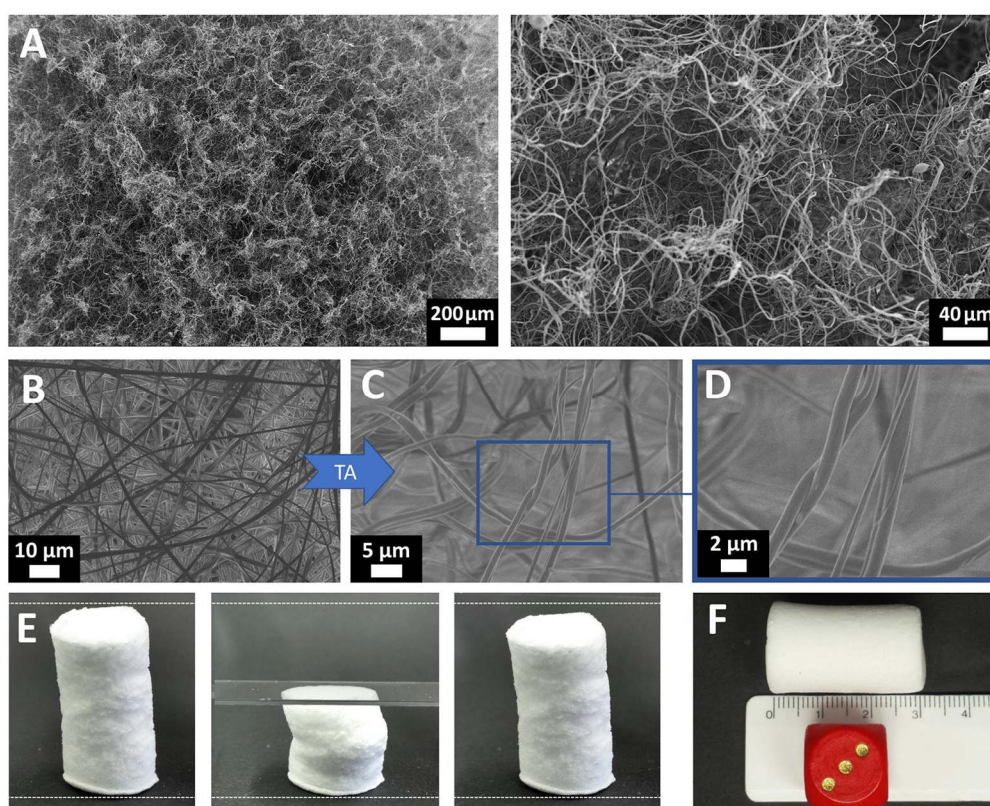
**Mammalian Cell Line and Culture Conditions.** Jurkat cells (DMSZ number: ACC 282) were maintained in RPMI1640 (with phenol red) culture medium, supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin. Cells were cultivated at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Jurkat cells were collected from suspension by centrifugation (200g, 5 min). During cultivation on the sponges, the culture medium was exchanged daily as previously described.<sup>39</sup>

**Static surface seeding:** One small piece of sterilized (UV-254 nm, 5 h) ultralight PFS was placed and immobilized per well into 6-well plates coated with agarose. The sponge was then prewetted with culture medium before being precoated with FCS. 1 × 10<sup>6</sup> cells were resuspended in 40  $\mu$ L of growth medium. The cells suspension was





**Figure 1.** Schematic to illustrate the general sponge fabrication steps.



**Figure 2.** Sponge structure of (A) a 9:1 PLA/PCL (sponge 3) PFS at different magnifications and SEM images showing 9:1 PLA/PCL (B) as-spun nonwoven (C, D) nonwoven fibers after thermal annealing (TA 60 °C, 72 h) with highlighted physically cross-linked fibers. (E) Reversibility behavior of a 9:1 PLA/PCL blend PFS (sponge 1) after one compression of ~50% of its original height, (F) photograph illustrating the size dimensions of the PFS produced.

carefully dispersed over the top surface of the sponge. The seeded sponge was transferred into the incubator for 30 min to allow the cells to enter the sponge. Five hundred microliters of growth medium was then added to the bottom of each well. After a further two hours of incubation, additional growth medium was slowly added along the side of the well to cover the sponge. Well plates were placed back into the incubator and the cells cultured for the indicated amount of time.

**Cell Staining Techniques.** For MTT staining the cultivated sponges were rinsed with DPBS, placed in fresh 6-well plates and incubated at 37 °C for 2 h with 0.5 mg/mL MTT in the culture medium without phenol red. For digital cell penetration depth analysis, the MTT stained sponge slices were cross sectioned in frozen state

with a blade. The cross-sectional image areas were divided into raster graphics of full image broadness and 6 pixels height. Each raster graphic was evaluated manually using the ImageJ (v. 1.50i) live histogram feature. The evaluated data was fit by a Lorentz statistical function using Origin Pro (v. 8.5) and plot using the maximum color scale value of each evaluated raster graphic Lorentz-fit. For visible light spectroscopic Formazan concentration evaluation, the formazan crystals were solubilized by incubating the sponges in 3 mL of isopropanol for 24 h under constant agitation. Then, 100  $\mu$ L aliquots of the solution were transferred into a 96-well flat-bottomed plate, and the absorbance was measured using a plate reader (Genios Pro, Tecan) at a wavelength of 580 nm. Five technical replicates were



measured per sample. For a qualitative assessment of the spatial distribution of the cells within the sponge, images were taken with a stereomicroscope (HUND WEZLAR FLQ150). The viability of the cells within the sponges was determined with the Live/Dead reduced biohazard viability/cytotoxicity kit (Invitrogen, Germany) that stains the living cells green through the highly permeable-permanent nucleic acid dye SYTO 10 and the dead cells red through the cell-impermeant dye DEAD Red. For staining the PFS were rinsed with DPBS, placed in fresh 6-well plates, and treated according to the manufacturer's instruction. Images were acquired on vertically cross-sectioned sponges using a confocal microscope Leica TCS SP8 (Model DMI 6000, HyD Hybrid-Detector; PMT-Detector) using an argon-laser (488 nm, Live/Dead). The cell-seeded sponges were measured floating in buffer solution in a chambered cell culture slide (MatTek Corp., USA).

For SEM studies, the sponges were rinsed twice with DPBS and fixed in 4.0% (v/v) glutaraldehyde in DPBS for 60 min. After washing with Milli-Q water, dehydration was performed by slow water replacement using a series of ethanol/water solutions (35%, 50%, 75%, and 95%) for 15 min with final dehydration in absolute ethanol for 15 min. Small fragments of the dehydrated cell cultured PFS after 3 and 10 days of cultivation were dried under atmospheric conditions and subsequently sliced into two parts. The cut PFS was folded back and mounted on a standard sample holder prior to SEM imaging using a conductive adhesion graphite-pad.

Further experimental data regarding polymer characterization (NMR, DSC, GPC) can be found in the [Supporting Information \(SI\)](#).

## ■ RESULTS AND DISCUSSION

**Preparation of Sponges.** Electrospun PLA fibers, as well as electrospun polymer blend-fibers based on PLA/PCL 9:1 (w/w) were used to produce PFS. The basic production steps required to gain an elastic PFS are illustrated in [Figure 1](#). The polymers are dissolved in a mixture of chloroform (CHF) and MeOH and electrospun to achieve polymer nonwovens. The thus prepared nonwovens were cut mechanically into short fibers ([Figure SI-1a, 2](#)) with a ratio of fiber diameter to fiber length of around 1/150  $\mu\text{m}$ , using an antisolvent mixture of 1:4 (v/v)  $\text{H}_2\text{O}/\text{tBuOH}$  as dispersion medium. As soon as the fiber dispersion medium was homogenized, it was filled into a 3D printed mold ([Figure SI-3](#)) and frozen. The frozen fiber dispersion was then freeze-dried to obtain a raw, non-cross-linked 3D PFS. In a subsequent thermal annealing (TA) process at 60 °C (PLA/PCL sponge) or 100 °C (PLA sponge) physically cross-linked PFS with elastic properties are achieved.

The PFS based on PLA/PCL and PLA can feature high reversible compressibility with fast recovery from deformation (video 1 PLA/PCL Sponge dry Compression in [Supporting Information](#)). PFS were successfully produced with a density range of 2.5  $\text{mg}/\text{cm}^3$  (video 2 PLAPCL Sponge 2 on Marabu feather in [Supporting Information](#)) up to 20  $\text{mg}/\text{cm}^3$  (not shown).

**Sponge Structure.** According to SEM analysis, the prepared physically cross-linked PFS are characterized by a random fiber distribution ([Figure 2A](#)). As the surface of a PFS is not representative of its internal structure, SEM images of carefully prepared PFS cross sections were taken (No. 3). In all of these images, an almost random distribution of fiber orientations is seen. A dual pore structure was obvious from SEM pictures. Large pores (few tens to few hundred micrometers) replicate the solvent's crystals, whereas pores smaller than 20  $\mu\text{m}$  are generated in between the fibers due to self-assembly of fibers.<sup>26</sup> A manual pore size evaluation was performed using eight SEM images of a cross-sectioned 9:1 PLA/PCL sponge. The evaluated pore size distribution, for

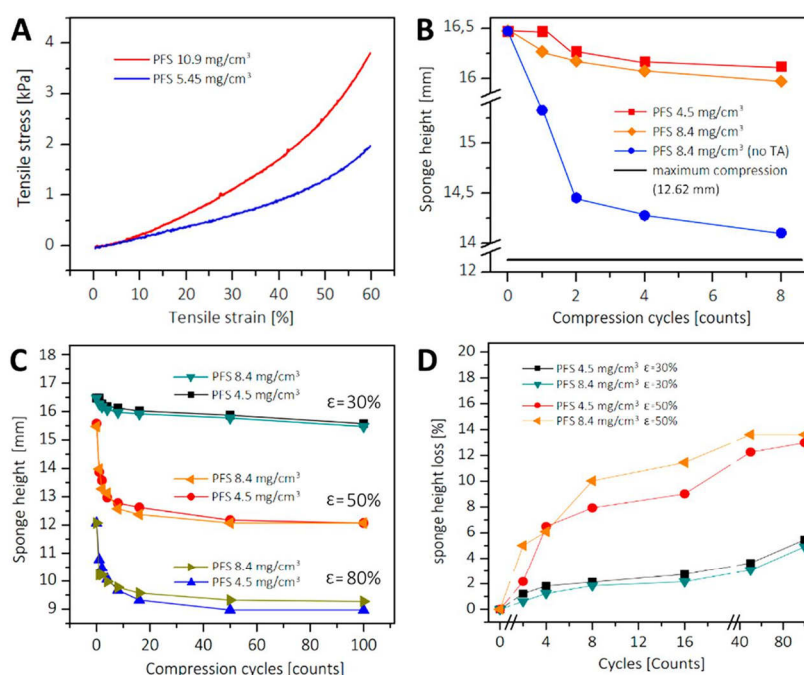
pores bigger than 20  $\mu\text{m}$ , is shown ([Figure SI-11](#)). A mean pore size of 80 ( $\pm 23$ )  $\mu\text{m}$  was calculated. The size of the pores ranges from 26 to 146  $\mu\text{m}$ ; 301 individual pores were used for calculation. A pore density of about  $1.7 \times 10^{10}$  pores per  $\text{cm}^3$  can be calculated. Nevertheless, performing a manual determination of pores using SEM images is a highly subjective practice. Hence, the evaluated data needs to be checked by mechanically performed macroscopic evaluations using e.g. Nano-Chromatography (Nano-CT) measurements in future experiments.

The PLA/PCL blend fibers undergo a structural rearrangement during TA which can be derived from a comparison of an as-spun nonwoven before and after TA at 60 °C for 72 h ([Figure 2B, C](#)). The fiber conformation is turning from a rather linear in the "as-spun" state into a highly nonlinear state with frequently alternating torsional directions afterward. This transformation can be explained by fiber shrinkage or relaxation processes that occur during thermal induction ([Figure SI-5, 6](#)). Such a rearrangement would certainly contribute to the less pronounced porous structure found after TA. Elasticity is expected to stem from physical cross-linking of randomly overlapping fibers, this physical cross-link can be seen in SEM images of the PLA/PCL sponge ([Figure 2D](#)). The high reversible compressibility of a PLA/PCL sponge (No. 1) with low density is illustrated in [Figure 2E](#), the typical PFS size dimensions prepared until now are in a range of 2 cm in diameter and 4 cm in height ([Figure 2F](#)). The porosity  $P$  of the PFS fabricated was calculated using an equation proposed by Berhan and Sastry.<sup>40</sup> A porosity  $P$  of 99.67% can be calculated for a PFS with 4  $\text{mg}/\text{cm}^3$  density, a fiber diameter  $d$  of 1  $\mu\text{m}$ , and a theoretical average fiber length  $L$  of 150  $\mu\text{m}$ .

**Structural Integrity and Recyclability.** The very first sponge fabrication experiments using PLA fiber dispersions were not successful, as the use of an appropriate fiber dispersion medium was necessary to achieve a stable dispersion and, hence, a stable raw sponge structure ([Figure SI-1b, c](#)). Soon it became clear that fiber–fiber interconnectivity seems to play the key role concerning the elasticity and, hence, the structural integrity and the final functionality of all PFS fabricated. In the case of PLA/PCL blend PFS the interconnectivity of fibers is, as evidenced by SEM imaging ([Figure 2D](#)), achieved by physical cross-linking during TA with reaching the melting point of PCL (~60 °C, [Figure SI-7](#)). PCL acts like a glue to create a stable linkage between overlapping fibers. Consequently a stable overall fiber network is formed. Unfortunately, a PLA/PCL sponge does not achieve elasticity by long-term treatments at temperatures below the melting point of PCL and above its glass transition temperature. Hence, physical cross-linking of PLA/PCL fibers is not working if only chain segment mobility is active, but that is not the case for the PLA only systems.

After applying 120 °C to a raw PLA sponge for 96 h, a temperature that is far below PLA's melting temperature ([Figure SI-7](#)), an elastic PFS with high reversible compressibility and high structural integrity is achieved as well ([Figure SI-1d](#)). By comparing both polymer systems investigated, we assume physical cross-linking of fibers, due to macromolecular interpenetration of interdiffusing polymer chains, to play the major role in leading to PLA sponge elasticity. We assume macromolecular interdiffusion processes, initiated at temperatures above the glass transition point of PLA, to take place at the surface layer of randomly overlapping fibers. The TA temperature and treatment time that are necessary to produce





**Figure 3.** Compressing reversibility testing results of 9:1 PLA/PCL sponge (equal initial height): (A) Mechanical compression stress–strain test results of 9:1 PLA/PCL sponges 4 and 5 with two different densities. Manual experiments: (B) Reversibility vs stress loading cycles, a direct comparison between a non-cross-linked sponge 6 and two cross-linked PFS sponges 7 and 8. (C) Sponges 7 and 8 height loss in relation to the number of stress loading cycles expressed (C) in length-scales and (D) as percentage height loss, after first compression at  $\epsilon$  30% and  $\epsilon$  50%.

elastic PLA sponge, comparable to the PLA/PCL blend ones, were found to be in the range of 100 °C ( $t > 5$  h) up to 120 °C ( $t > 1$  h). The process of creating stronger fiber junctions seems to be dependent on the applied TA treatment parameters (Figure SI-4), but detailed temperature- and treatment-time investigations are yet to be done. The assumed mechanism of interdiffusion of polymer chains could be explained by the model of reptation and chain motion based on defects proposed by P. de Gennes.<sup>41</sup> The presence of PCL seems to limit the polymer chain movement capability of PLA or does not allow interdiffusion processes.

For reasons of completeness the simultaneously increased crystallinity of PLA and PCL due to TA (Figure SI-8, -9; Table SI-1) also has to be taken into account, as it surely influences the elasticity performance of the PFS as well. With regard to disintegration experiments performed with PLA sponge after long-term treatment at temperatures below 100 °C, however, it can be derived that crystallinity mainly seems to contribute to the mechanical strength of the PFS but it does not seem to be mandatory for achieving elasticity (not shown).

The aspect of disintegration can, in turn, be useful with regard to recyclability. A fiber network of a non-cross-linked PFS can easily be dispersed and freeze-dried again. The recyclability of fiber based sponges has already been seen for sponges made from triblock poly(acrylate) by shaking them in acetone or dioxane.<sup>27</sup> Even an already cross-linked PFS can be recycled by cutting the PFS into fiber pieces again, but further investigations have to be made to give a more precise insight into the recyclability of an already cross-linked PFS.

**Mechanical Properties.** The mechanical properties of physically cross-linked 9:1 PLA/PCL sponge were investigated in more detail, using stress–strain ( $\sigma$ – $\epsilon$ ) compression experiments. A low sponge density means both less fibers per

unit of volume as well as a higher specific pore volume (SPV) in our system. Depending on sponge density a slightly increasing compressive strength, ranging between 1 and 4 kPa for compressions up to  $\epsilon = 60\%$ , can be found. The stress–strain plot (Figure 3A) shows a short linear elastic regime for sponge densities of  $\rho \approx 10$  mg/cm³ at  $\epsilon \approx < 10\%$ , whereas a low density PFS seems to have a far more pronounced one ( $\epsilon \approx < 30\%$ ). The compressive curve is deviating into a nonlinear course, which may mean that the densification of the PFS starts at this point.<sup>25</sup>

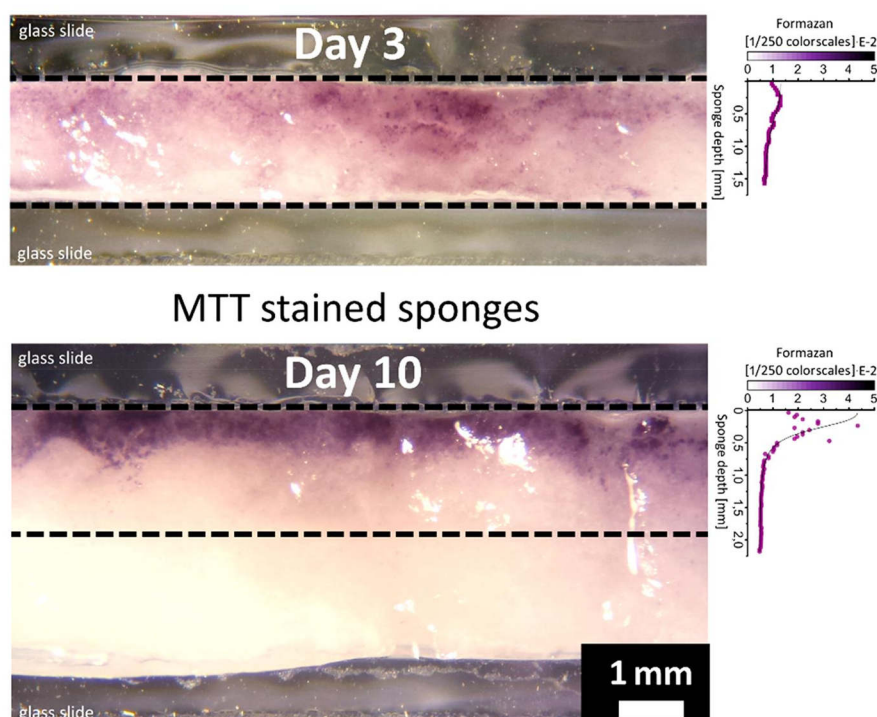
The elasticity of a PFS, depending on its density and the influence of physical cross-linking is shown in Figure 3B. The manually evaluated percentage height loss of these PFS is illustrated in Figure 3D. In Figure 3C, the loss in sponge height versus the number of applied compression cycles is shown for the PFS with their different densities and three different maximum compressions  $\epsilon$  (30%, 50%, and 80%) applied.

To give an insight into the mechanical performances of our sponges in physiological medium, mechanical compression tests of a PLA and a 9:1 PLA/PCL sponge, immersed in 1X PBS solution after plasma treatment, were performed. The results of these stress–strain experiments are shown in the Supporting Information (Figure SI-10). The PLA/PCL sponge, thermally treated at 60 °C shows higher mechanical strength than a PLA sponge with equal fiber density, treated at 130 °C. Compared to sponges measured after immersion in 1X PBS it becomes evident, that, though the mechanical strength is slightly reduced, the elasticity behavior for both sponge systems seems to be improved in physiological medium. Long-term influences of the physiological medium onto the elasticity of the sponges are yet to be done in the future.

A PLA/PCL sponge (No. 9) that was stored in ethanol solution did not lose its structural integrity over one and a half



**Figure 4.** Photographic images taken of contact angle measurements (A) before plasma and (B) after plasma treatment (C; purple) by using a 9:1 PLA/PCL sponge slice (sponge 13). The central image shows transformation of a dry, untreated PFS (sponge 12) into a spongy gel<sup>28</sup> after Plasma treatment and water uptake. (B) Water droplet absorption speed for plasma treated PFS (sponge 13).



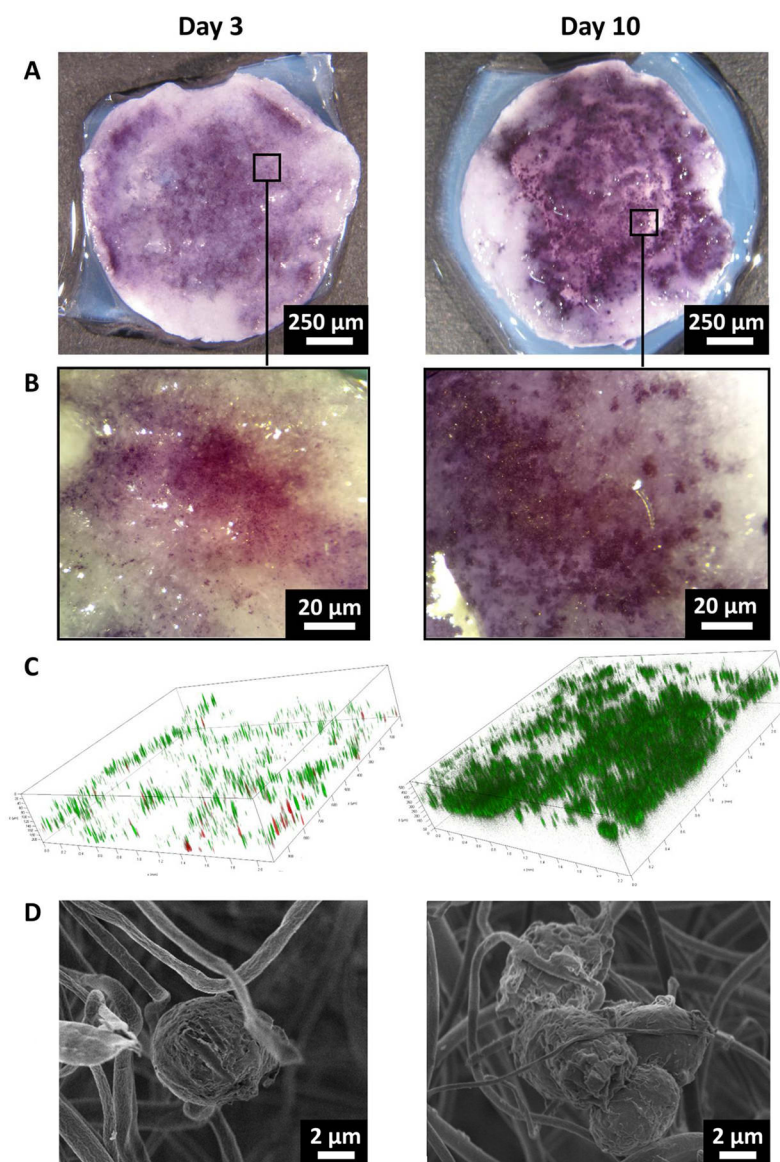
**Figure 5.** Digital color scale analysis of photographic images taken of Jurkat cell cultured and MTT stained sponge sample cross sections.

years. It is still structurally intact and does withstand high physical stress such as high frequent shaking (video 3 PLAPCL Sponge (9,10) Stability Comparison). A PLA/PCL sponge shows excellent reversible compressibility behavior not only in the dry but also in the wet state (video 4 PLAPCL sponge 11 Compression in EtOH). A PFS that is soaked in EtOH or water looks like a hydrogel (No. 12, Figure 4, center). Sponges only suffer from shrinking effects when they are taken out of solution and dried with or without vacuum. To reuse a solution soaked PFS and keep its original size, it just needs to be freeze-dried again.

**Contact Angle Measurements.** Contact angle measurements were performed using 9:1 PLA/PLC PFS slice samples (No. 13, Figure 4A). The polymers used, hence also the PFS, per se are hydrophobic, but a PFS can be easily hydrophilized (Figure 4B) using Plasma treatment (Figure 4C).

The possibility to use Plasma is an excellent opportunity as it allows rapid and easy functionalization of PFS. It is a noninvasive method, as it does not harm the bulk properties and the structural integrity of the fibers.<sup>38</sup> The contact angle and the water droplet absorption after plasma treatment is shown. As the droplet is absorbed by the hydrophilized PFS, its time depending droplet absorption was investigated. Using an





**Figure 6.** Cell-culturing results of 9:1 PLA/PCL sponge 14 after three and 10 days of incubation. Comparison between images taken of Jurkat cell-cultured PFS samples with (A) Overview MTT stained PFS, (B) Close up MTT stained PFS, (C) Live/Dead CLSM, and (D) SEM images.

untreated PFS, a mean contact angle of  $139.7 (\pm 4)^\circ$  out of ten measurements was recorded, whereas a plasma treated PFS is able to completely soak up a water droplet within six seconds. An ideal cylindrical PFS with  $5.2 \text{ cm}^3$  volume (No. 12, Figure 4, center) is completely soaked with water in less than 30 s (video 5 Same PLAPCL Sponge 12 after Plasma). A direct comparison of the same PFS before and after plasma treatment immersed in water is shown. For this PFS, a weight based water absorption capacity of  $57.3 (\pm 1.0) \text{ g/g}$  was calculated that correlates to a Specific Pore Volume (SPV) based water uptake capacity of  $87 (\pm 1.5) \%$ . According to this calculation about 13% of the FPS pore volume is still filled with air. The weight based water absorption value recorded corresponds to a mass increase of more than 5700%.

**Cell Seeding and Cell Proliferation.** Healing is challenging in cases where bigger tissue defects need to be repaired and the self-healing process by the human body

becomes strongly limited. To promote the healing process and to enable a full regeneration of the lost tissue, an artificial ECM has to be provided to serve as structural basis (scaffold) where complete tissue regeneration can take place. Effective cell seeding throughout the tissue scaffold often determines the success of tissue-engineering products. In this context beside the cell survival/proliferation, the cell distribution and infiltration is a major concern.

In order to demonstrate the high applicability of the prepared PFS for TE applications, cell culturing experiments were performed on FCS pretreated 9:1 PLA/PCL sponge slices (No. 14). FCS treatment of the PFS samples prior to cell experiments was performed as a prewetting step, as plasma treatment for PFS hydrophilization was not used at the very first stages of PFS characterization. In order to explore whether cells could survive and grow in the PFS, nonadherent Jurkat cells were used as a model cell system. The MTT assay is a



method for rapid and reliable determination of viable cell densities with a minimum of experimental effort and was therefore the method of choice to first analyze the efficiency of cell seeding in the PFS. The tetrazolium salt is converted by metabolically active cells into a purple insoluble formazan, which remains within the cell, and thus images of the purple-stained cells can be obtained. The cell depth penetration was analyzed for two MTT stained samples, after three and ten days of cultivation. A manual digital image analysis was applied for evaluation. Sponge cross sections were used for sample imaging. The sponges were gently stored between two glass slides with the maxims top facing up (Figure 5). A clearly visible penetration of cells into the scaffold can be found. The digital cell depth evaluation was done by analyzing the colorscales of Formazan in different sponge depths. Therefore, the images were divided into 280 (Day 3) and 390 (Day 10) individual raster graphics, each six pixels in height. For each raster graphic, a colorscale histogram was extracted and fit statistically. The maximum of each fit was plotted and attached to the right-hand side of each sponge image used for evaluation. A graph showing both color scale evaluation results in one plot was added to the Supporting Information (Figure SI-14).

At this stage of investigation, the preparation of sponge slice samples was done manually, using sponges in a nonfrozen, dry state, which resulted in hard to control sponge slice dimensions. Hence, the sponge slice that was used for sample Day 3 is about 1.9 mm in height, whereas the thickness of the sponge sample used for Day 10 is about 4.1 mm. Only a small number of cells seem to be present in higher sponge depths, as can be derived from a fading coloration toward deeper sample areas. The cross-sectional image taken of sample Day 3 shows a weak coloration of the incubated scaffold, indicating a small number of cells present inside the sponge during that time. Formazan coloration already indicates that higher cell concentrations close to the samples surface seem to be present. The plot of the sponge coloration evaluation result supports this impression. Eye-catching differences in cell concentration depending on the time of cultivation can be evidenced comparing both samples. The strong coloration of sample Day 10 indicates a strong increase in cell number and cell density. However, the high density of cells that can be evidenced seems to be partly limited to the area close to the sponge surface in a range of up to 1.0 mm depth. As the proliferation efficiency is strongly dependent on nutrient exchange with the surrounding medium, we conclude an effective penetration depth of nutrients of 1.0 mm to the surface for the static incubation applied. Cells deposited in higher sample depths were not able to proliferate in such an extent, which results in sharply fading Formazan coloration intensity toward deeper sponge areas.

Beside the cell depth penetration evaluation, a cultivation time dependent, qualitative Formazan concentration analysis was done using MTT stained sponges after 1, 3, 7, and 10 days of cultivation. Evaluation was performed by visible light spectroscopy after extraction of Formazan from the cells of each sample (Figure SI-15).

The location of viable cells is clearly visible on the seeded PFS showing that the cells are not evenly distributed (Figure 6A and B). Furthermore, after 10 days of cultivation, the cells clearly proliferate as evidenced by an increase of the purple staining. In order to collect additional information about the degree of cell distribution and infiltration throughout the PFS, the progress of cell proliferation was evaluated by CLSM after Live/Dead staining of the samples (Figure 6C). We observed a

thick and spread-out distribution of cells along the upper (seeded side) surface of the scaffold after 10 days of culture, indicating significant cell growth. We determined a Live/Dead-ratio of 6.5:1 (24.000:3.680 cells) for 3 days and 11.900:1 (52.900:5 cells) for 10 days of cultivation. For each cell, a cell size of 11.5  $\mu\text{m}$  was used for cell quantity calculation. To allow direct comparison between both samples, the CLSM image size used for evaluation was adjusted to about  $3 \times 3.5$  mm real size, respectively. The images used for calculation are given in Figure SI-16. Since the cultivations were performed under static conditions, mass transfer limitation for cell nutrients/oxygen might be responsible for the observed lack of spreading of the cells into the PFS. The CLSM images reveal areas in the PFS where the cells did not grow. This might reflect an experimental artifact due to some inhomogeneities of the initial cell seeding. In addition, some "non-wetted zones" that occurred during the conditioning of the fibers with FCS prior to seeding might display a higher degree of hydrophobicity interfered with the cells proliferation. It could also be hypothesized that the fibers exert a sieving action during cell seeding, and in such a way slowing cell diffusion throughout the PFS and influencing a more uniform cell distribution. Finally, we used SEM to observe detailed cellular-sponge interactions. Figure 6D shows the ultrastructure with some cell-to-cell adhesion of the seeded PFS. However, it is difficult to translate such high-resolution images into reliable cell-distribution results.

With regard to the limited penetration depth of the cells, it becomes evident that a method has to be found for future experiments which allows for a controlled and homogeneous distribution of cells within the entire 3D-scaffold. Ideally, a homogeneous distribution of cells should be achieved prior to cell proliferation initiation. Dynamic seeding methods, involving movement of the cell solution through and around the scaffold might provide better cell coverage and subsequent growth than static seeding.<sup>42</sup>

Two different approaches could be used to apply PFS for TE purposes. The first, *in vivo* approach might include insertion of a bare, plasma-treated PFS into the wound, where the autologous cells migrate into and autonomously initiate proliferation and tissue formation. The second, *ex vivo* approach includes the use of a plasma-treated PFS that gets seeded with a patient's own cells growing *in vitro* for a couple of days prior to wound insertion. Our results present the first steps toward the development of the latter. The suitability of the PFS for direct implantation without preseeding of cells (i.e., *in vivo* approach) must still be tested. Which of those fairly different approaches might be suitable, for the utilization of PFS in TE, will have to be weighed out in the future, as both comprise different ad- and disadvantages.

## CONCLUSIONS

The fabrication concept to produce 3D natural sponge-like scaffolds out of PLA or a polylactide/polycaprolactone blend polymer fibers is presented. Both polymers have already been used for a couple of different medical devices which were FDA approved and provide a well-known degradation process. The sponges presented come up with good reversible compressibility and fast recovery from deformation in the dry as well as the wet state. The sponges are easy to handle and can be modified by controllable, cost-effective, noninvasive methods to adjust the surface and inner wettability, the mechanical strength, and framework density, and, hence, the specific pore volume of the sponges. Very importantly, the wettability of the



sponges by liquid media could be adjusted by plasma treatment. By using the presented sponge fabrication concept it should be possible to use almost every kind of polymer or polymer blend system and form it into a comparable elastic fiber based sponge.

The sponge concept allows for fabrication of individually size- and shape-tunable sponges that are capable of automatically spanning an entire tissue defect. The sponges presented combine a stable, multiple physically cross-linked 3D-fiber framework with a direction independent highly open porous structure. These characteristics facilitate convection of fluids within the entire scaffold. This is highly important with regard to Tissue Engineering applications as mass transfer of cell nutrients and oxygen and metabolic waste exchange are crucial factors.<sup>43</sup> These sponges might also successfully support revascularization processes *in vivo*. Moreover, prevascularization strategies using endothelial progenitor cells and angiogenic factors could be developed to produce larger preseeded sponges,<sup>44</sup> though this is a highly demanding task and a still very challenging issue that has to be faced in future research.<sup>45</sup>

Hydrophilization of sponges by Plasma treatment as presented enables rapid and easy functionalization of sponges, which could allow for a huge variety of different chemical and biochemical modifications. Successful cell culturing experiments using Jurkat suspension cells were performed and analyzed by Confocal Laser Scanning Microscopy. A fast proliferation and a high level of living cells were detected.

Taking everything into account, fast prototyping of a user-adjustable, target-shaped artificial extracellular matrix comes within reach and offers highly exciting prospects for future Tissue Engineering applications.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: [10.1021/acs.biomac.8b00434](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00434).

Effects of solvents, polycaprolactone amount, and annealing conditions on the formation and stability of the corresponding sponges, images of short fibers, 3D printed aids used for controlled freezing of fiber dispersions, thermal transitions and phase transition data, compressibility of dry and wet (by PBS) sponges, porosity, pore size distribution and density calculations; quantitative cell penetration depth analysis from MTT stained sponges, visible light spectroscopic results of Formazan extracted from MTT stained sponge slice samples after 1, 3, 7, and 10 days of cultivation and CLSM images used for quantitative Live/Dead analysis of Jurkat cell cultured sponges after 3 and 10 days of cultivation (PDF)

Video of PLA/PCL sponge 1 dry compression (AVI)

Video of PLA/PCL sponge 2 on a Marabu feather (AVI)

PLAPCL Sponge 9,10 Stability Comparison (AVI)

Video of PLA/PCL sponge 11 in EtOH compression (AVI)

Video of same PLAPCL sponge 12 before and after plasma treatment (AVI)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Tel.: +49-921-553399. Fax: +49-921-553393. E-mail: [greiner@uni-bayreuth.de](mailto:greiner@uni-bayreuth.de) (A. Greiner).

## ORCID

Ruth Freitag: [0000-0003-4642-897X](https://orcid.org/0000-0003-4642-897X)

Seema Agarwal: [0000-0002-3174-3152](https://orcid.org/0000-0002-3174-3152)

## Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful for the financial support by DFG (GIP project). The possibility to measure CLSM and to use the Plasma oven at the Department of Physical Chemistry I is kindly acknowledged. Part of this work was presented at the Electrospinning COST Action MP1206 in Nicosia, Cyprus, April 19, 2017.

## ■ REFERENCES

- O'Brien, F. J. *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Mater. Today* **2011**, *14* (3), 88–95.
- Theocharis, A. D.; Skandalis, S. S.; Gialeli, C.; Karamanos, N. K. Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2016**, *97*, 4–27.
- Bajaj, P.; Schweller, R. M.; Khademhosseini, A.; West, J. L.; Bashir, R. 3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2014**, *16*, 247–276.
- Chen, G.; Sato, T.; Ushida, T.; Ochiai, N.; Tateishi, T. Tissue engineering of cartilage using a hybrid scaffold of synthetic polymer and collagen. *Tissue Eng.* **2004**, *10* (3–4), 323–330. [10.1089/107632704323061681](https://doi.org/10.1089/107632704323061681)
- Chung, H. J.; Park, T. G. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59* (4–5), 249–262.
- He, X.; Kawazoe, N.; Chen, G. Preparation of cylinder-shaped porous sponges of poly(L-lactic acid), poly(DL-lactic-co-glycolic acid), and poly( $\epsilon$ -caprolactone). *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 106082.
- Pan, Z.; Ding, J. Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Interface Focus* **2012**, *2* (3), 366–377.
- Wang, W.; Li, B.; Li, Y.; Jiang, Y.; Ouyang, H.; Gao, C. In vivo restoration of full-thickness cartilage defects by poly(lactide-co-glycolide) sponges filled with fibrin gel, bone marrow mesenchymal stem cells and DNA complexes. *Biomaterials* **2010**, *31* (23), 5953–5965.
- Zhou, Q.; Gong, Y.; Gao, C. Microstructure and mechanical properties of poly(L-lactide) scaffolds fabricated by gelatin particle leaching method. *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *98* (3), 1373–1379.
- Chen, W.; Yu, H.; Li, Q.; Liu, Y.; Li, J. Ultralight and highly flexible aerogels with long cellulose I nanofibers. *Soft Matter* **2011**, *7* (21), 10360.
- Meng, Y.; Young, T. M.; Liu, P.; Contescu, C. I.; Huang, B.; Wang, S. Ultralight carbon aerogel from nanocellulose as a highly selective oil absorption material. *Cellulose* **2015**, *22* (1), 435–447.
- Wang, S.; Peng, X.; Zhong, L.; Tan, J.; Jing, S.; Cao, X.; Chen, W.; Liu, C.; Sun, R. An ultralight, elastic, cost-effective, and highly recyclable superabsorbent from microfibrillated cellulose fibers for oil spillage cleanup. *J. Mater. Chem. A* **2015**, *3* (16), 8772–8781.
- Zhang, Z.; Sèbe, G.; Rentsch, D.; Zimmermann, T.; Tingaut, P. Ultralightweight and Flexible Silylated Nanocellulose Sponges for the Selective Removal of Oil from Water. *Chem. Mater.* **2014**, *26* (8), 2659–2668.
- Murphy, S. V.; Atala, A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32* (8), 773–785.
- Ma, P. X.; Choi, J. W. Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network. *Tissue Eng.* **2001**, *7* (1), 23–33.
- Richards, E.; Rizvi, R.; Chow, A.; Naguib, H. Biodegradable Composite Foams of PLA and PHBV Using Subcritical CO<sub>2</sub>. *J. Polym. Environ.* **2008**, *16* (4), 258–266.
- Calimeri, T.; Battista, E.; Conforti, F.; Neri, P.; Di Martino, M. T.; Rossi, M.; Foresta, U.; Piro, E.; Ferrara, F.; Amorosi, A.; Bahlis, N.;



- Anderson, K. C.; Munshi, N.; Tagliaferri, P.; Causa, F.; Tassone, P. A unique three-dimensional SCID-polymeric scaffold (SCID-synth-hu) model for in vivo expansion of human primary multiple myeloma cells. *Leukemia* **2011**, *25* (4), 707–711.
- (18) (a) Croisier, F.; Jérôme, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49* (4), 780–792. (b) Yang, T.-L. Chitin-based materials in tissue engineering: applications in soft tissue and epithelial organ. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12* (3), 1936–1963.
- (19) Lim, J. I.; Park, H.-K. Fabrication of macroporous chitosan/poly(L-lactide) hybrid scaffolds by sodium acetate particulate-leaching method. *J. Porous Mater.* **2012**, *19* (3), 383–387.
- (20) (a) Madani, A.; Zeinoddini, S.; Varahmi, S.; Turnbull, H.; Phillion, A. B.; Olson, J. A.; Martinez, D. M. Ultra-lightweight paper foams. *Cellulose* **2014**, *21* (3), 2023–2031. (b) Moss, T.; Paulus, I. E.; Raps, D.; Altstadt, V.; Greiner, A. Ultralight sponges of poly(paraxylylene) by template-assisted chemical vapour deposition. *e-Polym.* **2017**, *17* (4), 1138.
- (21) Jiang, S.; Agarwal, S.; Greiner, A. Low-Density Open Cellular Sponges as Functional Materials. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 1552010.1002/anie.201700684
- (22) Dong, C.; Lv, Y. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering. Recent Advances and New Perspectives. *Polymers* **2016**, *8* (2), 42.
- (23) Greiner, A.; Wendorff, J. H. Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46* (30), 5670–5703.
- (24) Sun, B.; Jiang, X.-J.; Zhang, S.; Zhang, J.-C.; Li, Y.-F.; You, Q.-Z.; Long, Y.-Z. Electrospun anisotropic architectures and porous structures for tissue engineering. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (27), 5389–5410.
- (25) Si, Y.; Yu, J.; Tang, X.; Ge, J.; Ding, B. Ultralight nanofiber-assembled cellular aerogels with superelasticity and multifunctionality. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5802.
- (26) Si, Y.; Fu, Q.; Wang, X.; Zhu, J.; Yu, J.; Sun, G.; Ding, B. Superelastic and superhydrophobic nanofiber-assembled cellular aerogels for effective separation of oil/water emulsions. *ACS Nano* **2015**, *9* (4), 3791–3799.
- (27) Duan, G.; Jiang, S.; Jérôme, V.; Wendorff, J. H.; Fathi, A.; Uhm, J.; Altstadt, V.; Herling, M.; Breu, J.; Freitag, R.; Agarwal, S.; Greiner, A. Ultralight, Soft Polymer Sponges by Self-Assembly of Short Electrospun Fibers in Colloidal Dispersions. *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25* (19), 2850–2856.
- (28) Jiang, S.; Duan, G.; Kuhn, U.; Morl, M.; Altstadt, V.; Yarin, A. L.; Greiner, A. Spongy Gels by a Top-Down Approach from Polymer Fibrous Sponges. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56* (12), 3285–3288.
- (29) Duan, G.; Jiang, S.; Moss, T.; Agarwal, S.; Greiner, A. Ultralight open cell polymer sponges with advanced properties by PPX CVD coating. *Polym. Chem.* **2016**, *7* (15), 2759–2764.
- (30) (a) Duan, G.; Bagheri, A. R.; Jiang, S.; Golenser, J.; Agarwal, S.; Greiner, A. Exploration of Macroporous Polymeric Sponges As Drug Carriers. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (10), 3215–3221. Duan, G.; Koehn-Serrano, M.; Greiner, A. Highly Efficient Reusable Sponge-Type Catalyst Carriers Based on Short Electrospun Fibers. *Macromol. Rapid Commun.* **2017**, *38* (3), 160051110.1002/marc.201600511
- (31) Jiang, S.; Uch, B.; Agarwal, S.; Greiner, A. Ultralight, Thermally Insulating, Compressible Polyimide Fiber Assembled Sponges. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (37), 32308–32315.
- (32) Jiang, S.; Reich, S.; Uch, B.; Hu, P.; Agarwal, S.; Greiner, A. Exploration of the Electrical Conductivity of Double-Network Silver Nanowires/Polyimide Porous Low-Density Compressible Sponges. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (39), 34286–34293.
- (33) Chen, W.; Chen, S.; Morsi, Y.; El-Hamshary, H.; Newhy, M. E.; Fan, C.; Mo, X. Superabsorbent 3D scaffold based on electrospun nanofibers for cartilage tissue engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 2441510.1021/acsami.6b06825
- (34) Chen, W.; Ma, J.; Zhu, L.; Morsi, Y.; El-Hamshary, H.; Al-Deyab, S. S.; Mo, X. Superelastic, superabsorbent and 3D nanofiber-assembled scaffold for tissue engineering. *Colloids Surf., B* **2016**, *142*, 165–172.
- (35) Xu, T.; Miszuk, J. M.; Zhao, Y.; Sun, H.; Fong, H. Electrospun polycaprolactone 3D nanofibrous scaffold with interconnected and hierarchically structured pores for bone tissue engineering. *Adv. Healthcare Mater.* **2015**, *4* (15), 2238–2246.
- (36) Yao, Q.; Cosme, J. G. L.; Xu, T.; Miszuk, J. M.; Picciani, P. H. S.; Fong, H.; Sun, H. Three dimensional electrospun PCL/PLA blend nanofibrous scaffolds with significantly improved stem cells osteogenic differentiation and cranial bone formation. *Biomaterials* **2017**, *115*, 115–127.
- (37) Chen, L.; Bai, Y.; Liao, G.; Peng, E.; Wu, B.; Wang, Y.; Zeng, X.; Xie, X. Electrospun poly(L-lactide)/poly( $\epsilon$ -caprolactone) blend nanofibrous scaffold: characterization and biocompatibility with human adipose-derived stem cells. *PLoS One* **2013**, *8* (8), e71265.
- (38) Morent, R.; Geyter, N. de; Desmet, T.; Dubruel, P.; Leys, C. Plasma Surface Modification of Biodegradable Polymers. A Review. *Plasma Processes Polym.* **2011**, *8* (3), 171–190.
- (39) Werner, M.; Schmoltdt, D.; Hilbrig, F.; Jérôme, V.; Raup, A.; Zambrano, K.; Hübner, H.; Buchholz, R.; Freitag, R. High cell density cultivation of human leukemia T cells (Jurkat cells) in semipermeable polyelectrolyte microcapsules. *Eng. Life Sci.* **2015**, *15* (4), 357–367.
- (40) Berhan, L.; Sastry, A. M. Modeling percolation in high-aspect-ratio fiber systems. I. Soft-core versus hard-core models. *Phys. Rev. E: Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **2007**, *75* (4 Pt 1), 41120.
- (41) Sperling, L. H. *Introduction to physical polymer science*; Wiley: Hoboken, NJ, 2006.
- (42) van den Dolder, J.; Spauwen, P. H. M.; Jansen, J. A. Evaluation of various seeding techniques for culturing osteogenic cells on titanium fiber mesh. *Tissue Eng.* **2003**, *9* (2), 315–325.
- (43) Yuksel, E.; Choo, J.; Wettergreen, M.; Liebschner, M. Challenges in Soft Tissue Engineering. *Seminars in Plastic Surgery* **2005**, *19* (03), 261–270.
- (44) Wong, H. K.; Ivan Lam, C. R.; Wen, F.; Mark Chong, S. K.; Tan, N. S.; Jerry, C.; Pal, M.; Tan, L. P. Novel method to improve vascularization of tissue engineered constructs with biodegradable fibers. *Biofabrication* **2016**, *8* (1), 15004.
- (45) (a) Place, E. S.; Evans, N. D.; Stevens, M. M. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat. Mater.* **2009**, *8* (6), 457–470. (b) Lovett, M.; Lee, K.; Edwards, A.; Kaplan, D. L. Vascularization strategies for tissue engineering. *Tissue Eng., Part B* **2009**, *15* (3), 353–370.

## Supporting Information

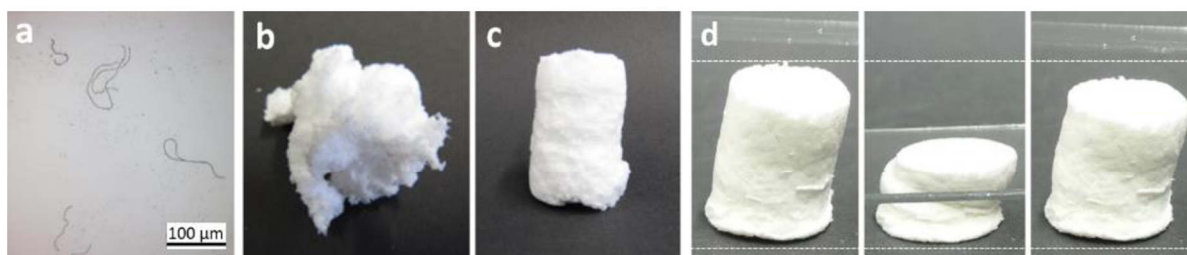
### Ultraporous, compressible, wettable polylactide/polycaprolactone sponges for tissue engineering

Michael Mader,<sup>a</sup> Valérie Jérôme,<sup>b</sup> Ruth Freitag,<sup>b</sup> Seema Agarwal,<sup>a</sup> and Andreas Greiner<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Macromolecular Chemistry and Bavarian Polymer Institute, University of Bayreuth, Universitätsstrasse 30, 95440 Bayreuth, Germany

<sup>b</sup>Process Biotechnology, University of Bayreuth, 95440, Bayreuth, Germany

The overall aim of the presented work was to create a PLA based PFS system. Hence, the first experiments were done using PLA fibers. The fibers were cut in a glass blender device until a homogeneous dispersion of fibers with a ratio of fiber diameter to fiber length of around 1/150  $\mu\text{m}$  was obtained (Fig. SI-1a, SI-2a-c).

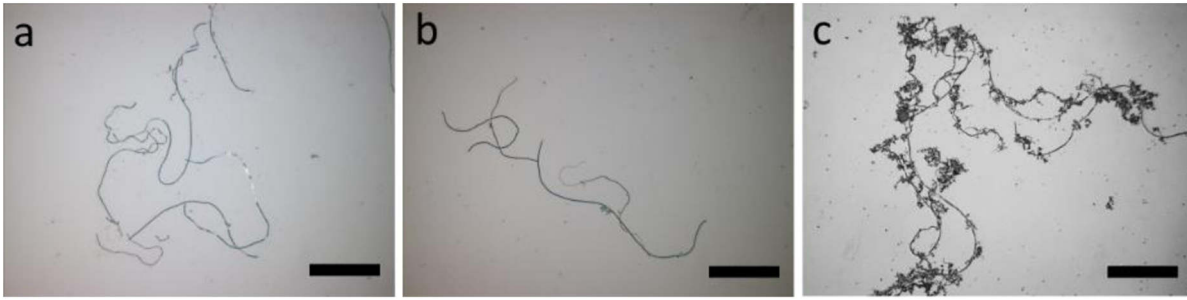


**Figure SI-1.** Microscopic images of (a) PLA cut fibers. Freeze-drying residues achieved using (b) H<sub>2</sub>O (sponge 15) and (c) 1:1 H<sub>2</sub>O/tBuOH as dispersion medium (sponge 16). (d) Compression of a PLA sponge (sponge 17).

In order to achieve appropriate fiber-dispersion homogeneity, an anti-solvent combination has to be used that is capable of wetting PLA and offers an appropriate density that suits to the density of the fibers to limit flocculation processes. The use of PLA fibers in water, as example of a dispersion medium which is not capable of wetting PLA, results in freeze dried fiber residues without any structural integrity (N° 15, **Fig. SI-1b**). Using a binary mixture of 1:1 (v/v) H<sub>2</sub>O/tBuOH as anti-solvent system, PLA fiber residues with an at least standalone structural integrity are achieved (N° 16, **Fig. SI-1c**) as a more homogeneous fiber dispersion is generated and flocculation is reduced. This was further enhanced with increasing tBuOH content (N° 17, **Fig. SI-1d**). Finally, the use of a binary solvent mixture of 1:4 H<sub>2</sub>O/tBuOH turned out to be a well working solvent system to create homogeneous blend fiber dispersions. Therefore, the dispersion medium composition has been kept constant during the first instance of PFS development to grant internal comparability. The used dispersion system was kept, as it is capable of wet the fibers, being suitable for freezing, compatible with the freeze-dryer and thus allows easy controllable rapid sponge prototyping.

Beside elastic PLA/PCL blend PFS (**Fig. 2E**), even PLA sponge with elastic properties can be achieved by thermal annealing of the FD residue, as shown in **Figure SI-1d**. The density of the PLA/PCL blend fibers is expected to be in a range between pure PCL (1.13 g/cm<sup>3</sup>, 23°C) and pure PLA (1.22 g/cm<sup>3</sup>), but has not been measured yet. Due to the density difference between fibers and the dispersion medium ( $\rho \approx 0.97 \text{ g/cm}^3$ )<sup>46</sup> an slowly emerging sedimentation process during sponge production cannot be prevented for low fibers densities, but limited if the freezing process is fast enough.





**Figure SI-2.** Image of cut (a) 9:1, (b) 3:1 and (c) 1:1 PLA/PCL fibers used for PFS fabrication. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

All PFS were prepared using a temperature controlled EtOH bath between  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . For freezing in EtOH, 3D-printed cups out of PLA were used with a custom made dewer-cover to allow easy freeze processing and high reproducibility (**Fig. SI-3**).



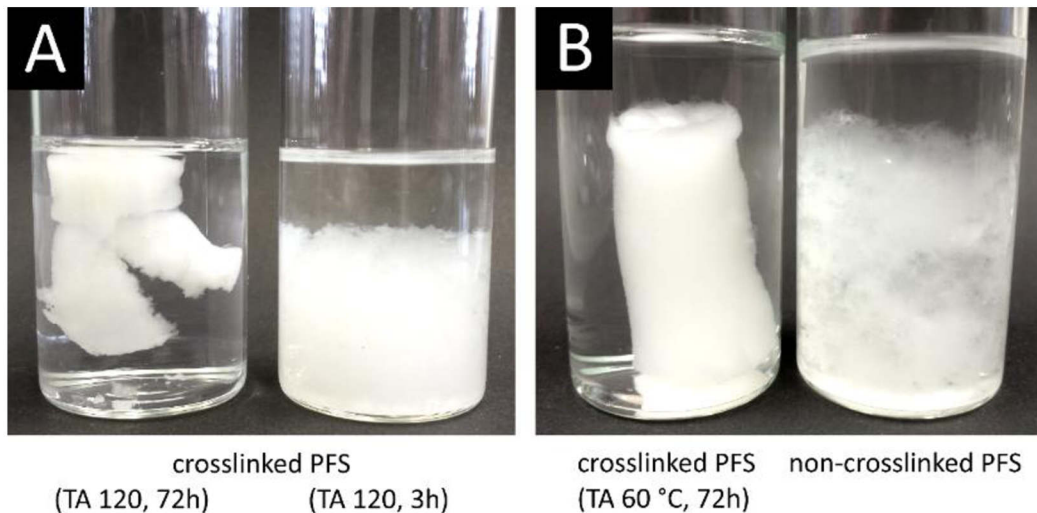
**Figure SI-3.** 3D printed aids used for controlled freezing of fiber dispersions.

All PLA freeze-drying residues produced were extremely sensible to pressure and shearing, whereupon even tiny forces lead to irreversible pressure marks. Regarding the lack of



reversible compressibility of the freeze-dried PLA residues it might be concluded that either the mechanical properties of the fibers are too weak or the fiber-fiber interconnectivity that is present after FD is insufficient. To evaluate which parameters are decisive to receive an elastic PFS, a blend system of PLA/PCL was used for direct comparisons. The PLA/PCL blend system offers an easy tunable polymer, represented by PLA, whose properties can be adjusted to improve the mechanical strength and the biodegradability of the system, combined with PCL, a rather gluey component that is supposed to facilitate fiber-fiber interconnectivity. As the glass transition temperature of PCL ( $T_g = -60\text{ °C}$ )<sup>47</sup> is far below room temperature, the polymer is in a stable but flexible adhesive-like state at atmospheric conditions, thus a better fiber interconnectivity is to be expected. As a matter of fact, the fabricated non-thermally treated PLA/PCL sponge are less sensitive to pressure and shearing forces and already do show slight reversible compressibility. Nevertheless, without a subsequent thermal treatment all non-crosslinked PFS based on PLA and PLA/PCL are far to pressure sensitive and thus not practically applicable. The latter becomes clear as rapid structural disintegration of non-crosslinked PLA and PLA/PCL blend PFS residues takes place as soon as they are immersed and shaken in a PLA wettable dispersion medium e.g. alcohol. These observations demonstrate that enhancing the fiber interconnectivity should result in better reversibility characteristics of the system. One well-thought-out approach would allow inter-fiber crosslinking without the need of a complex chemical crosslinking agent. Therefore, the most promising ideas to get a working sponge were the following: Firstly, treating the fibers in a TA process to increase crystallinity is one of the best non-invasive techniques to enhance the mechanical properties of a polymer.<sup>48-50</sup> Secondly, the use of a method to increase fiber-fiber interconnectivity that can guarantee a subsequent bendability of the sponge without structural disintegration is necessary.

**Structural integrity of sponges.** After applying a TA process to non-crosslinked PFS the formation of physically interconnected fibers can be experimentally evidenced (**Fig. 3**) by comparing thermally treated (N° 9) and non-treated PFS (N° 10) immersed in EtOH. The structural integrity of the PFS upon shaking is strongly dependent on the polymer system that is used. For PLA sponges the temperature and the running duration of the TA process applied are decisive. A non-crosslinked PLA/PCL sponge shows a standalone structural integrity after being immersed, it withstands slight shaking, but no strong shaking forces without disintegrating, yet. This observation already underlines the improved structural stability compared to an equally treated non-crosslinked PLA sponge which is disintegrating almost autonomously after being immersed in EtOH. The PLA/PCL sponge (N° 9) does not disintegrate in EtOH anymore after being treated at 60 °C, even after applying strong shaking forces (**Fig. 4B**, video PLAPCL Sponge 9,10 Stability Comparison). This is still true, after 18 months of storage. A PLA sponge (N° 18) that was thermally treated at 120 °C for three hours shows reversible compressibility but it still disintegrates easily upon shaking in solution (**Fig. SI-4A**). The overall stability against disintegration can be enhanced, as to be expected, by using higher TA durations and temperatures. The capability of not yet crosslinked PFS to sustain a standalone structural integrity in general, right after FD, can likely be traced back to random fiber entanglements. This is already shown, as a homogeneous PLA sponge after FD and without further treatments is almost as structurally self-sustaining as an equally treated non-crosslinked PLA/PCL blend PFS.

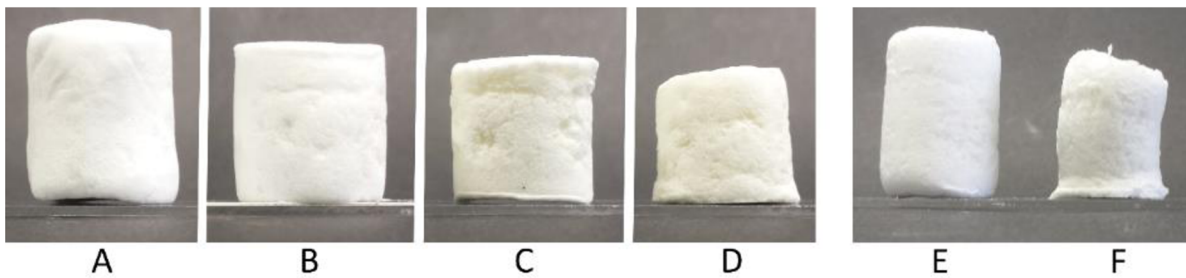


**Figure SI-4.** Structural Integrity of differently thermally treated (A) PLA sponge (sponges 18, 19) and (B) 9:1 PLA/PCL sponge (sponge 9, 10) stored in EtOH after shaking.

The structural integrity of a PLA sponge (N° 19), that was thermally treated for 72h at 120 °C, in solution, nevertheless, is still less pronounced compared to a PLA/PCL sponge which was thermally annealed at only 60 °C for one hour. The time scale that would be necessary to produce an equally structurally stable PLA sponge is yet to be investigated. Future developments in that field will comprise of finding a balance between treatment time, temperature and sponge shrinkage during TA (**Fig. SI-5, 6**).

During the research of this work, a focus on the fabrication of PLA/PCL polymer blends was set, as the maximum temperature of the TA process that must be applied to achieve an elastic PFS can be reduced to around 60 °C and since PLA/PCL sponges possess a higher structural integrity in solution. In addition to that an overall less pronounced shrinkage effect for PFS with low PCL content was found. Different compositions of PLA/PCL blend-systems have been investigated, including PLA/PCL sponges with 1:1, 3:1 and 9:1 weight ratio (w/w) to evaluate possible differences in the final sponge functionality. After application of an at least short-term TA of around 15 minutes at 60 °C, the reversible compressibility of all PLA/PCL sponges increases dramatically (not shown).

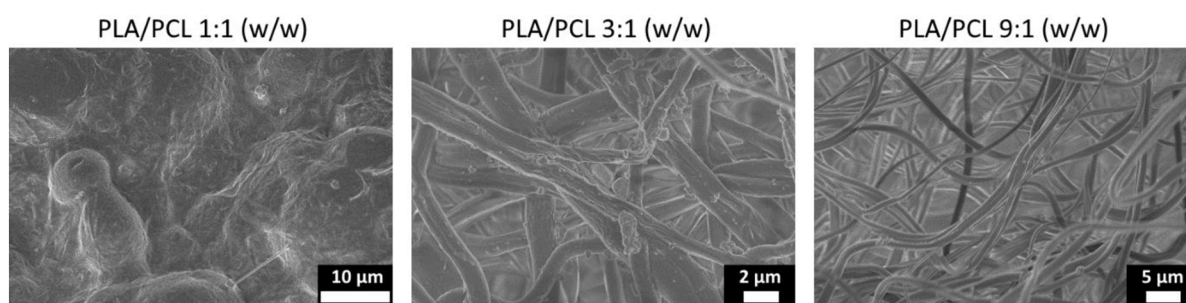
**Influence of PCL content on sponges.** To our findings, the PCL content is not a decisive factor regarding elasticity of the PFS. All PFS that were fabricated, independent from using high or low PCL weight content, show high elastic compressibility after TA. Unlike elasticity, the grade of sponge size shrinking during TA is sharply influenced by the weight fraction of PCL used. These findings are reflected in the fabrication technique used to produce electrospun PCL fiber based sponges published by Xu and Fong<sup>51</sup>. For PCL contents higher than 10 % (not shown), the results in a shape-irregular sponge shrinkage behavior, which makes it hard to predict the final sponge geometry and density which results in time-consuming sponge prototyping.



**Figure SI-5.** Temperature dependent sponge size shrinkage shown for (A) as-freeze-dried 9:1 PLA/PCL sponge (N° 20a-c) thermally annealed at (B) 60 °C, (C) 100 °C and (D) 120 °C for 72 h, respectively and a PLA sponge (N° 21a, b) (E) as-spun and (F) TA 120 °C (48 h).

Thus, no detailed studies using PFS with PCL contents higher than 10 % have been made. The basic PFS shrinkage for one PLA/PCL sponge (N° 20a-c) and one PLA sponge (N° 21a-b) upon TA is illustrated in **Figure SI-5**. Applying higher TA temperatures than 60 °C is not necessary<sup>48</sup> to achieve elastic behavior, as it just increases the maximum crystallinity of the sponge. An even lower grade of size shrinkage can be expected by further decreasing the PCL weight content, but also by reducing the TA temperature and its duration. The reasons for PFS shrinkage is reflected in **Figure SI-6**, showing PLA/PCL nonwovens of different composition after TA. They demonstrate the influence of PCL content on the fiber structure after applying

60 °C for 72 h. With increasing PCL content, it becomes increasingly difficult to maintain the fiber structure during TA treatment. The SEM images that are shown are samples of original PLA/PCL nonwovens used for PFS fabrication. The results depict how increasing PCL contents higher than 10 wt% lead to more and more irregular fiber melting.



**Figure SI-6.** SEM images showing the influence of the PCL weight content on the structural integrity of PLA/PCL blend-fibers of a nonwoven after applying 60 °C for 72 h. The scale bars represent 20 μm each.

For a 1:1 PLA/PCL blend the structure of the fibers is completely lost, 3:1 PLA/PCL fibers are at least recognizable as an assemblage of strongly interconnected fibers, but they have lost most of their former uniform fiber structure. The fiber nonwovens used for 9:1 PLA/PCL sponge show good shape-retaining properties upon TA.

**Influence of crystallinity on sponge functionality.** All DSC measurements of as-spun polymer fibers show rapid recrystallization at temperatures right after the glass transition temperature of PLA. The fact that the recrystallization of PLA in the 1<sup>st</sup> heating curve of the DSC process occurs at lower temperatures indicates that a lot of nucleation centers must be present in the polymer after electrospinning. This explanation is given in the work of Ribeiro and Sencadas et. al. who have investigated the influence on the morphology and crystallinity



of electrospun PLA fibers after short- and long-term low- and high-temperature thermal treatment.<sup>48</sup> According to their belief, these nucleation centers form during the ES process, promote and thus accelerate crystallization whereupon a strong increase of crystallinity is to be expected within the first 2 minutes after initiation of the TA process. The TA process and the increase of crystallinity which results therefrom, is expected to not play a major role regarding the reversible compressibility of a PFS due to the following reason. Even a short-term TA process applied to a PLA/PCL sponge facilitates a highly elastic behavior of the PFS. A PLA sponge, which was treated at 60 °C for 48 h, does not show an at least comparable elasticity after compression at all. Thus, it is expected that the grade of crystallinity mainly contributes to the mechanical strength of the PFS. The crystallinity of a 9:1 PLA/PCL sponge decisively increases from around 10 % in the as-spun state to 39 % after applying a long TA process at 60 °C for 72 h and can be further increased applying higher TA temperatures (DSC, **Fig. SI-7,8; Table SI-1**). The influence of crystallinity on the mechanical strength of a PLA/PCL sponge is yet to be investigated in detail.

**Thermal analysis of Polymers.**

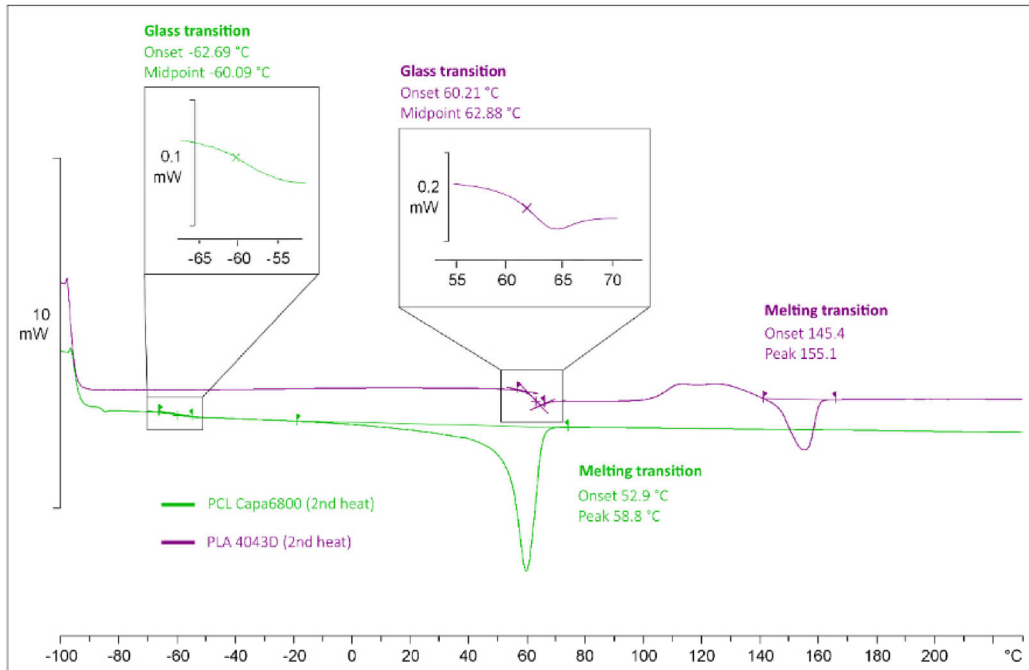


Figure SI-7. DSC measurements of PLA (Ingeo™ 4043D, NatureWorks LLC) and PCL (Capa™ 6800, Perstorp) 2<sup>nd</sup> heat curve.

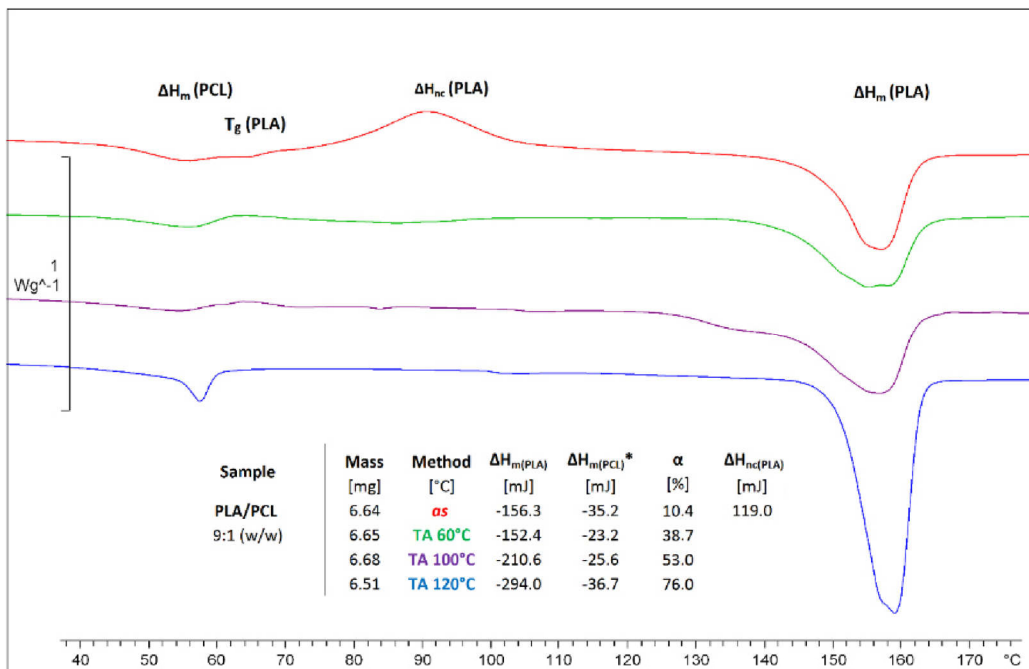
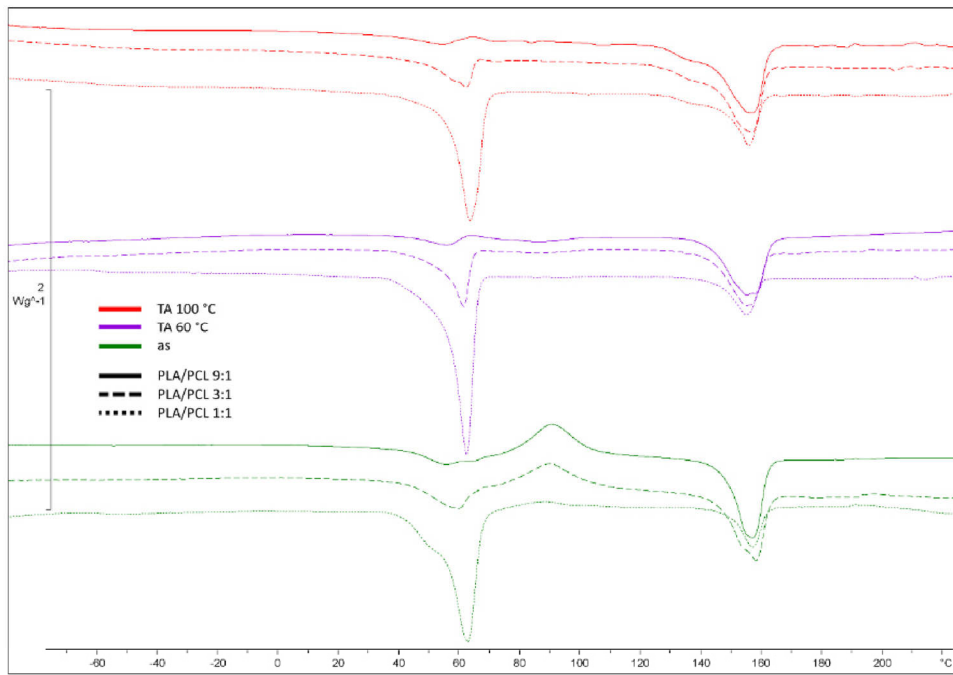
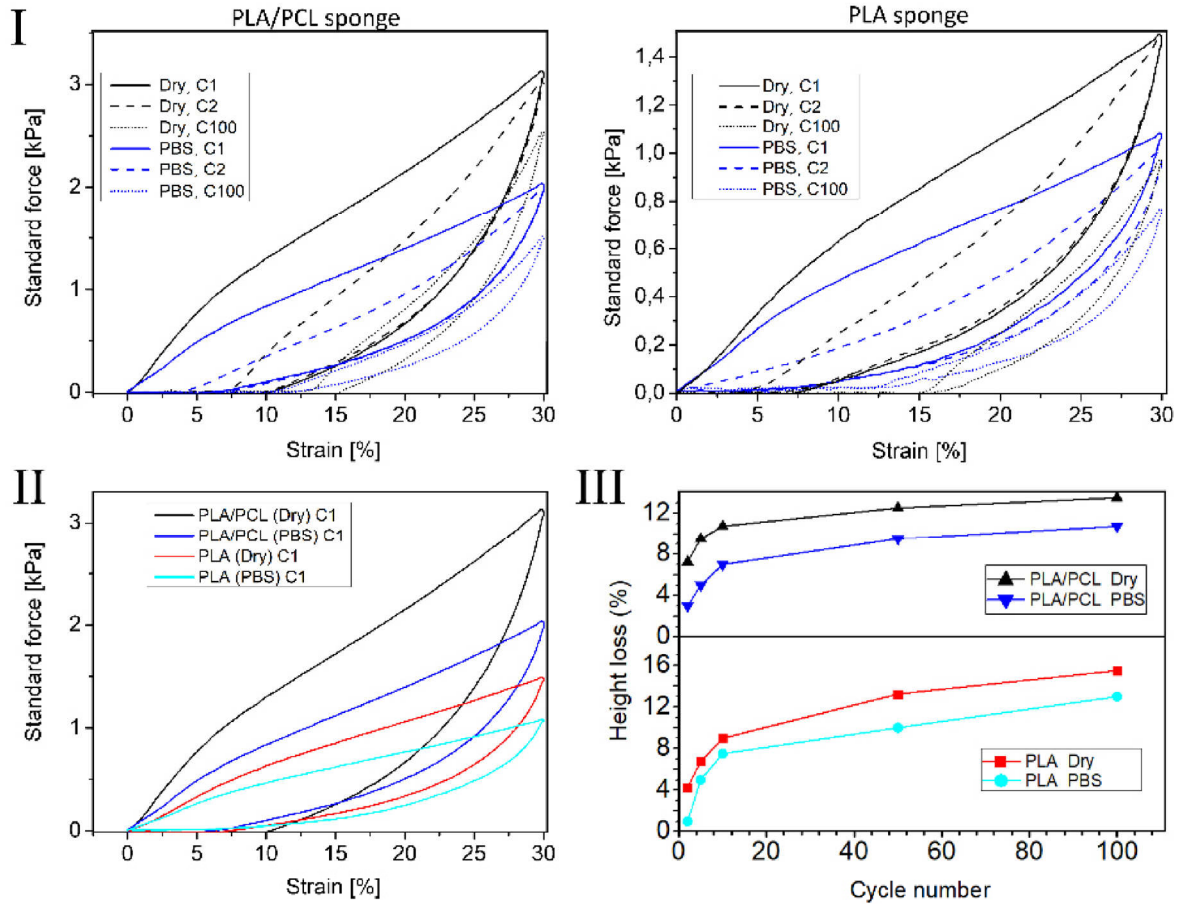


Figure SI-8. DSC measurements of 9:1 PLA/PCL fibers (1<sup>st</sup> heat curves) after TA at 60 °C, 100 °C and 120 °C in comparison to as-spun fibers.



**Figure SI-9.** DSC measurements of PLA/PCL 9:1, 3:1 and 1:1 fibers (1<sup>st</sup> heat curves) after TA at different temperatures.

**Compression experiments of sponges in PBS medium.**


**Figure SI-10.** Compressing reversibility testing results of sponges immersed in 1X PBS after up to 100 cycles of compression C with a maximum compression  $\varepsilon$  of 30%: (I) Comparison between dry- and wet-compression, (II) Comparison between all first dry- and wet-compressions of a PLA (sponge 22) and a PLAPCL sponge (sponge 23). (III) Height loss in relation to the number of stress loading cycles expressed as percentage height loss.

All sponges used for evaluation have a fiber density of  $16 \text{ mg/cm}^3$ , a diameter of 17.5 mm and height of about 15 mm.



**Table SI-1.** Data evaluated by DSC measurements of pure PLA and PCL, respectively, such as as-spun and thermally annealed 9:1, 3:1 and 1:1 PLA/PCL blends (72h).

| Sample                                   | Mass [mg] | Method [°C] | $\Delta H_{c(PLA)}$ [mJ] | $\Delta H_{nc(PLA)}$ [mJ] | $\Delta H_{m(PLA)}$ [mJ] | $\Delta H_{m(PCL)*}$ [mJ] | $\Delta H_m + \Delta H_{c/nc}$ (PLA) [mJ] | $\Delta H_m + \Delta H_{c/nc}$ (PCL) [mJ] | HoF <sub>(PLA/PCL)</sub> [J/g] | $\alpha$ [%] |
|--|-----------|-------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---|---|--------------------------------|--------------|
| PLA<br>(4043D)                           | 6.56      | as          | 140.2                    |                           | -157.48                  |                           | -6.9                                      |   | -1.0                           | 3            |
|  | 5.97      | TA 60°C     |                          |                           | -190                     |                           |   |   | -31.8                          | 64           |
|  | 6.45      | TA 100°C    |                          |                           |                          | -227.9                    |   | -227.9                                    |                                | 71.5         |
|  | 6.76      | TA 120°C    |                          |                           | -334.17                  |                           | -334.2                                    |   | -49.4                          | 100          |
| PCL<br>(Capa 6800)                       | 6.38      | TA 42°C     |                          |                           |                          | -551.3                    |   |   | -86.4                          | 100          |
|  | 6.62      | TA 120°C    | 4.5                      |                           |                          | -448.0                    |   | -443.5                                    | -67.0                          | 78           |
| PLA/PCL<br>1:1 (w/w)<br>± 20:21 (MW/MW)  | 6.7       | as          |                          | 39.5                      | -68.0                    | -279.2                    | -28.5                                     | -279.2                                    | -69.1                          | 35           |
|  | 6.62      | TA 60°C     |                          |                           | -66.8                    | -297.1                    | -66.8                                     | -297.1                                    | -69.1                          | 41           |
|  | 6.6       | TA 120°C    | 1.2                      |                           | -110.5                   | -223.9                    | -110.5                                    | -222.7                                    | -69.1                          | 37           |
| PLA/PCL<br>3:1 (w/w)<br>± 59:21 (MW/MW)  | 6.64      | as          |                          | 86.0                      | -146.9                   | -67.3                     | -60.9                                     | -67.3                                     | -59.6                          | 16           |
|  | 6.7       | TA 60°C     |                          |                           | -127.0                   | -96.5                     | -127.0                                    | -96.5                                     | -59.6                          | 30           |
|  | 6.61      | TA 120°C    |                          |                           | -245.3                   | -105.3                    | -245.3                                    | -105.3                                    | -59.6                          | 53           |
| PLA/PCL<br>9:1 (w/w)<br>± 178:21 (MW/MW) | 6.64      | as          |                          | 119.0                     | -156.3                   | -35.2                     | -37.3                                     | -35.2                                     | -53.6                          | 10           |
|  | 6.65      | TA 60°C     |                          |                           | -152.4                   | -23.2                     | -152.4                                    | -23.2                                     | -53.6                          | 39           |
|  | 6.68      | TA 100°C    |                          |                           | -210.6                   | -25.6                     | -210.6                                    | -25.6                                     | -53.6                          | 53           |
|  | 6.51      | TA 120°C    |                          |                           | -294.0                   | -36.7                     | -294.0                                    | -36.7                                     | -53.6                          | 77           |

$\Delta H_c$  = enthalpy of crystallization,  $\Delta H_{nc}$  = enthalpy of nucleation center promoted crystallization<sup>50</sup>,  $\alpha$  = polymer crystallinity, HoF = Heat of Fusion,  $\Delta H_m$  = melt enthalpy, TA = Thermal Annealing temperature, as = as-spun fibers, MW = Molecular weight.

The crystallinity of the polymer blends was calculated as follows: Melt enthalpy of melt and crystallization was summarized for blended PLA and PCL, respectively, to gain the origin melt enthalpy of the PLA and PCL blend-fraction before measuring and heating. The origin melt enthalpy of each of the polymer fractions was normalized to the mass of polymer used for measuring, which were normalized to the weight fraction of each polymer in the blend based on the molecular weight ( $M_w/M_w$ ) of PLA and PCL measured by MALLS GPC. The sum of these normalized values is denoted as Heat of Fusion (HoF) of the blend. Regarding  $\Delta H_m(PCL)*$  it must be annotated, that due to overlapping, the values of melt enthalpy used for calculation of PCL include the heat transfer of the glass transition of PLA. To calculate the maximum crystallinity of the blend systems, DSC data of pure polymers were used. Therefore, as-bought PLA was thermally treated at 120 °C, PCL at 42 °C for 72 h to reach maximum crystallinity.<sup>49,50</sup> As the polymers are immiscible on molecular scale, the maximum

crystallinity was calculated assuming that the polymers do not influence each other or the enthalpy changes during thermal treatment. The maximum crystallinity which is to be expected for a blend was calculated by summarizing the HoF of the pure polymers, normalized to the molecular weight based weight fraction. The crystallinity of both individual polymer fractions of a 9:1 PLA/PCL fiber (TA 60 °C, 72 h) is in a range of  $\alpha \approx 52\%$  (PLA) and  $\alpha \approx 36\%$  (PCL).

### Polymer fiber sponge characterization

**Porosity calculation of sponges.** The porosity P of the sponges fabricated was calculated according to the porosity defined by percolation threshold of fibers of a fibrillary structure with given length and radius as proposed by Berhan and Sastry<sup>40</sup>:

$$P = \left(1 - \frac{V}{V_{ex}}\right) \cdot 100\% \quad V = \frac{4\pi r^3}{3} + r^2 \pi L \quad V_{ex} = \frac{32\pi r^3}{3} + 8\pi L r^2 + \pi L^2 r$$

With:  $V$  Volume of the fiber,  $V_{ex}$  Excluded volume of the fiber

For the fabricated PFS systems a general fiber radius  $r$  of around  $0.5 \mu\text{m}$  was used, the fibers were cut into pieces with an average length  $L$  of around  $150 \mu\text{m}$ , whereof a value of Porosity  $P = 99.67\%$  can be calculated.

Alternative Porosity calculation formula: With regard to the more convenient sponge properties like fiber density and the density of the Bulk material, the following equation can be used:<sup>31</sup>

$$P = \left(1 - \frac{\rho_{SG}}{\rho_{bulk}}\right) \cdot 100\% \quad SPV = \frac{P}{\rho_{SG} \cdot 10^{-3}}$$

With:  $\rho_{SG}$  Density of the sponge,  $\rho_{bulk}$  Density of the bulk material, SPV Specific Pore Volume

**Density calculation of sponges.** The densities ( $\rho$ ) of the cylindrical shaped PFS were calculated by the following equation. The radius  $r$  and the height  $h$  of the PFS were measured using a Vernier scale.

$$\rho = \frac{m}{V_{\text{cyl.}}} = \frac{m}{\pi r^2 h}$$

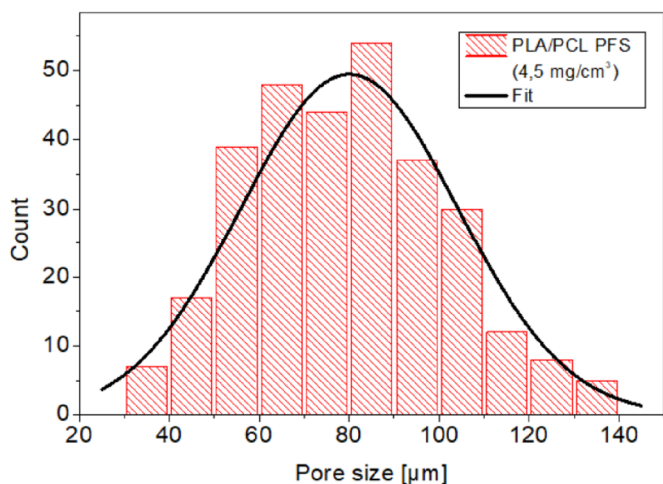
**Pore size distribution calculation.**

The diameter  $D_P$  of all pores evaluated from SEM images and the number of pores per unit volume of a sponge  $N_P$ , was calculated by<sup>52</sup>

$$D_P = \left[ \frac{\sum_{i=1}^n d_i^3}{n} \right]^{\frac{1}{3}} \quad N_P = \left( \frac{n \cdot M^2}{A} \right)^{\frac{3}{2}}$$

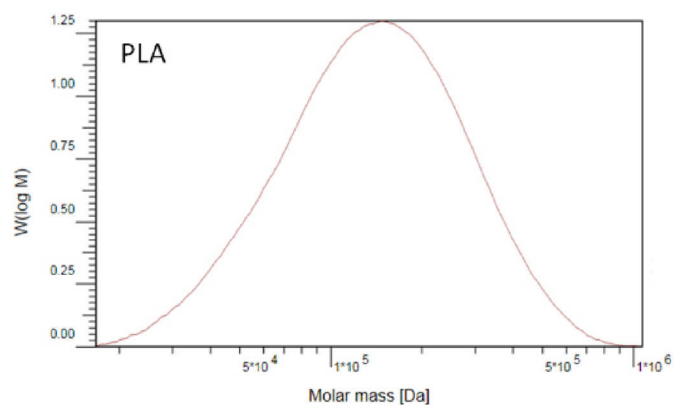
With:  $n$  Pore quantity,  $d$  Pore diameter ( $\mu\text{m}$ ),  $A$  SEM-Image area ( $\mu\text{m}^2$ ),  $M$  Magnification factor.

Pore size evaluation (**Fig. SI-11**) was done using the software ImageJ.

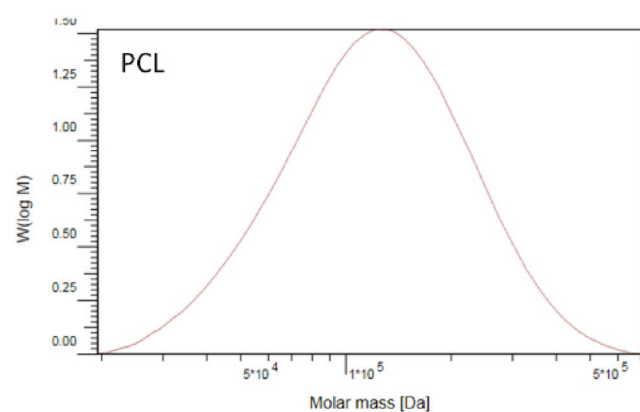


|                                  |     |  |     |
|----------------------------------|-----|--|-----|
| Mean pore Size [ $\mu\text{m}$ ] | 79  | <b>Minor pores (&lt;100<math>\mu\text{m}</math>)</b> |     |
| SD                               | 23  | In number  | 276 |
| Values                           | 600 | Percentage fraction                                  | 92% |
| Counted pores                    | 300 | <b>Macro pores (&gt;100<math>\mu\text{m}</math>)</b> |     |
| Min. pore size                   | 26  | In number  | 25  |
| Max pore size                    | 146 | Percentage fraction                                  | 8%  |

**Figure SI-11.** Evaluated pore size distribution of a PLA/PCL sponge (sponge 3).

**Molecular weight of polymers.**

**$\overline{M}_n$**  : 1.0754e5 g/mol  
 **$\overline{M}_w$**  : 1.7039e5 g/mol  
 **$\overline{M}_z$**  : 2.5237e5 g/mol  
**D** : 1.5843e0  
 **$\overline{M}_p$**  : 1.5066e5 g/mol



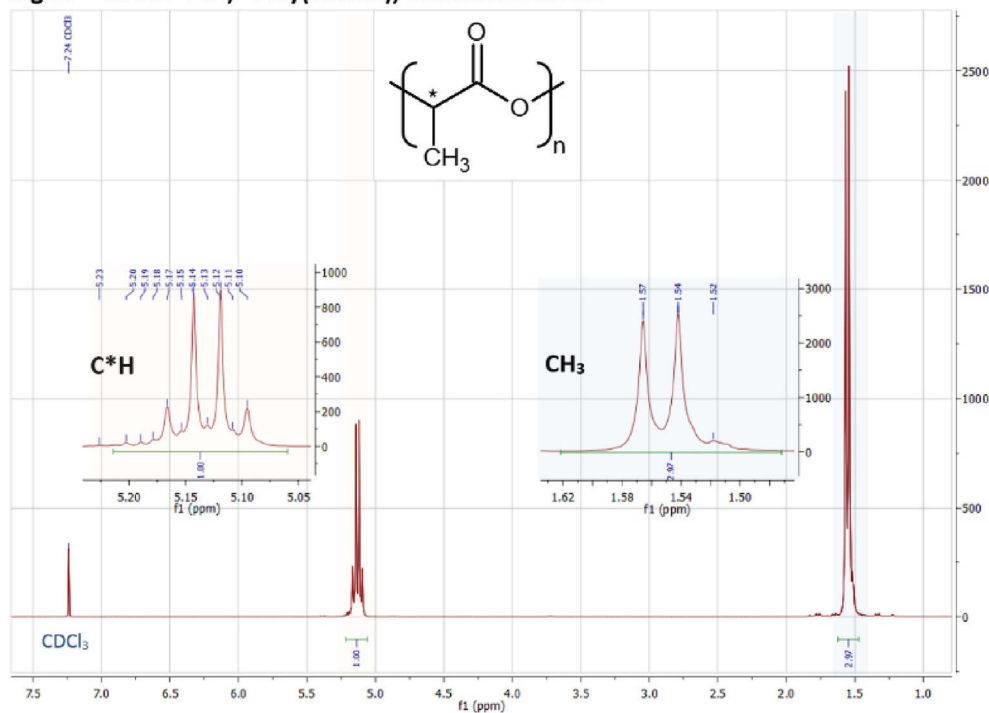
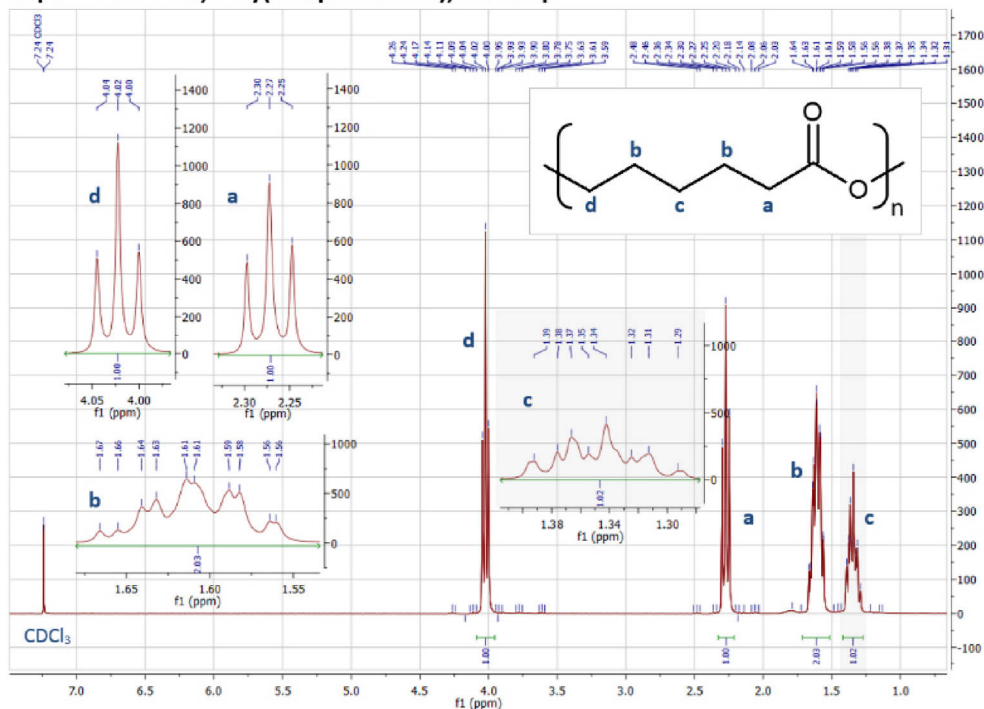
**$\overline{M}_n$**  : 9.9419e4 g/mol  
 **$\overline{M}_w$**  : 1.4417e5 g/mol  
 **$\overline{M}_z$**  : 2.0234e5 g/mol  
**D** : 1.4501e0  
 **$\overline{M}_p$**  : 1.3264e5 g/mol

**Figure SI-12.** MALLS measurement results of PLA and PCL.

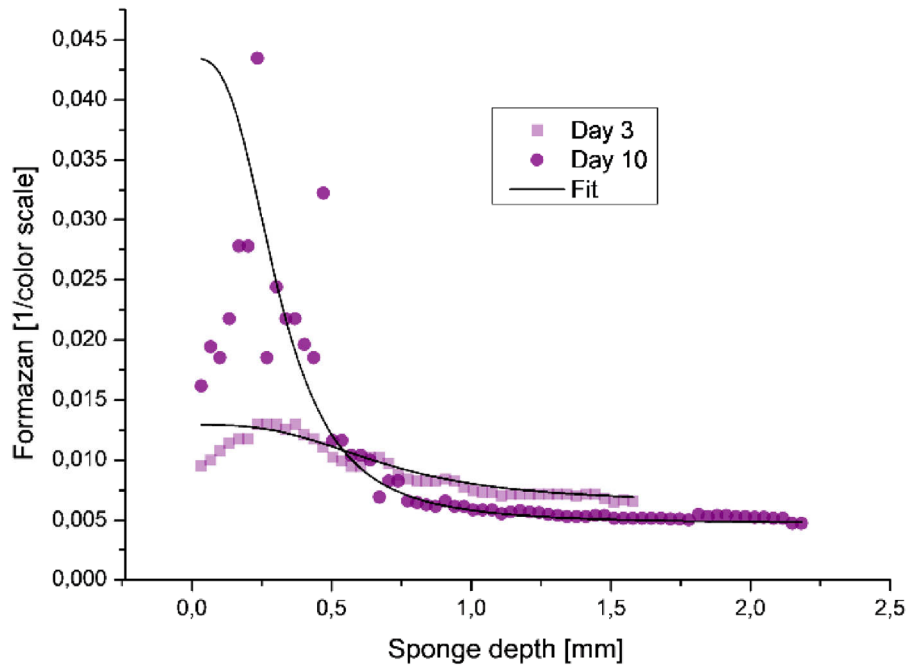


## NMR spectroscopic analysis of used polymers.

## Ingeo™ 4043D PLA, Poly(lactide), NatureWorks LLC

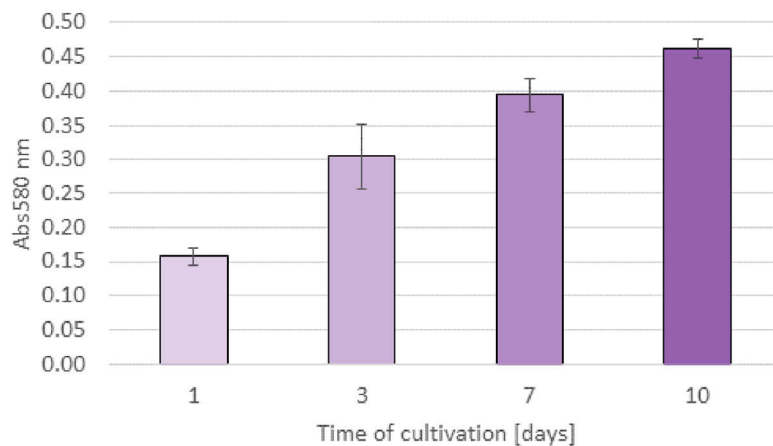
Capa™ 6800 PCL, Poly( $\epsilon$ -caprolactone), PerstorpFigure SI-13.  $^1\text{H-NMR}$  PLA and PCL (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz).

**Cell penetration depth analysis.**

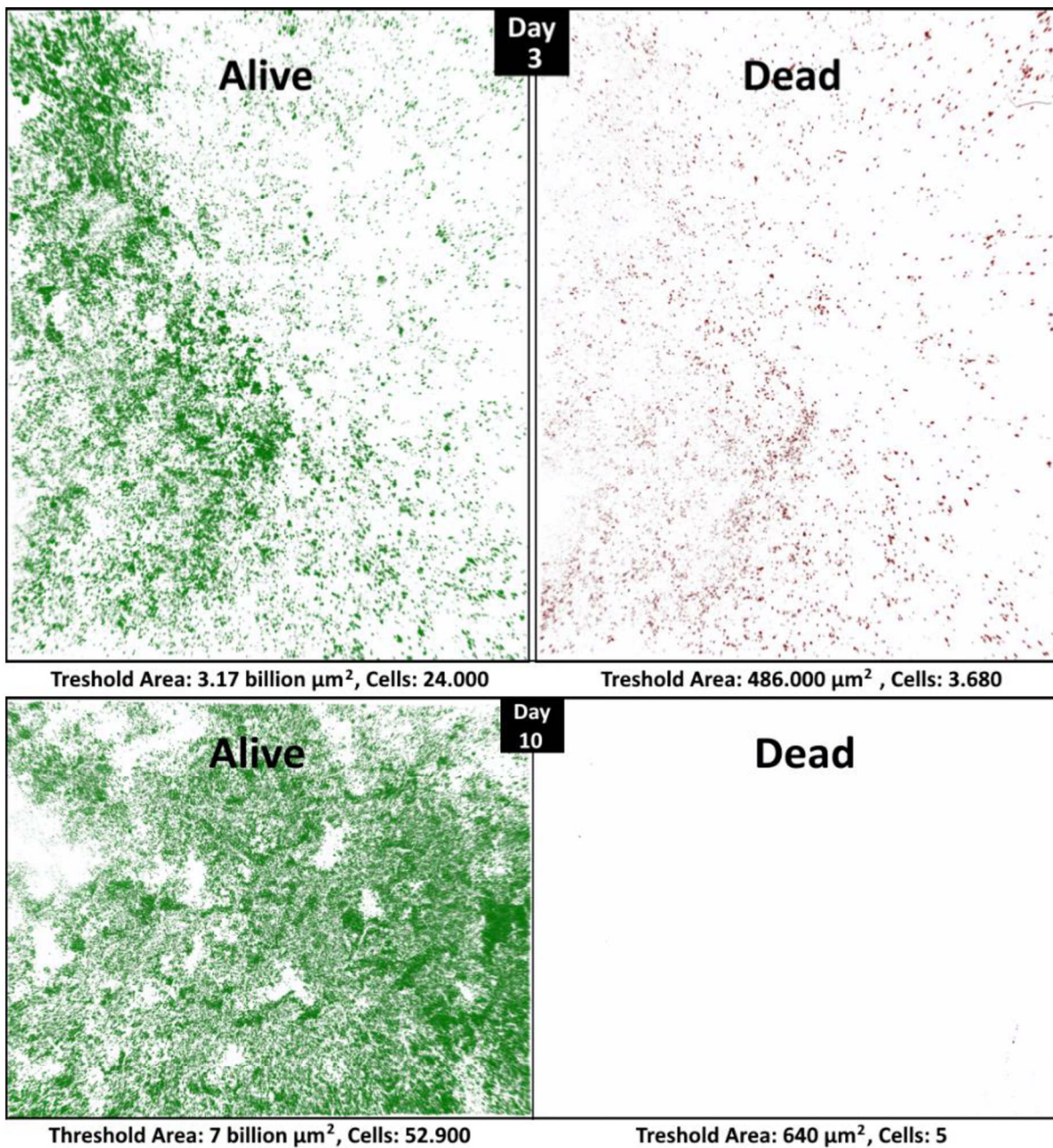


**Figure SI-14.** Digital color scale analysis of MTT stained sponge sample cross sections in a direct comparison.

**Spectroscopic Formazan quantity analysis.**



**Figure SI-15.** Visible light spectroscopic results of Formazan extracted from MTT stained sponge slice samples after one, three, seven and ten days of cultivation.

**Digital cell Live/Dead<sup>®</sup> quantity analysis.**

**Figure SI-16.** CLSM images used for quantitative Live/Dead<sup>®</sup> analysis of Jurkat cell cultured sponges after three and ten days of cultivation.

**References (Supporting Information).**

- (46) Egorov G. I.; Makarov D. M. Densities and volume properties of (water+tert-butanol) over the temperature range of (274.15 to 348.15)K at pressure of 0.1MPa. *Journal. Chem. Thermod.* **2011**, *43* (3), 430–441.
- (47) Perstorp Technical and Safety data sheet: PCL - Capa™ 6800.
- (48) Ribeiro C.; Sencadas V.; Costa C. M.; Gómez Ribelles J. L.; Lanceros-Méndez S. Tailoring the morphology and crystallinity of poly(L-lactide acid) electrospun membranes. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2011**, *12* (1), 15001.
- (49) Zhang J.; Liu H.; Ding J.-X.; Zhuang X.-L.; Chen X.-S.; Li Z.-M. Annealing regulates the performance of an electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone) membrane to accommodate tissue engineering. *RSC Adv* **2015**, *5* (41), 32604–32608.
- (50) Areias A. C.; Ribeiro C.; Sencadas V.; Garcia-Giralt N.; Diez-Perez A.; Gómez Ribelles J. L.; Lanceros-Méndez S. Influence of crystallinity and fiber orientation on hydrophobicity and biological response of poly(l-lactide) electrospun mats. *Soft Matter* **2012**, *8* (21), 5818.
- (51) Xu T.; Miszuk J. M.; Zhao Y.; Sun H.; Fong H. Electrospun Polycaprolactone 3D Nanofibrous Scaffold with Interconnected and Hierarchically Structured Pores for Bone Tissue Engineering. *Adv. Healthcare Mater.* **2015**, *4* (15), 2238–2246.
- (52) Bao J.-B.; Liu T.; Zhao L.; Hu G.-H.; Miao X.; Li X. Oriented foaming of polystyrene with supercritical carbon dioxide for toughening. *Polymer* **2012**, *53* (25), 5982–5993.



M2) Manuskript veröffentlicht im Journal 'Biomacromolecules'



pubs.acs.org/Biomac

Article

## Perfusion Cultivation of Artificial Liver Extracellular Matrix in Fibrous Polymer Sponges Biomimicking Scaffolds for Tissue Engineering

Michael Mader, Moritz Helm, Mingxia Lu, Martina H. Stenzel, Valérie Jérôme, Ruth Freitag\*, Seema Agarwal, and Andreas Greiner\*

Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00900>

Read Online

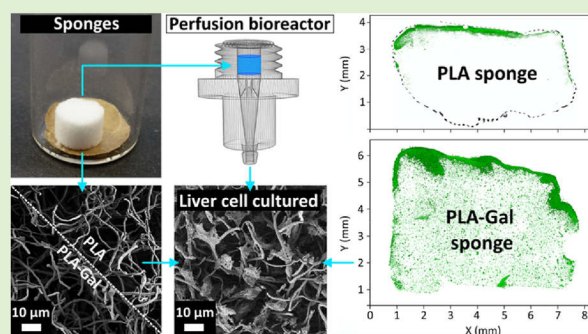
ACCESS |

Metrics &amp; More

Article Recommendations

Supporting Information

**ABSTRACT:** A major challenge in tissue engineering and artificial scaffolding is to combine easily tunable scaffolds biomimicking the extracellular matrix of native organs with delivery-controlled cell culturing to create fully cellularized, large artificial 3D scaffolds. Aiming at bioartificial liver construction, we present our research using galactose-functionalized, ultraporous polylactide 3D nanofiber sponges fabricated out of electrospun fibers. Sponge biomodification by blend galactosylation and in-solution coating is performed, respectively, using a polylactide-galactose carrier-copolymer that promotes cell delivery and features a pronounced autofluorescence. It allows us to verify the galactosylation success, evaluate its quality, and record dye-free, high-resolution images of the sponge network using confocal laser scanning microscopy. The galactose carrier and its impact on scaffold cellularization is validated in benchmark to several reference systems. Verification of the human hepatic cell asialoglycoprotein receptor presence and galactose interaction in culture is performed by  $\text{Cu}^{2+}$  receptor-blocking experiments. The culture results are extensively investigated in and ex situ to trace and quantify the cell culture progress, cell activity, and viability at different culture stages. Bioreactor cultivation of sponges reveals that the galactose carrier does not only facilitate cell adhesion but also enhances cellular distribution throughout the scaffold. The promising 3D culture results allow us to move forward to create mature in vitro liver model research systems. The elaboration into ex vivo testing platforms could help judging native cell material interactions with drugs or therapeutics, without the need of direct human or animal testing.



### INTRODUCTION

The controlled construction of large polymer scaffolds and their thorough cellularization is the primary step required for the successful creation of, for example, artificial organs. The underlying, complex demands are based on the necessity to mimic the sophisticated templates of nature, defined by the extracellular matrix (ECM) of human organs.<sup>1</sup> The natural ECM with its mostly nanofibrillar structure<sup>2</sup> provides a clear structural draft for artificial scaffolds to be adapted. Hence, the most apparent way to mimic the structural ECM conditions is to prepare scaffolds made from artificial fibrils, fabricated, for example, by electrospinning. Electrospinning is suitable to produce narrowly distributed synthetic as well as natural polymer fibers on the nano and micrometer scale assembled into nonwoven fleeces.<sup>3</sup> However, the sheet-like shape and poor tunability of the resulting nonwoven strongly limit fine tuning. This is especially problematic, as the cellularization process strongly depends on the porosity, pore structure, and interconnectivity of the 3D scaffold network. In order to better approach the native ECM original, combining the self-assembly<sup>4–6</sup> of electrospinning nanofibers with porosity tuning

by freeze drying (FD)<sup>7</sup> allows synergizing the individual advantages of both scaffolding techniques.<sup>8–10</sup> Such elastic, ECM mimicking, electrospun polymer fiber sponges can also be fabricated from degradable polymers such as polylactide (PLA), as presented recently.<sup>11</sup> Fong and coworkers developed an alternative fiber sponge fabrication technique based on thermal-induced self-agglomeration (TISA) to create polycaprolactone (PCL)<sup>12</sup>-based scaffolds. These various PCL blend polymer systems<sup>13–16</sup> are successfully used for in vivo bone tissue formation investigations. However, the agglomeration process of the TISA procedure strongly impedes to control many important sponge characteristics such as size, shape, porosity, pore size, and fiber distribution. The ability to individually tune

Received: June 11, 2020

Revised: July 26, 2020

Published: August 11, 2020



these characteristics is nevertheless decisive to flexibly adapt the scaffold properties to the highly specific demands of organ-ECM biomimicking tissue engineering (TE) research. Far from being fully understood yet, the complexity of the ECM in native organs is manifold in activity, functionality, and structural diversity.<sup>1</sup> In consequence, artificial scaffolds and scaffold materials must provide more than just an inert 2D framework with basic characteristics such as biocompatibility and degradability. All scaffolding techniques in modern TE, ranging from nature-based scaffolds such as decellularized organs<sup>17–19</sup> to synthetic<sup>11</sup> ones face fundamental (re)cellularization issues. They arouse a clear demand for defined cell-delivery strategies that promote pinpoint cell deposition and help to support sequencing during the target-oriented tissue construction of the artificial scaffold.<sup>20</sup> However, controlling the *in vitro* seeding of cells inside artificial scaffolds is tremendously challenging,<sup>21</sup> but mandatory to receive healthy and fully 3D cellularized scaffolds, a yet unsolved task in *in vitro* TE research. For targeted cell delivery, the degradable polymer scaffold first should allow its biofunctionalization with natural, ideally ECM related<sup>1</sup> components. The synthetic base material anchors the mechanical attributes of the synthetic material used, in combination with the introduced bioactive and cell delivery-promoting properties.<sup>22</sup> Aiming at 3D sponge cellularization, also dynamic culturing<sup>23</sup> of the scaffold is required to grant stable cell nutrition throughout the scaffold<sup>24</sup> and avoid diffusion limitations resulting in superficial cell proliferation<sup>11</sup> within the scaffold. Finally, also visualization of cell movements such as cell tractions within the pores of the artificial scaffolds is required to trace the process of cell distribution and proliferation within the scaffold, yet reflecting another major key obstacle in scaffolding and cell culture investigative research.<sup>25</sup>

Herein, we present our advances in cell delivery-controlled *in vitro* cultivation of human hepatocytes within galactose (Gal) bio-functionalized PLA polymer fiber sponges using a self-made percolation-based perfusion-bioreactor.<sup>23</sup> The hepatic cell asialoglycoprotein-receptor (ASGP-R) exhibit<sup>26,27</sup> a well-known Gal sugar specificity,<sup>28</sup> which can be used to increase hepatic cell adhesion,<sup>29,30</sup> also shown in the micropatterning results,<sup>31</sup> as well as cell activity and proliferation.<sup>32</sup> We demonstrate that these attributes can be used to functionalize our degradable polymer fiber sponge to promote delivery and proliferation of human liver cells deep inside the scaffold. The Gal carrier has several more advantages, such as a pronounced autofluorescence of the actually nonconjugated<sup>33</sup> polymer, also known from other sugar systems.<sup>34</sup> The copolymer remarkably extends the possibilities of polymer fiber sponge biomodification, also allowing *in-solution* coating and high-resolution scaffold structure visualization under an UV confocal laser scanning microscope.

## EXPERIMENTAL PART

**General Work Procedures. Electrospinning.** The polymer solutions for electrospinning are prepared by dissolving PLA (7 wt %, 7.9% w/v) and the indicated second polymer (0.6 wt %, 0.8% w/v) in a mixture of formic (FA) and acetic acid (AA) in chloroform CHCl<sub>3</sub>/ (FA/AA) (2.2:1 (4/6) v/v) in a closed glass container. The solution was equilibrated in CHCl<sub>3</sub> overnight, FA and AA such as 0.02 wt % pyridine in CHCl<sub>3</sub> (0.3 wt %) was added, stirred for 30 min at room temperature until homogeneity was achieved.

The impact of the poly(lactide)-*block*-poly(6-O-acryloyl- $\alpha$ -D-galactopyranose) (PLA-*b*-PAGP) carrier copolymer on hepatic culturing is validated in comparison to different reference systems using static cell culturing with nonwovens because of the higher

sampling output and evaluation reliability. As evaluation benchmark for the hepatic cells' ASGP-R impact on scaffold cellularization, two different basic nonwoven reference archetypes with different surface wettability are used. One hydrophobic blend of PLA and PCL (PLA/PCL) such as one hydrophilic PLA blend with a poly(lactide-*b*-ethylene oxide-*b*-lactide) (PLA/LAEOLA) is used. Fine tuned in its fractional composition, PLA/LAEOLA comes up with a hydrophilic behavior comparable to the PLA-Gal blend used.

PLA, PLA/PCL, PLA/LAEOLA, and PLA/PLA-*b*-PAGP (PLA-Gal) nonwoven samples are collected on glass slides placed on a grounded rotating disc (diameter 15 cm, aluminum foil) run at approximately 20 rpm. The dip-coated glass slide substrates are placed on aluminum foil during electrospinning. The following electrospinning conditions are used for all systems: 13.4 kV, 1.36 mL/h, 20 cm, and relative humidity 40% (22 °C) using one syringe (Sterican hypodermic needle 0.30 × 30 mm, B. Braun Melsungen AG). The nonwovens and references for our PLA-Gal validation experiments are dried under vacuum at 40 °C for 72 h, tempered at 60 °C for 1 h for glass slide immobilization and sterilized for 4 h under UV-light (254 nm).

Glass slide substrates with 1 mm thickness are cut manually into pieces of about 0.5 × 1 cm, cleaned with 100% EtOH, dried under pressurized air, and dip coated twice using 0.2 vol % PLA/PCL CHCl<sub>3</sub> solution. After each dipping step, the samples are air dried for at least 10 min. The dip-coated glass slides are dried under vacuum at 40 °C for 24 h before use.

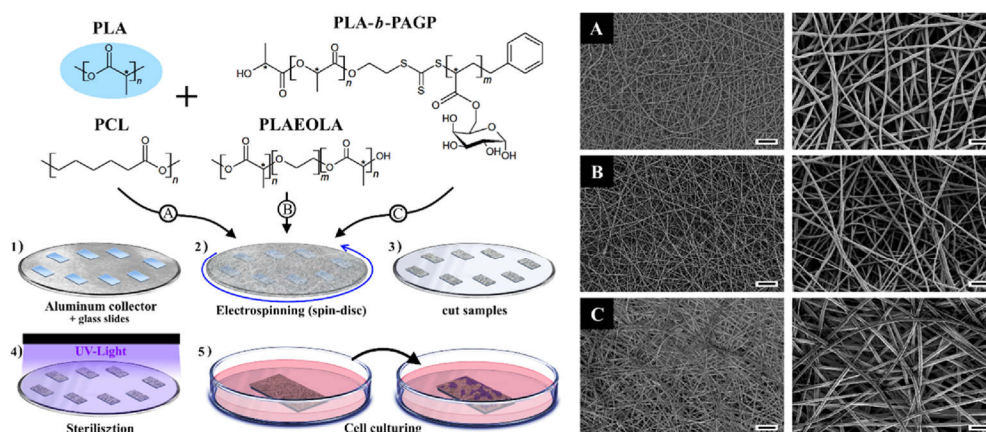
**Polymer Fiber Sponge Fabrication.** Sponge fabrication and the plasma surface activation were performed as previously reported.<sup>11</sup> The nonwovens used for cell culture are not treated with plasma, unlike all sponges used for bioreactor culture. The PLA-Gal nonwovens are used for PLA-Gal sponge fabrication. All sponges are thermally treated at 110 °C for 72 h to render them elastic. The PLA and PLA-Gal sponges are fabricated under identical conditions and with an identical sponge fiber density (6 mg/cm<sup>3</sup>). The cylindrical-shaped polymer fiber sponges are cut in a frozen medium to achieve highly comparable sponges with narrow density ( $\pm 0.5$  mg/cm<sup>3</sup>), shape and size distribution [height: 6.1 ( $\pm 0.1$ ) mm and diameter: 8.0 ( $\pm 0.04$ ) mm].

**Sponge Gal *In-solution* Coating.** The coating medium was prepared by dissolving 0.02 wt % PLA-*b*-PAGP in, for example, 6 vol % dimethyl sulfoxide (DMSO) in *t*BuOH using a high-speed homogenizer (SilentCrusher M, Heidolph) in a water bath at 30 °C. After plasma activation, a thermally annealed<sup>11</sup> sponge was gently placed inside the coating medium at 30 °C for 6 h. Subsequently, the immersed sponge was acclimatized at 22 °C for 1 h, chilled at 4 °C for 1 h, frozen at -26 °C for 30 min, freeze dried, and dried under vacuum at 40 °C for 24 h.

**Scanning Electron Microscopy.** For scanning electron microscopy (SEM) analysis, osmification (2 h at 4 °C in 0.8 (vol/vol) % OsO<sub>4</sub>, 0.1 M Na cacodylate, 3 (w/vol) % sucrose, and 3 mM MgCl<sub>2</sub>) followed by three washing steps in (0.1 M Na cacodylate pH 7.2, 3 (w/v) % sucrose, and 3 mM MgCl<sub>2</sub>) was performed prior to dehydration by slow water replacement using a series of ethanol/water solutions (35, 50, 75, and 95%) for 15 min with final dehydration in absolute ethanol for 15 min. The cell-cultured samples stored in 100% EtOH are dried using critical point drying<sup>35</sup> by hexamethyldisilazane (HMDS). The samples are dehydrolyzed with EtOH and de-ethanolized with EtOH/HMDS solutions of 100, 75, 50, and 25% ethanol content and then washed three times in the 100% HMDS content for 10 min, respectively.

**Mammalian Cell Line and Culture Conditions.** Hep-3B and HuH-7 human liver cells (hepatocellular carcinoma cell lines generous gift from Dr. Di Fazio, Marburg, Germany) are maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (with phenol red), supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 units mL<sup>-1</sup> penicillin, and 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> streptomycin. Cells are cultivated at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells are collected by trypsinization according to the standard cell culture lab procedure. During cultivation on the nonwovens, the culture medium was exchanged every second day. Cell numbers and viabilities during passaging, seeding steps, and determination of the doubling time are evaluated by trypan blue exclusion assay with a hemocytometer (Neubauer Improved, VWR





**Figure 1.** Schematic illustration of the fabrication steps performed to produce PLA-based blend-nonwovens and references for PLA-*b*-PAGP validation. (Top, left) Polymer materials used for sample fabrication in combination with PLA and (Right) SEM images of the nonwovens produced, respectively. The scale bars in each row correspond to (left) 20  $\mu\text{m}$  and (right) 5  $\mu\text{m}$  length, respectively.

International, Ismaning, Germany). For static surface seeding one sterilized nonwoven immobilized on PLA/PCL (9:1, w/w)-coated glass slides was placed per well into well plates. The nonwoven was then precoated with fetal calf serum (30–60 min at 37  $^{\circ}\text{C}$ ). After removal of the fetal calf serum, if not mentioned otherwise,  $13.2 \times 10^3$  cells  $\text{cm}^{-2}$  corresponding to  $6.6 \times 10^3$  cells (nonwoven 0.5 cm  $\times$  1 cm) were carefully dispersed over the top surface of the nonwoven. The seeded nonwoven was transferred into the incubator for 30 min to allow the cells to attach. Five hundred microliters of growth medium were then added to the bottom of each well. After a further 5 h of incubation, additional growth medium was slowly added along the side of the well to cover the nonwoven. Well plates were placed back into the incubator and the cells were cultured for the indicated amount of time. After alamarBlue assay, the nonwovens were rinsed twice with growth medium and fresh growth medium was added. Then, the plate was placed back in the cell culture incubator for further incubation.

**Bioreactor Cultivation.** For the direct perfusion of a cell suspension through the sponges, a perfusion microbioreactor, operable in the cell culture incubator, was designed and fabricated in house by additive manufacturing. The cell culture medium was pumped unidirectional with a peristaltic pump (Figure S11). The shape and size of the reactor chamber are customized to accommodate the sponge geometry [cylinder, 8 mm ( $\phi$ )  $\times$  6 mm (h)]. Because sponges are press-fit into the chamber, the cell suspension could not deviate around the sponge and was, therefore, forced to flow through its pores. For cell seeding, 1 mL of cell suspension ( $3.0 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) was slowly “injected” through the sponge (from the bottom) with a syringe prior to starting the dynamic cultivation using a perfusion rate of 0.7  $\text{mL min}^{-1}$ . The total cultivation volume was 50 mL.

**Cell Staining Techniques.** For MTT staining, the cultivated nonwovens were rinsed with DPBS, placed in fresh well-plates, and incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 2 h with 0.5  $\text{mg mL}^{-1}$  MTT in the culture medium without phenol red as described previously.<sup>11</sup> The viability of the cells within the nonwoven was determined with the Live/Dead reduced biohazard viability/cytotoxicity kit (Invitrogen, Germany) that stains the living cells green through the highly permeable-permanent nucleic acid dye SYTO 10 and the dead cells red through the cell-impermeant dye Dead Red. For staining, the nonwovens were rinsed with DPBS, placed in fresh 24-well plates, and treated according to the manufacturer’s instruction. After staining, nonwovens were extensively rinsed with DPBS and incubated for 60 min at room temperature in fixation buffer [2.5 (v/v) % glutaraldehyde—2.0 (v/v) % paraformaldehyde—0.1 M Na cacodylate pH 7.2, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ ] under agitation. After washing with Milli-Q water, the nonwovens were stored at 4  $^{\circ}\text{C}$  until analysis. To estimate the uniformity of seeding, a prelabeling of the cells with 5(6)-carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester (CFDA-SE) was performed as previously described<sup>36</sup> with some

modifications. Briefly, on the day of seeding, the CFDA-SE staining solution was prepared by diluting a 10 mM CFDA-SE stock in DMSO within DPBS-0.01% bovine serum albumin (BSA) to get a 5  $\mu\text{M}$  working concentration. HuH7 cells were harvested by trypsinization and washed once with DPBS-0.01% BSA. Then, the cells ( $10 \times 10^6$  cells) were incubated with the staining solution for 10 min at room temperature in the dark. The labeling reaction was stopped at 12 volumes of the growth medium. The CFDA-SE-labeled cells were washed once with the growth medium and incubated for 5 min in the cell culture incubator with the growth medium (14 mL). After centrifugation, the labeled cells were resuspended in the growth medium, counted, and the cell density was adjusted to  $3.0 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ .

**Immunodetection of Cell Surface Marker ASGPR-1.** For asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) quantification,  $1 \times 10^6$  cells treated with 60  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  for up to 11 days were collected by trypsinization and recovered by centrifugation (4  $^{\circ}\text{C}$ ), washed twice with Dulbecco’s phosphate-buffered saline (DPBS), and resuspended in 50  $\mu\text{L}$  ice-cold DPBS. Samples were then incubated with a phycoerythrin (PE)-labeled anti-ASGP-R antibody according to the manufacturer instructions and analyzed using a Cytomics FC500 (Beckman Coulter, Krefeld, Germany). Analysis of the flow cytometry data was done by CXP software 2.3 (Beckman Coulter).

**Cell Doubling Time.** For estimation of the doubling time, cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$  in the growth medium in 24-well plates (cultivation volume: 500  $\mu\text{L}$ /well). Every day until confluency was reached, cells of three wells were collected by trypsinization and counted independently, after counterstaining the dead cells with trypan blue. The doubling time was calculated for populations undergoing exponential growth. The experiment was performed in triplicate for each cell line.

$$t = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}}$$

where  $t$  is the doubling time and  $\mu_{\max}$  the growth rate in the exponential phase.

Further experimental and analytical device data used for material and sample characterization including SEM, CLSM, NMR, size exclusion chromatography, DSC, NanoCT, contact angle, and fluorescence spectrophotometry measurements are summarized in Supporting Information.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Galactose-Carrier Copolymer.** A RAFT synthesized block-copolymer of Gal and PLA, poly(lactide)-*block*-poly(6-*O*-acryloyl- $\alpha$ -D-galactopyranose)methacrylate (PLA-*b*-

C

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00900>  
Biomacromolecules XXXX, XXX, XXX–XXX



PAGP),<sup>37</sup> was used to introduce Gal to our electrospun PLA-based fiber systems (PLA-Gal, Figure 1). The PLA<sub>242</sub>-*b*-PAGP<sub>95</sub> synthesis was performed as published.<sup>37</sup> The combination of Gal and PLA in a copolymer has several positive consequences for material processing and galactosylation. With its covalently position-6 bonded  $\alpha$ -D-galactose, a hepatocyte relevant functionality can be introduced in large numbers. This polyfunctionality acts as high-density bioactive component triggering substrate communication by ASGP-R. It helps maximizing the impact on cell behavior, while minimizing the amount of copolymer required, for example, using coating techniques. Together with PLA, the copolymer can be dissolved in chloroform, to create homogeneously blend-galactosylated PLA-Gal nonwovens by electrospinning, used for PLA-*b*-PAGP validation. The resulting distribution of Gal within the fiber is advantageous for long-term cultivations with, for example, an advanced stage of scaffold degradation. It might be particularly necessary for long-term cultivations in which the progress of cell distribution, to achieve a fully cell-covered system (i.e., tissue), might not yet be completed. The amphiphilic nature also grants compatibility with PLA, the basic sponge material,<sup>11</sup> to facilitate PLA-sponge coat-galactosylation strategies presented herein. In both cases, the Gal-carrier can be used to form and retain a stable spinning as well as coating process to create a stable PLA-Gal electrospun nanofiber sponge matrix without the need of chemical cross-linking. The basic material information of samples and cell types used in this work is summarized in Tables 1, 2.

The level of ASGP-R on HuH-7 cells is almost two times higher than the expression found for the Hep-3B cells used.

**Sample Preparation.** The fabrication steps to produce galactosylated such as nongalactosylated (reference) samples for

**Table 1. Polymer Properties Calculated from SEC; MALLS-GPC; DSC, TGA, NMR, and Capillary Flow porometry<sup>a</sup>**

| polymer              | MW ( $M_n$ )                     | use  | annotation  |
|----------------------|----------------------------------|--|---|
| PLA <sup>11</sup>    | 110 kDa                          | base polymer for nonwoven and sponges  | $T_g$ 60 °C, $T_m$ > 150 °C (DSC)   |
| PLA- <i>b</i> -PAGP  | 40 kDa                           | used for galactosylation of fibers (nonwoven and sponges) and for PLA sponge coating | PLA <sub>242</sub> - <i>b</i> -PAGP <sub>95</sub> (SEC, NMR), $\bar{D}$ 1.4, Gal content: 42 wt % |
| PLA-Gal              |                                  | PLA and PLA- <i>b</i> -PAGP (blend galactosylated or coated nonwovens or sponges)    | $T_g$ 35–40 (DSC) degradation at >200 °C (TGA) Gal content: 3 wt % (blend 3:1, w/w)               |
| nonwoven             | mean fiber diameter              | mean pore size   | annotation  |
|                      |                                  | $\bar{S}_p$  |   |
| all nonwoven average | 0.9 ( $\pm$ 0.1) $\mu\text{m}^2$ | 2.5 ( $\pm$ 1.0) $\mu\text{m}^2$   | measure with a capillary flow porometer (not shown)   |
| sponges              | mean diameter                    | mean height  | porosity SPV <sup>11</sup>  |
| PLA                  | 8 ( $\pm$ 0.05) mm               | 6 ( $\pm$ 0.2) mm  | 99.5% 221 cm <sup>3</sup> /g  |
| PLA-Gal              | 8 mm                             | 6.5 mm   | 99.5% 221 cm <sup>3</sup> /g  |

<sup>a</sup>With:  $T_m$  melting point,  $T_g$  glass transition temperature, SPV specific pore volume.<sup>11</sup>

**Table 2. Hepatoma ASGP-R Expression Results**

| cell type | measurement type | expression ASGP-R (mean, %) | level of expression (MFI) |
|-----------|------------------|-----------------------------|---------------------------|
| HuH-7     | isotype control  | 0.5 $\pm$ 0.2               | 620 $\pm$ 130             |
|           | anti-ASGP-R-PE   | 87.1 $\pm$ 6.0              | 4780 $\pm$ 900            |
| Hep-3B    | isotype control  | 0.5 $\pm$ 0.2               | 530 $\pm$ 110             |
|           | anti-ASGP-R-PE   | 44.3 $\pm$ 6.7              | 2240 $\pm$ 1260           |

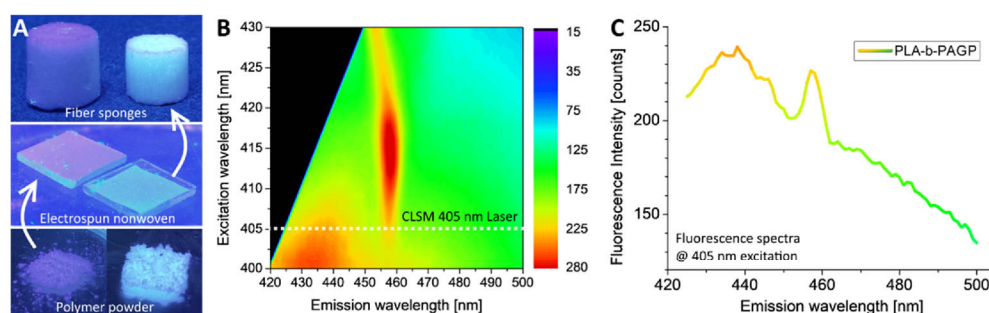
PLA-*b*-PAGP validation are performed by blend electrospinning and subsequent static, hepatic cell culture, as illustrated in Figure 1. Several replicate series of each electrospun PLA-based blend-nonwovens including 9:1 (w/w) PLA/PCL, 3:1 (w/w) PLA/LAEOLA, and 3:1 (w/w) PLA/PLA-*b*-PAGP (PLA-Gal) are evaluated after parallel culturing, respectively.

The hydrophilicity of all systems is recorded by contact angle measurements of nonwovens and films prepared thereof. The contact angles for PLA/PCL, PLA-Gal, and PLA/LAEOLA systems are found to be 130 ( $\pm$ 1), 134 ( $\pm$ 6), and 134 ( $\pm$ 1) for the nonwovens and 89° ( $\pm$ 3), 85° ( $\pm$ 2), and 81° ( $\pm$ 3) for the films prepared therefrom (Figure S1). Monolithic PLA as well as 3:1 (w/w) PLA/PLA-*b*-PAGP (PLA-Gal) polymer fiber sponges for 3D perfusion-bioreactor experiments are produced directly out of the precursor nonwoven materials already used for validation. The sponge fabrication is performed as presented recently,<sup>11</sup> with a fiber concentration of 6 mg/cm<sup>3</sup> (99.6% porosity). Only a few changes are applied to the sponge fabrication procedure discussed in Supporting Information 3. The overall homogeneity of the fiber distribution in dispersion, right before freezing, is greatly enhanced to generate highly reproducible, uniform sponge densities and shapes required for replicable bioreactor experiments. This further allows preparing structurally unharmed ultrathin sponges with thicknesses <0.5 mm (Figure S2, top) used for NanoCT imaging of a nanofiber sponge (Figure S2, bottom; Video S1).

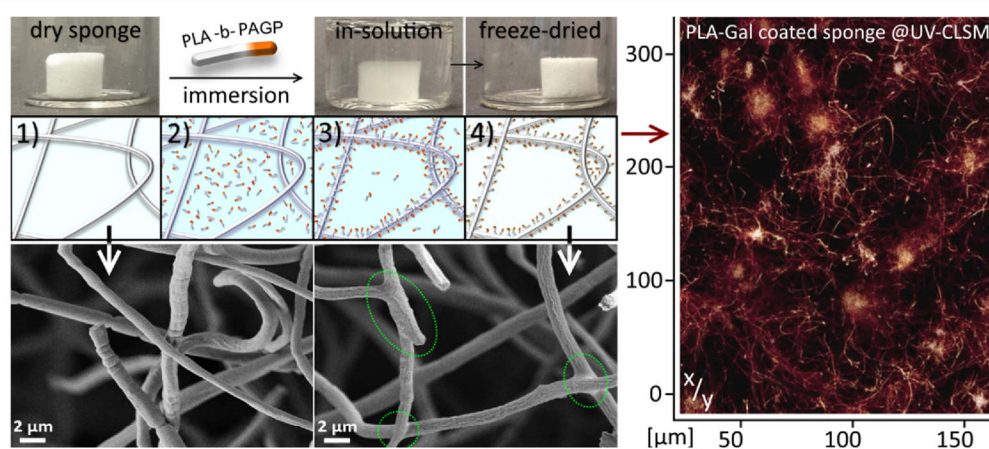
**Autofluorescence Characterization of Galactosylated Fiber Systems.** During material and scaffold characterization, we surprisingly found that the nonconjugated PAGP block of the PLA-*b*-PAGP copolymer features a pronounced autofluorescence of the yet unknown origin.<sup>34</sup> It impacts the fluorescence behavior of each state of sponge fabrication, from the crude polymer powder to electrospun blend-fibers and the PLA-Gal sponges fabricated thereof (Figure 2A). The autofluorescence properties of PLA-*b*-PAGP (Figure 2B,C), monolithic PLA, PAGP, and the RAFT agent used for copolymer synthesis (Supporting Information 4) are recorded as the 3D emission/absorption spectra. The autofluorescence of pure PLA is very weakly pronounced in contrast to the PAGP-block, which can be visualized with an excitation wavelength of 405 nm, accessible using a CLSM UV-laser (Figure 3, right). Therein, the sharply enhanced autofluorescence of PLA-Gal systems is quickly distinguishable from monolithic PLA (Figure S4). As the RAFT agent does not show any mentionable autofluorescence (Figure S3, bottom), we can derive that the pronounced material autofluorescence originates from the Gal carrying PAGP-block (Figure S3, top right).

We took this advantage to prove the galactosylation success and quality of our PLA-Gal fiber scaffold systems for both, blend-electrospun fibers and Gal-carrier-coated PLA sponges shown in the next chapter. The Gal-fraction is homogeneously distributed along electrospun blend-galactosylated fibers (Figure S5, top), but no information about the macromolecular distribution within the bulk fiber can be presented, yet.





**Figure 2.** Fluorescence behavior of the PLA-*b*-PAGP block-copolymer used for galactosylation. (A) Photographic images of PLA and PLA-Gal starting materials and fiber systems fabricated thereof, as visible under a UV-lamp in powder state, as electrospun nonwoven and sponge. (B) 3D Fluorescence spectra of PLA-*b*-PAGP and (C) the extracted 2D spectrum recorded under 405 nm excitation and present under CLSM 405 nm laser excitation. Detailed measurements of all materials can be found in [Supporting Information 1](#).



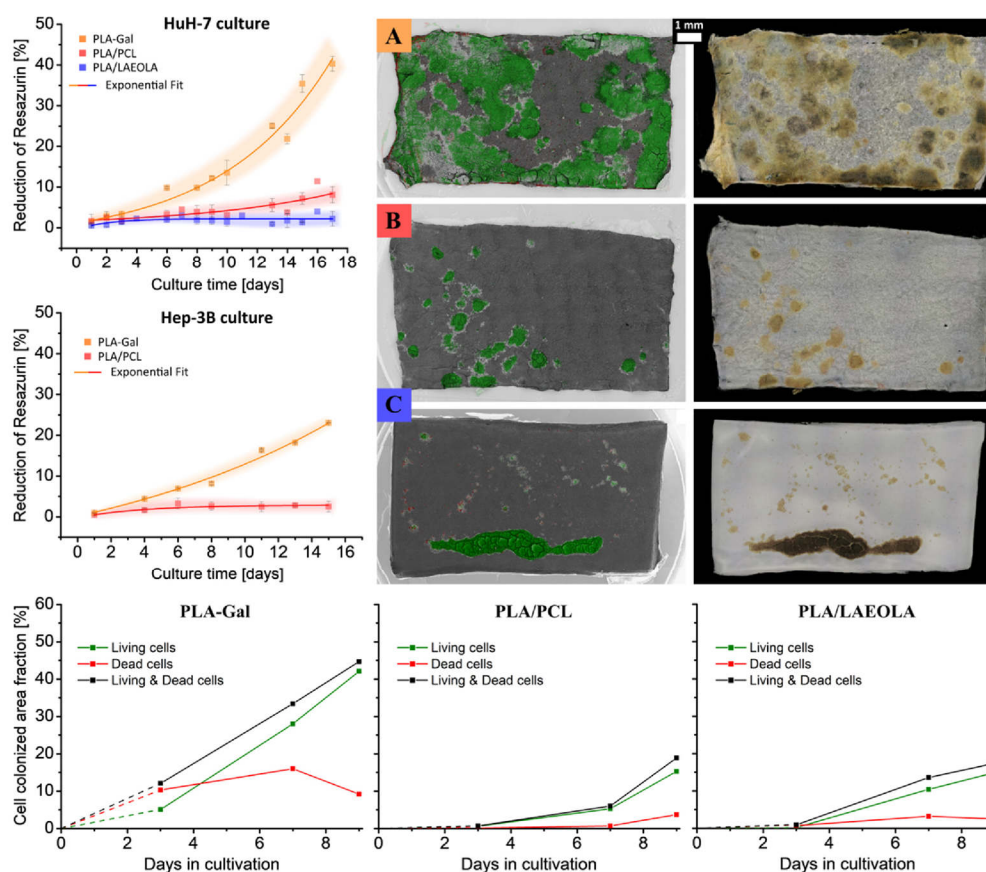
**Figure 3.** The PLA sponge coating procedure using PLA-*b*-PAGP in-solution self-assembly. (Top) An experimental illustration of the general steps for sponge galactosylation. The (1) PLA sponge in the dry state is (2) immersed in a PLA-*b*-PAGP solution. During (3) incubation and cooling, a homogeneous absorption of PLA-*b*-PAGP to the PLA surface is triggered and immobilized as coating by (4) freeze drying. (Right) High-resolution, 3D sponge fiber network structure of a PLA-*b*-PAGP-coated and cross-sectioned sponge visible under UV-CLSM ([Video S2](#)). (Bottom) SEM image of a monolithic PLA-sponge before and after the in-solution self-assembly PLA-*b*-PAGP coating. The coating can be evidenced in the form of pronounced fiber junctions (green circles), which cannot be found for crude samples.

**Self-assembly, In-solution Galactosylation of Sponges.** We present our results for an easy applicable monolithic PLA sponge galactosylation technique using PLA-*b*-PAGP by in-solution self-assembly under mild conditions. Coating has the potential to significantly reduce the amount of polymer necessary for galactosylation and can help to control the autofluorescence intensity of the system as well. Different binary solvent/antisolvent mixtures are used for polymer fiber sponge immersion and coating to analyze the basic polymer fiber sponge immersion and coat-processing stability during FD ([Supporting Information 5](#)). The basic steps of the in-solution coating are illustrated in [Figure 3](#). The presence of a coating and its quality is investigated by SEM and UV-CLSM imaging ([Figure 3](#), bottom). The SEM images indicate the successful coating of fibers, recognizable at fiber cross-over points in the presence of pronounced fiber junctions ([Figure 3](#), green circle). UV-CLSM autofluorescence imaging allows visualizing the coating quality and provides in-depth, dye-free, 3D high-resolution insights into the sponge fiber framework ([Figure 3](#), right and [Video S2](#)). Standard CLSM sample imaging under aqueous immersion conditions has a visual imaging limitation of about 50–100  $\mu\text{m}$  under CLSM because of the scattering and light absorption effects of each individual fiber. However, an

opaque PLA-based polymer fiber sponge almost turns transparent under oil immersion ([Figure S5](#), bottom), as the fiber bulk density is similar to the oil used for sample immersion and imaging. It allows increasing the visual imaging range to at least 1–2 mm, for deep reaching CLSM illumination and in-depth polymer fiber sponge visualization, only limited to the CLSM piezo-based z-range limitation (500  $\mu\text{m}$ ).

**Galactose Carrier Validation.** We prove the ASGP-R presence and the impact of Gal-carrier galactosylated blend-nonwovens on ASGP-R interaction in static hepatic cell culture experiments. Therefore, we quantify the progress of cell attachment, distribution, proliferation, and viability. Several cultivation series are performed and evaluated in and ex situ for different hepatic cell types, culture times, and starting cell concentrations to analyze data reliability and reproducibility.

**In situ Cultivation Results.** The static cell cultivation experiments performed with either HuH-7 or Hep-3B cells are traced in situ and noninvasively using alamarBlue and UV/VIS spectroscopy to quantify the cell activity depending on the resazurin reduction (RR) efficacy ([Figure 4](#), top left). For HuH-7 cultivation, a significantly higher RR can be found after 18 days for PLA-Gal, which is, on average, 18 $\times$  higher compared to PLA/LAEOLA and 5 $\times$  higher than in the PLA/PCL reference



**Figure 4.** In situ and ex situ hepatic cell nonwoven colonization evaluation results for (A) PLA-Gal, (B) PLA/PCL, (C) PLA/LAEOLA blend-electrospun nonwoven. (Top, left) In situ alamarBlue culture results of RR using HuH-7 cells. (Center, left) RR using Hep-3B cells. (Center, right) Exemplary ex situ images taken by CLSM and SEM (shown as overlay) such as LM image; (Bottom line) Ex situ time-dependent Live/Dead (green/red) results expressed in the cell-colonized area.

systems. This clear tendency is also found in the culture results evaluated ex situ after up to 30 days of culture and for different numbers of starting cells (Supporting Information 6, Figure S7, left center).

The cell growth on PLA-LAEOLA nonwoven is similar or even less pronounced than for PLA/PCL nonwovens clarifying that an increase of hydrophilicity caused by the galactose moieties is not decisively responsible for a better proliferation of cells. This finding is further promoted in ASGP-R-blocking experiments, shown later. For Hep-3B cultivation, the PLA-Gal nonwovens provide, on average, a 9× times higher RR compared to PLA/PCL systems (Figure 4, left center). The correlation of the RR difference between PLA-Gal and PLA/PCL samples, being exactly two times higher for HuH-7 compared to Hep-3B is suspicious. It might be explained as a consequence of the ASGP-R expression differences present, as Hep-3B cells ( $44 \pm 7$ ) possess only half of the ASGP-R expression compared to HuH-7 ( $87 \pm 6$ ) cells (Supporting Information 1).

**Ex situ Cultivation Evaluation.** The in situ spectroscopic results are supported by an ex situ full-sample-scale imaging analysis using CLSM, SEM, and light microscopic (LM) imaging (Figure 4, right). The ex situ data on cell proliferation and distribution are evaluated regarding the overall cell surface coverage of almost equally sized nonwovens, as the percentage amount of the cell-colonized nonwoven-area (CA).

The mean CA evaluated ex situ for PLA-Gal samples is up to 13× higher compared to PLA/LAEOLA and about 6× higher compared to PLA/PCL samples. Here, it must be taken into consideration that all ex situ evaluations are limited to the 2D perspective, hence cannot differentiate between cells laying on top of each other. Therefore, the in situ RR efficacy differences between the investigated nonwoven systems are more reliable for judging the real cell culture activity. A direct comparison between CLSM, SEM, and LM sample evaluation was carried out as well, in order to assess different 2D evaluation methods to one another (Figure S7, right) and qualitatively judge the suitability range of each imaging method. Though CLSM does not suffer from contrasting issues, the resulting data only slightly differ from the SEM or LM results. For PLA-Gal nonwovens, cell scaffold spreading is the dominant proliferation behavior found, whereas the resident hepatocytes on the reference systems prefer to grow in less-stable, thick cell multilayers. The thickness of the cell layers formed can be derived from the crack sizes of large areas of cell tissue, inevitably rupturing during critical drying, visible under SEM (Figure 4). Quantification of hepatic cell viability is performed ex situ, by CLSM imaging, after Live/Dead staining of the samples from one replica series at different times of cultivation, ranging from day 3 to day 9 (Figure 4, bottom). The Live/Dead ratio calculated for this time-dependent series is combined with the results of long-term cultivations of up to 30 days (Figure S8). The living fraction of hepatic cells reaches

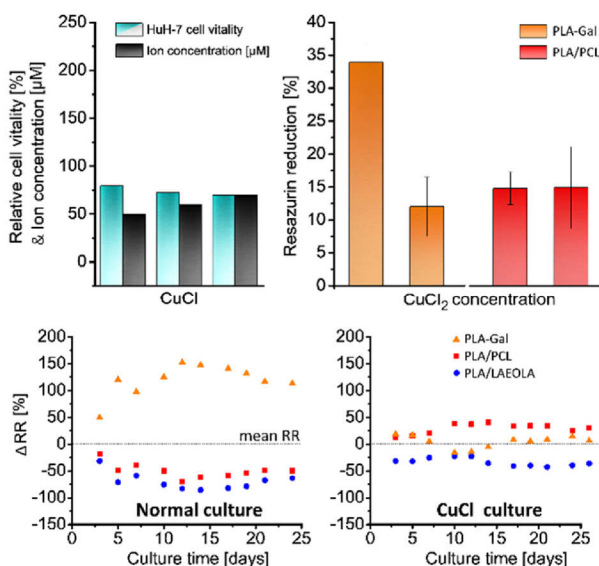
F

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00900>  
Biomacromolecules XXXX, XXX, XXX–XXX



about 84 ( $\pm 2$ )% averaged over all scaffold blend-types cultivated for 7 up to 30 days.

**ASGP-R Ion-Blocking Investigations.** The ex and in situ results discussed above demonstrate the impact of Gal on hepatic cell proliferation, as expected for the presence of an ASGP-R-mediated interaction of hepatic cells with galactosylated PLA fibers. To verify this claim, the hepatic cell culture experiments are repeated in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  ions (Figure 5). Copper ions are known to reduce the ligand-binding activity



**Figure 5.** (Top left) Relative percentage cell toxicity of  $\text{Cu}^{2+}$  ions for HuH-7 hepatic cells at different concentrations after eight days of culture compared to a blank reference culture [cultivation time: 8 days,  $n = 6$ ]. (Top right) Culture evaluation results with  $\text{Cu}^{2+}$  blocking the ASGP-R impact on RR for PLA-Gal and PLA/PCL. [Cultivation time: 15 days,  $n = 3$ ] (bottom line) in situ percentage “deviation of the RR” ( $\Delta\text{RR}$ ) to the “mean RR” of a sample series of each culture time, respectively, for 60  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$ .

of ASGP-R in the case of isolated rat hepatocytes<sup>38</sup> by up to 50% because of the accumulating inactive surface receptors. Ion toxicity (Figure 5, top left) and in situ RR measurements are performed to investigate the long-term applicability and ASGP-R-blocking efficacy of  $\text{Cu}^{2+}$  ions (Figure 5, top right). The presence of 60  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  ions reduces the ASGP-R impact on RR by an average of about 83 ( $\pm 5$ )%, whereas the percentage amount of RR with PLA/PCL nonwoven is almost unaffected. The normalized HuH-7 cell ASGP-R-blocking impact on the in situ measured RR of  $\text{Cu}^{2+}$  for different culture times is shown in Figure 5, bottom line. For visualization of the corresponding in situ culture results therein, the data are plotted after normalization of the RR of all culture sample series performed in parallel. The data are expressed as the “percentage deviation of the RR” ( $\Delta\text{RR}$ ) normalized to the “mean RR” of a sample series at each individual culture time. In consequence, a narrower distribution of  $\Delta\text{RR}$  toward the “mean RR” means that the RR efficacy of each sample and each culture time is more similar. Hence, in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$ , the ASGP-R impact on the scaffold cellularization efficacy is reduced to the mean level of the reference systems. Compared to PLA/PCL, the RR is even lower, again indicating that hydrophobicity of PLA-Gal systems is not decisively responsible for a better proliferation of cells.

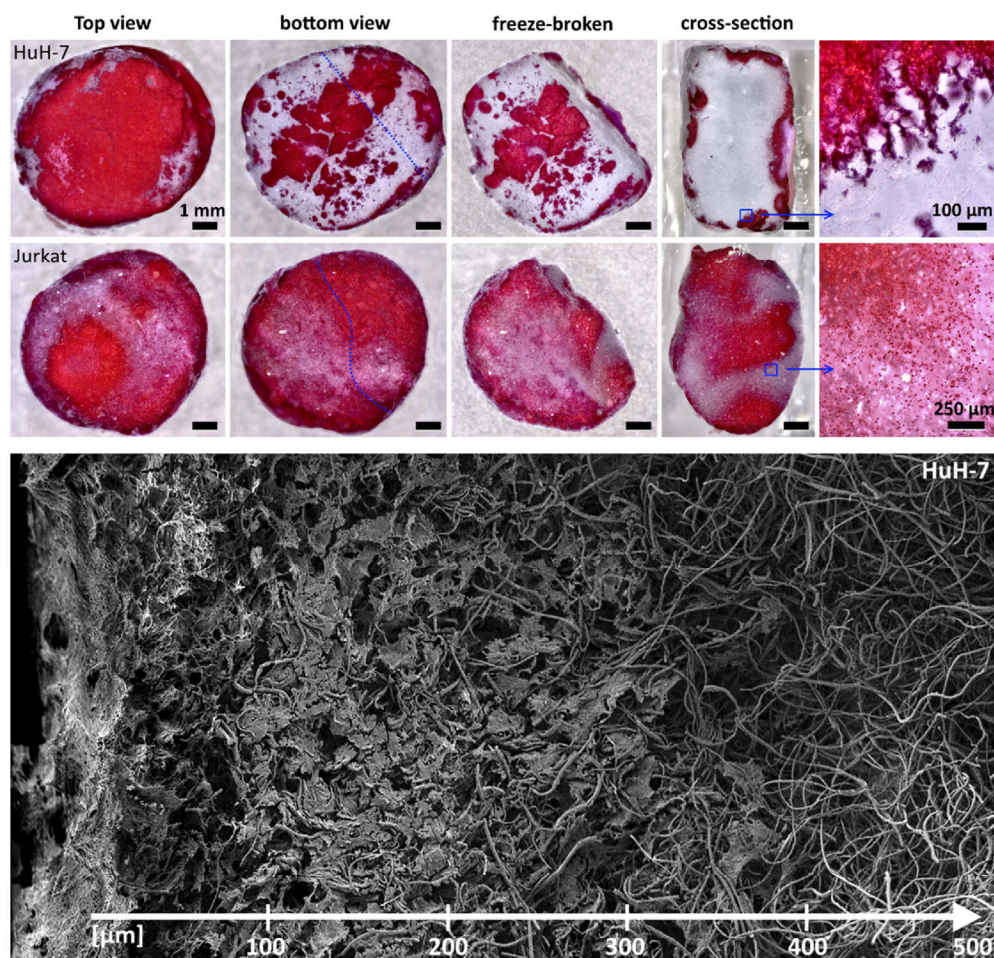
ASGP-R inactivation by  $\text{Zn}^{2+}$  reveals comparable results (not shown), but a significantly higher cell toxicity that makes  $\text{Zn}^{2+}$  ions unsuitable for long and short cell incubation times. The decrease in RR after  $\text{CuCl}_2$  treatment for cells cultivated on PLA-Gal strongly reinforces our hypothesis that the Gal moieties of these scaffolds favor the binding of hepatoma cells on nonwoven. The ASGP-R expression after up to 11 day incubation in the presence of 60  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$ , however, is similar to nontreated cells as shown by immunofluorescence analysis in flow cytometry (Figure S9). Hence, the copper treatment only leads to inactivation of the receptor and not to its down regulation, that is, antibodies can still bind as previously described by McAbee<sup>38</sup> for rat hepatocytes.

**Bioreactor Cultivations of Hepatic Cells on Galactosylated Sponges.** To overcome diffusion limitations of common 2D static or 3D culture,<sup>39,40</sup> a perfusion-bioreactor was constructed in house via additive manufacturing (Figure S10). The reactor was designed to promote the seeding of cells within the sponge interior and to adequately supply the cells with nutrients during 3D culture.<sup>24</sup> The latter is necessary to maintain cell viability and promote ECM production during long culture times and including cells growing deep inside the scaffold. We found it possible to almost homogeneously seed nonadherent Jurkat cells (size about 13  $\mu\text{m}$ ) into PLA sponges by perfusion (Figure 6), thereby inter alia complementing static culture results shown recently by our group.<sup>11</sup> It is, however, much more challenging to homogeneously seed adherent human hepatic cells (HuH-7, 20  $\mu\text{m}$ ) under similar conditions. The cell seeding step is especially important for epithelial cells such as HuH-7 because these cells tend to quickly form dense layers of epithelial tissue, which can, in the worst case, block perfusion. Hence, a uniform distribution of cells is crucial to establish a template for spatially uniform ECM deposition within the polymer fiber sponge while granting long-term stability and thorough perfusion flow during culture.

Any irregular cell deposition or cell growth might later accelerate the disruption of the bioreactor’s convective fluid flow through the polymer fiber sponge and must be avoided. The differing results comparing Jurkat and HuH-7 cell-seeding distribution already indicate that in the case of the adherent liver cells, the key factor for efficient cell seeding of polymer fiber sponges seems to be dominated by the cell interaction with the fiber surface. Therefore, we expanded our bioreactor culture investigations to evaluate the impact of PLA-Gal sponges on cell seeding under analog perfusion bioreactor culture conditions. Again, adherent HuH-7 cells are used, now stained prior to seeding with CFDA-SE, imaged by CLSM ex situ after sample cross-sectioning (Figure 7).<sup>36</sup>

The adherent nature of HuH-7 cells let them to quickly settle on the top of monolithic PLA sponges (Figure 7A), preventing cells to penetrate into the scaffold, as found previously (Figure 6). Using galactosylated PLA blend-electrospun PLA-Gal sponges under analog conditions (Figure 7B), we found that the Gal presence has an obvious positive impact on the initial hepatic cell distribution (Figure 7, bottom left). The homogeneity of the cell distribution inside of the PLA-Gal sponge has significantly improved compared to sponges without the presence of Gal as proven by the CLSM and by SEM imaging (Figure 7, bottom right). The sponge pore structure of each system is identical as shown in Supporting Information 7 (Figure S12). Hereby, it must be annotated that the absorption and emission spectra of CFDA-SE and PLA-*b*-PAGP are slightly overlapping. Hence, all fluorescing spots smaller than about 5–





**Figure 6.** (Top) Hepatic perfusion-bioreactor cell culture results with PLA sponges and MTT-stained HuH-7 such as Jurkat cells under LM. (Bottom) Cross-sectional, stitched SEM images to visualize the HuH-7 cell surface tissue formation and cell penetration into the PLA sponge.

10  $\mu\text{m}$  in diameter might arise from punctual, strong autofluorescent emission centers of dense PLA-Gal fiber regions.

## CONCLUSIONS

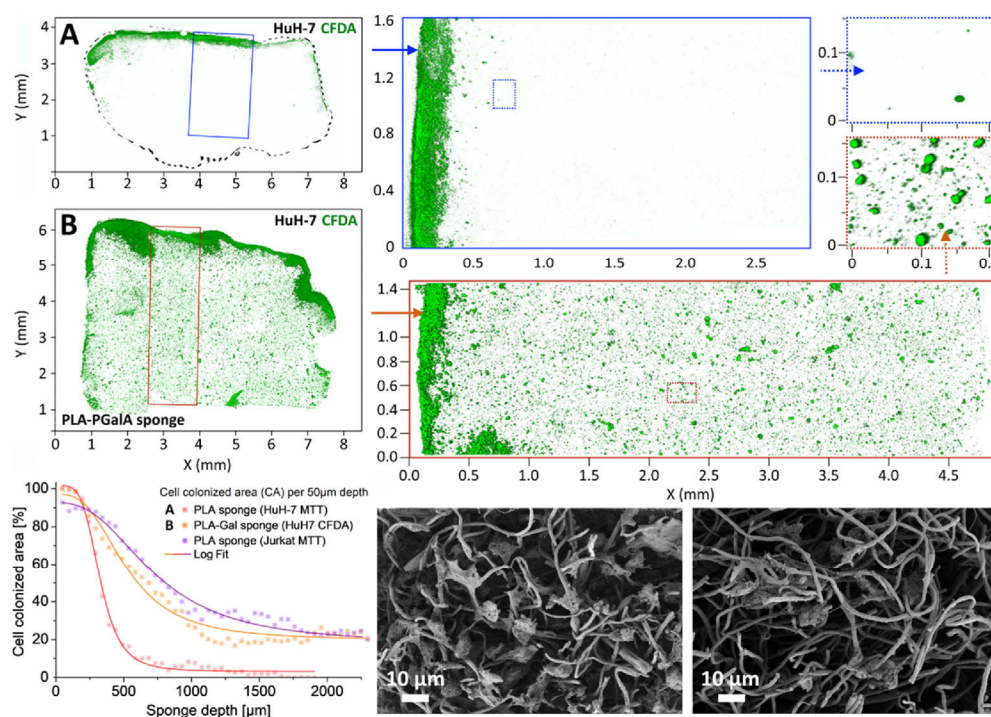
The galactose (Gal) biomodification and cell culture results using degradable polymer fiber-based sponges presented herein bring us closer to achieve fully cellularized artificial ECM biomimicking scaffolds. Two ways to effectively galactosylate polymer fiber sponges using either blend-electrospinning or a mild Gal-carrier in-solution coating procedure are presented. We validated the galactose-carrier system used for galactosylation and its cell distribution promoting the impact during human hepatic 2D static culture, compared to several synthetic references. The results are quantified in detail by in and ex situ evaluations of cell attachment, distribution, and proliferation. The promoting effects of the Gal-carrier are proven by  $\text{Cu}^{2+}$  ASGP-R-blocking experiments, which verify the Gal-carrier's capability to interact with the ASGP-R expressed by different hepatocytes.

A pronounced autofluorescence of the Gal-carrier was found and investigated. It allows creating in-depth and high-resolution 3D scaffold images of Gal-carrier-coated PLA polymer fiber sponges for visualization of its internal structure using an

ultraviolet-confocal laser scanning microscope. This might be further elaborated to allow parallel visualization of fibers, cells, and the polymer fiber sponge interaction in future.

Using 3D bioreactor perfusion culture, the cell distribution homogeneity inside of the PLA-Gal polymer fiber sponge is significantly improved compared to nongalactosylated polymer fiber sponges. Though the cells inside the PLA-Gal polymer fiber sponge are homogeneously distributed, there are still too many cells on the polymer fiber sponge surface. This must be brought under control in future, especially aiming at long-term bioreactor culture experiments, which require a long-term stable convective flow. The temporary inactivation of the ASGP-R, bound to the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  as presented, might be helpful in this regard. Further investigations can now focus on how the use of  $\text{Cu}^{2+}$  and, for example, pore structuring techniques affect cell distribution within the polymer fiber sponge to create homogeneously seeded and fully cellularized sponges. We also expect the cell seeding protocol to have a huge impact on the initial cell distribution, yet, kept constant for all investigations presented. The overall, very promising results allow us to pursue our aim and progress to advanced hepatic 3D bioreactor polymer fiber sponge cellularization experiments, aiming at long-term culture, distinct cellularization, and hepatocyte function investigations. Proving the liver cells' hepatic activity





**Figure 7.** Fusion-bioreactor cell culture results with HuH-7 cells evaluated by CLSM imaging with a 488 nm laser using cross-sections of (A) monolithic PLA sponge (with dashed sponge border) and (B) PLA-Gal sponge. (Bottom, left) Cell depth penetration evaluation of A and B compared to the PLA-Jurkat sponge results. (Bottom, right) SEM images of cells found in the cross-section of sponge (B) (left) at the sponge border and (right) in its center.

to be preserved within our sponges in future experiments, we can optimize them into mature bioactive cell testing platforms for human ex vivo analysis.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biomac.0c00900>.

SEM, CLSM, NMR, SEC, DSC, NanoCT, contact angle, and fluorescence spectrophotometry measurements (PDF)

NanoCT imaging of a nanofiber sponge (AVI)

Coated PLA sponge (AVI)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

**Ruth Freitag** – Process Biotechnology, University of Bayreuth, 95440 Bayreuth, Germany; [orcid.org/0000-0003-4642-897X](https://orcid.org/0000-0003-4642-897X); Email: [ruth.freitag@uni-bayreuth.de](mailto:ruth.freitag@uni-bayreuth.de)

**Andreas Greiner** – Macromolecular Chemistry and Bavarian Polymer Institute, University of Bayreuth, 95440 Bayreuth, Germany; [orcid.org/0000-0002-5310-3850](https://orcid.org/0000-0002-5310-3850); Email: [greiner@uni-bayreuth.de](mailto:greiner@uni-bayreuth.de)

### Authors

**Michael Mader** – Macromolecular Chemistry and Bavarian Polymer Institute, University of Bayreuth, 95440 Bayreuth, Germany

**Moritz Helm** – Process Biotechnology, University of Bayreuth, 95440 Bayreuth, Germany

**Mingxia Lu** – Centre for Advanced Macromolecular Design (CAMD), School of Chemistry, University of New South Wales, Sydney, New South Wales 2052, Australia

**Martina H. Stenzel** – Centre for Advanced Macromolecular Design (CAMD), School of Chemistry, University of New South Wales, Sydney, New South Wales 2052, Australia; [orcid.org/0000-0002-6433-4419](https://orcid.org/0000-0002-6433-4419)

**Valérie Jérôme** – Process Biotechnology, University of Bayreuth, 95440 Bayreuth, Germany

**Seema Agarwal** – Macromolecular Chemistry and Bavarian Polymer Institute, University of Bayreuth, 95440 Bayreuth, Germany; [orcid.org/0000-0002-3174-3152](https://orcid.org/0000-0002-3174-3152)

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biomac.0c00900>

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Lukas Weber for performing parts of the PLA-*b*-PAGP coating experiments; Oliver Riester, Gissela Katherine Constante Ibarra, and Ioannis Chontzoglou for producing parts of the data. Jessica Detzel and Anne Hagen are acknowledged for excellent help in the lab as an intern and Xiaojian Liao for his support with fluorescence spectrophotometry measurements.

## ■ REFERENCES

(1) Frantz, C.; Stewart, K. M.; Weaver, V. M. The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 4195–4200.

- (2) Theocharis, A. D.; Skandalis, S. S.; Gialeli, C.; Karamanos, N. K. Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2016**, *97*, 4–27.
- (3) Greiner, A.; Wendorff, J. H. Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 5670–5703.
- (4) Duan, G.; Jiang, S.; Jérôme, V.; Wendorff, J. H.; Fathi, A.; Uhm, J.; Altstädt, V.; Herling, M.; Brey, J.; Freitag, R.; Agarwal, S.; Greiner, A. Ultralight, Soft Polymer Sponges by Self-Assembly of Short Electrospun Fibers in Colloidal Dispersions. *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25*, 2850–2856.
- (5) Zhu, J.; Jiang, S.; Hou, H.; Agarwal, S.; Greiner, A. Low Density, Thermally Stable, and Intrinsic Flame Retardant Poly(bis-(benzimidazo)Benzophenanthroline-dione) Sponge. *Macromol. Mater. Eng.* **2018**, *303*, 1700615.
- (6) Si, Y.; Wang, X.; Dou, L.; Yu, J.; Ding, B. Ultralight and fire-resistant ceramic nanofibrous aerogels with temperature-invariant superelasticity. *Sci. Adv.* **2018**, *4*, No. eaas8925.
- (7) Kim, J.-W.; Taki, K.; Nagamine, S.; Ohshima, M. Preparation of poly(L-lactic acid) honeycomb monolith structure by unidirectional freezing and freeze-drying. *Chem. Eng. Sci.* **2008**, *63*, 3858–3863.
- (8) Jiang, S.; Agarwal, S.; Greiner, A. Low-Density Open Cellular Sponges as Functional Materials. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 15520–15538.
- (9) Deuber, F.; Mousavi, S.; Hofer, M.; Adlhart, C. Tailoring Pore Structure of Ultralight Electrospun Sponges by Solid Templating. *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 5595–5598.
- (10) Deuber, F.; Adlhart, C. From Short Electrospun Nanofibers to Ultralight Aerogels with Tunable Pore Structure. *Chimia* **2017**, *71*, 236–240.
- (11) Mader, M.; Jérôme, V.; Freitag, R.; Agarwal, S.; Greiner, A. Ultraporous, Compressible, Wetttable Polylactide/Polycaprolactone Sponges for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 1663–1673.
- (12) Xu, T.; Miszuk, J. M.; Zhao, Y.; Sun, H.; Fong, H. Electrospun polycaprolactone 3D nanofibrous scaffold with interconnected and hierarchically structured pores for bone tissue engineering. *Adv. Healthcare Mater.* **2015**, *4*, 2238–2246.
- (13) Yao, Q.; Cosme, J. G. L.; Xu, T.; Miszuk, J. M.; Picciani, P. H. S.; Fong, H.; Sun, H. Three dimensional electrospun PCL/PLA blend nanofibrous scaffolds with significantly improved stem cells osteogenic differentiation and cranial bone formation. *Biomaterials* **2017**, *115*, 115–127.
- (14) Xu, T.; Yao, Q.; Miszuk, J. M.; Sanyour, H. J.; Hong, Z.; Sun, H.; Fong, H. Tailoring weight ratio of PCL/PLA in electrospun three-dimensional nanofibrous scaffolds and the effect on osteogenic differentiation of stem cells. *Colloids Surf., B* **2018**, *171*, 31–39.
- (15) Miszuk, J. M.; Xu, T.; Yao, Q.; Fang, F.; Childs, J. D.; Hong, Z.; Tao, J.; Fong, H.; Sun, H. Functionalization of PCL-3D Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Improved BMP2-Induced Bone Formation. *Appl. Mater. Today* **2018**, *10*, 194–202.
- (16) Xu, T.; Liang, Z.; Ding, B.; Feng, Q.; Fong, H. Polymer blend nanofibers containing polycaprolactone as biocompatible and biodegradable binding agent to fabricate electrospun three-dimensional scaffolds/structures. *Polymer* **2018**, *151*, 299–306.
- (17) Mazza, G.; Rombouts, K.; Rennie Hall, A.; Urbani, L.; Vinh Luong, T.; Al-Akkad, W.; Longato, L.; Brown, D.; Maghsoudlou, P.; Dhillon, A. P.; Fuller, B.; Davidson, B.; Moore, K.; Dhar, D.; de Coppi, P.; Malago, M.; Pinzani, M. Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13079.
- (18) Mazza, G.; Al-Akkad, W.; Telese, A.; Longato, L.; Urbani, L.; Robinson, B.; Hall, A.; Kong, K.; Frenguelli, L.; Marrone, G.; Willacy, O.; Shaeri, M.; Burns, A.; Malago, M.; Gilbertson, J.; Rendell, N.; Moore, K.; Hughes, D.; Notingher, I.; Jell, G.; Del Rio Hernandez, A.; de Coppi, P.; Rombouts, K.; Pinzani, M. Rapid production of human liver scaffolds for functional tissue engineering by high shear stress oscillation-decellularization. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5534.
- (19) Wang, Y.; Nicolas, C. T.; Chen, H. S.; Ross, J. J.; de Lorenzo, S. B.; Nyberg, S. L. Recent Advances in Decellularization and Recellularization for Tissue-Engineered Liver Grafts. *Cells Tissues Organs* **2017**, *204*, 125–136.
- (20) Ogiso, S.; Yasuchika, K.; Fukumitsu, K.; Ishii, T.; Kojima, H.; Miyauchi, Y.; Yamaoka, R.; Komori, J.; Katayama, H.; Kawai, T.; Yoshitoshi, E. Y.; Kita, S.; Yasuda, K.; Uemoto, S. Efficient recellularisation of decellularised whole-liver grafts using biliary tree and foetal hepatocytes. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 35887.
- (21) Hayward, A. S.; Eissa, A. M.; Maltman, D. J.; Sano, N.; Przyborski, S. A.; Cameron, N. R. Galactose-functionalized polyHIPE scaffolds for use in routine three dimensional culture of mammalian hepatocytes. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 4271–4277.
- (22) O'Brien, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mat. Today* **2011**, *14*, 88–95.
- (23) Ahmed, S.; Chauhan, V. M.; Ghaemmaghami, A. M.; Aylott, J. W. New generation of bioreactors that advance extracellular matrix modelling and tissue engineering. *Biotechnol. Lett.* **2019**, *41*, 1–25.
- (24) Schmid, J.; Schwarz, S.; Meier-Staude, R.; Sudhop, S.; Clausen-Schaumann, H.; Schieker, M.; Huber, R. A Perfusion Bioreactor System for Cell Seeding and Oxygen-Controlled Cultivation of Three-Dimensional Cell Cultures. *Tissue Eng., Part C* **2018**, *24*, 585–595.
- (25) Kennedy, K. M.; Bhaw-Luximon, A.; Jhurry, D. Cell-matrix mechanical interaction in electrospun polymeric scaffolds for tissue engineering: Implications for scaffold design and performance. *Acta Biomater.* **2017**, *50*, 41–55.
- (26) Pricer, W. E.; Ashwell, G. The Binding of Desialylated Glycoproteins by Plasma Membranes of Rat Liver. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 4825–4833.
- (27) Soto-Gutierrez, A.; Fox, I. J.; Navarro-Alvarez, N. *Methods in Bioengineering: Cell Transplantation*; Artech House: Boston, 2011.
- (28) Weigel, P. H.; Schmell, E.; Lee, Y. C.; Roseman, S. Specific adhesion of rat hepatocytes to beta-galactosides linked to polyacrylamide gels. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 330–333.
- (29) Griffith, L. G.; Lopina, S. Microdistribution of substratum-bound ligands affects cell function: hepatocyte spreading on PEO-tethered galactose. *Biomaterials* **1998**, *19*, 979–986.
- (30) Oka, J. A.; Weigel, P. H. Binding and spreading of hepatocytes on synthetic galactose culture surfaces occur as distinct and separable threshold responses. *J. Cell Biol.* **1986**, *103*, 1055–1060.
- (31) Chien, H.-W.; Tsai, W.-B. Fabrication of tunable micropatterned substrates for cell patterning via microcontact printing of polydopamine with poly(ethylene imine)-grafted copolymers. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 3678–3686.
- (32) Cho, C. S.; Seo, S. J.; Park, I. K.; Kim, S. H.; Kim, T. H.; Hoshiba, T.; Harada, I.; Akaike, T. Galactose-carrying polymers as extracellular matrices for liver tissue engineering. *Biomaterials* **2006**, *27*, 576–585.
- (33) Liao, X.; Kahle, F.-J.; Liu, B.; Bässler, H.; Zhang, X.; Köhler, A.; Greiner, A. Polarized blue photoluminescence of mesoscopically ordered electrospun non-conjugated polyacrylonitrile nanofibers. *Mater. Horiz.* **2020**, *7*, 1605.
- (34) Thongjamroon, S.; Pattanapokratan, A. *International Conference on Photonics Solutions*; SPIE, 2015.
- (35) Braet, F.; de Zanger, R.; Wisse, E. Drying cells for SEM, AFM and TEM by hexamethyldisilazane: a study on hepatic endothelial cells. *J. Microsc.* **1997**, *186*, 84–87.
- (36) Parish, C. R.; Glidden, M. H.; Quah, B. J. C.; Warren, H. S. Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. *Curr. Protoc. Immunol.* **2009**, *84*, 4.9.1–4.9.13.
- (37) Ting, S. R. S.; Gregory, A. M.; Stenzel, M. H. Polygalactose containing nanocages: the RAFT process for the synthesis of hollow sugar balls. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 342–352.
- (38) McAbee, D. D.; Jiang, X. Copper and zinc ions differentially block asialoglycoprotein receptor-mediated endocytosis in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 14750–14758.
- (39) McMurtrey, R. J. Analytic Models of Oxygen and Nutrient Diffusion, Metabolism Dynamics, and Architecture Optimization in Three-Dimensional Tissue Constructs with Applications and Insights in Cerebral Organoids. *Tissue Eng., Part C* **2016**, *22*, 221–249.

(40) Geris, L. *Computational Modeling in Tissue Engineering*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2013.



## Supporting Information

# Perfusion Cultivation of Artificial Liver ECM in Fibrous Polymer Sponges Biomimicking Scaffolds for Tissue Engineering

*Michael Mader,<sup>a</sup> Moritz Helm,<sup>b</sup> Mingxia Lu,<sup>c</sup> Martina Stenzel,<sup>c</sup> Valérie Jérôme,<sup>b</sup> Ruth Freitag,<sup>t</sup> Seema Agarwal,<sup>a</sup> and Andreas Greiner,<sup>a\*</sup>*

<sup>a</sup>Macromolecular Chemistry and Bavarian Polymer Institute, University of Bayreuth, Universitätsstrasse 30, 95440 Bayreuth, Germany

<sup>b</sup>Process Biotechnology, University of Bayreuth, 95440, Bayreuth, Germany

<sup>c</sup> Centre for Advanced Macromolecular Design (CAMD), School of Chemistry, University of New South Wales, Sydney, NSW 2052, Australia



**SI-1 – Solvents and Materials.**

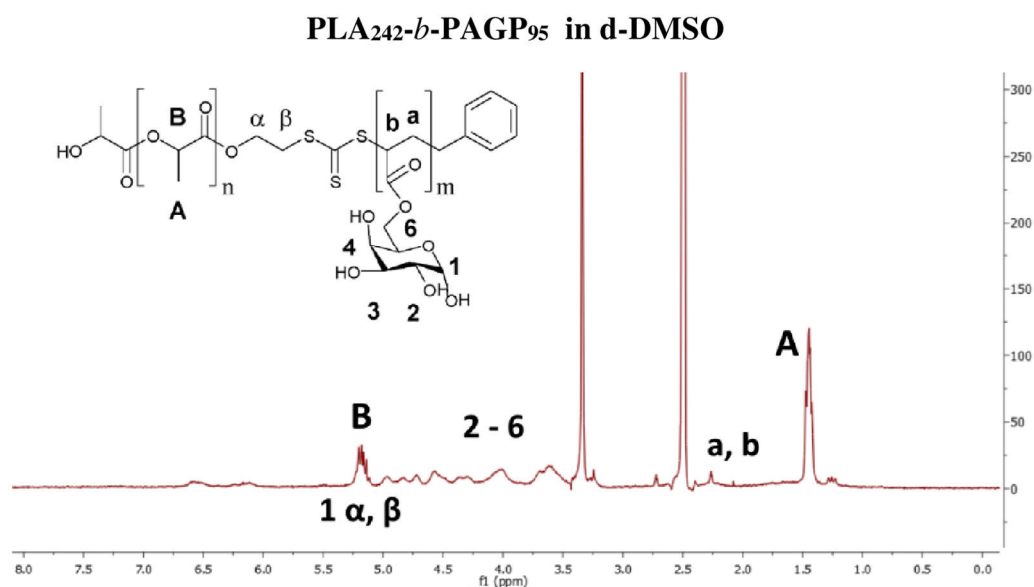
**Polymers.** Polylactide (Ingeo™ Biopolymer PLA 4043D, NatureWorks LLC), poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL Capa™ 6800, Perstorp), poly-lactide-ethylenoxide-lactide (PLAEOLA, #P-7331, Polymer Source Inc.), poly(lactide)-*block*-poly(6-*O*-acryloyl- $\alpha$ -d-galactopyranose) (PLA-*b*-PAGP, provided by M. Lu, M. Stenzel, University of Sidney, Australia) were used as received. 3D SLA-Printer and Resins: Formlabs Form 2 (Formlabs Inc., USA); Clear Resin (RS-F2-GPCL-04).

**Scaffolding solvents and reagents.** Chloroform (CHCl<sub>3</sub>, pur. 99.2 %, VWR International S.A.S, 0.8 % EtOH, Lot.: 17K274019), formic acid (FA, pur.  $\geq$  98 %, Sigma Aldrich, Lot.: SZB 1530V), acetic acid (AA, pur. 99.7 %, Fisher Scientific, Lot.: 1991469), pyridine (pur. 99+ %, Acros Organics, Lot.: 131780010). Ethanol (pur. 99.9 %, VWR International S.A.S, Lot.: 17I064005), Dimethyl sulfoxide (DMSO, pur. 99.9 %, Fisher Scientific, Lot.: 1989699), 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazane (HMDS, pur. 98 %, Merck KGaA, Lot.: S7576524 843), *tert*-Butanol (tBuOH, pur. 99.5 %, Grüssing GmbH) were used as received.

**Cell culture materials and standard chemicals.** If not otherwise indicated, Greiner Bio-One (Frickenhausen, Germany) was used as supplier for cell culture materials. Trypan blue solution (0.4 %) was from VWR (Ismaning, Germany). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal calf serum (FCS), L-glutamine, cell culture grade HEPES, penicillin and streptomycin were from Biochrom AG (Berlin, Germany). Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> (DPBS) was from Lonza (Visp, Switzerland). Minimum Essential Medium Eagle (MEM) without phenol red was from Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Dreieich, Germany). Alamar Blue solution was from BioRad (Feldkirchen, Germany). Mouse anti-ASGP-R1 antibodies fluorescently labelled with PE (563655; Clone 8D7) and isotype control PE mouse IgG1 Kappa (551436; Clone MOPC-21) were from BD Pharmingen (Heidelberg, Germany). 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFDA-SE) and glutardialdehyde solution (grade I, 70 %) were from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). The Live/Dead reduced biohazard viability/cytotoxicity kit was from Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Dreieich, Germany).

### Analytical devices and methods for material characterization and imaging.

**Nuclear magnet resonance spectroscopy (NMR).**  $^1\text{H}$ -NMR spectra were recorded on a Bruker Ultrashield 300 operating at a frequency of 300 MHz. *d*-chloroform was used as solvent. MestReNova (MestreLab Research S.L., version 6.1.0-6224) was used for spectra evaluation. The spectroscopic analysis includes an accumulation of 16 measurements. The polymers were used without further purification.



NMR measurements of the PLA block (not shown) and the resulting PLA-*b*-PAGP copolymer were carried out, respectively, to determine the block lengths in repeating units as PLA<sub>242</sub>-*b*-PAGP<sub>95</sub> and as molecular weight ( $M_n$ ) of the copolymer calculated as 40 kDa.

**Size Exclusion chromatography (SEC)** *N,N*-Dimethylacetamide (HPLC grade, RI 1.43) was used as solvent for dissolving polymer and as eluting solvent containing an additional 0.05 % (w/v) of 2,6- dibutyl-4-methylphenol and 0.03% (w/v) of LiBr. An injection volume of 50  $\mu\text{L}$  at a concentration of 0.1 mg/mL at a flow rate of 1.0 mL/min. and a column temperature of 50  $^\circ\text{C}$  was used. The system for SEC measurements was used as published.<sup>1</sup> The SEC measurements were performed at the University of Sidney at the department of chemistry in New South Wales (kindly provided by M. Lu, M. Stenzel).

**Thermogravimetric Analysis (TGA).** Measurements were performed on a TG 209 F1 Libra von NETZSCH using  $\text{AlO}_2$  crucibles (Thepro 85  $\mu\text{l}$ , 6.8 x 4 mm, compatible to NETZSCH 399.972).

**Differential Scanning Calorimetry.** DSC measurements were performed under nitrogen atmosphere using a Mettler Toledo 821c DSC system (TS0801R0 Sample Robot), which is calibrated with indium and zinc standards. The data evaluation was performed using STARe SW 9.20a software. The samples were heated from -20 to 130 °C (10 K/min) cooling to -20 °C (10 K/min) and a second heating was performed by heating to 130 °C (10 K/min) and cooling to room temperature.

**SEM.** Images were recorded on a Zeiss LEO 1530 (FE-SEM, Schottky-field-emission cathode, BPI KeyLab Electron and Optical Microscopy, Bayreuth) using an in-lens and SE 2 detector. An accelerating voltage of 2 kV was used. The samples were sputtered with platinum (1.3 nm) prior to SEM imaging using a sputter coater (Cressington HR208) with thickness controller (Cressington MTM20).

**Laser scanning confocal microscopy.** Images were recorded on a TCS SP8 CLSM (Leica, Model DMI 6000, PMT-Detector) using a diode-laser (488 nm Laser for Live/Dead<sup>®</sup>; 405nm Laser for autofluorescence of PLA-PAGP).

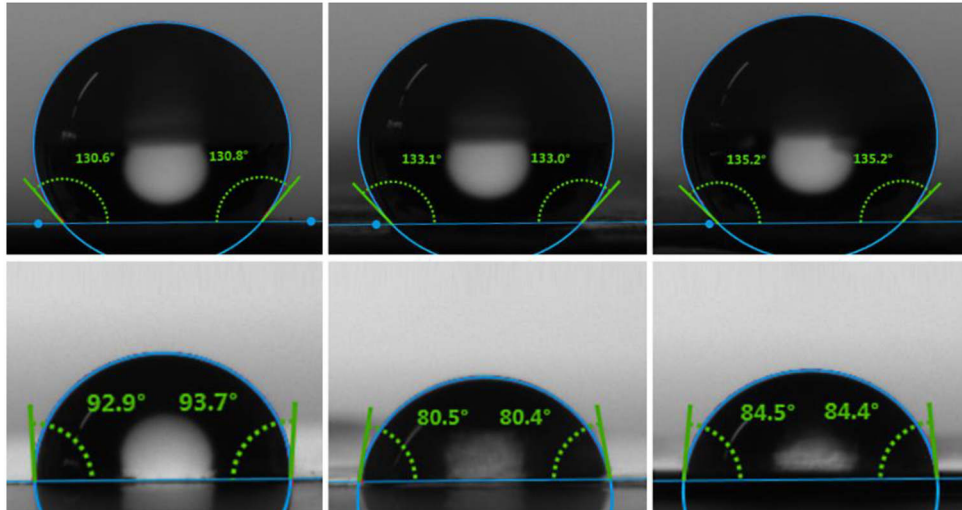
**Fluorescence spectrophotometry.** Autofluorescence measurements were recorded on a JASCO (FP-8600) luminescence spectrometer using a Xenon lamp excitation source.

**AlamarBlue<sup>®</sup> proliferation assay.** The estimation of cell proliferation with AlamarBlue<sup>®</sup> (Bio-Rad Laboratories, Inc.; Manufactured by Trek Diagnostic System) was performed according to the manufacturer instructions. Briefly, cell culture medium was discarded from the wells containing nonwovens. AlamarBlue<sup>®</sup> solution, in an amount equal to 10 % of the total volume, was prepared in fresh cell culture medium. AlamarBlue<sup>®</sup> containing medium was added to each well. Incubation was performed for two hours at 37 °C in the cell culture incubator. Fresh media was also added to wells containing no cells to serve as a negative control. To determine the fluorescence to be expected from the fully reduced form of the AlamarBlue<sup>®</sup> (positive control), AlamarBlue<sup>®</sup> solution made up in the cell culture medium was autoclaved for 15 minutes. Aliquots of the cell culture medium, as well as positive and negative controls, were collected and fluorescence (Ex. 535 nm / Em. 590 nm) was analyzed in triplicate in a plate reader (Genios Pro, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Germany).

## SI-2 – Gal carrier advantages, processing and validation

### Contact angle measurements.

The hydrophilicity can have a high impact to the affinity of cells. Therefore, contact angle measurements were performed using the virgin-nonwovens types used for cell culturing and films made thereof.



**SI-Figure 1.** Representative contact angle measurements of (Left) PLA/PCL, (Center) PLA/LAEOLA and right) PLA-Gal (top) nonwovens and (bottom) heat pressed films prepared thereof.

As the contact angles results of nonwovens cannot be representative for the wettability and hydrophilicity behavior of the material itself, we added the contact angle measurements of films, directly heat-pressed out of the nonwovens (180 °C, 30 s, 40 N).

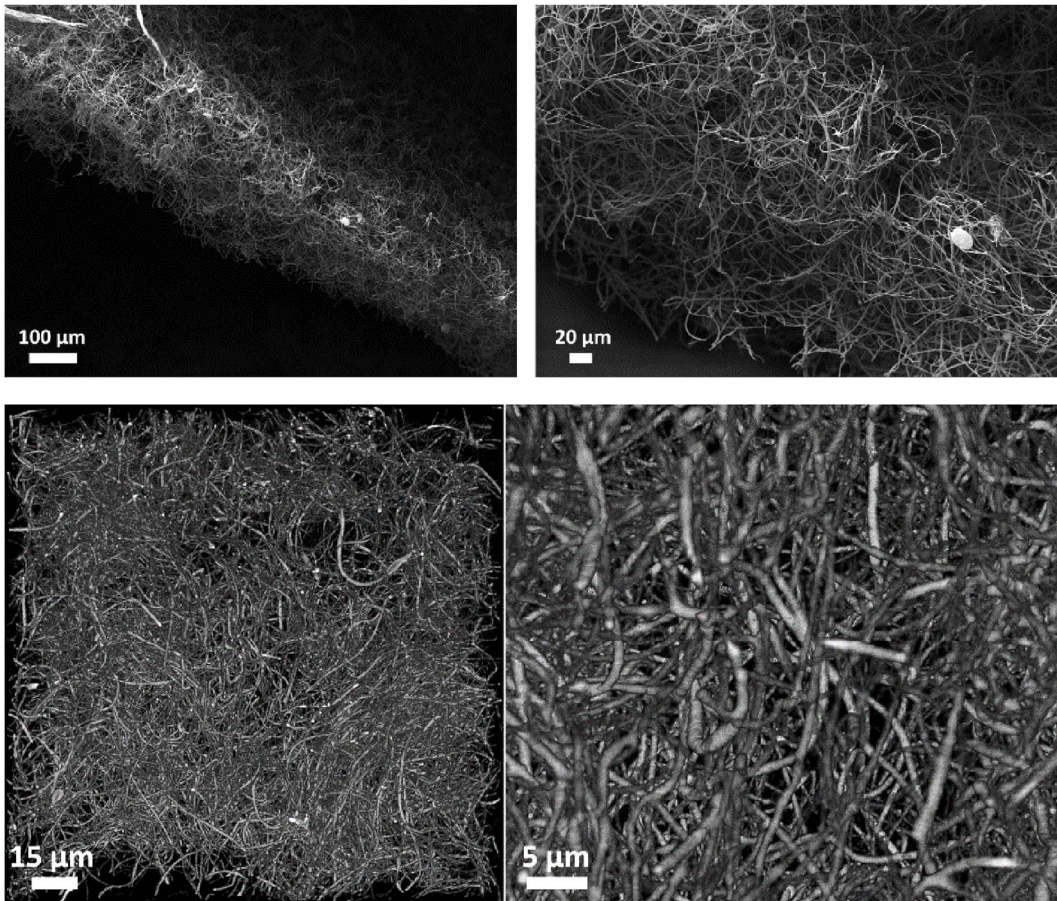
Contact angle measurements were performed on a Drop Shape Analyzer (Krüss Advance, v1.3.1) using Milli-Q water. For all measurements, water droplets of 4  $\mu$ L volume were used.



### SI-3 – Sponge characterization by NanoCT.

A few changes have been made in sponge fabrication in regard to the choice of freeze-drying molds used for sponge fabrication prior to the freezing process and the final freeze-drying step. These include the use of glass molds to clearly identify irregularities within the fiber dispersion distribution inside the mold. This irregularities can stem from, e.g., air entrapment and large fiber clusters. The use of glass molds allows to prevent such issues and helps to greatly increase the overall homogeneity of the fiber dispersion right before freezing. Far more homogeneous, highly reproducible and uniform sponge densities and shapes can be achieved, as described in the materials section.

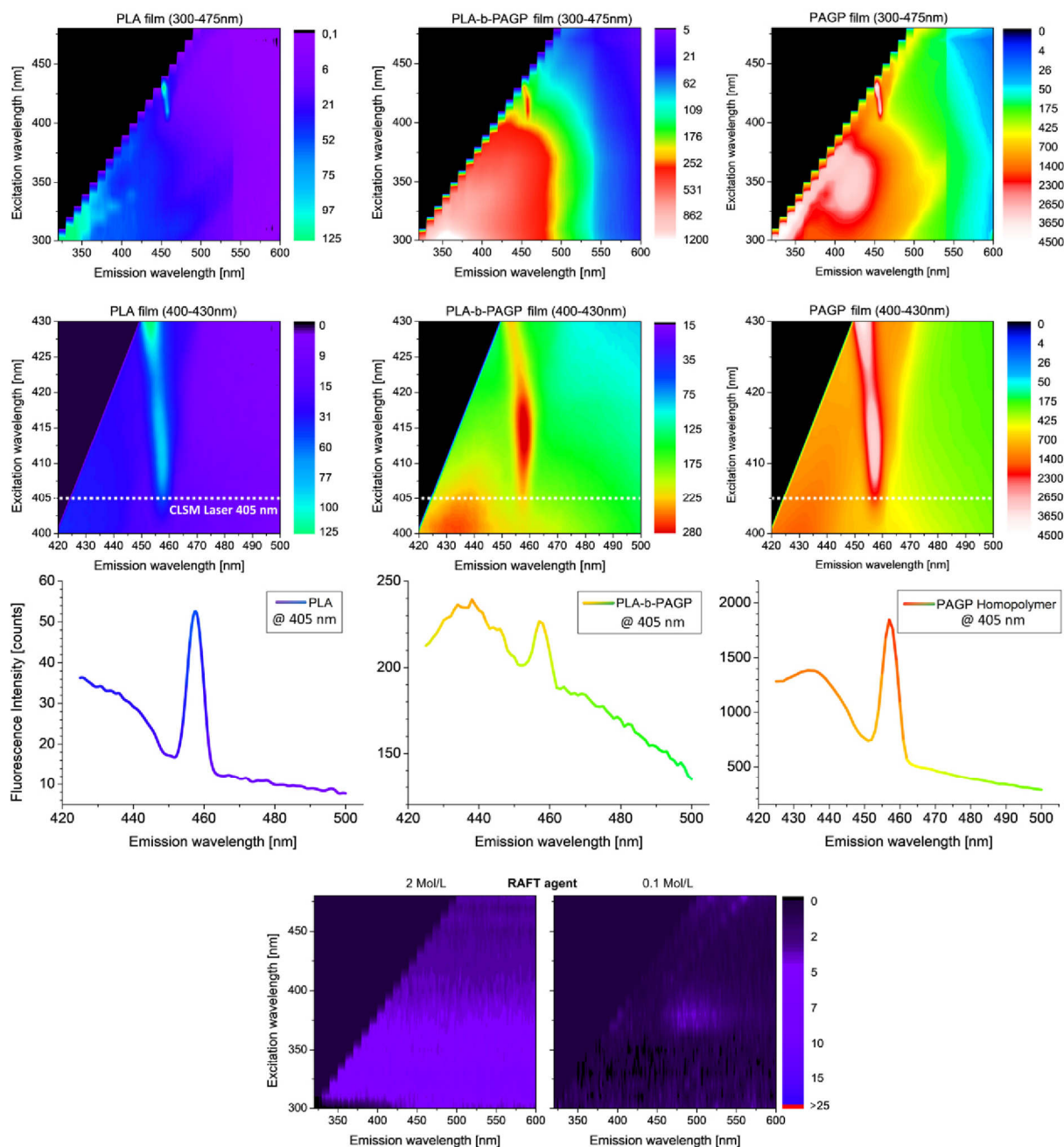
It also allows to prepare ultra-thin film PLA sponge samples used for NanoCT measurements shown in **SI-Figure 2**, and complemented with SEM images.



**SI-Figure 2.** (Top) SEM images of an ultra-thin PLA sponge ( $15 \text{ mg/cm}^3$ ) fabricated by freeze-cutting, as used for (bottom) NanoCT measurements (**SI-Video 2**).

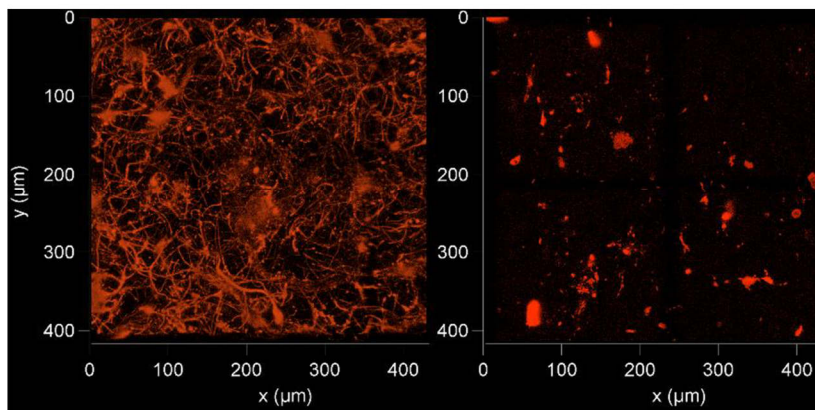
Images were recorded on a Skyscan 2214 (Bruker Corporation, Hamamatsu L10321 X-Ray source, Camera XIMEA MH110XC) and evaluated using ImageJ.

## SI-4 – Fluorescence spectra of used polymers and RAFT agent.



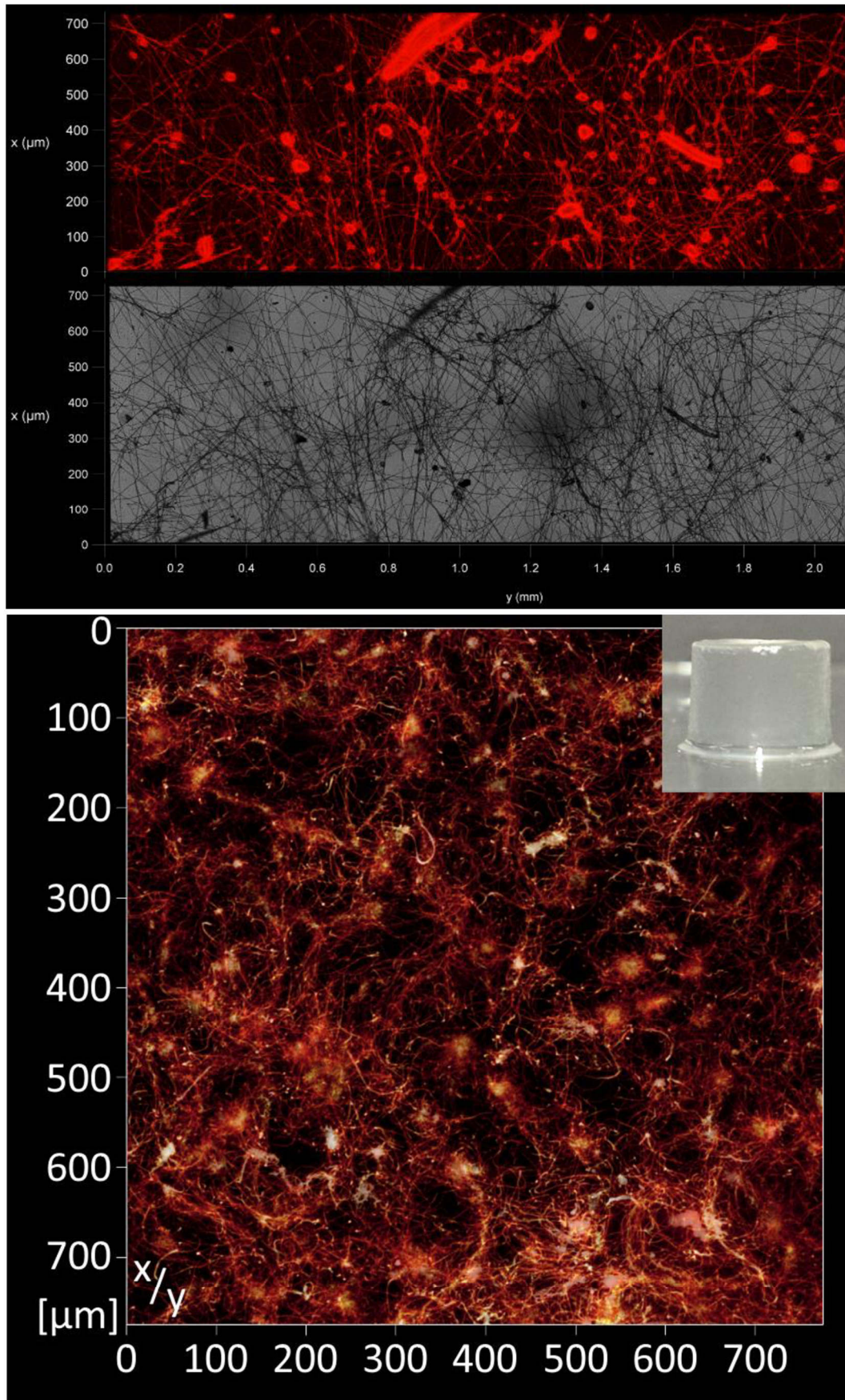
**SI-Figure 3.** Material autofluorescence characterization results evaluated by fluorescence spectrophotometry. (Top) Fluorescence spectral 3D excitation/emission range measurements for PLA, PLA-PAGP and PAGP recorded under analog conditions to demonstrate the relative fluorescence intensities. (Center) Fluorescence spectrum of each Polymer at 405 nm excitation, corresponding to the CLSM Laser wavelength available for sample characterization, respectively. (Bottom) Fluorescence spectral 3D excitation/emission range measurements for the RAFT agent (Trithiocarbonic Acid Benzyl Ester Dodecyl Ester) used, measure in DMF.

The autofluorescence of monolithic PLA is too low to visualize individual fibers (**SI-Fig. 4**, right) in contrast to PLA-PAGP in-solution treated PLA fibers under CLSM (**SI-Fig. 4**, left).



**SI-Figure 4.** CLSM measurements of a (left) PLA-*b*-PAGP coated PLA-Sponge and (right) monolithic PLA sponge. The measurements were performed and evaluated at identical conditions and parameters.





**SI-Figure 5.** UV-CLSM images of (Top) PLA-Gal blend-fibers with fluorescence and transmittance detector-channel. (Bottom) PLA-*b*-PAGP coated PFS used for CLSM imaging after immersion in oil.



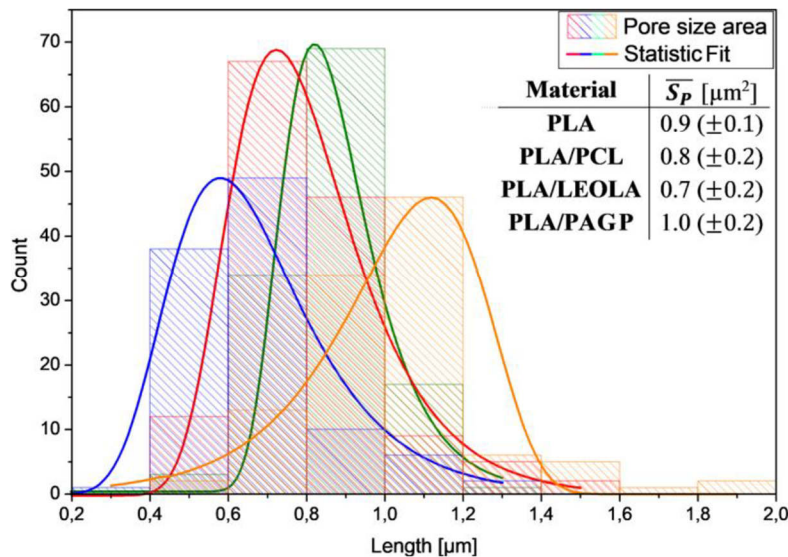
## Fiber diameter and nonwoven pore size distribution.

### Porometer measurements.

The bulk porosity of the nonwovens was evaluated by porometer measurements. A Capillary flow Porometer (PSM 165/H, Topas-GmbH) for evaluation of pores in the size range of 0.25-130  $\mu\text{m}$  using Topor (Topas-GmbH) test-liquid (surface tension: 16 mN/m) was used. The sample width examined was 0.95  $\text{cm}^2$ , respectively.

The mean pore size of PLA-Gal nonwoven was calculated to be slightly higher with 3.9 ( $\pm 0.2$ )  $\mu\text{m}^2$  (flow volume at 10 kPa: 10.6 L/min, 1868  $\text{Ls}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) compared to PLA/PCL of 1.6 ( $\pm 0.1$ )  $\mu\text{m}^2$  (4.6 L/min, 808  $\text{Ls}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) and PLA/LAEOLA of 2.1 ( $\pm 0.2$ )  $\mu\text{m}^2$  (5.8 L/min, 1020  $\text{Ls}^{-1}\text{m}^{-2}$ ). The given standard deviation is normalized to the percentage pore fraction of each mean pore size measured.

The topography of the electrospun nonwovens used was also characterized manually, evaluating the very first fiber layers, which are important for the attachment of the cells during cell seeding. Therefore, the visible pore size of the nonwovens surface from SEM images was calculated (**SI-Fig. 6**). One representative nonwoven of each polymer system type used for cell culturing was characterized using SEM imaging and ImageJ evaluation, respectively.



**SI-Figure 6.** Manually SEM evaluated distribution and median of (left) fiber diameter for PLA and PLA blend nonwovens used for cell cultivation experiments.

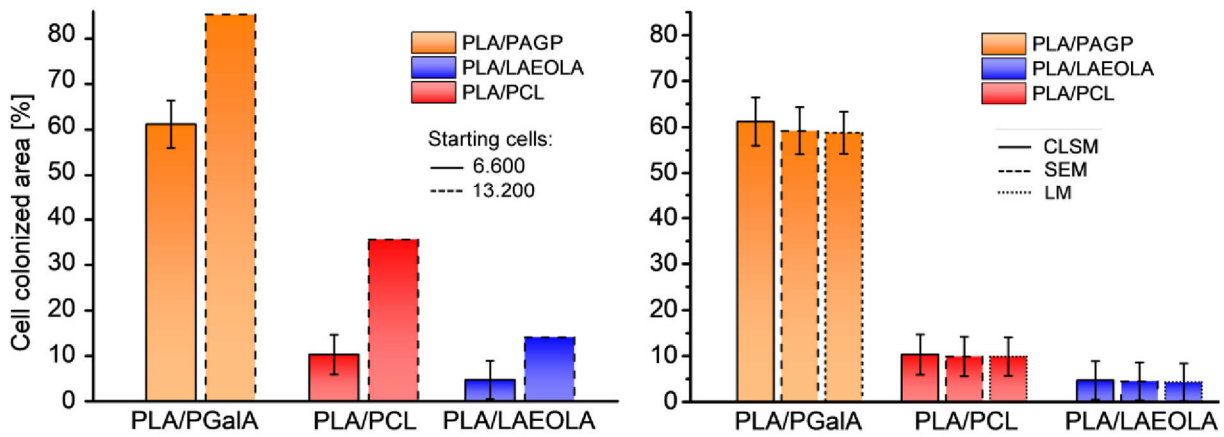
**SI-5 – Development of an in-solution PLA sponge Gal coating technique.**

Different binary PLA-*b*-PAGP and PLA solvent/anti-solvent mixtures were used for sponge immersion such as freeze-drying stability and coating investigations. This includes the PLA-*b*-PAGP solvents Dioxane and DMSO and the PLA anti-solvents H<sub>2</sub>O and tert-BuOH. Dioxane itself is able to dissolve small concentrations, DMSO can dissolve large amounts of PLA-*b*-PAGP. The PLA used, strongly swells under presence of DMSO and dissolves in Dioxane. Though the swelling of PLA in DMSO is reversible, it can have a negative impact on the sponge's integrity during immersion. All compositions of DMSO/water were incompatible for immersion of PLA sponges as the presence of water itself, in combination with any DMSO amounts, strongly decrease the structural integrity of the sponge. This leads to a quick fiber disintegration or collapse of the sponge structure in solution or during the freeze-drying process. This is found to be the case for very small and high water fractions of less than 0.1 Vol. % up to 99 Vol. %. The DMSO/tert-BuOH systems with less than 20 Vol. % DMSO did not show any significant sponge structure harming or noteworthy fiber disintegration effects. The same is true for Dioxane systems which were equally able to sustain the sponge shape and structural integrity as water mixture for Dioxane fractions of less than 30 Vol. % and as tert-BuOH mixture for Dioxane fractions of less than 35 Vol. %.

Those binary mixtures capable of granting a stable PLA sponge shape and structural integrity upon immersion and freeze-drying, were enriched with small amounts of PLA-*b*-PAGP and used for coating investigations. Pure, dried water-free DMSO can be used for PLA sponge immersion, but cannot be used for coating, as the sponge always starts to disintegrate in DMSO under presence of PLA-*b*-PAGP. This was investigated for different PLA-*b*-PAGP contents and can be explained with the PLA swelling behavior in DMSO and the amphiphilic properties of the copolymer which destabilizes the weak physical fiber network junctions established by thermal treatment<sup>2</sup>. Finally, only binary mixtures were capable of being used for coating experiments so far.

**SI-6 – Gal-carrier validation - Static cell culturing experiments**

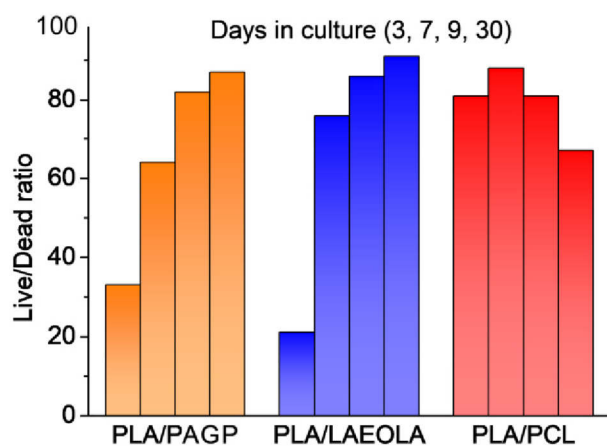
**Scaffold colonization evaluation comparison of different imaging techniques.**



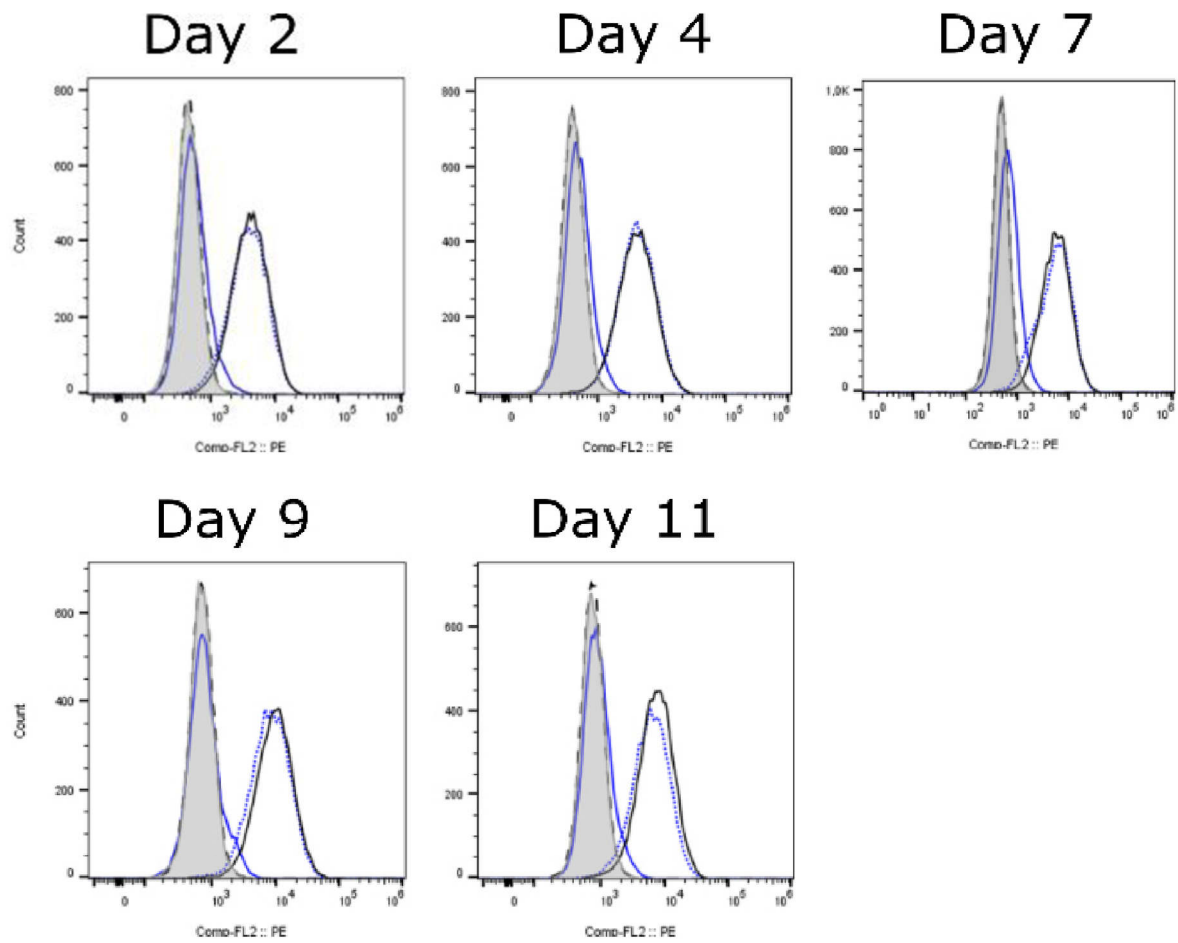
**SI-Figure 7.** *Ex-situ* performed cell colonization area evaluation results (left) comparing CLSM evaluation results with two different starting cell number concentrations, (right) comparing different 2D sample image evaluation techniques of identical samples using CLSM, SEM and light microscopy (LM).

The median CA calculated from SEM (**SI-Fig. 7**) data is 59 ( $\pm 5$ ) % for PLA/PAGP, 10 ( $\pm 4$ ) % for PLA/PCL and 5 ( $\pm 4$ ) % for PLA/LAEOLA nonwovens. The received data for different 2D sample imaging evaluation techniques is almost identical, but CLSM imaging results do not lack in cell visualization contrast, which results in slightly, but reproducibly higher (3.5  $\pm 0.4$  %) values, respectively.

**Live/Dead results from *ex-situ* CLSM evaluation of HuH-7 culture**



**SI-Figure 8.** Culture time dependent *ex-situ* Live/Dead ratio CLSM results.

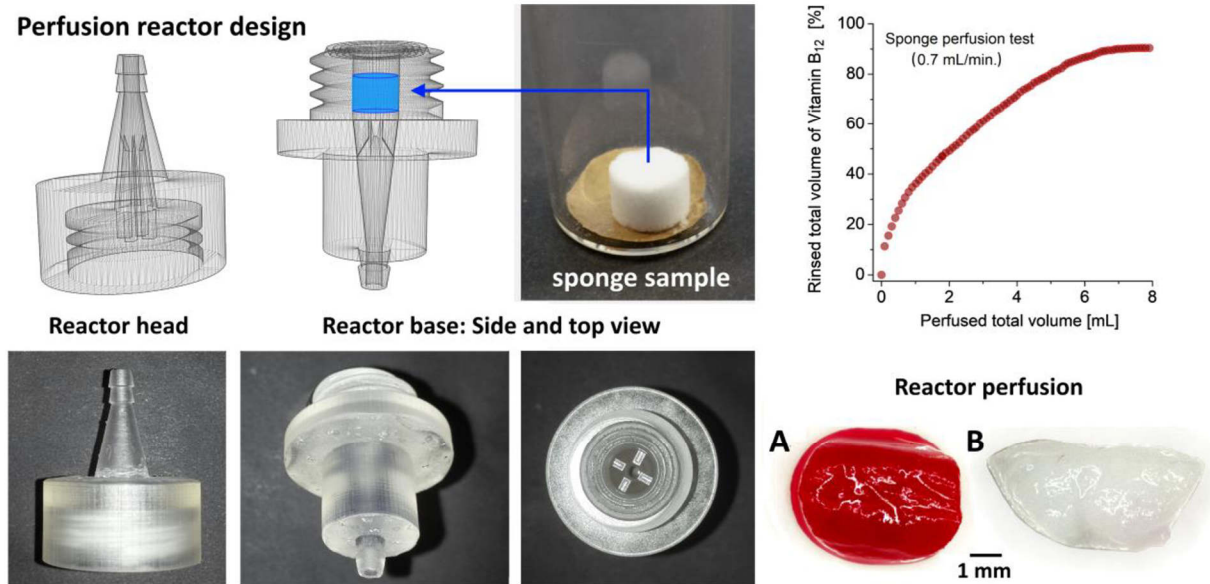
**Flow-cytometric analysis of ASGPR**

**SI-Figure 9.** Flow-cytometry analysis of ASGPR expression after CuCl<sub>2</sub> treatment. Representative FACS plots of HuH-7 cells cultivated for up to 11 days with 60 μM CuCl<sub>2</sub> (blue lines). The expression of ASGPR-R was determined by flow cytometry. Black lines represent non-treated cells. Negative control: grey, isotype control: dashed lines, anti-ASGPR-PE: solid and dotted lines.

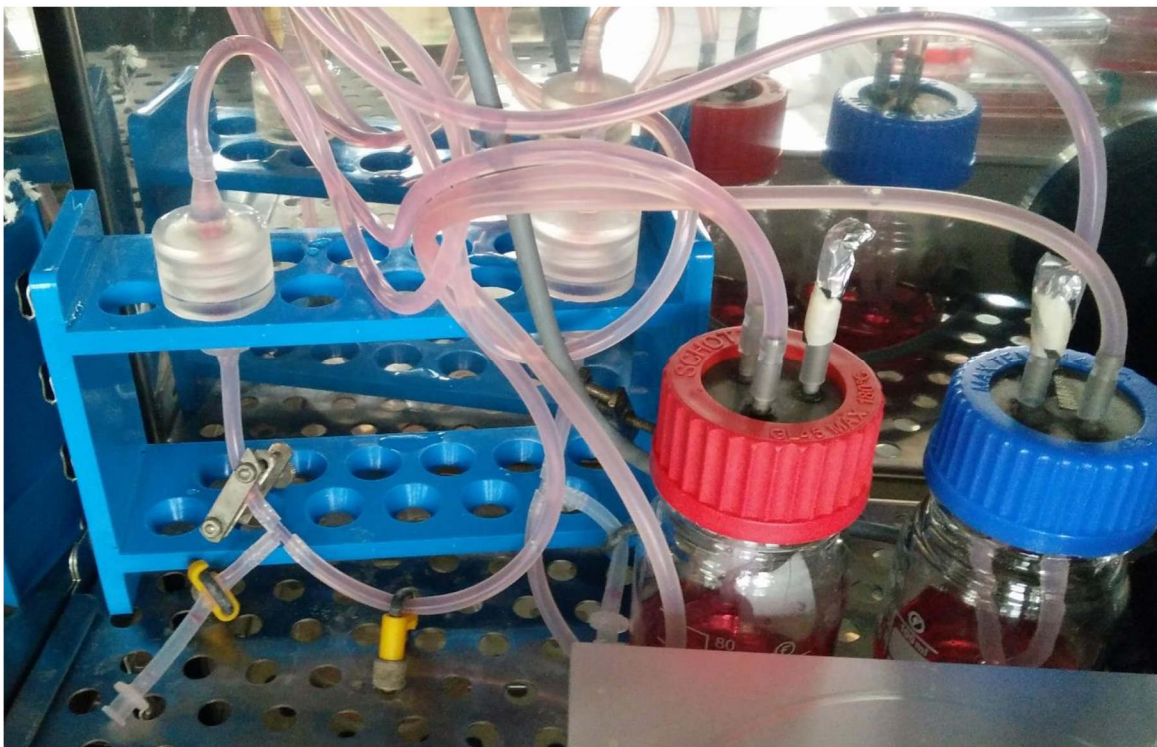


**SI-7 – Perfusion bioreactor**

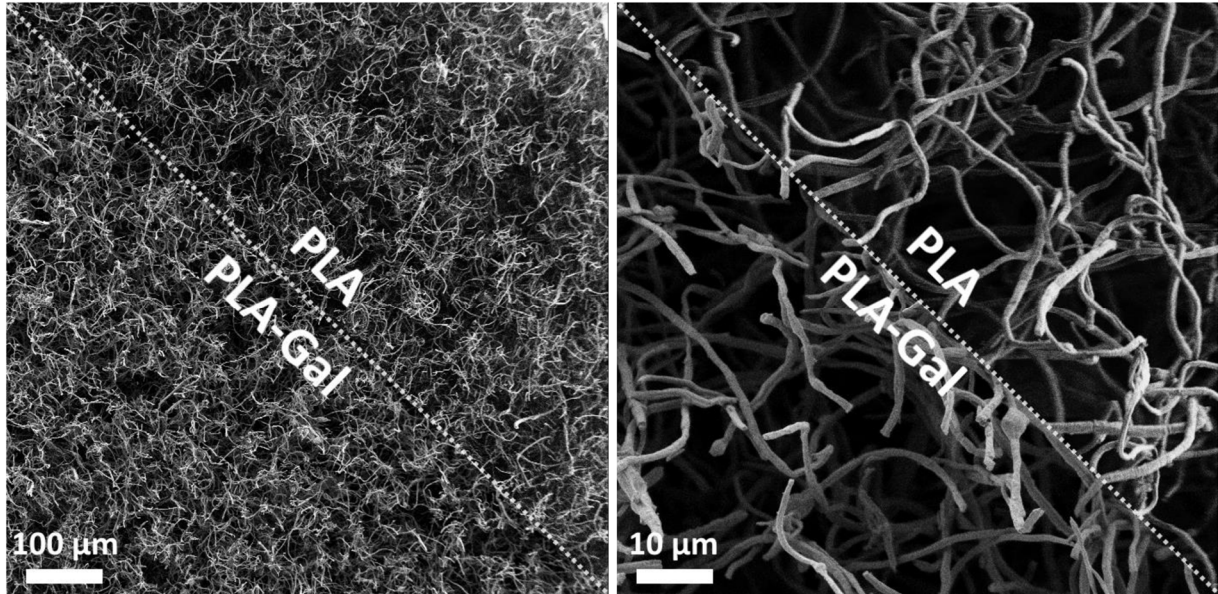
The bioreactor concept was developed by computer aided design and fabricated by 3D stereolithography (SLA) printing (SI-Fig. 10).



**SI-Figure 10.** (Left) Percolation-perfusion bioreactor design and (right) perfusion flow characterization by UV spectroscopic quantification of the sponge-medium-load exchange (A→B) using Vitamin B<sub>12</sub>.



**SI-Figure 11.** Perfusion-Bioreactor cell culturing setup used to unidirectionally pump cell culture medium through a PFS with a peristaltic pump system.



**SI-Figure 12.** Representative SEM images of a PLA and a PLA-Gal blend-electrospun sponge as used in bioreactor hepatic cell culture, in direct comparison.

## LITERATURE

- (1) S. R. S. Ting, A. M. Gregory, M. H. Stenzel, *Polygalactose containing nanocages: the RAFT process for the synthesis of hollow sugar balls*, *Biomacromolecules*, 10(2), **2009**, 342-352.
- (2) M. Mader, V. Jérôme, R. Freitag, S. Agarwal, A. Greiner, *Ultraporous, Compressible, Wettable Polylactide/Polycaprolactone Sponges for Tissue Engineering*, *Biomacromolecules*, 19(5), **2018**, 1663-1673.



## M3) Manuskript veröffentlicht im 'International Journal of Pharmaceutics'

International Journal of Pharmaceutics: X 2 (2020) 100055



Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Pharmaceutics: X

journal homepage: [www.journals.elsevier.com/international-journal-of-pharmaceutics-x](http://www.journals.elsevier.com/international-journal-of-pharmaceutics-x)Noninvasive characterization (EPR,  $\mu$ CT, NMR) of 3D PLA electrospun fiber sponges for controlled drug delivery

Johanna Zech<sup>a,1</sup>, Michael Mader<sup>b,1</sup>, Daniel Gündel<sup>c,2</sup>, Hendrik Metz<sup>a</sup>, Andreas Odparlik<sup>c</sup>, Seema Agarwal<sup>b</sup>, Karsten Mäder<sup>a,\*</sup>, Andreas Greiner<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Pharmacy, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Wolfgang-Langenbeck-Straße 4, Halle (Saale) 06120, Germany

<sup>b</sup> Macromolecular Chemistry and Bavarian Polymer Institute, University of Bayreuth, Universitätsstraße 30, Bayreuth 95440, Germany

<sup>c</sup> Department of Nuclear Medicine, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Ernst-Grube-Straße 40, Halle (Saale) 06120, Germany

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Sponge  
Electrospinning  
Coating  
Drug delivery system  
3D imaging  
NMR

## ABSTRACT

Highly porous 3D-scaffolds, made from cut, electrospun PLA fibers, are relatively new and promising systems for controlled drug-delivery applications. Because knowledge concerning fundamental processes of drug delivery from those scaffolds is limited, we noninvasively characterized drug-loading and drug-release mechanisms of these polymer-fiber sponges (PFS). We screened simplified PFS-implantation scenarios with EPR and  $\mu$ CT to quantify and 3D-visualize the absorption of model-biofluids and an oil, a possible drug-loading liquid. Saturation of PFS (6 × 8 mm, h × d) is governed by the high hydrophobicity of the material and air-entrapment. It required up to 45 weeks for phosphate-buffered saline and 11 weeks for a more physiological, surface-active protein-solution, indicating the slow fluid-uptake of PFS as an effective mechanism to substantially prolong the release of a drug incorporated within the scaffold. Medium-chain triglycerides, as a good wetting liquid, saturated PFS within seconds, suggesting PFS potential to serve as carrier-vessels for immobilizing hydrophobic drug-solutions to define a liquid's 3D-interface. Oil-retention under mechanical stress was therefore investigated. <sup>1</sup>H NMR permitted insights into PFS-oil interaction, confirming surface-relaxation and restricted diffusion; both did not influence drug release from oil-loaded PFS. Results facilitate better understanding of PFS and their potential use in drug delivery.

## 1. Introduction

Controlled release over extended periods of time (days, weeks, months) has important applications in drug therapy for humans and animals, but also in agriculture, environmental sciences, and other areas. For drug therapy in humans, essential applications include the treatment of cancer, local inflammation, infections, schizophrenia or growth-hormone deficiencies. Currently, the dominating material by far is polylactide (PLA) or poly(lactide-co-glycolide) PLGA. Dosage forms include mainly preformed implants, microparticles and in-situ forming implants. Current problems of existing delivery systems for controlled release include, but are not limited to, complex manufacturing steps, undesirable release profiles (e.g., high burst release or lag times of

several weeks), the in vivo injection of organic solvents for in-situ forming implants and autocatalytic polymer-degradation leading to faster degradation of larger particles (Siepmann et al., 2005) and very acidic microenvironments (pH around 2 (Mäder et al., 1996; Schädlich et al., 2014)). This acidic microenvironment might also lead to drug degradation prior to release (Guo et al., 2019; Lucke et al., 2002). Consequently, there is a need for the development of new and alternative, controlled-release drug delivery systems. A relatively new and very attractive option is the use of polymer fiber sponges (PFS), highly porous 3D scaffolds made from electrospun polymer fibers.

Electrospinning is a versatile scaffolding tool that reproducibly turns various polymer formulations into a variety of electrospun fibers of adjustable size, size distribution and porosity (Greiner and Wendorff,

**Abbreviations:** BSA, Bovine serum albumin; CVD, Chemical vapor deposition; dTempol, 4-Hydroxy-Tempo-d17; EPR, Electron paramagnetic resonance; MCT, Medium-chained triglycerides;  $\mu$ CT, Micro-computed tomography; NMR, Nuclear magnetic resonance; <sup>15</sup>N-PCM, Carbamoyl-proxyl <sup>15</sup>N-nitroxide 3-Carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolidin-1-oxyl; PFS, Polymer-fiber sponges; PLA, Polylactide; PPX, [2.2]Paracyclophane

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [karsten.maeder@pharmazie.uni-halle.de](mailto:karsten.maeder@pharmazie.uni-halle.de) (K. Mäder), [greiner@uni-bayreuth.de](mailto:greiner@uni-bayreuth.de) (A. Greiner).

<sup>1</sup> J. Zech and M. Mader contributed equally to this manuscript.

<sup>2</sup> Present address: Institute of Radiopharmaceutical Cancer Research, Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Permoser Straße 15, 04318 Leipzig (Germany)

<https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2020.100055>

Received 12 June 2020; Received in revised form 17 August 2020; Accepted 20 August 2020

Available online 27 August 2020

2590-1567/© 2020 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

2007). Electrospun scaffolds are applied in tissue engineering and have been developed as carriers for prolonged drug release, both intracranially and intraperitoneally (Li et al., 2018; Ranganath and Wang, 2008; Tseng et al., 2015). Their 2D sheet-like shape, however, features a low specific pore volume and demands for large incisions in order to place the implants at the site of treatment.

Freeze-drying is frequently used to produce 3D scaffold sponge systems that are successfully applied for the delivery of different compounds (Duarte et al., 2005; Kassem et al., 2015; Tihan et al., 2015; Zhang et al., 2018). They have been translated into clinical practice as, e.g., the implantable gentamycin-releasing collagen sponge GENTA-COLL® resorb. Fabrication of such sponges is done by lyophilization of polymer solutions. This allows creating drug-loaded scaffolds with micro- and macro-sized matrix patterns of tunable pore structure but strong limitations in the parallel, precise regulation of the pore-wall characteristics. Pore-wall thickness and distribution, as well as the pore-interconnectivity, however, are decisive to adjust drug release, pore-interdiffusion and release from the scaffold.

In this regard, the advantages of ultra-light electrospun PFS are eye-catching (Duan et al., 2015; Si et al., 2014). They synergize the advantages of electrospinning and freeze-drying to create a compact, 3D porous drug-carrier matrix with user-adjustable nano-, micro- and macro-scale dimensions. They can be produced from different materials, including degradable polymers (Mader et al., 2018), and have proven their versatility in various applications, such as extreme temperature and fire insulation (Si et al., 2018), as emulsion separator (Si et al., 2015), catalyst (Duan et al., 2016) and drug carrier (Duan et al., 2017a, 2017b).

The PFS matrix comes with a high fiber-loading capacity which can, through a coating, e.g., chemical vapor deposition (CVD) (Duan et al., 2016) of poly(para xylylene) (PPX) (Simon et al., 1998), be specifically modified to tune the drug release profile (Duan et al., 2017a). By using electrospun fibers instead of polymer solutions in common freeze-drying, the wall-thickness factor is replaced by a controllable fiber diameter. It provides a stable, 3D fiber structure, with an all-directional, open-porous fiber network of adjustable porosity and unlimited pore interconnectivity, both promoting drug accessibility. Direct drug-processing during electrospinning and the narrow fiber-diameter distribution can grant an equal length of drug-diffusion from the fibers in all parts of the scaffold. A. Greiner and coworkers have already used PPX-coated PFS for controlled drug release of an anti-malaria drug (Duan et al., 2017a), (Bagheri et al., 2017), H. Fong and coworkers have introduced a bone growth factor to promote bone formation (Miszuk et al., 2018). It is to be expected that the uptake of body-fluids into these PFS scaffold after implantation could greatly determine drug release and is probably mostly controlled by the wetting of the scaffolds. Hydrophobicity of the material is, therefore, another crucial factor that can be modified by, e.g., coating or plasma treatment (Mader et al., 2018). Due to their large specific pore-volume (up to 99.8%), PFS can also carry huge amounts of medium without collapsing or losing shape. This makes them highly attractive as drug-solution carrier-vessel, as the liquid is forced into a predictable geometrical shape, which is favorable for controlled, equable and prolonged drug release.

The combination of two principles of drug loading, (a) drug incorporation within the fiber scaffold and (b) liquid-loading of the PFS pore-system with drug solutions, can turn them into versatile multi-drug carriers that can flexibly provide user-adjustable doses and drug combinations at the point-of-care (Jennings et al., 2016; Parker et al., 2015). The fundamental processes prevailing inside of PFS, including liquid-uptake/loading and release mechanisms from the scaffold, are still hardly understood. It was, therefore the aim of this study to investigate these processes in more detail and noninvasively, utilizing  $\mu$ CT, NMR measurements, EPR spectroscopy and EPR Imaging. EPR spectroscopy and EPR imaging can provide valuable information on drug delivery processes, including micro-viscosity, micro-polarity, micro-pH and oxygen content (Lurie and Mäder, 2005; Mäder et al.,

1997; Schreier et al., 2014). Spectral-spatial imaging permits to assign the spectra to a specific layer of a sample (Yu et al., 2019). Thus liquid-progression in the PFS is traced and visualized by EPR imaging and confirmed by 3D  $\mu$ CT images of the samples. The influence of hydrophobicity, as well as residual air inside the scaffolds, on fluid-penetration is evaluated. In addition, basic structural integrity, reversible elasticity and different liquid-retention scenarios under compression stress situations are studied, applying standardized mechanical force on empty and liquid-filled PFS over a number of different testing cycles.

The liquid-PFS interaction is investigated for medium-chained triglycerides (MCT) via  $^1\text{H}$  NMR, quantifying diffusion coefficients and transverse  $T_2$ /spin-spin-relaxation times. Both parameters give insight into whether oil molecules experience strong interaction with the PFS material. Changes in the diffusion coefficient would point to restricted diffusion, due to oil-fiber interaction or small pore size of the matrix. Similarly, alterations of  $T_2$  for immobilized oil could suggest surface-relaxation of liquid molecules at the oil-fiber interface, facilitated by oil-scaffold interaction. As such interactions could influence the release profile of a model-drug, a comparative in-vitro drug release study of oil-loaded PFS versus free oil is performed. The release of the paramagnetic compound is followed semi-quantitatively with standard EPR.

The overall results will lead to a better understanding of controlled drug delivery processes and mechanisms from 3D electrospun polymer fiber sponges, which will enable rational design and optimization of such systems.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Poly lactide (Ingeo Biopolymer PLA 4043D, Nature-Works LLC, USA) (PLA) and [2.2]para-cyclo-phane (PPX-C, SCS coatings, USA, Lot.: 17A20009) (PPX) are used as received. The paramagnetic EPR spin probe 4-Hydroxy-Tempo-d17 (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetra-methyl-piperidine-d17-1-oxyl) (dTempol) is manufactured by ISOTEC®, Merck KGaA, Germany (Table 1), 3-Carbamoyl-proxyl 15 N-nitroxide 3-Carbamoyl-2,2,5,5-tetra-methyl-3-pyrrolidin-1-oxyl ( $^{15}\text{N}$ -PCM) by Merck / Millipore Sigma, USA. Bovine serum albumin, fraction V (> 98%, low endotoxin, CELLPURE®, Mw ~ 66,000 g/mol) (BSA) is purchased from Carl Roth GmbH + Co. KG, Germany. Miglyol® 812 (Caprylic /Capric Triglycerides / medium-chained triglycerides Ph. Eur.) (MCT) is obtained from Sasol Olefins & Surfactants GmbH, Germany. All other chemicals are of analytical grade. Double distilled water is used in all experiments.

### 2.2. Fabrication of samples

The PFS were prepared from electrospun PLA-fiber nonwovens, as published recently (Mader et al., 2018). The cylindrical-shaped PFS were cut in frozen medium to achieve highly comparable PFS with narrow density ( $12.5 \pm 1.0$  mg/cm<sup>3</sup>, shape- and size distribution (Height h: ( $6.1 \pm 0.1$ ) mm and Diameter d: ( $8.0 \pm 0.04$ ) mm). The PFS were subsequently coated with PPX prior to use, reaching a final density of ( $28 \pm 1.5$ ) mg/cm<sup>3</sup>. The PFS oil-loading capacity was determined as drained net weight after slowly immersing the PFS in MCT and subsequent gravimetric analysis.

### 2.3. PPX-coating with thickness and hydrophilicity analysis

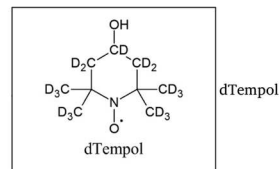
The PLA PFS were coated with PPX by CVD and characterized as previously reported (Duan et al., 2016). Six PLA PFS were fastened to a cannula tip and placed inside the reaction chamber (Labcoater 1, SCS Germany GmbH), together with an ethanol-cleaned glass slide for indirect coating thickness evaluation, using a Dektak profilometer (Surface Profiler 150, Veeco Instruments Inc.). PFS depth-dependent SEM PPX coating-thickness evaluations were performed using ImageJ.



**Table 1**

Pharmaceutically relevant model-liquids and the chemical structure of the EPR spin probe 4-Hydroxy-Tempo-d<sub>17</sub> (dTempol) used to study the uptake of different fluids into the PFS and model drug release studies.

| Liquid system | Model  | Liquid*  |
|---------------|--|--|
| PBS           | Aqueous/hydrophilic                                    | Phosphate-buffered saline pH 7.4 Ph. Eur preserved with 0.02% NaN <sub>3</sub> |
| 5% BSA        | Surface-active protein-solution model for bodily fluid | 5.0 wt% Bovine serum albumin in PBS  |
| MCT           | Hydrophobic oil, suitable for drug loading of PFS      | Medium-chained triglycerides<br><i>Miglyol 812</i> <sup>®</sup>                |



\*1 mM dTempol is added for EPR measurements.

Indirect coating-thickness evaluations were carried out by placing a control glass-slide near the PFS during the coating process to achieve a general thickness of about 1 μm for all PPX-coated samples. As this technique cannot represent the coating thickness throughout the whole PFS scaffold, detailed coating thickness gradient evaluations using SEM imaging were performed, by subtraction of the mean coated- and the non-coated-fiber diameter. As expected, the received coating thickness achieved with static CVD is decreasing with reaching deeper PFS areas (Fig. S1). Beyond 300 μm, along the way inside towards the PFS core, the coating thickness is slowly, asymptotically decreasing from 1.2 μm to about 400 nm within 500 μm of scaffold-depth.

The hydrophobicity was measured by contact angle measurements. The water contact angle of PFS was measured on a Drop Shape Analyzer (Krüss Advance, v1.3.1) using Milli-Q water as a 4 μl water droplet. Examples are shown in Fig. S1 bottom.

### 2.3.1. Scanning electron microscopy

SEM images were recorded on a Zeiss LEO 1530 (FE-SEM, Schottky-field-emission cathode; in-lens and SE 2 detector) at the Bavarian Polymer Institute (BPI, KeyLab Electron and Optical Microscopy) in Bayreuth. An accelerating voltage of 2 kV was used. The samples were sputtered with platinum (1.3 nm) prior to SEM imaging, using a sputter coater (Cressington HR208) with a thickness controller (Cressington MTM20).

### 2.4. Liquid uptake visualization via EPR Imaging and μCT

To study the uptake rate and mechanism of fluids penetrating the PFS, the PFS samples were incubated with different pharmaceutically relevant model liquids (Table 1).

The PFS were carefully placed in sample holders that were custom-made to fit the PFS size exactly. This allowed penetration of liquid only in one dimension - from the top of the cylinder-shaped PFS - while preventing any leakage of fluids along the sides of the material. The PFS were submerged in the model liquid, tightly sealed and incubated at 37 °C. Fluid levels of 5 mm above the PFS surfaces were maintained at all times to guarantee a constant hydrostatic pressure. During measurements, the PFS remained in the sample holders and were not removed until the end of the experiment. Experiments were done in triplicates, for two types of sample holders, either allowing or preventing the escape of air from the PFS with invading solvent front (closed/open bottom, Table 2).

The liquid uptake over time was monitored with EPR spectroscopy and EPR imaging as well as μCT imaging for PBS and 5% BSA, while MCT uptake is only visualized using μCT scans. Sample holders for EPR and NMR experiments were made from Teflon; a low-density plastic was used for the fabrication of μCT sample holders.

### 2.4.1. EPR studies

In electron paramagnetic resonance spectroscopy, the amplitude of the signal of the paramagnetic spin probe was used to determine the amount of dTempol taken up by the PFS with PBS or 5% BSA over time. 1D spatial-spectral EPR imaging was applied to visualize the distribution of the spin probe in the samples along the y-axis (Fig. S5). EPR measurements were performed using an L-band EPR spectrometer (MagnetTech, Germany), equipped with an additional magnet for variable gradient fixed-orientation imaging. A glass capillary containing a 1 mM solution of 3-Carbamoyl-proxyl <sup>15</sup>N-nitroxide 3-Carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolidin-1-oxyl (<sup>15</sup>N-PCM) in methanol / H<sub>2</sub>O served as internal standard to correct the varying attenuation of the signal due to the changing presence of H<sub>2</sub>O in the samples. The data was recorded with the Cu3 v.6.1 program (MagnetTech, Germany) and transformed to render spectral-spatial EPR plots. Parameters used for measurements are given in Table S1.

### 2.4.2. μCT-scans

Micro-computed tomography scans were performed to record 3D images of the distribution of liquid and air in the PFS, allowing to further investigation of the pattern of penetration of the different testing-fluids. X-ray μCT scans were carried out with a NanoScan PET/CT (Mediso, Hungary), in semi-circular mode with one rotation. Reconstruction of the images was done with Nucline Software (Mediso, Hungary), using a Butterworth filter and a voxel size of 125 × 125 × 125 μm, and analyzed with PMOD software (PMOD Technologies, Switzerland). Units in all μCT images are given in Hounsfield units. The following parameters have been used: 720 projections, x-ray energy 70 kVp, exposition time 300 ms, bin 1:4.

**Measurements of scaffold-MCT interactions.** Small amounts of MCT, a good PFS wetting liquid, added to the top of the PFS network, spread within the very first PFS layers. Time-dependent MCT visualization inside the PFS, using μCT measurements, reproducibly reveal, that the oil does not move deeper into the scaffold within 24 h (Fig. S2).

#### Porosity calculation of PFS.

The porosity P of the PFS fabricated is calculated as follows (Duan et al., 2017a):



$$P = \left(1 - \frac{\rho_s}{\rho_{bulk}}\right) \cdot 100 \text{ SPV} = \frac{P}{\rho_s \cdot 10^{-3}}$$

$$L_c = \text{dry net weight} \frac{\text{loaded PFS}}{\text{unloaded PFS}}$$

With:  $\rho_s$  Density of the PFS [mg/cm<sup>3</sup>],  $\rho_{bulk}$  Density of the bulk material [g/cm<sup>3</sup>], SPV Specific Pore Volume [cm<sup>3</sup>/g],  $L_c$  Loading capacity of a PFS [g/g].

**Table 2**

Sample holders used for PFS incubation and liquid-uptake results. Duration of liquid-uptake of different model-fluids in the PPX-coated PFS is given in days unless stated otherwise.

|        | Closed-bottom sample holder |                 | Open-bottom sample holder |               | PFS   | testing fluid   |
|--------|-----------------------------|-----------------|---------------------------|---------------|---|---|
|        | EPR                         | $\mu$ CT        | EPR                       | $\mu$ CT      |   |   |
| PBS    | 168   245   315             | 131   131   204 | 28   28   28              | –             |  |  |
| 5% BSA | 77   77   77                | 63   70   70    | –                         | –             |   |   |
| MCT    | –                           | 28   42   42    | –                         | < 5   < 5 min |   |   |

### 2.5. Compressibility tests

Stress-strain experiments were performed using a Zwick/Roell Z 2.5 (ZwickRoell GmbH & Co. KG) (load sensor 20 N, compressing speed 5 mm/min, 23 °C) following DIN 53421 for cylindrical samples. The PFS samples were placed on and covered with a 170  $\mu$ m glass slide during the compression to prevent oil crawling.

**PFS liquid loading.** For PFS liquid-load capacity calculations, the PFS were entirely filled with liquid by unidirectional immersion. The PFS is taken out of solution, and excess of fluid is removed to calculate the net-weight gravimetrically. The individual PFS used for calculation are depicted in Fig. S3.

### 2.6. $^1\text{H}$ NMR studies

To study transversal relaxation time  $T_2$  and the diffusion coefficient  $D$  of the oil, both, by itself as free MCT and when located in the fiber scaffolds,  $^1\text{H}$  NMR measurements were performed with a low-field benchtop Maran Ultra  $^1\text{H}$  NMR spectrometer (Oxford Instruments, UK). The PFS were completely saturated with MCT, while free MCT samples were kept in sample holders that contained the same volume of MCT in the same shape as the oil-loaded PFS. The sample temperature was maintained at 37 °C during measurements. The Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence with a relaxation delay of 5 s and a receiver gain of 40 was used to determine  $T_2$ . Sixty-four scans were acquired for each measurement, and the data processed with the WinDXP software (Oxford Instruments, UK) to give the  $T_2$  distributions. Molecular diffusion of free MCT and oil in the PFS was analyzed using a pulsed-gradient stimulated-echo sequence (Fig. S6).

### 2.7. Model-drug release

The immobilization of the oil in the PFS material could potentially slow down the release of small drug molecules from MCT-loaded PFS compared to free MCT. The interaction of MCT with the PFS scaffolds, as well as the restricting effect of the PFS structure on free diffusion, could alter release kinetics for the oil-loaded carriers.

To test this hypothesis, we studied the release of dTempol as a model-drug from both free and immobilized MCT. To ensure that the interface between the oil and the release medium is kept the same in both cases, a release apparatus was built. It consists of a tube that either fits one PFS loaded with 280  $\mu$ l MCT, or the equal volume of oil, shaped as a cylinder of identical dimensions as the PFS (Fig. 7). The MCT contained 2 mmol/kg dTempol, and the release of the spin probe was followed via X-band EPR measurements.

dTempol release was studied under sink conditions at 37 °C in 35 ml PBS pH 7.4 Ph. Eur., while gently shaking the samples. At each time-point, 50  $\mu$ l of the release medium were collected in a glass capillary, which was then sealed on both ends and analyzed with a MiniScope MS 200 benchtop X-band EPR spectrometer (MagnetTech, Germany).

Measurement parameters can be found in Table S2.

## 3. Results and discussion

### 3.1. PFS sample fabrication

The basic fabrication steps to produce the PFS used in this work are performed as published recently (Mader et al., 2018). To investigate the physical processes occurring in PFS during, e.g., long-term incubation scenarios, possible negative impacts on PFS structure or integrity must be avoided. Therefore, all PFS used for our experiments are coated with a thin-layer of PPX by CVD (Duan et al., 2016) to enhance their mechanical properties while maintaining their pore structure and overall hydrophilicity. PPX-coating also minimizes water absorption of the PLA PFS, reducing the risk of hydrolytic degradation of the PLA fiber network during long incubation periods in aqueous environments. Aiming at the potential use of PFS as multi-component drug carrier systems, as mentioned in the introduction, PFS PPX-coating offers several additional advantages with regard to the extension of possible areas of application (Jiang et al., 2018). It has, however, to be said, that PPX as a non-biodegradable material is only suitable for use and implantation where the PFS could be removed easily after complete drug delivery, or ex-vivo application. Therefore, PPX is to be seen mainly as a well-studied model-polymer in our experiments. The development of coating techniques with other - also biodegradable - materials will allow for an even more versatile fine-tuning of the PFS properties, permitting a wide range of different applications in drug delivery and tissue engineering.

### 3.2. PPX-coating thickness and hydrophilicity analysis

The PLA PFS PPX-coating allows for a precise and almost non-invasive adjustment of the PFS scaffold properties while maintaining its structural characteristics (Duan et al., 2016). The homogeneity of the PPX-coating influences the PFS mechanical properties and drug release from the fibers (Duan et al., 2016). Hence, the PFS coating and wettability, investigated in detail, are given in Fig. S1. Contact angle and SEM coating-thickness quantification investigations are shown. Quantification of the mean depth-dependent fiber diameter shows a sharp decrease in coating thickness within the very first fiber layers. Starting at the top of the PFS, PPX thickness is asymptotically decreasing from 1.2  $\mu$ m to about 400 nm within 500  $\mu$ m of PFS-depth. Contact angle measurements reveal that the hydrophilicity is almost unchanged by PPX-coating, with a difference of 136° (PLA) to 144° (PLA-PPX).

### 3.3. PFS liquid-uptake model scenarios

Biofluids advancing in the PFS scaffold are indispensable for the potential release of drugs incorporated in the fibers in the case of implantation. Preliminary trials of PFS-liquid interaction investigations performed by  $\mu$ CT imaging (Fig. S2) indicate that for MCT, the liquid



perfusion within the PFS is dominated by capillary forces, which are surpassing gravitation. Hence any migration into the scaffold has to be driven by external forces, e.g., excess of liquid or hydrostatic pressure. These forces were simulated by immersion of the PFS to achieve reproducible PFS liquid-loading results.

We investigated the PFS-liquid interaction using three different model-liquids, as the contact angle already indicates the wetting of the hydrophobic scaffold being a major parameter governing liquid-uptake. EPR and  $\mu$ CT imaging are used to visualize the liquid-penetration process. Two sample holders were used for PFS liquid incubation to simulate individual aspects of typical implantation scenarios of PFS imaginable during in-vivo or in-vitro application (Yu et al., 2019). The holders helped to controllably assess the influence and behavior of the liquid-phase progression and the replacing of the void, i.e., the air present inside a PFS. One holder type provides a closed bottom (Table 2, top left); the other has an open bottom (Table 2, top right). The closed-bottom holder encases the PFS on all but one side; hence, air can only exit through or at the interface of the infiltrating liquid. The open-bottom holder allows air to evade from the PFS through the opening, in the opposite direction to the approaching liquid front. Both scenarios were investigated using three PFS samples, respectively. The overall results of the EPR and  $\mu$ CT PFS liquid-load investigations are summarized in Table 2. The hydrophilicity of a drug-delivery system has a crucial influence on its behavior when placed in a particular environment. Poor wettability with aqueous liquids will decidedly affect the absorption of, e.g., bodily fluids by the PFS after implantation, impacting the resulting drug-release profile and the performance of the PFS material in-vivo. Upon incubation with PBS and 5% BSA, a layer of air on the PFS surface indicated the initial non-wetting of the surface.

### 3.3.1. Tracing liquid-uptake via EPR and $\mu$ CT imaging

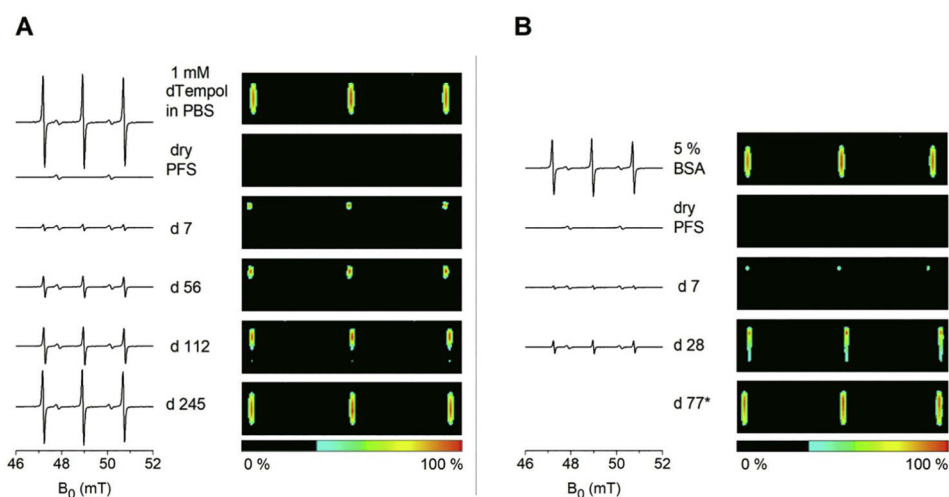
**Closed-bottom sample holder.** In the closed-bottom sample holder, fluid-penetration and full saturation by PBS was subject to considerable fluctuations, requiring 168 up to 315 days (24–45 weeks) (Fig. 1A) in the EPR experiments. In EPR 1D-imaging, the liquid-penetration progress was visible as one seemingly evenly traveling solvent-front along the y-axis (see Fig. S5).

$\mu$ CT analysis revealed that in the plastic sample-holders, the liquid preferably intruded the scaffold along the edges of the holders' cavity, steadily enclosing the air inside the PFS (Fig. 2). In the presence of 5%

BSA, air-encapsulation still occurred, but all PFS were reproducibly fully saturated in 70 ( $\mu$ CT) - 77 (EPR) days (Fig. 1B, Fig. 2). The surface-active BSA decreased the absorption-time of an aqueous liquid around three-fold by increasing wettability, thereby accelerating potential drug release. Nonetheless, the uptake of the BSA-solution was still considerably slow, making drug delivery mainly imaginable for localized treatment with drugs of a very low  $EC_{50}$  and high potency. The uptake of MCT, a good PFS wetting liquid (Fig. S1), was completed after 4–6 weeks.  $\mu$ CT scans displayed a liquid-loading mechanism analogous to the PBS and BSA systems (Fig. 2), including a slowly shrinking air pocket.

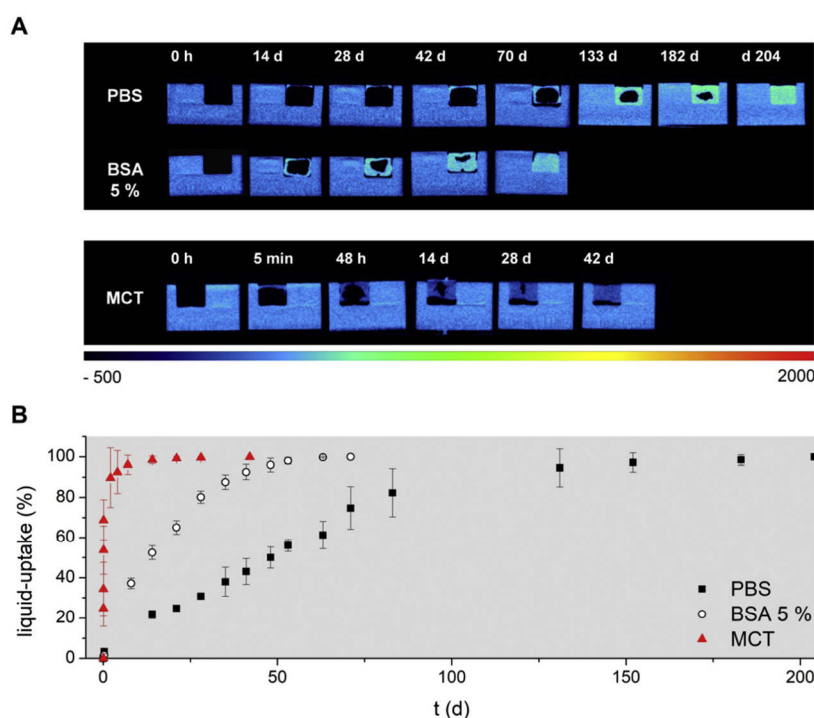
The encasement of air, acting as a slowly receding barrier, could deliberately be used as a measure to achieve prolonged drug release. The mechanism is similar to what was proposed by Yohe et al. as “using displacement of air to control delivery rates” (Yohe et al., 2012) for super-hydrophobic 2D electrospun fiber mats. Air encapsulated within the PFS needs to be dissolved in the advancing fluid and diffuse to the PFS surface to evade the scaffold. Air solubility in the liquid, shape and surface area of the air pocket and the diffusion coefficient have, therefore, to be considered. However, such an application is only suitable for a site of implantation where the delicate PFS will be protected from mechanical stress, e.g., intracranially or inside bones, as compression could expel the air and change release rates considerably. Gradual displacement of air might also be exploited for dry PFS employed as extractable drug-loaded cartridges ex-vivo, e.g., in an infusion-chamber system, an advancement to what has been suggested for electrospun fiber mats (Bagheri et al., 2017).

**Open-bottom holder.** Allowing air to be released during incubation instead of placing a PFS in an enclosed cavity or fully immersing it is simulated by using an open-bottom holder (Fig. 3). The two-directional open cavity permits air to evade from the scaffold and avoid its encapsulation. Thereby liquid-uptake rate is greatly increased. A PFS placed on the interface of MCT is completely saturated within less than 30 s, beyond the limit of  $\mu$ CT and EPR visualization and our sampling setup. In the incubation scenario with the open-bottom holder, MCT penetrates the whole PFS in less than 5 min (Fig. 3A), which is more than  $10^4$  times faster than in a closed-cavity situation. Under analog conditions, the uptake time of PBS is reproducibly decreased from an average of 243 days to 28 days, respectively (Fig. 3B, day 28 not shown). No indication of encapsulated air could be found in  $\mu$ CT

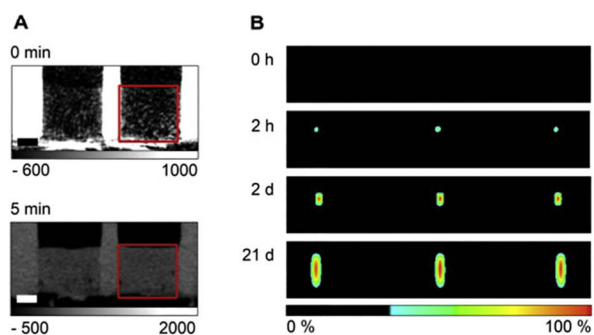


**Fig. 1.** EPR spectra and the corresponding EPR images of liquid-uptake of PFS incubated in closed-bottom sample holders at 37 °C. The first row shows the signal of the empty sample holder filled with incubation medium. The  $^{15}\text{N}$ -PCM reference capillary is accountable for the two signals at 47.8 and 50.2 mT. **A:** PBS pH 7.4 with 1 mM dTempol. **B:** 5% BSA with 1 mM dTempol.

\*As the EPR spin probe is slowly degrading in the presence of BSA, reliable semi-quantitative evaluation from EPR spectra is not possible for day 77.



**Fig. 2.** Liquid-uptake of PFS incubated in closed-bottom sample holder. **A:**  $\mu$ CT scans of one PFS for each of the incubation media. Dry parts of the PFS are not visible due to the low density of the material. **B:** The uptake of liquid for each PFS in volume % of the PFS saturated with fluid.



**Fig. 3.** Liquid-uptake of PFS in open-bottom sample holder, incubated at 37 °C. **A:**  $\mu$ CT scans, top: dry PFS, bottom: PFS completely saturated with MCT after 5 min of incubation (Bar = 3 mm). **B:** EPR images: top: dry PFS, below: PFS incubated with PBS pH 7.4 after 2 h, 2 days and 3 weeks.

measurements.

As neither surface tension nor viscosity alone can reasonably be employed to explain our observations, the penetration of the liquids into the porous PFS system is best described by the Washburn's equation (Washburn, 1921):

$$L = \sqrt{\frac{\gamma r t \cos(\phi)}{2\eta}}$$

$L$ , the depth of fluid penetration over time  $t$  is controlled by the surface tension  $\gamma$  and dynamic viscosity  $\eta$  of the fluid, the contact angle  $\phi$  between solid material and tested fluid and the pore radius  $r$ .  $r$  is considered to be the same for all our samples.

Here, the contact angle, quantifying the interfacial tension at the PFS-liquid interface, is the most influential parameter and best explains

our results. The results further underline that besides the implantation environment (provided exit of air from the samples), wetting of the scaffold is one main parameter governing the liquid uptake in PFS.

### 3.3.2. Spin probe micro-environment

The EPR spectra acquired in the fluid-uptake experiments also give information on the micro-environment of the spin probe as it enters the pores of the fiber matrix with the incubation medium (Fig. 1), (Kemp et al., 2010; Lurie and Mäder, 2005).

All spectra exhibit hyperfine splitting into three symmetrical, narrow lines of the same amplitude, indicating that the  $^{14}\text{N}$ -nitroxide radical dTempol stays mobile, in solution, at all times. No crystallization/immobilization - e.g., as a result of the probe entering the fibers and consequent precipitation - occurred.

Changes in the hyperfine-splitting constant (seen as the distance between lines) over time are not visible, showing that micro-polarity did not change over the course of the experiment. Increasing micro-viscosity would be visible as a broadening of the EPR signals. Such signal variations were not observed here, and we, therefore, conclude that dTempol did not experience any changes to its micro-environment during the incubation of samples. The lack of different environments can be attributed to the high porosity of the system: the entrapped liquid is responsible for the observed EPR signal, no contribution from the solid fibers was observed. The lack of contributions from immobilized spectra results from the low amount of solid material present in the sample and the hydrophilic properties of dTempol. It is noteworthy, that despite the macroscopic immobilization of the liquid in the 3D-matrix, the micro-viscosity and micro-polarity are not changed in comparison to the bulk liquid.

### 3.4. PFS compression and reversible oil release

If used as drug-solution carrier-vessels, PFS must be able to reliably



**Table 3**

Overview of all PFS used in this work, their porosity, pore volume in dry and model-liquid loaded state. Corresponding images of representative individual PFS can be found in Fig. S3. The evaluated data of compression experiments shown and performed with dry and loaded PFS.

| Material                   | Density (mg/cm <sup>3</sup> ) | SPV (cm <sup>3</sup> /g) | P (%)                     | Model liquid           | L <sub>c</sub> (g/g) | SPV <sub>load</sub> (%V/V)   |
|----------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------|------------------------------|
| PLA                        | (12.5 ± 1)                    | 79                       | 99                        | Water                  | (76 ± 0.4)           | (98 ± 0.2)                   |
|                            | (12.5 ± 1)                    | 79                       | 99                        | MCT                    | (78 ± 0.2)           | (98 ± 0.1)                   |
| PLA-c-PPX                  | (28.0 ± 1.5)                  | 35                       | 98                        | Water                  | (35 ± 0.4)           | (99 ± 0.2)                   |
|                            | (28.0 ± 1.5)                  | 35                       | 98                        | MCT                    | (34 ± 0.3)           | (99 ± 0.4)                   |
| Compression c500 ε10 20 30 | ε <sub>onset</sub> (%)        | Elasticity (%)           | Δw (mJ·10 <sup>-2</sup> ) | σ <sub>Max</sub> (kPa) | E-Module (kPa)       | Oil retention reversible (%) |
| Dry                        | 2   6   12                    | 85   70   60             | 7   3   6                 | 7   11   17            | (0.9 ± 0.1)          | -                            |
| 100% load                  | 3   6   12                    | 70   69   59             | 1   3   4                 | 6   9   11             | (0.7 ± 0.1)          | 97   94   88                 |
| 90% load                   | 5   -   -                     | 50   -   -               | 1   -   -                 | 3.5   -   -            | 0.7   -   -          | 100                          |
| 80% load                   | -   13   -                    | -   35   -               | -   1   -                 | -   5.8   -            | -   0.8   -          | 100                          |
| 70% load                   | -   -   15                    | -   -   30               | -   -   3                 | -   -   8.4            | -   -   0.6          | 100                          |

With: SPV Specific Pore Volume; P Porosity; L<sub>c</sub> PFS Load capacity; SPV<sub>load</sub> Filled PFS volume fraction; (see IS-0) σ<sub>Max</sub>. Maximum compression stress; ε<sub>onset</sub> Onset strain, indicating the first measurable stress upon compression, used for elasticity calculation; Elasticity as percentage grade indicating how the system can reversibly return to its original shape after compression at different ε<sub>Max</sub>; Δw Compression workload; E-Module; Reversible oil-retention capability of the PFS after the end of compression.

retain loading-fluids, such as oily drug solutions, without changes to the PFS stability and shape. Any unwanted expulsion of drug-solution under mechanical stress that can be reasonably expected during the application of such systems would change the drug-release profile and consequently has to be ruled out.

Uniaxial compression experiments were performed to quantify the impact of PFS oil-loading on the PFS characteristics, including size, shape, elasticity and the oil-retention profile upon pressure. The evaluated and calculated stress-strain, elasticity and oil retention data for all compression experiments after 500 cycles are summarized in Table 3.

#### 3.4.1. PFS compression in dry and fully oil-loaded state

The physical-mechanical properties with and without oil loading and the impact of different oil loads were quantified. Reference measurements were carried out with coated but unloaded, dry PPX PFS. The stress-strain experiments performed were documented by digital photography (Fig. 4). Different maximum compressions (ε<sub>Max</sub>) of 10%, 20% and 30% were investigated to quantify the reversibility of the MCT release, and hence, the reabsorption capabilities of PFS.

To assure comparability between the individual PFS compression-experiments performed, the same PFS was used for a complete ε<sub>Max</sub>-measuring sequence. A direct comparison between the compression characteristics of a PPX-coated PFS in dry and in a fully loaded state (Fig. 4) is shown. The resulting force-displacement diagrams indicate that there is only a minor loss in the maximum compression. The maximum oil-load capacity as dry net weight is determined gravimetrically for each PFS used before compression. The mean oil-load capacity is found to be in a range of (34 ± 0.3) g MCT per gram of a 6 × 8 mm (h × d) PPX-coated PFS, representing (99 ± 0.4) % of the theoretically available specific pore volume.

Oil was instantaneously released from the fully loaded PFS immediately after starting the compression experiment, as is to be expected. After compression, as the PFS suffers from an ε<sub>Max</sub>-dependent height loss, parts of the MCT cannot be reabsorbed by the PFS anymore. This surely is a problem regarding any application because it will make the release from oily drug solutions formerly immobilized in the PFS unpredictable. Therefore, we also investigated PFS loads below the maximum loading-capacity and the resulting impact on the structural behavior of a PFS, its size, elasticity, hence, reversible oil release and reabsorption capabilities.

#### 3.4.2. PFS compression under reduced oil loads

PFS compression at ε<sub>Max</sub>. 10% to 30% with different PFS oil-loads, ranging from 70% to 90%, was performed to quantitatively evaluate the

shape integrity of a partially loaded PFS, the MCT release and reabsorption characteristics of coated PFS (Fig. 5) during compression stress. For comprehensibility reasons, it must be said that the negative load value for each PFS is kept equal to the value of ε<sub>Max</sub>. applied.

The mechanical results in combination with the images taken of the PFS during measurement reveal that oil always started to leak from PFS at a compression stage of about 70% of the applied ε<sub>Max</sub>, independent of PFS load prepared. For clear visualization, timeline images of a PFS loaded with 80% MCT and its gradual compression to 20% ε<sub>Max</sub>. are shown in (Fig. S4). The strain at which the oil release is first observed does not seem to vary much within 500 cycles of compression. No air escape from the PFS was noted during compression; hence, no air voids within the PFS seem to have been present or could exit from the inside of the samples. We can, therefore, conclude that each compression within the range of ε<sub>Max</sub>. equal to the negative PFS load can assure that the oil is always reabsorbed completely, even after 500 cycles of compression.

#### 3.5. <sup>1</sup>H NMR studies

The high oil-loading and -holding capacity of the PFS suggests a strong interaction of MCT with the PFS scaffold at the solid-liquid interface. To better understand these interactions and their impact on drug release, T<sub>2</sub> distributions and diffusion coefficients for free MCT and oil immobilized in the PFS were acquired using <sup>1</sup>H NMR.

##### 3.5.1. Transverse magnetization relaxation T<sub>2</sub>

Measurements were performed for T<sub>2</sub> in both, free MCT in a cylindrical sample holder, and the same amount of MCT immobilized in PFS of the same dimensions. For free MCT, just one population was found, with T<sub>2</sub> ranging from 100 to 1000 ms (Fig. 6, top left). Only bulk spin-spin relaxation could occur between similar or identical triglycerides, resulting in just one peak.

T<sub>2</sub> distribution of liquids in porous material is influenced by the surface to volume ratio of the material and the consequent surface-relaxation, possible bulk-relaxation, as well as the restricted diffusion in the pores, as laid out in (Kleinberg and Horsfield, 1990). When immobilized in the PFS scaffold, the T<sub>2</sub> relaxation times of MCT were found to represent different populations (Fig. 6, bottom left). The peak at 300 ms can be attributed to the bulk-relaxation of the free MCT in the larger pores of the PFS, while peaks at 1 and 100 ms were not present for free MCT and have to be caused by the effects of the PFS scaffold. Shorter times for T<sub>2</sub> are usually attributed to prolonged interaction between spins due to molecules staying in close proximity to each other. Hence, the presence of the signal at around 1 ms suggests MCT

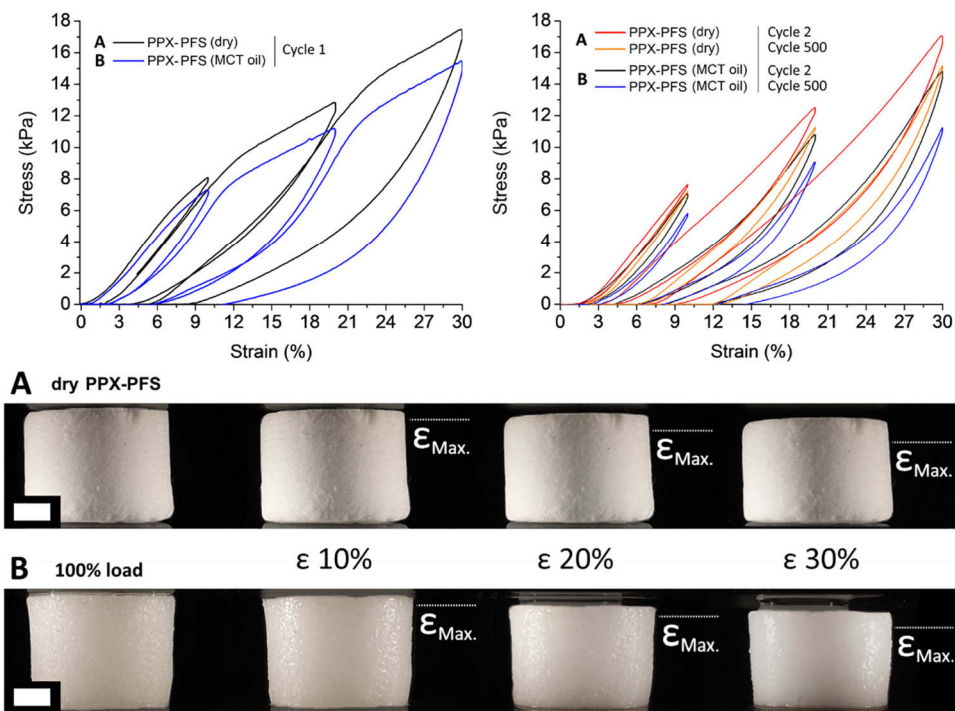


Fig. 4. Compression results for (top-left) the first and (top-right) the second as well as the 500th cycle of a compression sequence, shown section by section ranging from  $\epsilon_{Max}$ . 10% to 30%. (Bottom) PFS images prior and subsequently after each 500-cycle stage of the compression sequence, respectively. (Bar = 2 mm).

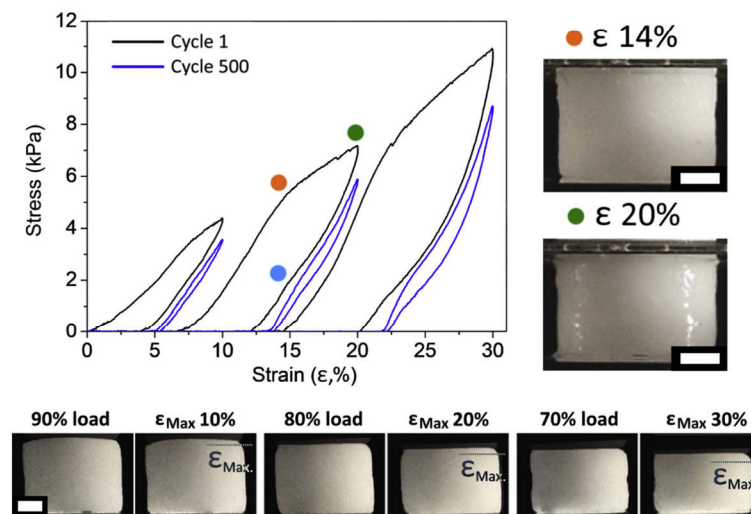
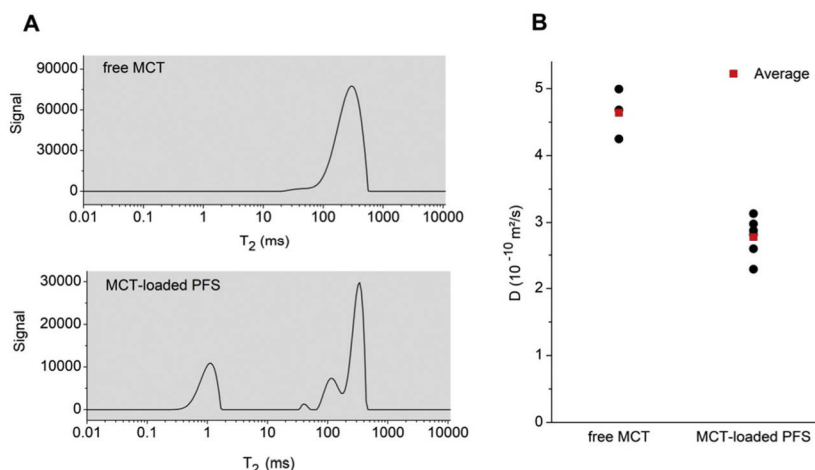


Fig. 5. Top: PFS compression results for a PFS loaded with (A) 90%, (B) 80% or (C) 70% MCT and compressed by  $\epsilon_{Max}$ . = (A) 10%, (B) 20% or (C) 30%. Bottom-row: PFS are shown for each load and corresponding  $\epsilon_{Max}$ , in their initial state or after 500 cycles of compression, respectively. (Bar = 2 mm).

molecules immobilized at the surface of the PPX-coated fibers, undergoing surface-relaxation, spin-spin interaction between the oil and the PFS material. The size of the peak at 1 ms, about 30% of the integral, indicates that a considerable fraction of the MCT is interacting with the PPX surface, e.g., by van-der-Waals interactions, due to the large surface to volume ratio of the PFS scaffold.

The size and distribution of pores in PFS before coating is given in (Mader et al., 2018), showing a dual pore structure with diameters of 20–140  $\mu\text{m}$ . The larger pores allow free diffusion of MCT and bulk-

relaxation. In the smaller pores restriction of free diffusion could also affect  $T_2$  values as MCT molecules are more likely to reach the matrix material and undergo surface-relaxation. A relation between smaller pore size and shorter  $T_2$  is well established and utilized in different fields of research, such as geology and radiology (Davis et al., 1986; Fantazzini et al., 2003; Kleinberg, 1994; Kleinberg and Horsfield, 1990).



**Fig. 6.** <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of free MCT and MCT-loaded PFS. **A:** exemplary  $T_2$  distribution of free MCT (top) and MCT-loaded PFS (bottom) at 37 °C, **B:** Diffusion coefficient  $D$  at 37 °C of free MCT (triplicate, average  $D = (4.6 \pm 0.4) 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s) and six PFS loaded with MCT (average  $D = (2.8 \pm 0.3) 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s).

### 3.5.2. Diffusion coefficient $D$

Similar to the measurement of  $T_2$ , the diffusion coefficient  $D$  can also render information on the size of small structures, such as liquid-filled pores or emulsion droplets. If free movement of molecules is restricted,  $D$  decreases with pore or droplet size (Broekmann, 2002; Morgan et al., 2019). Molecules reaching a barrier are “bouncing off” and back in the opposite direction, their signal wrongly attributed to molecules that travel slower.  $D$  of free MCT and the oil immobilized in the PFS, likewise obtained with <sup>1</sup>H NMR, are given in Fig. 6 (right).  $D$  was slightly lower for the MCT-loaded PFS, confirming the restriction of diffusion in the scaffold. As only one value for  $D$  was acquired for each PFS, we cannot determine if there were different populations of  $D$  contributing to an overall reduction but, considering the  $T_2$  results, it is highly possible. Also, measurement of  $D$  in a porous system is time depended because with increasing time more molecules reach the matrix and experience restriction. This is not depicted as we only obtained one value for  $D$ .

### 3.6. EPR drug-release studies

To evaluate whether drug release from oil loaded PFS is affected by the restricted diffusion in and interaction with the scaffold, we performed a simple release experiment. The release of dTempol, as a

model-substance of a small-molecule drug, from free oil and MCT-soaked PFS was followed using standard EPR.

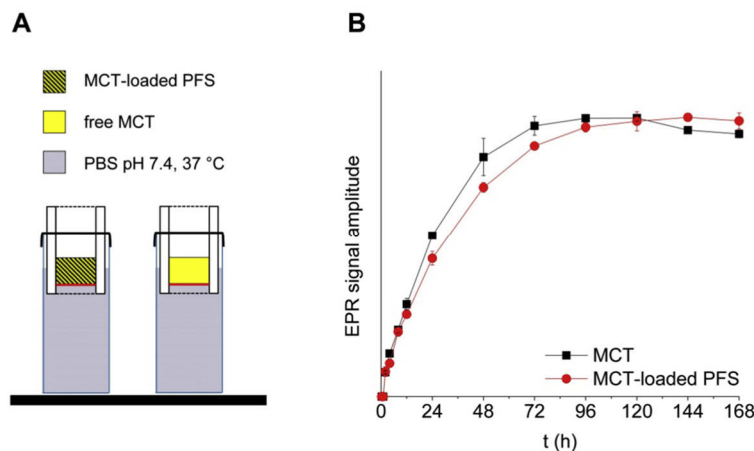
Considering the cylindrical shape of the PFS and oil (Fig. 7, left), we expect the diffusion of dTempol to the oil-PBS interface, a distance of up to 6 mm, to be the main mechanism governing the release process. The diffusion of the spin probe in MCT can be described using Fick's first law of diffusion (Fick, 1851), with  $J$  being the flux of dTempol,  $D$  the diffusion coefficient and  $\frac{d\varphi}{dx}$  the concentration gradient.

$$J = -D \frac{d\varphi}{dx}$$

Dimensions and drug-loading of the immobilized and free MCT were equal. The area of the interface between oil and PBS was kept identical by our custom-made sample holders, and sink conditions in the receptor medium were assured. Hence the only variable expected to change the flux of the model drug to the oil-PBS interface is  $D$ . Drug release from the oil immobilized in the PFS was quite similar to the release from bulk MCT (Fig. 7, right). This can be explained with the high porosity and interconnectivity of the pore-system, which only slightly restricts the diffusion of small molecules within the PFS scaffold.

### 4. Conclusion

Our experiments provide new insights into the physical processes



**Fig. 7.** **Left)** Setup for release study of dTempol from MCT. The red line indicates the interface between oil and PBS, kept at 50.3 mm<sup>2</sup> for both, free MCT and oil immobilized in the scaffolds. **Right)** Release of dTempol from free MCT and MCT-loaded PFS, given as signal amplitude of x-band EPR spectroscopy measurements. MCT is spiked with 10 mM dTempol; release was assayed in PBS pH 7.4 at 37 °C.



present within polymer fiber sponges. They further promote their applicability as multi-component drug delivery systems, for both, drug incorporation directly within the PFS scaffold as well as loading with drug-solutions after fabrication.

The different implantation model-scenarios and model-liquids tested reveal how the fluid-uptake and the prevailing scaffold interactions can be used to impact drug release from PFS. Noninvasive EPR and  $\mu$ CT imaging traced and quantified the progression of liquid-penetration. We identified the governing parameters to be considered in a typical application-scenario, mainly the wettability of the PFS but also the implantation site because liquid-infiltration rates are strongly influenced by air encapsulation. Our results indicate how to employ these processes in prolonged drug release in an aqueous environment and achieve a reproducible and continuous extraction of drug incorporated in the PFS scaffolds.

The PFS oil-retention, reversible elasticity and structural integrity under typical mechanical application-stress situations were quantified for complete as well as partial PFS liquid-loading. The PFS can retain most of its shape and elasticity in all dry and liquid-load scenarios independent from the applied liquid-load and compression stress scenario, respectively. The NMR results revealed how MCT, a possible drug-carrier-liquid, interacts with the PFS on a molecular level, indicating that both surface-relaxation and bulk-relaxation occur. Diffusion-coefficient measurements showed a restriction of diffusion for oil molecules within the PFS scaffold. Surprisingly, comparative drug-release studies from PFS and free-liquid reveal that neither liquid-surface interaction nor restrained diffusion substantially impacts drug release from PFS. We can conclude that PFS can effectively immobilize liquids inside their network and preserve drug-solutions in a predefined geometry.

In this work, we kept most of the PFS properties constant to grant comparability of our results. However, PFS can easily be manufactured from and combined with various excipients to create user-adjustable properties capable of facing almost any site-specific requirements in the future. Based on the presented results, we want to elaborate the versatile tunability of PFS further to create mature multi-component drug-release platforms for pharmaceutical as well as tissue engineering applications.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank the German Research Foundation for their financial support (DFG grants AG24/23-2, GR972/42-1 and MA1648/12-2) of this study. We acknowledge the financial support of the Open Access Publication Fund of the Martin-Luther-University Halle-Wittenberg.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijph.2020.100055>.

#### References

- Bagheri, A.R., Agarwal, S., Golenser, J., Greiner, A., 2017. Unlocking Nanocarriers for the Programmed Release of Antimalarial Drugs. *Glob. Challenges* 1, 1600011. <https://doi.org/10.1002/gch.2.201600011>.
- Broekmann, I., 2002. PFG-NMR-Untersuchungen an Monoglycerid-Gelen Und Wasser-in-Öl-Emulsionen (Doctoral Dissertation).
- Davis, C.A., Genant, H.K., Dunham, J.S., 1986. The Effects of Bone on Proton NMR Relaxation Times of Surrounding Liquids.
- Duan, G., Jiang, S., Jérôme, V., Wendorff, J.H., Fathi, A., Uhm, J., Altstadt, V., Herling, M., Breu, J., Freitag, R., Agarwal, S., Greiner, A., 2015. Ultralight, soft polymer sponges by self-assembly of short electrospun fibers in colloidal dispersions. *Adv. Funct. Mater.* 25, 2850–2856. <https://doi.org/10.1002/adfm.201500001>.
- Duan, G., Jiang, S., Moss, T., Agarwal, S., Greiner, A., 2016. Ultralight open cell polymer sponges with advanced properties by PPX CVD coating. *Polym. Chem.* 7, 2759–2764. <https://doi.org/10.1039/c6py00339g>.
- Duan, G., Bagheri, A.R., Jiang, S., Golenser, J., Agarwal, S., Greiner, A., 2017a. Exploration of Macroporous Polymeric Sponges as Drug Carriers. *Biomacromolecules* 18, 3215–3221. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00852>.
- Duan, G., Koehn-Serrano, M., Greiner, A., 2017b. Highly Efficient Reusable Sponge-Type Catalyst Carriers based on Short Electrospun Fibers. *Macromol. Rapid Commun.* 38, 1–6. <https://doi.org/10.1002/marc.201600511>.
- Duarte, A., Patricio, J., Pereira, A., Gil, M., Cabrita, A., Barros, M., Cartucho, D., 2005. Immobilisation of Cardosin A in Chitosan Sponges as a Novel Implant for Drug delivery. *Curr. Drug Discov. Technol.* 2, 231–238. <https://doi.org/10.2174/157016305775202973>.
- Fantazzini, P., Brown, R.J.S., Borgia, G.C., 2003. Bone tissue and porous media: Common features and differences studied by NMR relaxation. *Magn. Reson. Imaging* 21, 227–234. [https://doi.org/10.1016/S0730-725X\(03\)00129-2](https://doi.org/10.1016/S0730-725X(03)00129-2).
- Fick, A., 1851. Über Diffusion. *Ann. Phys.* 170, 59–86.
- Greiner, A., Wendorff, J.H., 2007. Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew. Chem. - Int. Ed.* 46, 5670–5703. <https://doi.org/10.1002/anie.200604646>.
- Guo, N., Zhang, Q., Sun, Y., Yang, H., 2019. Separation and identification of acylated leuporelin inside PLGA microspheres. *Int. J. Pharm.* 560, 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.01.061>.
- Jennings, J.A., Beenken, K.E., Parker, A.C., Smith, J.K., Courtney, H.S., Smeltzer, M.S., Haggard, W.O., 2016. Polymicrobial Biofilm Inhibition Effects of Acetate-Buffered Chitosan Sponge delivery device. *Macromol. Biosci.* 16, 591–598. <https://doi.org/10.1002/mabi.201500347>.
- Jiang, S., Chen, Y., Duan, G., Mei, C., Greiner, A., Agarwal, S., 2018. Electrospun nanofiber reinforced composites: a review. *Polym. Chem.* 9, 2685–2720. <https://doi.org/10.1039/c8py00378e>.
- Kassem, M.A.A., ElMeshad, A.N., Fares, A.R., 2015. Lyophilized Sustained Release Mucoadhesive Chitosan Sponges for Buccal Bupirone Hydrochloride delivery: Formulation and in Vitro Evaluation. *AAAPS PharmSciTech* 16, 537–547. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0243-3>.
- Kempe, S., Metz, H., Mäder, K., 2010. Application of Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy and imaging in drug delivery research - Chances and challenges. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.08.007>.
- Kleinberg, R.L., 1994. Pore size distributions, pore coupling, and transverse relaxation spectra of porous rocks. *Magn. Reson. Imaging* 12, 271–274. [https://doi.org/10.1016/0730-725X\(94\)91534-2](https://doi.org/10.1016/0730-725X(94)91534-2).
- Kleinberg, R.L., Horsfield, M.A., 1990. Transverse relaxation processes in porous sedimentary rock. *J. Magn. Reson.* 88, 9–19. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(90\)90104-H](https://doi.org/10.1016/0022-2364(90)90104-H).
- Li, J., Xu, W., Li, D., Liu, T., Zhang, Y.S., Ding, J., Chen, X., 2018. Locally Deployable Nanofiber Patch for Sequential Drug delivery in Treatment of primary and Advanced Orthotopic Hepatomas. *ACS Nano* 12, 6685–6699. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b01729>.
- Lucke, A., Kiermaier, J., Göpferich, A., 2002. Peptide Acylation by Poly( $\alpha$ -Hydroxy Esters). *Pharm. Res.* 19, 175–181. <https://doi.org/10.1023/A:1014272816454>.
- Lurie, D.J.D., Mäder, K., 2005. Monitoring drug delivery processes by EPR and related techniques - Principles and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1171–1190. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.01.023>.
- Mäder, K., Gallez, B., Liu, K.J., Swartz, H.M., 1996. Non-invasive in vivo characterization of release processes in biodegradable polymers by low-frequency electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biomaterials* 17, 457–461. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)89664-5](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)89664-5).
- Mäder, K., Bacic, G., Domb, A., Elmalak, O., Langer, R., Swartz, H.M., 1997. Noninvasive in vivo monitoring of Drug Release and Polymer Erosion from Biodegradable Polymers by EPR Spectroscopy and NMR Imaging. *J. Pharm. Sci.* 86, 126–134. <https://doi.org/10.1021/js9505105>.
- Mader, M., Jérôme, V., Freitag, R., Agarwal, S., Greiner, A., 2018. Ultraporous, Compressible, Wettable Polylactide/Polycaprolactone Sponges for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* 19, 1663–1673. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00434>.
- Miszuk, J.M., Xu, T., Yao, Q., Fang, F., Childs, J.D., Hong, Z., Tao, J., Fong, H., Sun, H., 2018. Functionalization of PCL-3D electrospun nanofibrous scaffolds for improved BMP2-induced bone formation. *Appl. Mater. Today* 10, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.12.004>.
- Morgan, V., Sad, C., Constantino, A., Azeredo, R., Lacerda, V., Castro, E., Barbosa, L., 2019. Droplet Size Distribution in Water-Crude Oil Emulsions by Low-Field NMR. *J. Braz. Chem. Soc.* 30, 1587–1598. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190057>.
- Parker, A.C., Beenken, K.E., Jennings, J.A., Hittle, L., Shirtliff, M.E., Bumgardner, J.D., Smeltzer, M.S., Haggard, W.O., 2015. Characterization of local delivery with amphotericin B and vancomycin from modified chitosan sponges and functional biofilm prevention evaluation. *J. Orthop. Res.* 33, 439–447. <https://doi.org/10.1002/jor.22760>.
- Ranganath, S.H., Wang, C.H., 2008. Biodegradable microfiber implants delivering paclitaxel for post-surgical chemotherapy against malignant glioma. *Biomaterials* 29, 2996–3003. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.002>.
- Schädlich, A., Kempe, S., Mäder, K., 2014. Non-invasive in vivo characterization of microclimate pH inside in situ forming PLGA implants using multippectral fluorescence imaging. *J. Control. Release* 179, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.01.011>.



- 024.
- Schreier, B., Rabe, S., Winter, S., Ruhs, S., Mildenerger, S., Schneider, B., Sibilia, M., Gotthardt, M., Kempe, S., Mäder, K., Grossmann, C., Gekle, M., 2014. Moderate inappropriately high aldosterone/NaCl constellation in mice: Cardiovascular effects and the role of cardiovascular epidermal growth factor receptor. *Sci. Rep.* 4. <https://doi.org/10.1038/srep07430>.
- Si, Y., Yu, J., Tang, X., Ge, J., Ding, B., 2014. Ultralight nanofibre-assembled cellular aerogels with superelasticity and multifunctionality. *Nat. Commun.* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6802>.
- Si, Y., Fu, Q., Wang, X., Zhu, J., Yu, J., Sun, G., Ding, B., 2015. Superelastic and Superhydrophobic Nanofiber-Assembled Cellular Aerogels for Effective Separation of Oil/Water Emulsions. *ACS Nano* 9, 3791–3799. <https://doi.org/10.1021/nn506633b>.
- Si, Y., Wang, X., Dou, L., Yu, J., Ding, B., 2018. Ultralight and fire-resistant ceramic nanofibrous aerogels with temperature-invariant superelasticity. *Sci. Adv.* 4. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aas8925>.
- Siepmann, J., Elkharraz, K., Siepmann, F., Klose, D., 2005. How autocatalysis accelerates drug release from PLGA-based microparticles: a quantitative treatment. *Biomacromolecules* 6, 2312–2319. <https://doi.org/10.1021/bm050228k>.
- Simon, P., Mang, S., Hasenhiindl, A., Gronski, W., Greiner, A., 1998. Poly(p-xylylene) and its derivatives by chemical vapor deposition: Synthesis, mechanism, and structure. *Macromolecules* 31, 8775–8780. <https://doi.org/10.1021/ma9808070>.
- Tihan, G.T., Ungureanu, C., Barbaresso, R.C., Zgârian, R.G., Rau, I., Meghea, A., Albu, M.G., Ghica, M.V., 2015. Chloramphenicol collagen sponges for local drug delivery in dentistry. *Comptes Rendus Chim.* 18, 986–992. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2015.06.004>.
- Tseng, Y.Y., Wang, Y.C., Su, C.H., Liu, S.J., 2015. Biodegradable vancomycin-eluting poly [(d,l)-lactide-co-glycolide] nanofibres for the treatment of postoperative central nervous system infection. *Sci. Rep.* 5, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep07849>.
- Washburn, E.W., 1921. Note on the dynamics of capillary flow. *Phys. Rev.* 17, 273–283. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.18.206>.
- Yohe, S.T., Colson, Y.L., Grinstaff, M.W., 2012. Superhydrophobic materials for tunable drug release: using displacement of air to control delivery rates. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 2016–2019. <https://doi.org/10.1021/ja211148a>.
- Yu, H., Chen, X., Cai, J., Ye, D., Wu, Y., Fan, L., Liu, P., 2019. Novel porous three-dimensional nanofibrous scaffolds for accelerating wound healing. *Chem. Eng. J.* 369, 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.03.091>.
- Zhang, Z., Kuang, G., Zong, S., Liu, S., Xiao, H., Chen, X., Zhou, D., Huang, Y., 2018. Sandwich-like Fibers/Sponge Composite Combining Chemotherapy and Hemostasis for Efficient Postoperative Prevention of Tumor Recurrence and Metastasis. *Adv. Mater.* 30, 1–9. <https://doi.org/10.1002/adma.201803217>.

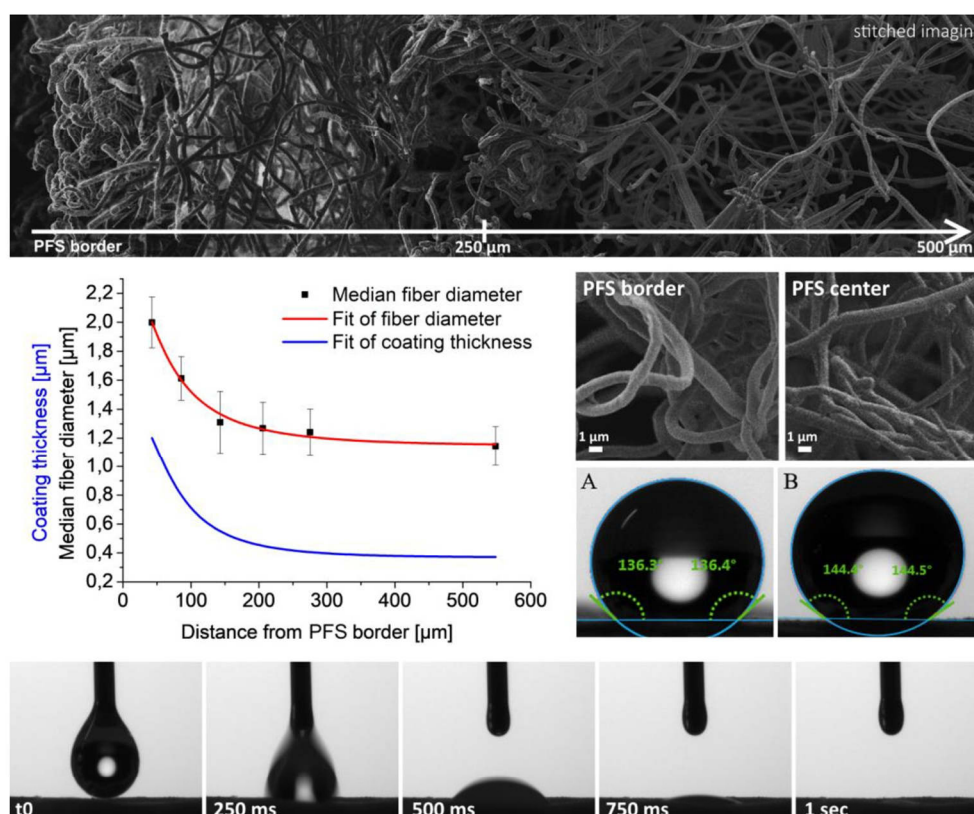
## Supporting Information (SI)

### 1. Materials and Solvents

Poly lactide (Ingeo Biopolymer PLA 4043D, Nature-Works LLC, USA) (PLA) and [2.2]paracyclophane (PPX-C, SCS coatings, USA, Lot.: 17A20009) (PPX) are used as received. The paramagnetic EPR spin probe 4-Hydroxy-Tempo-d<sub>17</sub> (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-d<sub>17</sub>-1-oxyl) (dTempol) is manufactured by ISOTEC®, Merck KGaA, Germany (**Table 1**), 3-Carbamoyl-proxyl <sup>15</sup>N-nitroxide 3-Carbamoyl-2,2,5,5,-tetramethyl-3-pyrrolidin-1-oxyl (<sup>15</sup>N-PCM) by Merck / Millipore Sigma, USA. Bovine serum albumin, fraction V (> 98 %, low endotoxin, CELLPURE®, M<sub>w</sub> ~ 66000 g/mol) (BSA) is purchased from Carl Roth GmbH + Co. KG, Germany. Miglyol ® 812 (Caprylic /Capric Triglycerides / medium-chained triglycerides Ph. Eur.) (MCT) is obtained from Sasol Olefins & Surfactants GmbH, Germany. All other chemicals are of analytical grade. Double distilled water is used in all experiments.

### 2. PPX-coating thickness homogeneity and hydrophilicity analysis

Indirect coating-thickness evaluations are carried out by placing a control glass-slide near the PFS during the coating process to achieve a general thickness of about 1 μm for all PPX-coated samples.



**SI-Fig. 1.** (Top; graph) PFS depth-depending PPX-coating thickness evaluations performed by SEM imaging and subsequent digital measurement of stitched images. Water contact angle measurements performed for (A) a PLA PFS and (B) a PPX-coated PFS (Bottom) Quantified oil penetration speed shown for a PPX-coated PFS.

As this technique cannot represent the coating thickness throughout the whole PFS scaffold, detailed coating thickness gradient evaluations using SEM imaging are performed, by subtraction of the mean coated- and the non-coated-fiber diameter. As expected, the received coating thickness achieved with static CVD is decreasing with reaching deeper PFS areas (**SI-Fig. 1**). Beyond 300  $\mu\text{m}$ , along the way inside towards the PFS core, the coating thickness is slowly, asymptotically decreasing from 1.2  $\mu\text{m}$  to about 400 nm within 500  $\mu\text{m}$  of scaffold-depth.

#### Contact angle measurements.

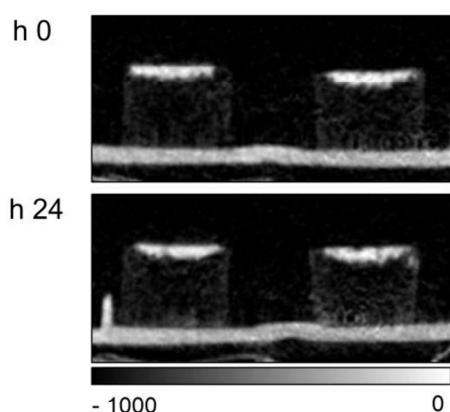
The water contact angle of PFS is measured on a Drop Shape Analyzer (Krüss Advance, v1.3.1) using Milli-Q water as a 4  $\mu\text{L}$  water droplet.

### 3. Scanning electron microscopy

SEM images are recorded on a Zeiss LEO 1530 (FE-SEM, Schottky-field-emission cathode; in-lens and SE 2 detector) at the Bavarian Polymer Institute (BPI, KeyLab Electron and Optical Microscopy) in Bayreuth. An accelerating voltage of 2 kV is used. The samples are sputtered with platinum (1.3 nm) prior to SEM imaging, using a sputter coater (Cressington HR208) with a thickness controller (Cressington MTM20).

### 4. Scaffold-MCT interaction

Small amounts of MCT, a good PFS wetting liquid, added to the top of the PFS network, spread within the very first PFS layers. Time-dependent MCT visualization inside the PFS, using  $\mu\text{CT}$  measurements, reproducibly reveal, that the oil does not move deeper into the scaffold within 24 h (**SI-Fig. 2**).

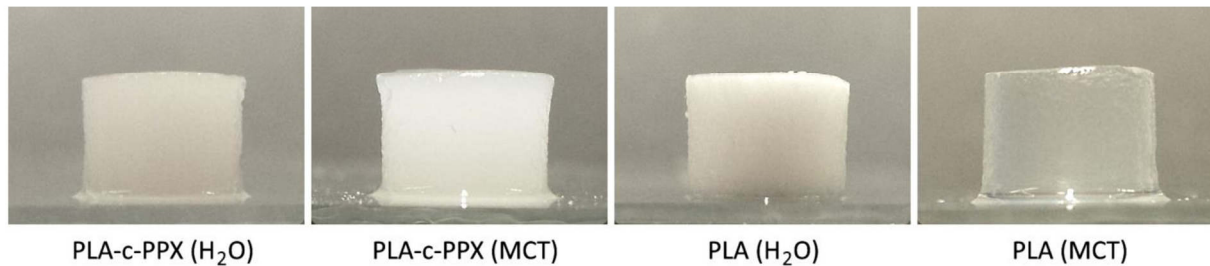


**SI-Fig. 2.** Non-external force driven PFS model-liquid penetration.  $\mu\text{CT}$  scans of PLA-PPX PFS after addition of small MCT amounts illustrate the absorption and retention at the spot of addition.



### 5. PFS liquid loading

For PFS liquid-load capacity calculations, the PFS were entirely filled with liquid by unidirectional immersion. The PFS is taken out of solution, and excess of fluid is removed to calculate the net-weight gravimetrically. The individual PFS used for calculation are illustrated in **SI-Fig. 3**.



**SI-Fig. 3.** Photographic images presenting both, PPX-coated and uncoated, model-liquid loaded PFS types, loaded with either water or MCT, as used for the net-weight solvent-load calculations (**Table 3**) after PFS immersion. Depending on density-difference of medium and fiber material, a PLA PFS turns from opaque to almost transparent.

### 6. $\mu$ CT-scanning parameters

|      | projections | x-ray energy<br>(kVp) | exposition time<br>(ms) | bin |
|------|-------------|-----------------------|-------------------------|-----|
| Scan | 720         | 70                    | 300                     | 1:4 |

### 7. Porosity calculation of PFS

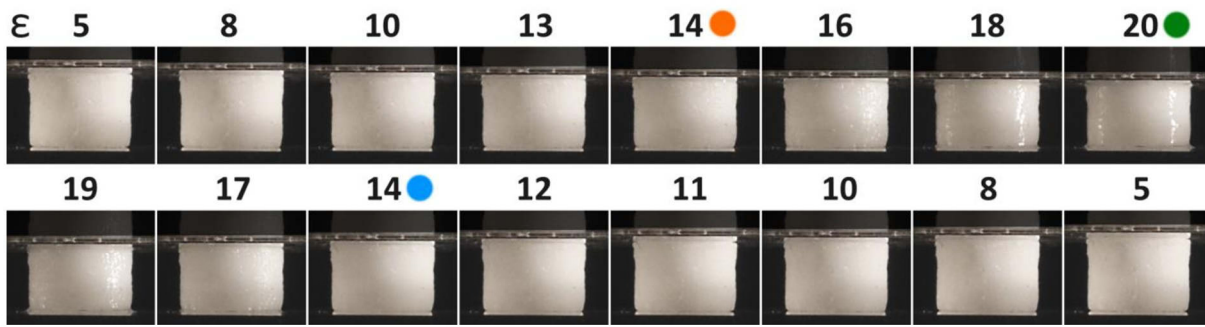
The porosity  $P$  of the PFS fabricated is calculated as follows (Duan et al., 2017a):

$$P = \left(1 - \frac{\rho_S}{\rho_{bulk}}\right) \cdot 100 \quad SPV = \frac{P}{\rho_S \cdot 10^{-3}}$$

$$L_c = \text{dry net weight} \frac{\text{loaded PFS}}{\text{unloaded PFS}}$$

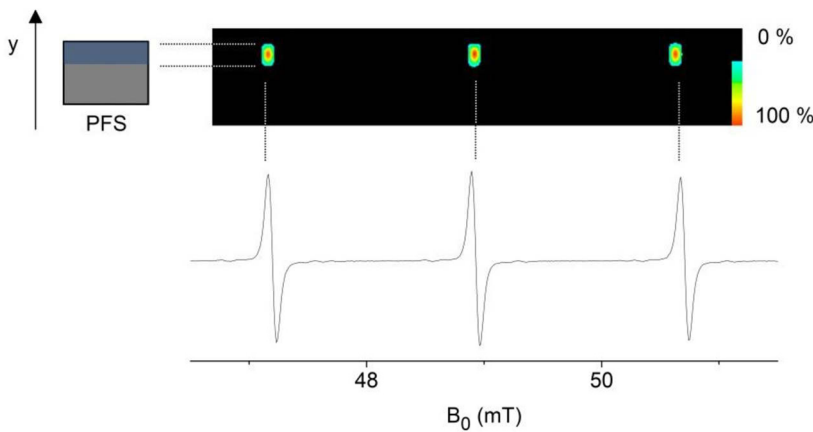
With:  $\rho_S$  Density of the PFS [ $\text{mg}/\text{cm}^3$ ],  $\rho_{bulk}$  Density of the bulk material [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ], SPV Specific Pore Volume [ $\text{cm}^3/\text{g}$ ],  $L_c$  Loading capacity of a PFS [ $\text{g}/\text{g}$ ].

8. PFS compression under reduced oil load



SI-Fig. 4. Images of gradual compressed of up to 20 %  $\epsilon_{Max}$  of the PFS loaded with 80 % MCT; to visualize the process of oil release from the PFS upon compression.

9. L-band EPR-spectroscopy and imaging parameters



SI-Fig. 5. Exemplary EPR spectrum and spectral-spatial contour plot of a PFS filled with PBS in the upper third: In the intensity color-coded EPR image, the three signals of the NO-radical dTempol are visible, giving the spatial distribution of spin probe-loaded fluid in the wetted PFS material along the y-axis. There is no signal for the dry part of the sample. In the EPR spectrum of the same sample, the corresponding three signals of dTempol are given here as the first derivative commonly used for the plotting of EPR spectra. A more detailed description of the construction of EPR spatial-spectral plots can be found in S. Kempe et al. (Kempe et al., 2010).

|                  | frequency<br>*<br>(GHz) | B0<br>(mT) | modulation<br>amplitude<br>(mT) | sweep<br>(mT) | sweep time<br>(s) | spectra | samples |
|------------------|-------------------------|------------|---------------------------------|---------------|-------------------|---------|---------|
| EPR spectroscopy | 1                       | 49         | 0.03                            | 10            | 60                | 1       | 1024    |
| EPR imaging      | 1                       | 49         | 0.03                            | 10            | 60                | 25**    | 1024    |

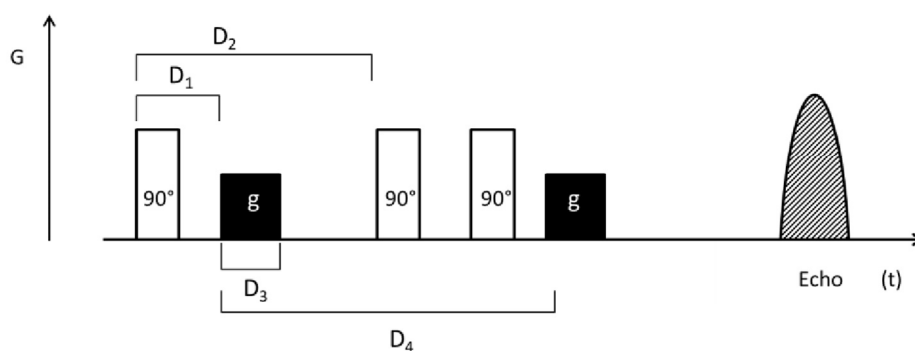
\* Because of the high dielectric loss, samples of larger dimensions (> 1 mm) cannot be measured by standard EPR (9-10 GHz), but only by low-frequency L-band EPR equipment (1 GHz); \*\*31 projections, 6 missings

## 10. Washbourn's Equation

$$L = \sqrt{\frac{\gamma r t \cos(\phi)}{2\eta}}$$

The depth of fluid penetration  $L$  over time  $t$  is controlled by the surface tension  $\gamma$  and dynamic viscosity  $\eta$  of the fluid, the contact angle  $\phi$  between solid material and tested fluid and the pore radius  $r$ .  $r$  is considered to be the same for all our samples.

## 11. $^1\text{H}$ -NMR diffusions coefficient measurements



SI-Fig. 6. Pulsed-gradient stimulated-echo sequence

|       |                       |                                       |           |
|-------|-----------------------|---------------------------------------|-----------|
| $D_1$ | 90 $\mu\text{s}$      | strength of gradient pulse            | 30 000    |
| $D_2$ | 7000 $\mu\text{s}$    | amplitude $g$ of the gradient field * | 0.858 T/m |
| $D_3$ | 220 $\mu\text{s}$     | RG receiver gain                      | 60        |
| $D_4$ | 120-300 $\mu\text{s}$ | RD relaxation delay                   | 1 s       |

\*theoretical amplitude  $g$  of the gradient field is 0.992 T/m, correction factor 0.931

## 12. Model drug release x-band EPR spectroscopy parameters

|                     | frequency<br>(GHz) | $B_0$<br>(mT) | modulation<br>(mT) | sweep<br>(mT) | sweep time<br>(s) | M/V<br>attenuation<br>(dB) | samples |
|---------------------|--------------------|---------------|--------------------|---------------|-------------------|----------------------------|---------|
| EPR<br>spectroscopy | 9-10               | 355           | 0.05               | 5.88          | 60                | 15                         | 4096    |

**LITERATURE**

- Bagheri, A.R., Agarwal, S., Golenser, J., Greiner, A., 2017. Unlocking Nanocarriers for the Programmed Release of Antimalarial Drugs. *Glob. Challenges* 1, 1600011. <https://doi.org/10.1002/gch2.201600011>
- Broekmann, I., 2002. PFG-NMR-Untersuchungen an Monoglycerid-Gelen und Wasser-in-Öl-Emulsionen (Doctoral dissertation).
- Davis, C.A., Genant, H.K., Dunham, J.S., 1986. The effects of bone on proton NMR relaxation times of surrounding liquids.
- Duan, G., Bagheri, A.R., Jiang, S., Golenser, J., Agarwal, S., Greiner, A., 2017a. Exploration of Macroporous Polymeric Sponges As Drug Carriers. *Biomacromolecules* 18, 3215–3221. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00852>
- Duan, G., Jiang, S., Jérôme, V., Wendorff, J.H., Fathi, A., Uhm, J., Altstädt, V., Herling, M., Breu, J., Freitag, R., Agarwal, S., Greiner, A., 2015. Ultralight, soft polymer sponges by self-assembly of short electrospun fibers in colloidal dispersions. *Adv. Funct. Mater.* 25, 2850–2856. <https://doi.org/10.1002/adfm.201500001>
- Duan, G., Jiang, S., Moss, T., Agarwal, S., Greiner, A., 2016. Ultralight open cell polymer sponges with advanced properties by PPX CVD coating. *Polym. Chem.* 7, 2759–2764. <https://doi.org/10.1039/c6py00339g>
- Duan, G., Koehn-Serrano, M., Greiner, A., 2017b. Highly Efficient Reusable Sponge-Type Catalyst Carriers Based on Short Electrospun Fibers. *Macromol. Rapid Commun.* 38, 1–6. <https://doi.org/10.1002/marc.201600511>
- Duarte, A., Patricio, J., Pereira, A., Gil, M., Cabrita, A., Barros, M., Cartucho, D., 2005. Immobilisation of Cardosin A in Chitosan Sponges as a Novel Implant for Drug Delivery. *Curr. Drug Discov. Technol.* 2, 231–238. <https://doi.org/10.2174/157016305775202973>
- Fantazzini, P., Brown, R.J.S., Borgia, G.C., 2003. Bone tissue and porous media: Common features and differences studied by NMR relaxation. *Magn. Reson. Imaging* 21, 227–234. [https://doi.org/10.1016/S0730-725X\(03\)00129-2](https://doi.org/10.1016/S0730-725X(03)00129-2)
- Fick, A., 1851. Über Diffusion. *Ann. Phys.* 170, 59–86.
- Greiner, A., Wendorff, J.H., 2007. Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 46, 5670–5703. <https://doi.org/10.1002/anie.200604646>
- Guo, N., Zhang, Q., Sun, Y., Yang, H., 2019. Separation and identification of acylated leuprorelin inside PLGA microspheres. *Int. J. Pharm.* 560, 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.01.061>
- Jennings, J.A., Beenken, K.E., Parker, A.C., Smith, J.K., Courtney, H.S., Smeltzer, M.S., Haggard, W.O., 2016. Polymicrobial Biofilm Inhibition Effects of Acetate-Buffered Chitosan Sponge Delivery Device. *Macromol. Biosci.* 16, 591–598. <https://doi.org/10.1002/mabi.201500347>
- Jiang, S., Chen, Y., Duan, G., Mei, C., Greiner, A., Agarwal, S., 2018. Electrospun nanofiber reinforced composites: A review. *Polym. Chem.* 9, 2685–2720. <https://doi.org/10.1039/c8py00378e>
- Kassem, M.A.A., ElMeshad, A.N., Fares, A.R., 2015. Lyophilized Sustained Release Mucoadhesive



- Chitosan Sponges for Buccal Buspirone Hydrochloride Delivery: Formulation and In Vitro Evaluation. *AAPS PharmSciTech* 16, 537–547. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0243-3>
- Kempe, S., Metz, H., Mäder, K., 2010. Application of Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy and imaging in drug delivery research - Chances and challenges. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.08.007>
- Kleinberg, R.L., 1994. Pore size distributions, pore coupling, and transverse relaxation spectra of porous rocks. *Magn. Reson. Imaging* 12, 271–274. [https://doi.org/10.1016/0730-725X\(94\)91534-2](https://doi.org/10.1016/0730-725X(94)91534-2)
- Kleinberg, R.L., Horsfield, M.A., 1990. Transverse relaxation processes in porous sedimentary rock. *J. Magn. Reson.* 88, 9–19. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(90\)90104-H](https://doi.org/10.1016/0022-2364(90)90104-H)
- Li, J., Xu, W., Li, D., Liu, T., Zhang, Y.S., Ding, J., Chen, X., 2018. Locally Deployable Nanofiber Patch for Sequential Drug Delivery in Treatment of Primary and Advanced Orthotopic Hepatomas. *ACS Nano* 12, 6685–6699. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b01729>
- Lucke, A., Kiermaier, J., Göpferich, A., 2002. Peptide Acylation by Poly( $\alpha$ -Hydroxy Esters). *Pharm. Res.* 19, 175–181. <https://doi.org/10.1023/A:1014272816454>
- Lurie, D.J., Mäder, K., 2005. Monitoring drug delivery processes by EPR and related techniques - Principles and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1171–1190. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.01.023>
- Mäder, K., Bacic, G., Domb, A., Elmalak, O., Langer, R., Swartz, H.M., 1997. Noninvasive in Vivo Monitoring of Drug Release and Polymer Erosion from Biodegradable Polymers by EPR Spectroscopy and NMR Imaging. *J. Pharm. Sci.* 86, 126–134. <https://doi.org/10.1021/js9505105>
- Mäder, K., Gallez, B., Liu, K.J., Swartz, H.M., 1996. Non-invasive in vivo characterization of release processes in biodegradable polymers by low-frequency electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biomaterials* 17, 457–461. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)89664-5](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)89664-5)
- Mader, M., Jérôme, V., Freitag, R., Agarwal, S., Greiner, A., 2018. Ultraporous, Compressible, Wettable Polylactide/Polycaprolactone Sponges for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* 19, 1663–1673. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00434>
- Miszuk, J.M., Xu, T., Yao, Q., Fang, F., Childs, J.D., Hong, Z., Tao, J., Fong, H., Sun, H., 2018. Functionalization of PCL-3D electrospun nanofibrous scaffolds for improved BMP2-induced bone formation. *Appl. Mater. Today* 10, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.12.004>
- Morgan, V., Sad, C., Constantino, A., Azeredo, R., Lacerda, V., Castro, E., Barbosa, L., 2019. Droplet Size Distribution in Water-Crude Oil Emulsions by Low-Field NMR. *J. Braz. Chem. Soc.* 30, 1587–1598. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190057>
- Parker, A.C., Beenken, K.E., Jennings, J.A., Hittle, L., Shirliff, M.E., Bumgardner, J.D., Smeltzer, M.S., Haggard, W.O., 2015. Characterization of local delivery with amphotericin B and vancomycin from modified chitosan sponges and functional biofilm prevention evaluation. *J. Orthop. Res.* 33, 439–447. <https://doi.org/10.1002/jor.22760>
- Ranganath, S.H., Wang, C.H., 2008. Biodegradable microfiber implants delivering paclitaxel for post-surgical chemotherapy against malignant glioma. *Biomaterials* 29, 2996–3003. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.002>
- Schädlich, A., Kempe, S., Mäder, K., 2014. Non-invasive in vivo characterization of microclimate pH inside in situ forming PLGA implants using multispectral fluorescence imaging. *J. Control.*

Release 179, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.01.024>

- Schreier, B., Rabe, S., Winter, S., Ruhs, S., Mildenerger, S., Schneider, B., Sabilia, M., Gotthardt, M., Kempe, S., Mäder, K., Grossmann, C., Gekle, M., 2014. Moderate inappropriately high aldosterone/NaCl constellation in mice: Cardiovascular effects and the role of cardiovascular epidermal growth factor receptor. *Sci. Rep.* 4. <https://doi.org/10.1038/srep07430>
- Si, Y., Fu, Q., Wang, X., Zhu, J., Yu, J., Sun, G., Ding, B., 2015. Superelastic and Superhydrophobic Nanofiber-Assembled Cellular Aerogels for Effective Separation of Oil/Water Emulsions. *ACS Nano* 9, 3791–3799. <https://doi.org/10.1021/nn506633b>
- Si, Y., Wang, X., Dou, L., Yu, J., Ding, B., 2018. Ultralight and fire-resistant ceramic nanofibrous aerogels with temperature-invariant superelasticity. *Sci. Adv.* 4. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aas8925>
- Si, Y., Yu, J., Tang, X., Ge, J., Ding, B., 2014. Ultralight nanofibre-assembled cellular aerogels with superelasticity and multifunctionality. *Nat. Commun.* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6802>
- Simon, P., Mang, S., Hasenhindl, A., Gronski, W., Greiner, A., 1998. Poly(p-xylylene) and its derivatives by chemical vapor deposition: Synthesis, mechanism, and structure. *Macromolecules* 31, 8775–8780. <https://doi.org/10.1021/ma9808070>
- Teodora Tihan, G., Ungureanu, C., Constantin Barbaresso, R., Gabriela Zgârian, R., Rau, I., Meghea, A., Georgiana Albu, M., Violeta Ghica, M., 2015. Chloramphenicol collagen sponges for local drug delivery in dentistry. *Comptes Rendus Chim.* 18, 986–992. <https://doi.org/10.1002/adem.200980016>
- Tseng, Y.Y., Wang, Y.C., Su, C.H., Liu, S.J., 2015. Biodegradable vancomycin-eluting poly[(d,l)-lactide-co-glycolide] nanofibres for the treatment of postoperative central nervous system infection. *Sci. Rep.* 5, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep07849>
- Washburn, E.W., 1921. Note on the dynamics of capillary flow. *Phys. Rev.* 17, 273–283. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.18.206>
- Yohe, S.T., Colson, Y.L., Grinstaff, M.W., 2012. Superhydrophobic materials for tunable drug release: Using displacement of air to control delivery rates. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 2016–2019. <https://doi.org/10.1021/ja211148a>
- Yu, H., Chen, X., Cai, J., Ye, D., Wu, Y., Fan, L., Liu, P., 2019. Novel porous three-dimensional nanofibrous scaffolds for accelerating wound healing. *Chem. Eng. J.* 369, 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.03.091>
- Zhang, Z., Kuang, G., Zong, S., Liu, S., Xiao, H., Chen, X., Zhou, D., Huang, Y., 2018. Sandwich-Like Fibers/Sponge Composite Combining Chemotherapy and Hemostasis for Efficient Postoperative Prevention of Tumor Recurrence and Metastasis. *Adv. Mater.* 30, 1–9. <https://doi.org/10.1002/adma.201803217>

## 4 Anhang – Strukturmodifizierungen von Polymerfaser-Schwämmen

### 4.1 Einleitung – Hintergrund und Techniken

Das aktuelle Herstellungsverfahren von PLA basierten PFS (nach SANFD, Kap. 1.5.2) ermöglicht derzeit lediglich die direkte Porenstrukturierung über Steuerung der Kristallisation, während des Gefrierprozesses im Gefriertrocknungsschritt (Kap. 1.6.5). Dabei werden vorrangig PFS mit nur gering ausgeprägter Porenstrukturierung gewonnen (Kap. 1.6.5.2). Für die Herstellung ultra-poröser PLA basierter PFS, ist bisher kein Verfahren zur kontrollierten, gerichteten Porenstrukturierung (Kap. 1.6.5.3) bekannt bzw. veröffentlicht worden. Es existieren bisher lediglich Arbeiten zur gerichteten Porenstrukturierung von Schwämmen hergestellt aus Polymerlösungen.<sup>[32,139,217-219]</sup> Auch alternative Techniken zur Mikroporen-Strukturierung von Schwämmen, anders als über Dispersionsmedium-Kristallisation, sind aktuell nicht bekannt. Selbes gilt für Techniken zur präzisen Makrokanalisierung von ultra-porösen PFS.

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich hierzu an drei voneinander unabhängig durchführbaren Techniken zur Porenstrukturierung bzw. Makrokanalisierung von PFS gearbeitet. Die Porenstrukturierung der PFS kann sowohl 1) während der Gefriertrocknung als auch 2) nach der thermischen Vernetzung des PFS erfolgen. Die Techniken 1-3 können dabei auch beliebig miteinander kombiniert werden. Das zugrundeliegende Verfahren, der Modifizierungsablauf und die ersten Ergebnisse dieser Arbeit sind in den folgenden Kapiteln zusammengefasst:

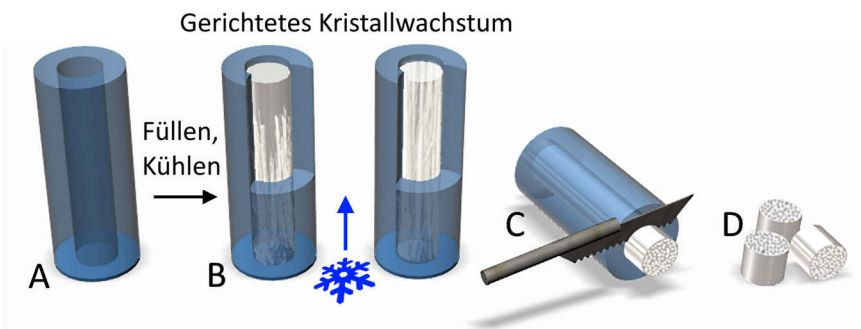
- Technik 1** erlaubt die direkte Porenstrukturierung von PLA-PFS während der Gefriertrocknung, basierend auf der Verwendung von *t*-BuOH als Dispersionsmedium.
- Technik 2** erlaubt die nachträgliche Porenstrukturierung von PLA-PFS unter Verwendung von z.B. Na-Acetat oder MgSO<sub>4</sub> mit bevorzugt nadelförmiger Kristallit-Struktur.
- Technik 3** erlaubt die Makrokanalisierung von PLA-PFS durch Einsatz von Metallkanülen während der PFS-Herstellung nach SANFD sowie in Kombination mit Technik 1 & 2.

Die folgenden Kapitel basieren auf Beobachtungen bisheriger Ergebnisse, Erfahrungswerten und Annahmen, sie konnten noch nicht vollständig durch Experimente belegt werden.



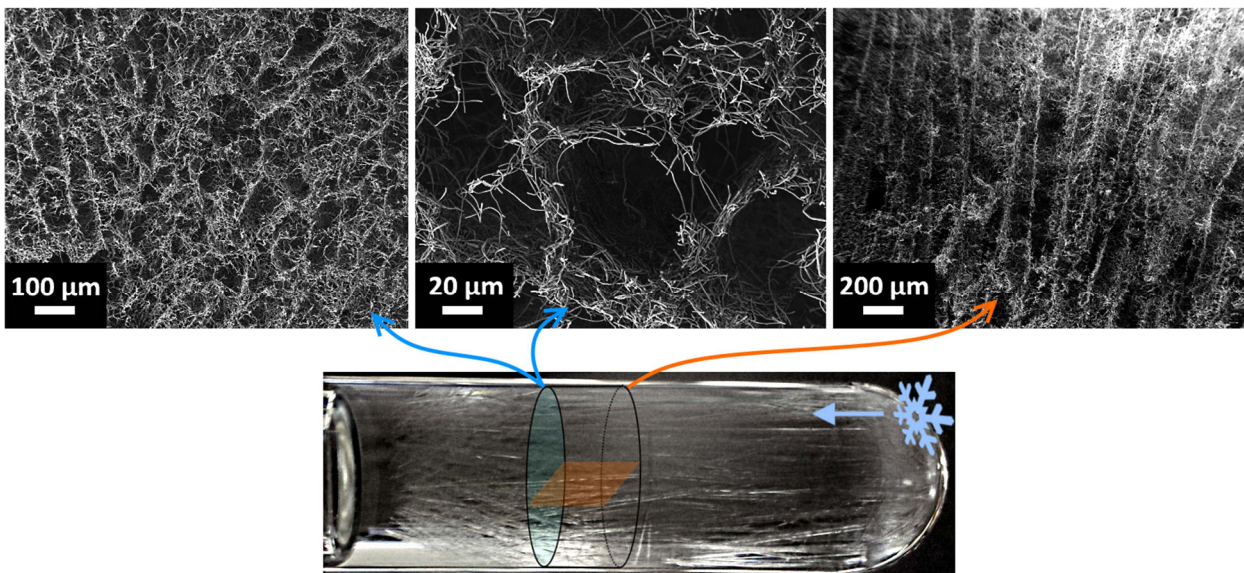
#### 4.1.1 Technik 1 – Herstellung von PLA-PFS mit gerichteter Porenstruktur

Unter bestimmten Bedingungen bildet *t*-BuOH nadelförmige Kristalle (**Abb. 36**, unten) aus, welche unter Steuerung ihrer Wachstumsrichtung, zur Erzeugung gerichtet (Kap. 1.6.5) porenstrukturierter PFS eingesetzt werden können. (**Abb. 35**).



**Abbildung 35.** Herstellung von PFS mit gerichteter Porenstruktur (Dispersionsmedium: *t*-BuOH): A) Ein Glasrohr mit Faserdispersionsmedium wird bei 4 °C auf einer Glasplatte stehend gekühlt. B) Der Kristallisationseintritt ausgehend vom Glasplattenkontakt, führt zu gerichteter Kristallisierung entlang der Gefäßausrichtung. C) Unter Tief-kalten Bedingungen (-196 °C, N<sub>2</sub>) wird der gefrorene Korpus in definierter Länge aus der Form gedrückt und geschnitten, um D) gleichmäßig große PFS zu erhalten.

Die *t*-BuOH Kristallitgröße hat direkten Einfluss auf die spätere Porengröße (Kap. 1.6.5.2) und es ist anzunehmen, dass das Kristallwachstum von *t*-BuOH durch Steuerung des Temperaturgradienten gezielt variiert werden kann, um die spätere Porengröße im PFS gezielt zu steuern.



**Abbildung 36.** Porenstruktur eines nach **Abbildung 35** hergestellten PFS mit gerichteter Porenstruktur. SEM-Abbildungen (Links und Mitte) der Poren im horizontalen Querschnitt, (Rechts) Porenstruktur im vertikalen Querschnitt, der Porenverlauf zieht sich hier einseitig gerichtet durch den gesamten Schwamm. (Unten) Gerichtet gewachsene *t*-BuOH Kristalle (im Glas-Behälter ohne Fasern) zur Querschnittsillustration.

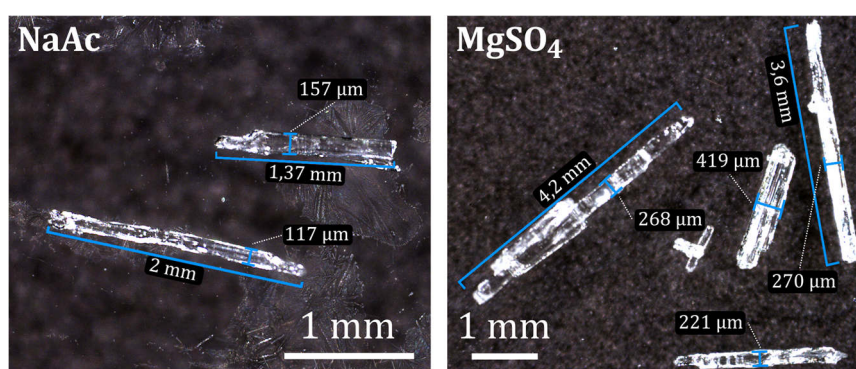
Durch das gerichtete Kristallwachstum ergeben sich jedoch, auf Grund der daraus resultierenden Anisotropie des Systems, auch deutliche Einschränkungen in der Handhabung und dem Proben-ausschuss Anteil des vorletzten Schrittes der PFS-Herstellung.



Die Kristallisationsrichtung entscheidet, ob eine PFS-Struktur und somit die mechanischen Eigenschaften des späteren Trägers isotrop oder anisotrop sind. Die Anisotropie führt als negativer Nebeneffekt zu einer hohen mechanischen Anisotropie des gefrorenen Dispersionsmediums, welches seine Verarbeitbarkeit und Handhabbarkeit beim Schnitt (**Abb. 35, C**) der PFS während ihrer Herstellung maßgeblich erschwert. Im Verlauf der gerichteten Porenstrukturierung (Kap. 1.6.5.3) ergibt sich durch die hohe Anisotropie des gerichtet gefrorenen Dispersionsmediums eine um etwa den Faktor 10-20x gesteigerte Ausschussrate in der Probenproduktion.

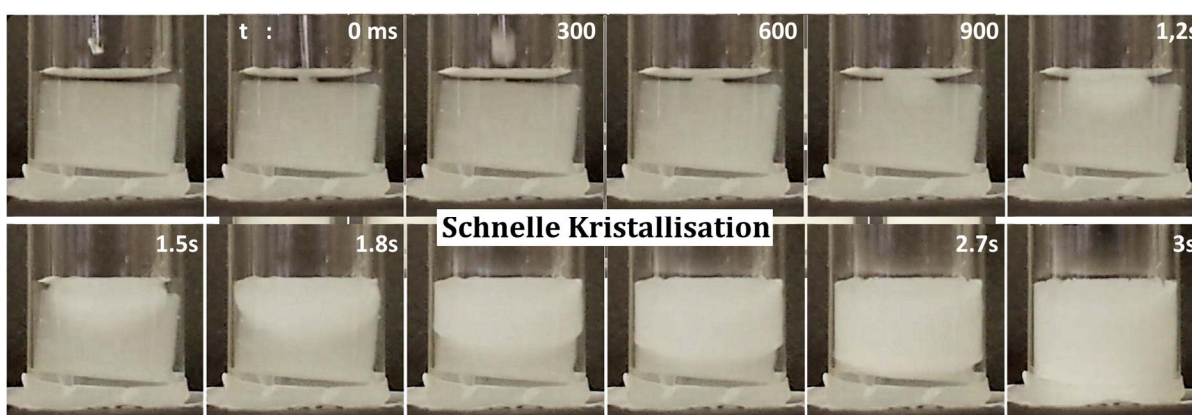
#### 4.1.2 Technik 2 – Porenmodifizierung von PFS durch Salzstrukturübertragung

Natriumacetat (NaAc) bildet ähnlich wie Magnesiumsulfat, unter schneller Kristallisation aus stark übersättigten Lösungen, nadelförmige Kristalle aus (**Abb. 37**).



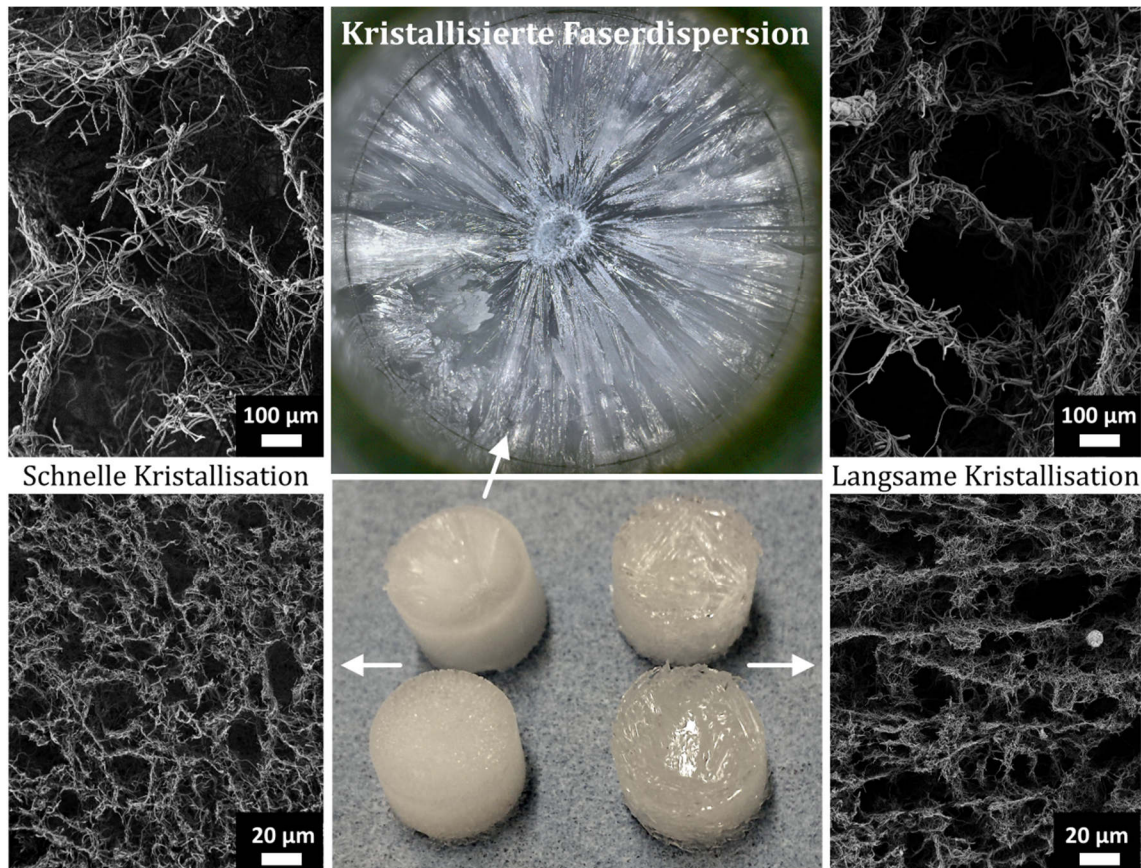
**Abbildung 37.** Nadelförmige Salz-Kristalle aus Fällung von Natriumacetat (NaAc) und Magnesiumsulfat.

Durch Übertragung dieser Kristallit-Struktur auf einen PFS ist es denkbar, die Porenstruktur des PFS aus mehreren Kristallisationsrichtungen auch ggf. mehrfach hintereinander zu modifizieren. Das Verfahren basiert darauf, einen auf üblichem Wege hergestellten PFS (Kap. 1.6.5) oder z.B. bereits unter Verwendung von Technik 1 porenstrukturierten PFS, unter leicht erhöhten Temperaturen ( $\sim 30^\circ\text{C}$ ) in eine (sonst) übersättigte NaAc-Lösung zu geben und diese Lösung anschließend abkühlen und kristallisieren zu lassen (**Abb. 38**).



**Abbildung 38.** Verlauf einer schnellen Kristallisation (NaAc-Lösung) zur Porenstrukturierung eines darin eingetauchten PLA-PFS. (Anmerkung: Eine Hydrophilierung des PFS durch Plasma ist zur Immersion den PFS hier, auf Grund des hohen Salzgehaltes der Lösung, nicht nötig.)

Nach Trocknung des Systems und unter kurzer Anwendung von Schmelzbedingungen zur Strukturübertragung, kann bei einer Strukturierungstemperatur (S-Temp.) von 150 °C (PLA-PFS: 5 Min.) die Struktur des Salzkristallits auf den PFS übertragen werden. Die Struktur des PFS bleibt ohne oder bei zu kurzer Temperaturbehandlung unverändert. Durch anschließendes Waschen des PFS im Salzkristall kann das Salz entfernt und der PFS nach Gefriertrocknen zurückgewonnen und charakterisiert werden. Durch Steuerung der K-Temperatur und somit der Kristallisationsgeschwindigkeit kann die Porenstruktur verändert werden (**Abb. 39**).



**Abbildung 39.** Kristallstruktur von PLA basierten PFS nach Porenstrukturierung durch Salzkristallstrukturübertragung. Die Porenstruktur lässt sich durch Steuerung der Kristallisationsbedingungen (Temperatur → Kristallisationsgeschwindigkeit) variieren. Die Skala entspricht 20 µm.

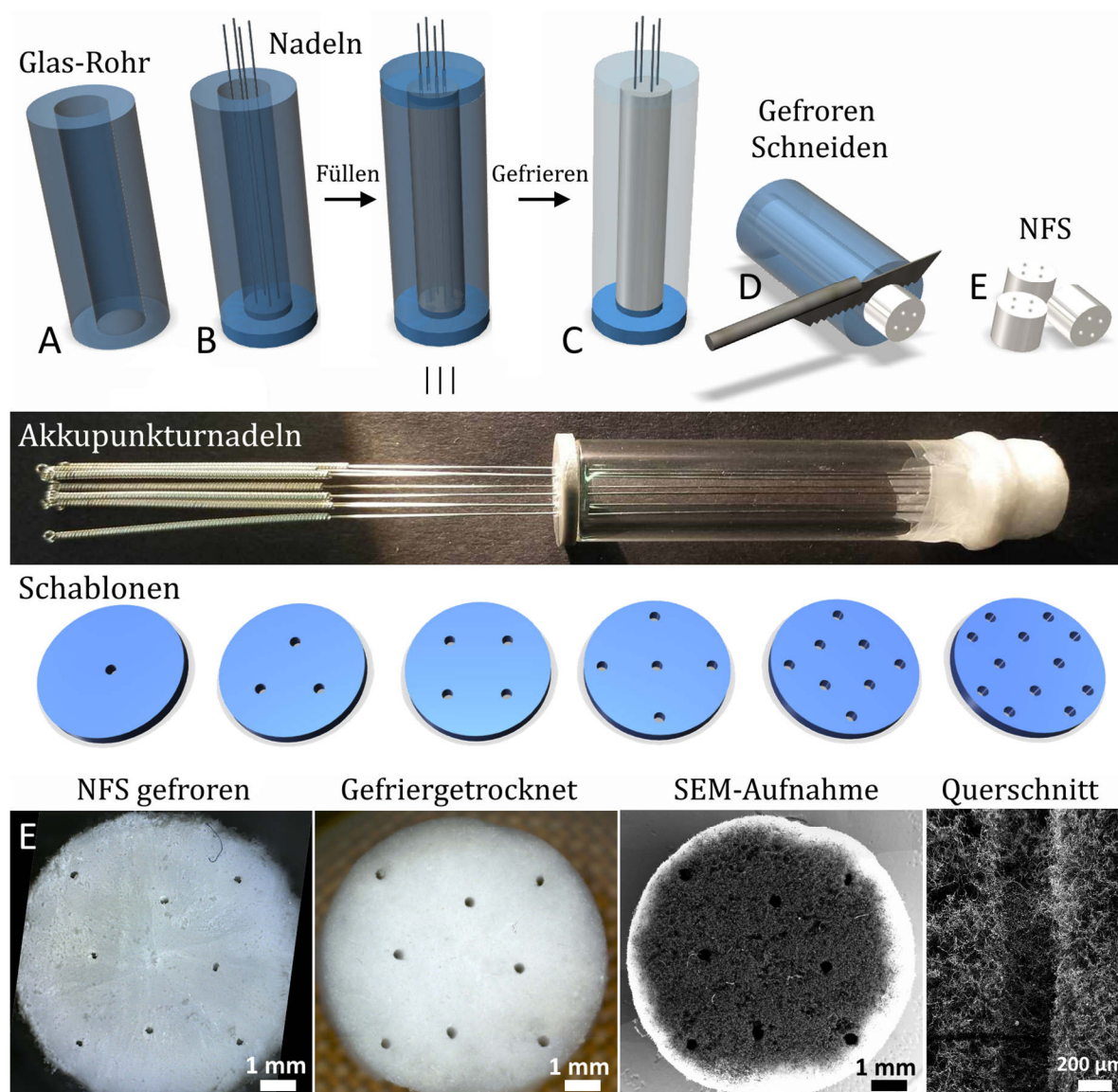
Es ist anzunehmen, dass sich die Größe als auch die Gestalt der Poren sowie Fasern ebenfalls unter Steuerung der S-Temperatur und der Laufzeit der Temperierung verändern lässt. Ein langfristig bei 150 °C temperierter PFS konnte nach Entfernen des Salzes nicht mehr als PFS gewonnen werden. Vermutlich wird die Faserstruktur, oder das Faser-Netzwerk (bei bisher unbestimmter Laufzeit der Temperierung) dauerhaft beschädigt. Eine Zersetzung von PLA bei diesen Temperaturen ist nur für kurzzeitige Temperierungen zu vermeiden. In beiden Techniken ist festzustellen, dass die Kristallstruktur des verwendeten Dispersionsmediums bzw. Salzes und die kontrollierte Steuerung des Kristallisationsprozesses über die finale Porenstruktur sowie ihre Einheitlichkeit entscheiden, vor allem entlang der Ausbreitungsrichtung der Kristallisation (nicht gezeigt).



### 4.1.3 Technik 3 – Makrokanalisierung von PFS

Es existieren Techniken zur nachträglichen Makrokanalisierung von Schwämmen, welche unter Einsatz von löslichen Templaten<sup>[220]</sup> oder unter harschen Methoden, z.B. unter Einsatz eines Lasers<sup>[221]</sup>, erzeugt werden können. Diese Makrokanäle könnten zukünftig zur Steuerung der Zellbesiedlung, der künstlichen Zellträger-Vaskularisierung, oder zur Anpassung des konvektiven Nährmediumtransports eines zellbesiedelten PFS in Bioreaktor-Kultur (**M2**) Anwendung finden.

Als alternative Technik zu den genannten Verfahren einer Schwamm Makrokanalisierung habe ich eine Technik entwickelt, welche sich für PLA-PFS eignet und in die PFS-Herstellungsverfahren nach SANFD (1.5.2) sowie den obig genannten Techniken zur Porenstrukturierung integrieren lässt. Die Technik basiert auf dem Einsatz von Metallkanülen (Durchmesser von 300  $\mu\text{m}$ , oder mehr möglich), bei sonst gleichbleibender PFS-Herstellung bzw. Verarbeitung (**Abb. 40**).



**Abbildung 40.** Herstellung von PFS mit definierten Makrokanälen (300  $\mu\text{m}$ ): A) Ein Glasrohr wird B) durch eine Schablone mit Metallkanülen versehen (Fotographie Mitte), danach die Faserdispersion zugegeben, C) eingefroren, die Kanülen entnommen und D) der gefrorene Körper unter tiefen Bedingungen geschnitten, um hieraus E) gleichmäßig große PFS zu erhalten.

Die Hauptproblematik der Technik besteht in der Homogenisierung der Faserdispersion unter Präsenz der Kanülen. Die Homogenisierung wird dabei durch die räumlichen Einschränkungen wie auch durch Vibration der Kanülen stark beeinträchtigt. Die Kanülen verdrängen die Faserdispersion und müssen daher vor Zugabe der Dispersion eingeführt, gegenüber Vibration fixiert und nach Gefrieren der Faserdispersion wieder entfernt werden, um die PFS weiter bearbeiten zu können.

### **4.2 Resümee**

Die auf die genannten PFS Strukturierungstechniken jeweilig einflussnehmenden Faktoren der Kristallisations- und Temperaturkontrolle sowie der Homogenisierung der Dispersion sind ohne spezielles Labor-Equipment nur schwer zu kontrollieren. Die durch die beschriebenen Techniken noch einmal stark erweiterte Anzahl an Einflussfaktoren der Systemdynamik der PFS-Herstellung (Kap. 1.6.1) erhöhen die Komplexität der PFS-Herstellung und die Proben-Ausschussrate noch einmal maßgeblich. Dies gilt vor allem für kombinatorische Produktionsschritte, wie z.B. der gleich-zeitiger Mikroporen- und Makrokanal Schwammstrukturierung. Dabei ist auch die Anisotropie ein schwerwiegendes Problem in Hinblick auf die Komplexität und Ausschussrate der PFS-Herstellung.





## 5 Literaturquellen

- [1] Interview: Science Journalist Pere Estupinyà, "George M. Whitesides: Chemistry has always been the ultimate nanotechnology", zu finden unter: [https://gmwgroup.harvard.edu/media/Metode\\_2011\\_Review.pdf](https://gmwgroup.harvard.edu/media/Metode_2011_Review.pdf), (30.01.15).
- [2] W. R. Mulley, J. Kanellis, *Understanding crossmatch testing in organ transplantation: A case-based guide for the general nephrologist* (DOI: 10.1111/j.1440-1797.2010.01414.x), *Nephrology* (Carlton, Vic.), 16(2), **2011**, 125-133.
- [3] F. J. O'Brien, *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering* (DOI: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X), *Mat. Today*, 14(3), **2011**, 88-95.
- [4] Woodhead Publishing Series in Biomaterials (Hrsg.), *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds. Materials, Technologies, and Applications*, **2018**, Elsevier.
- [5] S. Zhang, M. Xing, B. Li, *Biomimetic Layer-by-Layer Self-Assembly of Nanofilms, Nanocoatings, and 3D Scaffolds for Tissue Engineering* (DOI: 10.3390/ijms19061641), *International journal of molecular sciences*, 19(6), **2018**.
- [6] G. Duan, S. Jiang, V. Jérôme, J. H. Wendorff, A. Fathi, J. Uhm, V. Altstädt, M. Herling, J. Breu, R. Freitag et al., *Ultralight, Soft Polymer Sponges by Self-Assembly of Short Electrospun Fibers in Colloidal Dispersions* (DOI: 10.1002/adfm.201500001), *Adv. Funct. Mater.*, 25(19), **2015**, 2850-2856.
- [7] S. Jiang, Y. Chen, G. Duan, C. Mei, A. Greiner, S. Agarwal, *Electrospun nanofiber reinforced composites: a review* (DOI: 10.1039/C8PY00378E), *Polym. Chem.*, 9(20), **2018**, 2685-2720.
- [8] Y. Si, J. Yu, X. Tang, J. Ge, B. Ding, *Ultralight nanofibre-assembled cellular aerogels with superelasticity and multifunctionality* (DOI: 10.1038/ncomms6802), *Nature commun.*, 5, **2014**, 5802.
- [9] T. P. Haider, C. Völker, J. Kramm, K. Landfester, F. R. Wurm, *Kunststoffe der Zukunft? Der Einfluss von bioabbaubaren Polymeren auf Umwelt und Gesellschaft* (DOI: 10.1002/ange.201805766), *Angew. Chem.*, 131(1), **2019**, 50-63.
- [10] S. Michels, J. Wolf, *Stratified Treatment in Lung Cancer* (DOI: 10.1159/000453406), *Oncology research and treatment*, 39(12), **2016**, 760-766.
- [11] I. Mahmood, *Prediction of drug clearance in children from adults: a comparison of several allometric methods* (DOI: 10.1111/j.1365-2125.2006.02622.x), *British journal of clinical pharmacology*, 61(5), **2006**, 545-557.
- [12] Römpp Thieme, "Römpp Thieme Online Enzyklopädie. Georg Thieme Verlag KG", zu finden unter: <https://roempp.thieme.de>, (20.01.20).
- [13] C. Frantz, K. M. Stewart, V. M. Weaver, *The extracellular matrix at a glance* (DOI: 10.1242/jcs.023820), *J. Cell Sci.*, 123(Pt 24), **2010**, 4195-4200.
- [14] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, N. K. Karamanos, *Extracellular matrix structure* (DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.001), *Adv. Drug Delivery Rev.*, 97, **2016**, 4-27.
- [15] G. Mazza, K. Rombouts, A. Rennie Hall, L. Urbani, T. Vinh Luong, W. Al-Akkad, L. Longato, D. Brown, P. Maghsoudlou, A. P. Dhillon et al., *Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation* (DOI: 10.1038/srep13079), *Sci. Rep.*, 5, **2015**, 13079.
- [16] Y. Wang, C. T. Nicolas, H. S. Chen, J. J. Ross, S. B. de Lorenzo, S. L. Nyberg, *Recent Advances in Decellularization and Recellularization for Tissue-Engineered Liver Grafts* (DOI: 10.1159/000479597), *Cells, tissues, organs*, 204(3-4), **2017**, 125-136.
- [17] S. Ogiso, K. Yasuchika, K. Fukumitsu, T. Ishii, H. Kojima, Y. Miyauchi, R. Yamaoka, J. Komori, H. Katayama, T. Kawai et al., *Efficient recellularisation of decellularised whole-liver grafts using biliary tree and foetal hepatocytes* (DOI: 10.1038/srep35887), *Sci. Rep.*, 6, **2016**, 35887.

- [18] C. Selden, B. Fuller, *Role of Bioreactor Technology in Tissue Engineering for Clinical Use and Therapeutic Target Design* (DOI: 10.3390/bioengineering5020032), *Bioengineering* (Basel, Switzerland), 5(2), **2018**.
- [19] J. Schmid, S. Schwarz, R. Meier-Staude, S. Sudhop, H. Clausen-Schaumann, M. Schieker, R. Huber, *A Perfusion Bioreactor System for Cell Seeding and Oxygen-Controlled Cultivation of Three-Dimensional Cell Cultures* (DOI: 10.1089/ten.TEC.2018.0204), *Tissue Eng., Part C*, 24(10), **2018**, 585-595.
- [20] S. Ahmed, V. M. Chauhan, A. M. Ghaemmaghami, J. W. Aylott, *New generation of bioreactors that advance extracellular matrix modelling and tissue engineering* (DOI: 10.1007/s10529-018-2611-7), *Biotechnol. Lett.*, 41(1), **2019**, 1-25.
- [21] M. N. V. Ravi Kumar (Hrsg.), *Handbook of polyester drug delivery systems*, **2017**, Pan Stanford Publishing, Singapore.
- [22] S. Yi, F. Ding, L. Gong, X. Gu, *Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (DOI: 10.2174/1574888X11666160905092513), *Current stem cell research & therapy*, 12(3), **2017**, 233-246.
- [23] N. Davidenko, T. Gibb, C. Schuster, S. M. Best, J. J. Campbell, C. J. Watson, R. E. Cameron, *Biomimetic collagen scaffolds with anisotropic pore architecture* (DOI: 10.1016/j.actbio.2011.09.033), *Acta biomaterialia*, 8(2), **2012**, 667-676.
- [24] J.-P. Chen, S.-F. Li, Y.-P. Chiang, *Bioactive Collagen-Grafted Poly-L-Lactic Acid Nanofibrous Membrane for Cartilage Tissue Engineering* (DOI: 10.1166/jnn.2010.1945), *J. Nanosci. Nanotech.*, 10(8), **2010**, 5393-5398.
- [25] J.-P. Chen, C.-H. Su, *Surface modification of electrospun PLLA nanofibers by plasma treatment and cationized gelatin immobilization for cartilage tissue engineering* (DOI: 10.1016/j.actbio.2010.08.015), *Acta biomaterialia*, 7(1), **2011**, 234-243.
- [26] A.-M. Haaparanta, E. Jarvinen, I. F. Cengiz, V. Ella, H. T. Kokkonen, I. Kiviranta, M. Kellomaki, *Preparation and characterization of collagen/PLA, chitosan/PLA, and collagen/chitosan/PLA hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering* (DOI: 10.1007/s10856-013-5129-5), *Journal of materials science. Materials in medicine*, 25(4), **2014**, 1129-1136.
- [27] W. He, Z. Ma, T. Yong, W. E. Teo, S. Ramakrishna, *Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth* (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.049), *Biomaterials*, 26(36), **2005**, 7606-7615.
- [28] H. H. Oh, Y.-G. Ko, H. Lu, N. Kawazoe, G. Chen, *Preparation of porous collagen scaffolds with micropatterned structures* (DOI: 10.1002/adma.201200237), *Advanced materials* (Deerfield Beach, Fla.), 24(31), **2012**, 4311-4316.
- [29] T. Sato, G. Chen, T. Ushida, T. Ishii, N. Ochiai, T. Tateishi, J. Tanaka, *Evaluation of PLLA-collagen hybrid sponge as a scaffold for cartilage tissue engineering* (DOI: 10.1016/j.msec.2003.12.010), *Materials Science and Engineering: C*, 24(3), **2004**, 365-372.
- [30] G. Chen, T. Sato, T. Ushida, N. Ochiai, T. Tateishi, *Tissue engineering of cartilage using a hybrid scaffold of synthetic polymer and collagen* (DOI: 10.1089/107632704323061681), 10(3-4), **2004**, 323-330.
- [31] Z.-Q. Feng, H.-J. Lu, M. K. Leach, N.-P. Huang, Y.-C. Wang, C.-J. Liu, Z.-Z. Gu, *The influence of type-I collagen-coated PLLA aligned nanofibers on growth of blood outgrowth endothelial cells* (DOI: 10.1088/1748-6041/5/6/065011), *Biomedical materials* (Bristol, England), 5(6), **2010**, 65011.
- [32] X. Yu, G. Qian, S. Chen, D. Xu, X. Zhao, C. Du, *A tracheal scaffold of gelatin-chondroitin sulfate-hyaluronan-polyvinyl alcohol with orientated porous structure* (DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.12.017), *Carbohydrate Polymers*, 159, **2017**, 20-28.

- [33] S. R. Hong, Y. M. Lee, T. Akaike, *Evaluation of a galactose-carrying gelatin sponge for hepatocytes culture and transplantation* (DOI: 10.1002/jbm.a.10138), *Journal of biomedical materials research. Part A*, 67(3), **2003**, 733-741.
- [34] W. Chen, S. Chen, Y. Morsi, H. EI-Hamshary, M. E. Newhy, C. Fan, X. Mo, *Superabsorbent 3D scaffold based on electrospun nanofibers for cartilage tissue engineering* (DOI: 10.1021/acsami.6b06825), *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**.
- [35] W. Chen, J. Ma, L. Zhu, Y. Morsi, H. EI-Hamshary, S. S. Al-Deyab, X. Mo, *Superelastic, superabsorbent and 3D nanofiber-assembled scaffold for tissue engineering* (DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.02.050), *Colloids Surf. B*, 142, **2016**, 165-172.
- [36] C. S. Ki, S. Y. Park, H. J. Kim, H.-M. Jung, K. M. Woo, J. W. Lee, Y. H. Park, *Development of 3-D nanofibrous fibroin scaffold with high porosity by electrospinning: implications for bone regeneration* (DOI: 10.1007/s10529-007-9581-5), *Biotechnology letters*, 30(3), **2008**, 405-410.
- [37] W. Shao, J. He, Q. Han, F. Sang, Q. Wang, L. Chen, S. Cui, B. Ding, *A biomimetic multilayer nanofiber fabric fabricated by electrospinning and textile technology from polylactic acid and Tussah silk fibroin as a scaffold for bone tissue engineering* (DOI: 10.1016/j.msec.2016.05.081), *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 67, **2016**, 599-610.
- [38] Y. Gotoh, S. Niimi, T. Hayakawa, T. Miyashita, *Preparation of lactose-silk fibroin conjugates and their application as a scaffold for hepatocyte attachment*, *Biomaterials*, 25(6), **2004**, 1131-1140.
- [39] A. Tripathi, J. S. Melo, *Preparation of a sponge-like biocomposite agarose-chitosan scaffold with primary hepatocytes for establishing an in vitro 3D liver tissue model* (DOI: 10.1039/C5RA04153H), *RSC Adv*, 5(39), **2015**, 30701-30710.
- [40] A. Nussinovitch, R. Velez-Silvestre, M. Peleg, *Compressive characteristics of freeze-dried agar and alginate gel sponges* (DOI: 10.1021/bp00019a015), *Biotechnol. Prog.*, 9(1), **1993**, 101-104.
- [41] M. Y. Zhao, L. H. Li, B. Li, C. R. Zhou, *LBL coating of type I collagen and hyaluronic acid on aminolyzed PLLA to enhance the cell-material interaction* (DOI: 10.3144/expresspolymlett.2014.36), *Express Polym. Lett.*, 8(5), **2014**, 322-335.
- [42] J. Fan, Y. Shang, Y. Yuan, J. Yang, *Preparation and characterization of chitosan/galactosylated hyaluronic acid scaffolds for primary hepatocytes culture* (DOI: 10.1007/s10856-009-3833-y), *Journal of materials science. Materials in medicine*, 21(1), **2010**, 319-327.
- [43] J. Yang, M. Goto, H. Ise, C.-S. Cho, T. Akaike, *Galactosylated alginate as a scaffold for hepatocytes entrapment* (DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00129-6), *Biomaterials*, 23(2), **2002**, 471-479.
- [44] T. W. Chung, J. Yang, T. Akaike, K. Y. Cho, J. W. Nah, S. I. Kim, C. S. Cho, *Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment* (DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00399-4), *Biomaterials*, 23(14), **2002**, 2827-2834.
- [45] L. Shapiro, S. Cohen, *Novel alginate sponges for cell culture and transplantation* (DOI: 10.1016/S0142-9612(96)00181-0), *Biomaterials*, 18(8), **1997**, 583-590.
- [46] B. Dhurai, N. Saraswathy, R. Maheswaran, P. Sethupathi, P. Vanitha, S. Vigneshwaran, V. Rameshbabu, *Electrospinning of curcumin loaded chitosan/poly (lactic acid) nanofilm and evaluation of its medicinal characteristics* (DOI: 10.1007/s11706-013-0222-8), *Front. Mater. Sci.*, 7(4), **2013**, 350-361.
- [47] M. Ignatova, N. Manolova, N. Markova, I. Rashkov, *Electrospun non-woven nanofibrous hybrid mats based on chitosan and PLA for wound-dressing applications* (DOI: 10.1002/mabi.200800189), *Macromolecular bioscience*, 9(1), **2009**, 102-111.
- [48] M. G. Ignatova, N. E. Manolova, R. A. Toshkova, I. B. Rashkov, E. G. Gardeva, L. S. Yossifova, M. T. Alexandrov, *Electrospun nanofibrous mats containing quaternized chitosan and polylactide with in vitro antitumor activity against HeLa cells* (DOI: 10.1021/bm100285n), *Biomacromolecules*, 11(6), **2010**, 1633-1645.



- [49] E. Mirzaei, R. Faridi-Majidi, F. A. Paskiabi, M. A. Shokrgozar, *Genipin cross-linked electrospun chitosan-based nanofibrous mat as tissue engineering scaffold* (DOI: 10.7508/nmj.2014.03.003), *Nanomedicine Journal*, 1(3), **2014**, 137-146.
- [50] P. Sangsanoh, O. Suwanton, A. Neamark, P. Cheepsunthorn, P. Pavasant, P. Supaphol, *In vitro biocompatibility of electrospun and solvent-cast chitosan substrata towards Schwann, osteoblast, keratinocyte and fibroblast cells* (DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2009.10.029), *European Polymer Journal*, 46(3), **2010**, 428-440.
- [51] Z.-Q. Feng, X. Chu, N.-P. Huang, T. Wang, Y. Wang, X. Shi, Y. Ding, Z.-Z. Gu, *The effect of nanofibrous galactosylated chitosan scaffolds on the formation of rat primary hepatocyte aggregates and the maintenance of liver function* (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.053), *Biomaterials*, 30(14), **2009**, 2753-2763.
- [52] I.-K. Park, J. Yang, H.-J. Jeong, H.-S. Bom, I. Harada, T. Akaike, S.-I. Kim, C.-S. Cho, *Galactosylated chitosan as a synthetic extracellular matrix for hepatocytes attachment* (DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00108-X), *Biomaterials*, 24(13), **2003**, 2331-2337.
- [53] F. Croisier, C. Jérôme, *Chitosan-based biomaterials for tissue engineering* (DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009), *Eur. Polym. J.*, 49(4), **2013**, 780-792.
- [54] I.-Y. Kim, S.-J. Seo, H.-S. Moon, M.-K. Yoo, I.-Y. Park, B.-C. Kim, C.-S. Cho, *Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications* (DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.07.009), *Biotechnology advances*, 26(1), **2008**, 1-21.
- [55] C. Laurencin, T. Jiang, S. Kumbar, L. Nair, *Biologically Active Chitosan Systems for Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (DOI: 10.2174/156802608783790974), *CTMC*, 8(4), **2008**, 354-364.
- [56] Y.-J. Seol, J.-Y. Lee, Y.-J. Park, Y.-M. Lee, Young-Ku, I.-C. Rhyu, S.-J. Lee, S.-B. Han, C.-P. Chung, *Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation* (DOI: 10.1023/B:BILE.0000032962.79531.fd), *Biotechnology letters*, 26(13), **2004**, 1037-1041.
- [57] J. I. Lim, H.-K. Park, *Fabrication of macroporous chitosan/poly(L-lactide) hybrid scaffolds by sodium acetate particulate-leaching method* (DOI: 10.1007/s10934-011-9485-6), *J. Porous. Mater.*, 19(3), **2012**, 383-387.
- [58] Y. Wan, Y. Fang, H. Wu, X. Cao, *Porous polylactide/chitosan scaffolds for tissue engineering* (DOI: 10.1002/jbm.a.31025), *Journal of biomedical materials research. Part A*, 80(4), **2007**, 776-789.
- [59] T. Prasad, E. A. Shabeena, D. Vinod, T. V. Kumary, P. R. Anil Kumar, *Characterization and in vitro evaluation of electrospun chitosan/polycaprolactone blend fibrous mat for skin tissue engineering* (DOI: 10.1007/s10856-014-5352-8), *Journal of materials science. Materials in medicine*, 26(1), **2015**, 5352.
- [60] A. Sarasam, S. V. Madihally, *Characterization of chitosan-polycaprolactone blends for tissue engineering applications* (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.01.071), *Biomaterials*, 26(27), **2005**, 5500-5508.
- [61] K. Oungbho, B. W. Müller, *Chitosan sponges as sustained release drug carriers* (DOI: 10.1016/S0378-5173(97)00201-9), *International Journal of Pharmaceutics*, 156(2), **1997**, 229-237.
- [62] S. A. Sell, P. S. Wolfe, K. Garg, J. M. McCool, I. A. Rodriguez, G. L. Bowlin, *The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering* (DOI: 10.3390/polym2040522), *Polymers*, 2(4), **2010**, 522-553.
- [63] K. Ye, D. Liu, H. Kuang, J. Cai, W. Chen, B. Sun, L. Xia, B. Fang, Y. Morsi, X. Mo, *Three-dimensional electrospun nanofibrous scaffolds displaying bone morphogenetic protein-2-derived peptides for the promotion of osteogenic differentiation of stem cells and bone regeneration* (DOI: 10.1016/j.jcis.2018.09.071), *Journal of colloid and interface science*, 534, **2019**, 625-636.
- [64] Q. Yao, J. G. L. Cosme, T. Xu, J. M. Miszuk, P. H. S. Picciani, H. Fong, H. Sun, *Three dimensional electrospun PCL/PLA blend nanofibrous scaffolds with significantly improved stem cells osteogenic*

- differentiation and cranial bone formation* (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.11.018), *Biomaterials*, 115, **2017**, 115-127.
- [65] T. Xu, Q. Yao, J. M. Miszuk, H. J. Sanyour, Z. Hong, H. Sun, H. Fong, *Tailoring weight ratio of PCL/PLA in electrospun three-dimensional nanofibrous scaffolds and the effect on osteogenic differentiation of stem cells* (DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.07.004), *Colloids Surf., B*, 171, **2018**, 31-39.
- [66] J. M. Miszuk, T. Xu, Q. Yao, F. Fang, J. D. Childs, Z. Hong, J. Tao, H. Fong, H. Sun, *Functionalization of PCL-3D Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Improved BMP2-Induced Bone Formation* (DOI: 10.1016/j.apmt.2017.12.004), *Appl. Mater. today*, 10, **2018**, 194-202.
- [67] G.-M. Kim, Le, Kim Huyen Trang, S. M. Giannitelli, Y. J. Lee, A. Rainer, M. Trombetta, *Electrospinning of PCL/PVP blends for tissue engineering scaffolds* (DOI: 10.1007/s10856-013-4893-6), *Journal of materials science. Materials in medicine*, 24(6), **2013**, 1425-1442.
- [68] J. E. Barralet, L. L. Wallace, A. J. Strain, *Tissue engineering of human biliary epithelial cells on polyglycolic acid/polycaprolactone scaffolds maintains long-term phenotypic stability* (DOI: 10.1089/107632703322495673), *Tissue engineering*, 9(5), **2003**, 1037-1045.
- [69] E. Boland, G. Wnek, D. Simpson, K. Pawlowski, G. Bowlin, *Tailoring tissue engineering scaffolds using electrostatic processing techniques: a study of Poly(glycolic acid) electrospinning* (DOI: 10.1081/MA-100108380), *J. of Macromolecular Sc., Part A*, 38(12), **2001**, 1231-1243.
- [70] S. G. Kumbar, S. P. Nukavarapu, R. James, L. S. Nair, C. T. Laurencin, *Electrospun poly(lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering* (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.06.028), *Biomaterials*, 29(30), **2008**, 4100-4107.
- [71] J. G. Lees, S. A. Lim, T. Croll, G. Williams, S. Lui, J. Cooper-White, L. R. McQuade, B. Mathiyalagan, B. E. Tuch, *Transplantation of 3D scaffolds seeded with human embryonic stem cells: biological features of surrogate tissue and teratoma-forming potential* (DOI: 10.2217/17460751.2.3.289), *Regenerative medicine*, 2(3), **2007**, 289-300.
- [72] Z. Pan, J. Ding, *Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine* (DOI: 10.1098/rsfs.2011.0123), *Interface focus*, 2(3), **2012**, 366-377.
- [73] I. Manavitehrani, A. Fathi, H. Badr, S. Daly, A. Negahi Shirazi, F. Dehghani, *Biomedical Applications of Biodegradable Polyesters* (DOI: 10.3390/polym8010020), *Polymers*, 8(1), **2016**.
- [74] M. W. King, B. S. Gupta, R. Guidoin (Hrsg.) *Woodhead publishing series in textiles, no. 113*, The Textile Institute; Woodhead Publishing, [Manchester, United Kingdom], Oxford.
- [75] M. Prakasam, J. Locs, K. Salma-Ancane, D. Loca, A. Largeteau, L. Berzina-Cimdina, *Biodegradable Materials and Metallic Implants-A Review* (DOI: 10.3390/jfb8040044), *Journal of functional biomaterials*, 8(4), **2017**.
- [76] H. Ye, K. Zhang, D. Kai, Z. Li, X. J. Loh, *Polyester elastomers for soft tissue engineering* (DOI: 10.1039/c8cs00161h), *Chemical Society reviews*, 47(12), **2018**, 4545-4580.
- [77] G. Narayanan, V. N. Vernekar, E. L. Kuyinu, C. T. Laurencin, *Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopaedic regenerative engineering* (DOI: 10.1016/j.addr.2016.04.015), *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, **2016**, 247-276.
- [78] B. K. Lee, Y. Yun, K. Park, *PLA micro- and nano-particles* (DOI: 10.1016/j.addr.2016.05.020), *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, **2016**, 176-191.
- [79] C. Ribeiro, V. Sencadas, C. M. Costa, J. L. Gómez Ribelles, S. Lanceros-Méndez, *Tailoring the morphology and crystallinity of poly(L-lactide acid) electrospun membranes* (DOI: 10.1088/1468-6996/12/1/015001), *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 12(1), **2011**, 15001.
- [80] J. R. Sarasua, A. L. Arraiza, P. Balerdi, I. Maiza, *Crystallinity and mechanical properties of optically pure polylactides and their blends* (DOI: 10.1002/pen.20331), *Polym. Eng. Sci.*, 45(5), **2005**, 745-753.

- [81] M. Mader, V. Jérôme, R. Freitag, S. Agarwal, A. Greiner, *Ultraporous, Compressible, Wetttable Polylactide/Polycaprolactone Sponges for Tissue Engineering* (DOI: 10.1021/acs.biomac.8b00434), *Biomacromolecules*, 19(5), **2018**, 1663-1673.
- [82] D. P. Bhattarai, L. E. Aguilar, C. H. Park, C. S. Kim, *A Review on Properties of Natural and Synthetic Based Electrospun Fibrous Materials for Bone Tissue Engineering* (DOI: 10.3390/membranes8030062), *Membranes*, 8(3), **2018**.
- [83] P. H. Weigel, E. Schmell, Y. C. Lee, S. Roseman, *Specific adhesion of rat hepatocytes to beta-galactosides linked to polyacrylamide gels*, *j. biol. chem.*, 253(2), **1978**, 330-333.
- [84] J. A. Oka, P. H. Weigel, *Binding and spreading of hepatocytes on synthetic galactose culture surfaces occur as distinct and separable threshold responses* (DOI: 10.1083/jcb.103.3.1055), *J. Cell Biol.*, 103(3), **1986**, 1055-1060.
- [85] Q. L. Loh, C. Choong, *Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size* (DOI: 10.1089/ten.teb.2012.0437), *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 19(6), **2013**, 485-502.
- [86] J. K. Muenzner, P. Kunze, P. Lindner, S. Polaschek, K. Menke, M. Eckstein, C. I. Geppert, P. Chanvorachote, T. Baeuerle, A. Hartmann et al., *Generation and characterization of hepatocellular carcinoma cell lines with enhanced cancer stem cell potential* (DOI: 10.1111/jcmm.13911), *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(12), **2018**, 6238-6248.
- [87] A. Eltom, G. Zhong, A. Muhammad, *Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review* (DOI: 10.1155/2019/3429527), *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019(4), **2019**, 1-13.
- [88] K. M. Kennedy, A. Bhaw-Luximon, D. Jhurry, *Cell-matrix mechanical interaction in electrospun polymeric scaffolds for tissue engineering: Implications for scaffold design and performance* (DOI: 10.1016/j.actbio.2016.12.034), *Acta Biomater.*, 50, **2017**, 41-55.
- [89] J. D. Humphrey, E. R. Dufresne, M. A. Schwartz, *Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis* (DOI: 10.1038/nrm3896), *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(12), **2014**, 802-812.
- [90] A. K. Nussler, A. Wang, P. Neuhaus, J. Fischer, J. Yuan, L. Liu, K. Zeilinger, J. Gerlach, P. J. Arnold, W. Albrecht, *The suitability of hepatocyte culture models to study various aspects of drug metabolism*, *ALTEX*, 18(2), **2001**, 91-101.
- [91] C. S. Cho, S. J. Seo, I. K. Park, S. H. Kim, T. H. Kim, T. Hoshiba, I. Harada, T. Akaike, *Galactose-carrying polymers as extracellular matrices for liver tissue engineering* (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.06.008), *Biomaterials*, 27(4), **2006**, 576-585.
- [92] A. S. Hayward, A. M. Eissa, D. J. Maltman, N. Sano, S. A. Przyborski, N. R. Cameron, *Galactose-functionalized polyHIPE scaffolds for use in routine three dimensional culture of mammalian hepatocytes* (DOI: 10.1021/bm401145x), *Biomacromolecules*, 14(12), **2013**, 4271-4277.
- [93] G. Mazza, W. Al-Akkad, A. Telese, L. Longato, L. Urbani, B. Robinson, A. Hall, K. Kong, L. Frenguelli, G. Marrone et al., *Rapid production of human liver scaffolds for functional tissue engineering by high shear stress oscillation-decellularization* (DOI: 10.1038/s41598-017-05134-1), *Sci. Rep.*, 7(1), **2017**, 5534.
- [94] G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi, *A biodegradable hybrid sponge nested with collagen microsponges* (DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(200008)51:2<273::AID-JBM16>3.0.CO;2-O), *J. Biomed. Mater. Res.*, 51(2), **2000**, 273-279.
- [95] W. Wang, B. Li, Y. Li, Y. Jiang, H. Ouyang, C. Gao, *In vivo restoration of full-thickness cartilage defects by poly(lactide-co-glycolide) sponges filled with fibrin gel, bone marrow mesenchymal stem cells and DNA complexes* (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.029), *Biomater.*, 31(23), **2010**, 5953-5965.

- [96] P. X. Ma, J. W. Choi, *Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network* (DOI: 10.1089/107632701300003269.), *Tissue engineering*, 7(1), **2001**, 23-33.
- [97] O. Erol, A. Pantula, W. Liu, D. H. Gracias, *Transformer Hydrogels: A Review* (DOI: 10.1002/admt.201900043), *Adv. Mater. Technol.*, 4(4), **2019**, 1900043.
- [98] S. Mantha, S. Pillai, P. Khayambashi, A. Upadhyay, Y. Zhang, O. Tao, H. M. Pham, S. D. Tran, *Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (DOI: 10.3390/ma12203323), *Materials*, 12(20), **2019**.
- [99] E. Prince, E. Kumacheva, *Design and applications of man-made biomimetic fibrillar hydrogels* (DOI: 10.1038/s41578-018-0077-9), *Nat Rev Mater*, 4(2), **2019**, 99-115.
- [100] S. V. Murphy, A. Atala, *3D bioprinting of tissues and organs* (DOI: 10.1038/nbt.2958), *Nature biotechnology*, 32(8), **2014**, 773-785.
- [101] N. A. Sears, D. R. Seshadri, P. S. Dhavalikar, E. Cosgriff-Hernandez, *A Review of Three-Dimensional Printing in Tissue Engineering* (DOI: 10.1089/ten.TEB.2015.0464), *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 22(4), **2016**, 298-310.
- [102] S. You, J. Li, W. Zhu, C. Yu, D. Mei, S. Chen, *Nanoscale 3D printing of hydrogels for cellular tissue engineering* (DOI: 10.1039/C8TB00301G), *J. Mater. Chem. B*, 6(15), **2018**, 2187-2197.
- [103] E. Goulart, L. C. de Caires-Junior, K. A. Telles-Silva, B. H. S. Araujo, S. A. Rocco, M. Sforca, I. L. de Sousa, G. S. Kobayashi, C. M. Musso, A. F. Assoni et al., *3D bioprinting of liver spheroids derived from human induced pluripotent stem cells sustain liver function and viability in vitro* (DOI: 10.1088/1758-5090/ab4a30), *Biofabrication*, 12(1), **2019**, 15010.
- [104] H.-W. Kang, S. J. Lee, I. K. Ko, C. Kengla, J. J. Yoo, A. Atala, *A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity* (DOI: 10.1038/nbt.3413), *Nature biotechnology*, 34(3), **2016**, 312-319.
- [105] S. Cai, H. Xu, Q. Jiang, Y. Yang, *Novel 3D electrospun scaffolds with fibers oriented randomly and evenly in three dimensions to closely mimic the unique architectures of extracellular matrices in soft tissues: fabrication and mechanism study* (DOI: 10.1021/la304414j), *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 29(7), **2013**, 2311-2318.
- [106] R. Grant, D. C. Hay, A. Callanan, *A Drug-Induced Hybrid Electrospun Poly-Capro-Lactone: Cell-Derived Extracellular Matrix Scaffold for Liver Tissue Engineering* (DOI: 10.1089/ten.tea.2016.0419), *Tissue engineering. Part A*, 23(13-14), **2017**, 650-662.
- [107] Q. P. Pham, U. Sharma, A. G. Mikos, *Electrospun poly(epsilon-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration* (DOI: 10.1021/bm060680j), *Biomacromolecules*, 7(10), **2006**, 2796-2805.
- [108] T. P. Burton, A. Callanan, *A Non-woven Path: Electrospun Poly(lactic acid) Scaffolds for Kidney Tissue Engineering* (DOI: 10.1007/s13770-017-0107-5), *Tissue engineering and regenerative medicine*, 15(3), **2018**, 301-310.
- [109] M. Wojasinski, K. Faliszewski, T. Ciach, "Electrospinning Production of PLLA Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering", zu finden unter: [https://www.researchgate.net/publication/237064775\\_Electrospinning\\_Production\\_of\\_PLLA\\_Fibrous\\_Scaffolds\\_for\\_Tissue\\_Engineering](https://www.researchgate.net/publication/237064775_Electrospinning_Production_of_PLLA_Fibrous_Scaffolds_for_Tissue_Engineering), (**03.09.15**).
- [110] I. Jun, H.-S. Han, J. R. Edwards, H. Jeon, *Electrospun Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering: Viewpoints on Architecture and Fabrication* (DOI: 10.3390/ijms19030745), *International journal of molecular sciences*, 19(3), **2018**.
- [111] Q. Zhang, H. Lu, N. Kawazoe, G. Chen, *Preparation of collagen scaffolds with controlled pore structures and improved mechanical property for cartilage tissue engineering* (DOI: 10.1177/0883911513494620), *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 28(5), **2013**, 426-438.
- [112] Z. Fereshteh in *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds. Materials, Technologies, and Applications* (Hrsg.: Woodhead Publishing Series in Biomaterials), Elsevier, **2018**.



- [113] F. Yang, R. Murugan, S. Ramakrishna, X. Wang, Y.-X. Ma, S. Wang, *Fabrication of nano-structured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering* (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.08.062), *Biomaterials*, 25(10), **2004**, 1891-1900.
- [114] Y. Meng, T. M. Young, P. Liu, C. I. Contescu, B. Huang, S. Wang, *Ultralight carbon aerogel from nanocellulose as a highly selective oil absorption material* (DOI: 10.1007/s10570-014-0519-5), *Cellulose*, 22(1), **2015**, 435-447.
- [115] S. M. Chin, C. V. Synatschke, S. Liu, R. J. Nap, N. A. Sather, Q. Wang, Z. Álvarez, A. N. Edelbrock, T. Fyrner, L. C. Palmer et al., *Covalent-supramolecular hybrid polymers as muscle-inspired anisotropic actuators* (DOI: 10.1038/s41467-018-04800-w), *Nature communications*, 9(1), **2018**, 2395.
- [116] A. Ovsianikov, M. Malinauskas, S. Schlie, B. Chichkov, S. Gittard, R. Narayan, M. Löbler, K. Sternberg, K.-P. Schmitz, A. Haverich, *Three-dimensional laser micro- and nano-structuring of acrylated poly(ethylene glycol) materials and evaluation of their cytotoxicity for tissue engineering applications* (DOI: 10.1016/j.actbio.2010.10.023), *Acta biomaterialia*, 7(3), **2011**, 967-974.
- [117] A. Salerno, M. Fernández-Gutiérrez, J. San Román del Barrio, C. Domingo, *Bio-safe fabrication of PLA scaffolds for bone tissue engineering by combining phase separation, porogen leaching and scCO<sub>2</sub> drying* (DOI: 10.1016/j.supflu.2014.10.029), *The Journal of Supercritical Fluids*, 97, **2015**, 238-246.
- [118] B. Raphael, T. Khalil, V. L. Workman, A. Smith, C. P. Brown, C. Streuli, A. Saiani, M. Domingos, *3D cell bioprinting of self-assembling peptide-based hydrogels* (DOI: 10.1016/j.matlet.2016.12.127), *Materials Letters*, 190, **2017**, 103-106.
- [119] L. C. Hsiao, A. Z. M. Badruddoza, L.-C. Cheng, P. S. Doyle, *3D printing of self-assembling thermoresponsive nanoemulsions into hierarchical mesostructured hydrogels* (DOI: 10.1039/c6sm02208a), *Soft Matter*, 13(5), **2017**, 921-929.
- [120] L. C. Hsiao, A. Z. M. Badruddoza, L.-C. Cheng, P. S. Doyle, *3D printing of self-assembling thermoresponsive nanoemulsions into hierarchical mesostructured hydrogels* (DOI: 10.1039/c6sm02208a), *Soft Matter*, 13(5), **2017**, 921-929.
- [121] A. Kosik-Kozioł, M. Costantini, T. Bolek, K. Szöke, A. Barbeta, J. Brinchmann, W. Świążkowski, *PLA short sub-micron fiber reinforcement of 3D bioprinted alginate constructs for cartilage regeneration* (DOI: 10.1088/1758-5090/aa90d7), *Biofabrication*, 9(4), **2017**, 44105.
- [122] T. Xu, J. M. Miszuk, Y. Zhao, H. Sun, H. Fong, *Electrospun polycaprolactone 3D nanofibrous scaffold with interconnected and hierarchically structured pores for bone tissue engineering* (DOI: 10.1002/adhm.201500345), *Adv. Healthcare Mater.*, 4(15), **2015**, 2238-2246.
- [123] T. Xu, Z. Liang, B. Ding, Q. Feng, H. Fong, *Polymer blend nanofibers containing polycaprolactone as biocompatible and biodegradable binding agent to fabricate electrospun three-dimensional scaffolds/structures* (DOI: 10.1016/j.polymer.2018.07.074), *Polymer*, 151, **2018**, 299-306.
- [124] F. Deuber, S. Mousavi, L. Federer, C. Adlhart, *Amphiphilic Nanofiber-Based Aerogels for Selective Liquid Absorption from Electrospun Biopolymers* (DOI: 10.1002/admi.201700065), *Adv. Mater. Interfaces*, 4(12), **2017**, 1700065.
- [125] S. Jiang, B. Uch, S. Agarwal, A. Greiner, *Ultralight, Thermally Insulating, Compressible Polyimide Fiber Assembled Sponges* (DOI: 10.1021/acsami.7b11045), *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 9(37), **2017**, 32308-32315.
- [126] X. Liao, P. Hu, S. Agarwal, A. Greiner, *Impact of the Fiber Length Distribution on Porous Sponges Originating from Short Electrospun Fibers Made from Polymer Yarn* (DOI: 10.1002/mame.201900629), *Macromol. Mater. Eng.*, 2019, **2020**, 1900629.
- [127] F. Deuber, S. Mousavi, M. Hofer, C. Adlhart, *Tailoring Pore Structure of Ultralight Electrospun Sponges by Solid Templating* (DOI: 10.1002/slct.201601084), *ChemistrySelect*, 1(18), **2016**, 5595-5598.

- [128] T. Xu, Y. Ding, Z. Wang, Y. Zhao, W. Wu, H. Fong, Z. Zhu, *Three-dimensional and ultralight sponges with tunable conductivity assembled from electrospun nanofibers for a highly sensitive tactile pressure sensor* (DOI: 10.1039/c7tc03456c), *J. Mater. Chem. C*, 5(39), **2017**, 10288-10294.
- [129] Y. Si, X. Wang, L. Dou, J. Yu, B. Ding, *Ultralight and fire-resistant ceramic nanofibrous aerogels with temperature-invariant superelasticity* (DOI: 10.1126/sciadv.aas8925), *Sci. Adv.*, 4(4), **2018**, eaas8925.
- [130] H. Yu, X. Chen, J. Cai, D. Ye, Y. Wu, L. Fan, P. Liu, *Novel porous three-dimensional nanofibrous scaffolds for accelerating wound healing* (DOI: 10.1016/j.cej.2019.03.091), *Chemical Engineering Journal*, 369, **2019**, 253-262.
- [131] G. Duan, A. R. Bagheri, S. Jiang, J. Golenser, S. Agarwal, A. Greiner, *Exploration of Macroporous Polymeric Sponges As Drug Carriers* (DOI: 10.1021/acs.biomac.7b00852), *Biomacromolecules*, 18(10), **2017**, 3215-3221.
- [132] G. Duan, S. Jiang, T. Moss, S. Agarwal, A. Greiner, *Ultralight open cell polymer sponges with advanced properties by PPX CVD coating* (DOI: 10.1039/C6PY00339G), *Polym. Chem.*, 7(15), **2016**, 2759-2764.
- [133] S. Jiang, G. Duan, U. Kuhn, M. Morl, V. Altstadt, A. L. Yarin, A. Greiner, *Spongy Gels by a Top-Down Approach from Polymer Fibrous Sponges* (DOI: 10.1002/anie.201611787), *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56(12), **2017**, 3285-3288.
- [134] P. Simon, S. Mang, A. Hasenhindl, W. Gronski, A. Greiner, *Poly(p-xylylene) and Its Derivatives by Chemical Vapor Deposition: Synthesis, Mechanism, and Structure*, *Macromolecules*, 31(25), **1998**, 8775-8780.
- [135] Y. Si, Q. Fu, X. Wang, J. Zhu, J. Yu, G. Sun, B. Ding, *Superelastic and superhydrophobic nanofiber-assembled cellular aerogels for effective separation of oil/water emulsions* (DOI: 10.1021/nn506633b), *ACS nano*, 9(4), **2015**, 3791-3799.
- [136] S. Jiang, S. Agarwal, A. Greiner, *Low-Density Open Cellular Sponges as Functional Materials* (DOI: 10.1002/anie.201700684), *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56(49), **2017**, 15520-15538.
- [137] G. Duan, M. Koehn-Serrano, A. Greiner, *Highly Efficient Reusable Sponge-Type Catalyst Carriers Based on Short Electrospun Fibers* (DOI: 10.1002/marc.201600511), *Macromol. Rapid Commun.*, 38(3), **2017**.
- [138] A. R. Bagheri, S. Agarwal, J. Golenser, A. Greiner, *Unlocking Nanocarriers for the Programmed Release of Antimalarial Drugs* (DOI: 10.1002/gch2.201600011), *Global Challenges*, 1(2), **2017**, 1600011.
- [139] J.-W. Kim, K. Taki, S. Nagamine, M. Ohshima, *Preparation of poly(L-lactic acid) honeycomb monolith structure by unidirectional freezing and freeze-drying* (DOI: 10.1016/j.ces.2008.04.036), *Chem. Eng. Sci.*, 63(15), **2008**, 3858-3863.
- [140] V. Speranza, A. de Meo, R. Pantani, *Thermal and hydrolytic degradation kinetics of PLA in the molten state* (DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2013.12.031), *Polymer Degradation and Stability*, 100, **2014**, 37-41.
- [141] Z. Dai, J. Ronholm, Y. Tian, B. Sethi, X. Cao, *Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications* (DOI: 10.1177/2041731416648810), *Journal of tissue engineering*, 7, **2016**, 2041731416648810.
- [142] T. A. M. Valente, D. M. Silva, P. S. Gomes, M. H. Fernandes, J. D. Santos, V. Sencadas, *Effect of Sterilization Methods on Electrospun Poly(lactic acid) (PLA) Fiber Alignment for Biomedical Applications* (DOI: 10.1021/acsami.5b10869), *ACS applied materials & interfaces*, 8(5), **2016**, 3241-3249.
- [143] J. Zhu, R. E. Marchant, *Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds* (DOI: 10.1586/erd.11.27), *Expert review of medical devices*, 8(5), **2011**, 607-626.

- [144] A. Gregor, E. Filová, M. Novák, J. Kronek, H. Chlup, M. Buzgo, V. Blahnová, V. Lukášová, M. Bartoš, A. Nečas et al., *Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer* (DOI: 10.1186/s13036-017-0074-3), *Journal of biological engineering*, 11, **2017**, 31.
- [145] T. M. Robinson, D. W. Huttmacher, P. D. Dalton, *The Next Frontier in Melt Electrospinning: Taming the Jet* (DOI: 10.1002/adfm.201904664), *Adv. Funct. Mater.*, 29(44), **2019**, 1904664.
- [146] E. Castro-Aguirre, F. Iñiguez-Franco, H. Samsudin, X. Fang, R. Auras, *Poly(lactic acid)-Mass production, processing, industrial applications, and end of life* (DOI: 10.1016/j.addr.2016.03.010), *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, **2016**, 333-366.
- [147] J. Zeng, H. Haoqing, A. Schaper, J. H. Wendorff, A. Greiner, *Poly-L-lactide nanofibers by electrospinning – Influence of solution viscosity and electrical conductivity on fiber diameter and fiber morphology* (DOI: 10.1515/epoly.2003.3.1.102), *e-Polymers*, 3(1), **2003**.
- [148] W. Zhang, M. Liu, Y. Liu, R. Liu, F. Wei, R. Xiao, H. Liu, *3D porous poly(l-lactic acid) foams composed of nanofibers, nanofibrous microspheres and microspheres and their application in oil–water separation* (DOI: 10.1039/C5TA02759D), *J. Mater. Chem. A*, 3(26), **2015**, 14054-14062.
- [149] T. Standau, C. Zhao, S. Murillo Castellón, C. Bonten, V. Altstädt, *Chemical Modification and Foam Processing of Polylactide (PLA)* (DOI: 10.3390/polym11020306), *Polymers*, 11(2), **2019**.
- [150] S. Li, S. McCarthy, *Influence of Crystallinity and Stereochemistry on the Enzymatic Degradation of Poly(lactide)s* (DOI: 10.1021/ma990117b), *Macromolecules*, 32(13), **1999**, 4454-4456.
- [151] M. S. Lopes, A. L. Jardini, R. M. Filho, *Poly (Lactic Acid) Production for Tissue Engineering Applications* (DOI: 10.1016/j.proeng.2012.07.534), *Procedia Engineering*, 42, **2012**, 1402-1413.
- [152] R. Auras, L.-T. Lim, S. E. M. Selke, H. Tsuji, *Poly(Lactic Acid)*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, **2010**.
- [153] A. Greiner, J. H. Wendorff, *Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers* (DOI: 10.1002/anie.200604646), *Angew. Chem., Int. Ed.*, 46(30), **2007**, 5670-5703.
- [154] L. W. Liu, W. M. Kang, B. W. Cheng, Y. Liu, *PLA Nanofibers Electrospun from System of Low Toxicity Solvent* (DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.221.657), *AMR*, 221, **2011**, 657-661.
- [155] R. Casasola, N. L. Thomas, A. Trybala, S. Georgiadou, *Electrospun poly lactic acid (PLA) fibres: Effect of different solvent systems on fibre morphology and diameter* (DOI: 10.1016/j.polymer.2014.06.032), *Polymer*, 55(18), **2014**, 4728-4737.
- [156] Y. Li, C. T. Lim, M. Kotaki, *Study on structural and mechanical properties of porous PLA nanofibers electrospun by channel-based electrospinning system* (DOI: 10.1016/j.polymer.2014.10.073), *Polymer*, 56, **2015**, 572-580.
- [157] A. C. Areias, C. Ribeiro, V. Sencadas, N. Garcia-Giralt, A. Diez-Perez, J. L. Gómez Ribelles, S. Lanceros-Méndez, *Influence of crystallinity and fiber orientation on hydrophobicity and biological response of poly(l-lactide) electrospun mats* (DOI: 10.1039/c2sm25557j), *Soft Matter*, 8(21), **2012**, 5818.
- [158] Y. Ner, J. A. Stuart, G. Whited, G. A. Sotzing, *Electrospinning nanoribbons of a bioengineered silk-elastin-like protein (SELP) from water* (DOI: 10.1016/j.polymer.2009.09.017), *Polymer*, 50(24), **2009**, 5828-5836.
- [159] J. Xue, T. Wu, Y. Dai, Y. Xia, *Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications* (DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00593), *Chemical reviews*, 119(8), **2019**, 5298-5415.
- [160] X. Chen, Y. Xu, W. Zhang, K. Xu, Q. Ke, X. Jin, C. Huang, *Online fabrication of ultralight, three-dimensional, and structurally stable ultrafine fibre assemblies with a double-porous feature* (DOI: 10.1039/c9nr01477b), *Nanoscale*, 11(17), **2019**, 8185-8195.
- [161] P. Bansal, K. Bubel, S. Agarwal, A. Greiner, *Water-stable all-biodegradable microparticles in nanofibers by electrospinning of aqueous dispersions for biotechnical plant protection* (DOI: 10.1021/bm2014679), *Biomacromolecules*, 13(2), **2012**, 439-444.

- [162] C. Zhang, F. Feng, H. Zhang, *Emulsion electrospinning: Fundamentals, food applications and prospects* (DOI: 10.1016/j.tifs.2018.08.005), Trends in Food Science & Technology, 80, **2018**, 175-186.
- [163] D. Han, A. J. Steckl, *Coaxial Electrospinning Formation of Complex Polymer Fibers and their Applications* (DOI: 10.1002/cplu.201900281), ChemPlusChem, 84(10), **2019**, 1453-1497.
- [164] S. K. Smoukov, T. Tian, N. Vitichuli, S. Gangwal, P. Geisen, M. Wright, E. Shim, M. Marquez, J. Fowler, O. D. Velev, *Scalable liquid shear-driven fabrication of polymer nanofibers* (DOI: 10.1002/adma.201404616), Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.), 27(16), **2015**, 2642-2647.
- [165] I. W. Fathona, A. Yabuki, *Short electrospun composite nanofibers: Effects of nanoparticle concentration and surface charge on fiber length* (DOI: 10.1016/j.cap.2014.03.015), Current Applied Physics, 14(5), **2014**, 761-767.
- [166] I. W. Fathona, A. Yabuki, *A simple one-step fabrication of short polymer nanofibers via electrospinning* (DOI: 10.1007/s10853-014-8065-y), J Mater Sci, 49(9), **2014**, 3519-3528.
- [167] A. Morel, S. Domaschke, V. Urundolil Kumaran, D. Alexeev, A. Sadeghpour, S. N. Ramakrishna, S. J. Ferguson, R. M. Rossi, E. Mazza, A. E. Ehret et al., *Correlating diameter, mechanical and structural properties of poly(l-lactide) fibres from needleless electrospinning* (DOI: 10.1016/j.actbio.2018.09.055), Acta biomaterialia, 81, **2018**, 169-183.
- [168] Y. Yin, J. Xiong, *Effect of the Distribution of Fiber Orientation on the Mechanical Properties of Silk Fibroin/Polycaprolactone Nanofiber Mats* (DOI: 10.1177/155892501701200303), Journal of Engineered Fibers and Fabrics, 12(3), **2017**, 155892501701200.
- [169] A. Jiménez, M. Peltzer, R. Ruseckaite (Hrsg.) *RSC polymer chemistry series, Vol. 12*, Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- [170] L. T. Sin, B. S. Tveen in *Poly(lactic Acid)*, Elsevier, **2019**.
- [171] P. Roach, N. J. Shirtcliffe, M. I. Newton, *Progress in superhydrophobic surface development* (DOI: 10.1039/B712575P), Soft Matter, 4(2), **2008**, 224-240.
- [172] K. R. V. Subramanian, T. N. Rao, A. Balakrishnan (Hrsg.), *Nanofluids and their engineering applications*, **2019**, CRC Press, Boca Raton, FL.
- [173] O. Du Roure, A. Lindner, E. N. Nazockdast, M. J. Shelley, *Dynamics of Flexible Fibers in Viscous Flows and Fluids* (DOI: 10.1146/annurev-fluid-122316-045153), Annu. Rev. Fluid Mech., 51(1), **2019**, 539-572.
- [174] S. H. Hyun, T. Y. Kim, G. S. Kim, H. H. Park, *Synthesis of low-porous silica films via freeze drying* (DOI: 10.1023/A:1006775213914), Journal of Materials Science Letters, 19(20), **2000**, 1863-1866.
- [175] S. Jiang, N. Helfricht, G. Papastavrou, A. Greiner, S. Agarwal, *Low-Density Self-Assembled Poly(N-Isopropyl Acrylamide) Sponges with Ultrahigh and Extremely Fast Water Uptake and Release* (DOI: 10.1002/marc.201700838), Macromolecular rapid communications, 39(8), **2018**, e1700838.
- [176] J. Zhu, S. Jiang, H. Hou, S. Agarwal, A. Greiner, *Low Density, Thermally Stable, and Intrinsic Flame Retardant Poly(bis(benzimidazo)Benzophenanthroline-dione) Sponge* (DOI: 10.1002/mame.201700615), 303(4), **2018**, 1700615.
- [177] W. Chen, H. Yu, Q. Li, Y. Liu, J. Li, *Ultralight and highly flexible aerogels with long cellulose I nanofibers* (DOI: 10.1039/c1sm06179h), Soft Matter, 7(21), **2011**, 10360.
- [178] L. Hu, C.-A. Wang, Y. Huang, C. Sun, S. Lu, Z. Hu, *Control of pore channel size during freeze casting of porous YSZ ceramics with unidirectionally aligned channels using different freezing temperatures* (DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2010.07.032), Journal of the European Ceramic Society, 30(16), **2010**, 3389-3396.
- [179] R. Battino, T. R. Rettich, T. Tominaga, *The Solubility of Nitrogen and Air in Liquids* (DOI: 10.1063/1.555713), Journal of Physical and Chemical Reference Data, 13(2), **1984**, 563-600.
- [180] F. Yang, *Progress in applied mathematical modeling*, Nova Science Publishers, New York, **2008**.



- [181] N. Hamdami, J.-Y. Monteau, A. Le Bail, *Simulation of coupled heat and mass transfer during freezing of a porous humid matrix* (DOI: 10.1016/j.ijrefrig.2004.03.016), *International Journal of Refrigeration*, 27(6), **2004**, 595-603.
- [182] P. G. de Gennes, *Reptation of a Polymer Chain in the Presence of Fixed Obstacles* (DOI: 10.1063/1.1675789), *The Journal of Chemical Physics*, 55(2), **1971**, 572-579.
- [183] M. Doi, S. F. Edwards, *Dynamics of concentrated polymer systems. Part 1.—Brownian motion in the equilibrium state* (DOI: 10.1039/F29787401789), *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, 74(0), **1978**, 1789-1801.
- [184] S. R. S. Ting, A. M. Gregory, M. H. Stenzel, *Polygalactose containing nanocages: the RAFT process for the synthesis of hollow sugar balls* (DOI: 10.1021/bm801123b), *Biomacromolecules*, 10(2), **2009**, 342-352.
- [185] R. Yang, F. Meng, S. Ma, F. Huang, H. Liu, Z. Zhong, *Galactose-decorated cross-linked biodegradable poly(ethylene glycol)-b-poly( $\epsilon$ -caprolactone) block copolymer micelles for enhanced hepatoma-targeting delivery of paclitaxel* (DOI: 10.1021/bm2006856), *Biomacromolecules*, 12(8), **2011**, 3047-3055.
- [186] Hanumantharao, Rao, *Multi-Functional Electrospun Nanofibers from Polymer Blends for Scaffold Tissue Engineering* (DOI: 10.3390/fib7070066), *Fibers*, 7(7), **2019**, 66.
- [187] Y. Wan, C. Tu, J. Yang, J. Bei, S. Wang, *Influences of ammonia plasma treatment on modifying depth and degradation of poly(L-lactide) scaffolds* (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.12.007), *Biomaterials*, 27(13), **2006**, 2699-2704.
- [188] R. Morent, N. de Geyter, T. Desmet, P. Dubruel, C. Leys, *Plasma Surface Modification of Biodegradable Polymers* (DOI: 10.1002/ppap.201000153), *Plasma Processes Polym.*, 8(3), **2011**, 171-190.
- [189] T. Wang, Z.-Q. Feng, M. K. Leach, J. Wu, Q. Jiang, *Nanoporous fibers of type-I collagen coated poly(L-lactic acid) for enhancing primary hepatocyte growth and function* (DOI: 10.1039/c2tb00195k), *J. Mater. Chem. B*, 1(3), **2013**, 339-346.
- [190] J.P. Chen, S.F. Lee and I.P. Chiang, "Plasma-Treated and Collagen-Coated PLLA Nanofiber Membrane for Cartilage Tissue Engineering", zu finden unter: <http://www.nsti.org/procs/Nanotech2005v1/2/W905.05>.
- [191] M. Asadian, K. V. Chan, M. Norouzi, S. Grande, P. Cools, R. Morent, N. de Geyter, *Fabrication and Plasma Modification of Nanofibrous Tissue Engineering Scaffolds* (DOI: 10.3390/nano10010119), *Nanomaterials* (Basel, Switzerland), 10(1), **2020**.
- [192] A. Soto-Gutierrez, I. J. Fox, N. Navarro-Alvarez, *Methods in bioengineering. Cell transplantation*, Artech House, Boston, **2011**.
- [193] W. E. Pricer, G. Ashwell, *The Binding of Desialylated Glycoproteins by Plasma Membranes of Rat Liver*, *J. Biol. Chem.*, 247(14), **1972**, 4633-4640.
- [194] H.-W. Chien, W.-B. Tsai, *Fabrication of tunable micropatterned substrates for cell patterning via microcontact printing of polydopamine with poly(ethylene imine)-grafted copolymers* (DOI: 10.1016/j.actbio.2012.06.033), *Acta Biomater.*, 8(10), **2012**, 3678-3686.
- [195] R. Kassab, *Molecular recognition by Kluyveromyces of amphotericin B-loaded, galactose-tagged, poly(lactic acid) microspheres* (DOI: 10.1016/S0968-0896(02)00028-7), *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10(6), **2002**, 1767-1775.
- [196] T. G. Park, *Perfusion culture of hepatocytes within galactose-derivatized biodegradable poly(lactide-co-glycolide) scaffolds prepared by gas foaming of effervescent salts* (DOI: 10.1002/jbm.1224), *J. Biomed. Mater. Res.*, 59(1), **2002**, 127-135.
- [197] E. F. Craparo, C. Sardo, R. Serio, M. G. Zizzo, M. L. Bondi, G. Giammona, G. Cavallaro, *Galactosylated polymeric carriers for liver targeting of sorafenib* (DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.02.047), *International Journal of Pharmaceutics*, 466(1-2), **2014**, 172-180.

- [198] F. Renò, V. Traina, S. Gatti, E. Battistella, M. Cannas, *Functionalization of a poly(D,L)lactic acid surface with galactose to improve human keratinocyte behavior for artificial epidermis* (DOI: 10.1002/bit.21744), *Biotechnology and bioengineering*, 100(1), **2008**, 195-202.
- [199] J. J. Yoon, Y. S. Nam, J. H. Kim, T. G. Park, *Surface immobilization of galactose onto aliphatic biodegradable polymers for hepatocyte culture* (DOI: 10.1002/bit.10239), *Biotechnology and bioengineering*, 78(1), **2002**, 1-10.
- [200] D.-Q. Wu, B. Lu, C. Chang, C.-S. Chen, T. Wang, Y.-Y. Zhang, S.-X. Cheng, X.-J. Jiang, X.-Z. Zhang, R.-X. Zhuo, *Galactosylated fluorescent labeled micelles as a liver targeting drug carrier* (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.11.027), *Biomaterials*, 30(7), **2009**, 1363-1371.
- [201] V. Ladmiral, M. Semsarilar, I. Canton, S. P. Armes, *Polymerization-induced self-assembly of galactose-functionalized biocompatible diblock copolymers for intracellular delivery* (DOI: 10.1021/ja407033x), *Journal of the American Chemical Society*, 135(36), **2013**, 13574-13581.
- [202] S. Quan, Y. Wang, A. Zhou, P. Kumar, R. Narain, *Galactose-based Thermosensitive Nanogels for Targeted Drug Delivery of Iodoazomycin Arabinofuranoside (IAZA) for Theranostic Management of Hypoxic Hepatocellular Carcinoma* (DOI: 10.1021/acs.biomac.5b00576), *Biomacromolecules*, 16(7), **2015**, 1978-1986.
- [203] R. Selvakumar, S. N. M. Mohaideen, S. Aravindh, C. Sabarinath, M. Ananthasubramanian, *Effect of biotin and galactose functionalized gelatin nanofiber membrane on HEP-2 cell attachment and cytotoxicity* (DOI: 10.1007/s00232-013-9608-x), *The Journal of membrane biology*, 247(1), **2014**, 35-43.
- [204] J. Gopinathan, S. Mano, V. Elakkiya, M. M. Pillai, K. S. Sahanand, B. K. D. Rai, R. Selvakumar, A. Bhattacharyya, *Biomolecule incorporated poly-ε-caprolactone nanofibrous scaffolds for enhanced human meniscal cell attachment and proliferation* (DOI: 10.1039/C5RA14315B), *RSC Adv*, 5(90), **2015**, 73552-73561.
- [205] B. Nugraha, X. Hong, X. Mo, L. Tan, W. Zhang, P.-M. Chan, C. H. Kang, Y. Wang, L. T. Beng, W. Sun et al., *Galactosylated cellulosic sponge for multi-well drug safety testing* (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.087), *Biomaterials*, 32(29), **2011**, 6982-6994.
- [206] B. Wang, Q. Hu, T. Wan, F. Yang, Le Cui, S. Hu, B. Gong, M. Li, Q. C. Zheng, *Porous Lactose-Modified Chitosan Scaffold for Liver Tissue Engineering: Influence of Galactose Moieties on Cell Attachment and Mechanical Stability* (DOI: 10.1155/2016/2862738), *International Journal of Polymer Science*, 2016, **2016**, 1-8.
- [207] V. Dhaware, D. Díaz Díaz, S. Sen Gupta, *Biopolymer/Glycopolyptide-Blended Scaffolds: Synthesis, Characterization and Cellular Interactions* (DOI: 10.1002/asia.201901227), *Chemistry, an Asian journal*, 14(24), **2019**, 4837-4846.
- [208] Y. Qiu, Z. Mao, Y. Zhao, J. Zhang, Q. Guo, Z. Gou, C. Gao, *Polycaprolactone scaffold modified with galactosylated chitosan for hepatocyte culture* (DOI: 10.1007/s13233-012-0056-8), *Macromol. Res.*, 20(3), **2012**, 283-291.
- [209] K.-N. Chua, W.-S. Lim, P. Zhang, H. Lu, J. Wen, S. Ramakrishna, K. W. Leong, H.-Q. Mao, *Stable immobilization of rat hepatocyte spheroids on galactosylated nanofiber scaffold* (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.040), *Biomaterials*, 26(15), **2005**, 2537-2547.
- [210] F. L. Maclean, C. L. Lau, S. Ozergun, R. D. O'Shea, C. Cederfur, J. Wang, K. E. Healy, F. R. Walker, D. Tomas, M. K. Horne et al., *Galactose-functionalised PCL nanofibre scaffolds to attenuate inflammatory action of astrocytes in vitro and in vivo* (DOI: 10.1039/C7TB00651A), *J. Mater. Chem. B*, 5(22), **2017**, 4073-4083.
- [211] J. C. Rosa, P. S. de Oliveira, R. Garratt, L. Beltramini, K. Resing, M. C. Roque-Barreira, L. J. Greene, *KM+, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the beta-prism fold* (DOI: 10.1110/ps.8.1.13), *Protein science : a publication of the Protein Society*, 8(1), **1999**, 13-24.

- [212] Q. Wei, R. Haag, *Universal polymer coatings and their representative biomedical applications* (DOI: 10.1039/C5MH00089K), *Mater. Horiz.*, 2(6), **2015**, 567-577.
- [213] R. Nisticò, *Block copolymers for designing nanostructured porous coatings* (DOI: 10.3762/bjnano.9.218), *Beilstein journal of nanotechnology*, 9, **2018**, 2332-2344.
- [214] M. Mader, M. Helm, M. Lu, M. H. Stenzel, V. Jérôme, R. Freitag, S. Agarwal, A. Greiner, *Perfusion Cultivation of Artificial Liver Extracellular Matrix in Fibrous Polymer Sponges Biomimicking Scaffolds for Tissue Engineering* (DOI: 10.1021/acs.biomac.0c00900), *Biomacromolecules*, 21(10), **2020**, 4094-4104.
- [215] J. Zech, M. Mader, D. Gündel, H. Metz, A. Odparlik, S. Agarwal, K. Mäder, A. Greiner, *Noninvasive characterization (EPR,  $\mu$ CT, NMR) of 3D PLA electrospun fiber sponges for controlled drug delivery* (DOI: 10.1016/j.ijpx.2020.100055), *International journal of pharmaceutics: X*, 2, **2020**, 100055.
- [216] T. Moss, I. E. Paulus, D. Raps, V. Altstädt, A. Greiner, *Ultralight sponges of poly(para-xylylene) by template-assisted chemical vapour deposition* (DOI: 10.1515/epoly-2016-0329), *e-Polymers*, 17(4), **2017**, 1138.
- [217] H. Schoof, J. Apel, I. Heschel, G. Rau, *Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges* (DOI: 10.1002/jbm.1028), *J. Biomed. Mater. Res.*, 58(4), **2001**, 352-357.
- [218] H. Zhang, I. Hussain, M. Brust, M. F. Butler, S. P. Rannard, A. I. Cooper, *Aligned two- and three-dimensional structures by directional freezing of polymers and nanoparticles* (DOI: 10.1038/nmat1487), *Nature materials*, 4(10), **2005**, 787-793.
- [219] J. Wu, Q. Zhao, J. Sun, Q. Zhou, *Preparation of poly(ethylene glycol) aligned porous cryogels using a unidirectional freezing technique* (DOI: 10.1039/C2SM07411G), *Soft Matter*, 8(13), **2012**, 3620.
- [220] K. Uto, T. Muroya, M. Okamoto, H. Tanaka, T. Murase, M. Ebara, T. Aoyagi, *Design of super-elastic biodegradable scaffolds with longitudinally oriented microchannels and optimization of the channel size for Schwann cell migration* (DOI: 10.1088/1468-6996/13/6/064207), *Science and Technology of Advanced Materials*, 13(6), **2016**, 64207.
- [221] B. L.-P. Lee, H. Jeon, A. Wang, Z. Yan, J. Yu, C. Grigoropoulos, S. Li, *Femtosecond laser ablation enhances cell infiltration into three-dimensional electrospun scaffolds* (DOI: 10.1016/j.actbio.2012.04.023), *Acta biomaterialia*, 8(7), **2012**, 2648-2658.
- [222] S. Thongjamroon, A. Pattanaporkratana in *Int. Conf. Photonics Solutions*.

## 6 Ausblick

Im Rahmen der in dieser Arbeit zusammengefassten Schritte zur Herstellung und Modifizierung von abbaubaren Polymeren und daraus hergestellten Polymerfaser-Schwämmen ergeben sich unzählige potenziell vielversprechende Weiterentwicklungsmöglichkeiten und Fragestellungen ...

### **... mechanisch-physikalischer Natur.**

PFS-Belastbarkeit in Abhängigkeit zur PLA Materialzusammensetzung (Taktizität) aber vor allem Faserdicke ( $> 1 \mu\text{m}$ ) sollte untersucht werden. Beide Faktoren sind äußerst vielversprechend, da sie eine Steigerung der PFS-Integrität bei gleichbleibender Porosität und Poreninterkonnektivität ermöglichen sollten. Auf Grund des antagonistischen Verhaltens zwischen PFS-Integrität und Faserdicke nach thermischer Vernetzung (Ergebnisse nicht gezeigt) ist dabei, bei gleichbleibender Vernetzung, auch eine Desintegrationsanalyse sinnvoll, um die Desorption von Einzelfasern aus dem PFS-Verbund untersuchen und optimieren zu können. Faser-Desorption ist eventuell durch chemische Vernetzung von PLA-PFS denkbar, eine solche muss jedoch wiederum gleichlaufend zu Material-Abbaubarkeitsstudien erfolgen.

### **... biozellulärer Natur.**

Poren- und Besiedlungskontrolle: Die gleichmäßige Steuerung der Porosität von PFS (Poren-Größe, -Verteilung, -Interkonnektivität, -Richtung), ihrer reproduzierbaren Herstellung und der davon ausgehenden Einflüsse auf die Zellbesiedlung und eine Langzeit-Kultur ist von hohem Interesse in der Gewebezüchtung. Die bisherigen und zukünftigen PFS-Systeme sollten dabei auch für alternative Zelltypen (Hep-3B, Hep-G2, usw.) und Zellsysteme (Leber, Niere, usw.) untersucht werden.

Zellversorgung: Neben der weiteren Entwicklung und Optimierung der PFS Zellularisierung mit Hilfe von 3D Perfusionsbioreaktoren sind auch die Fragestellungen und Möglichkeiten einer der Leberzell-Kultivierung vorgeschalteten oder parallelen künstlicher Gefäßbildung (Vaskularisierung) von hohem Interesse für den weiteren Verlauf der PFS Entwicklung.<sup>[3]</sup>

### **... medizinischer Natur.**

PLA-PFS besitzen, basierend auf den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen ein hohes Potential zur Entwicklung in eine ausgereifte *in-vitro* Zelltest-Plattform oder für erste *in-vivo* Applikationen. Die Verwendung von medizinisch zugelassenem PLA ist dabei jedoch auch von Interesse, ebenso wie die Weiterentwicklung bisheriger Techniken zur Steuerung der *in-vitro* Zellbesiedlung in Bioreaktoren, da hierbei der Einsatz und die Freisetzung von Medikamenten oder Wachstumsfaktoren von hohem Interesse ist.

### **... materialchemischer Natur.**



---

Die PLA basierten wie auch PLA-Gal galaktosylierten PFS sollten in weiterführenden Arbeiten in ihrer Materialzusammensetzung variiert werden. Es ist anzunehmen, dass dies Möglichkeiten zur Steuerung der Zell-Substrat Haftung und gezielteren Anpassung der Zellbesiedlungskontrolle liefern könnte. Hierzu gehört auch eine genauere Bestimmung der Interaktion von Zellen und Material in Bezug auf Haftung (z.B. in Abhängigkeit zum PLGA-PAGP Copolymer oder Galaktose-Blocklängen-Anteil) und der Einfluss auf den Zellbesiedlungsprozess. Die Zugabe von Additiven (Kap. 1.2: Wachstumsfaktoren, Enzyme, Medikamente usw.) und die weitere Entwicklung der PFS-Beschichtung mit PLA-*b*-PAGP Systemen ist ebenso von Interesse (alternativ: Kollagen, Hyaluronsäure, Fibroin), um die Vielfalt und Flexibilität der abbaubaren PFS für weitere ECM abbildende (biomimetische) Ansätze zu erweitern.

### **... rheologischer Natur.**

Die Faserverteilung vor Gefrieren bzw. Gefriertrocknen (Kap. 1.6.5.1) ist ein entscheidender Faktor für die Qualität der hergestellten PFS. Die Reproduzierbarkeit und Glaubwürdigkeit der damit durchgeführten Experimente werden durch sie maßgeblich beeinflusst (Kap. 1.6.5.4). Die grundlegenden Fragestellungen zur Homogenisierung konzentrierter Faserdispersionen, im Hinblick auf ihre rheologischen Zusammenhänge, sollten daher in weiterführenden Arbeiten genauer untersucht werden.

### **... zur Material- und PFS-Abbaubarkeit**

Die Wahl des PFS-Basismaterials ist neben der bisherigen, rein *in-vitro* basierten Zellkulturanalyse (M1, M2) auch für *in-vivo* Applikationen von hoher Bedeutung. Hier sollten jedoch auch andere Basismaterialien mit geeigneterer Abbau-Geschwindigkeit gegenüber des in dieser Arbeit herangezogenen PLLA verwendet werden (z.B. amorphes PLA, PLGA, Mischsysteme PLA/PLGA usw.). Das in dieser Arbeit verwendete PLA ist nicht für medizinische Anwendungen zugelassen und unter physiologischen Bedingungen nur sehr langsam abbaubar.

### **... zur Fluoreszenz**

Eine noch genauere Analyse der Autofluoreszenz<sup>[222]</sup> von Gal-Systemen (Steuerung der Absorptions-/Emissionsbanden, Quantifizierung der Quantenausbeute u.ä.) ist von hohem Interesse für die Gewebezücht, da sie z.B. die parallel-Analytik von PFS-Struktur, Zell-Verteilung und Proliferation erlauben. Gegebenenfalls könnten diese Analysen dann sogar mit Lebend/Tot Messungen kombiniert werden. Auf diese Weise können noch weit mehr Informationen zur Zell-Substrat-Interaktion und auch Zell-Viabilität nach Perfusion in Bioreaktor-Kultur gewonnen werden.



## 7 Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Andreas Greiner für die hoch spannende Arbeit, die fachliche Betreuung und die vielen Anregung während meiner Zeit am Lehrstuhl bedanken. Es war mir möglich sehr selbstständig zu promovieren und viele eigene Ideen zu realisieren. Mein Dank gebührt auch allen Mitgliedern der MCII für die Unterstützung und die Jahre der Zusammenarbeit. Ihr habt stets für eine positive Arbeitsatmosphäre gesorgt und mit vielen Anregungen zu dieser Arbeit beigetragen.

Ich bedanke mich besonders bei Xiaojian Liao, Mahsa Mafi, Lisa-Catrin Leitner, Simon Neumann, Jian Zhu, Chen Liang und Qiang Gao für die stets so herzliche Atmosphäre und die schöne Zeit. Meinen Bacheloranten Lisa-Cathrin Leitner und Lukas Weber danke ich für die harmonische Arbeitszeit, mit euren Arbeiten und Vorstudien habt ihr einen wichtigen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet.

Prof. Dr. Ruth Freitag danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens, wie auch ihren vielen unglaublich sympathischen und hilfsbereiten Mitarbeitern in der Bioprozesstechnik, allen voran Dr. Valérie Jérôme. Liebe Valérie, ich bedanke mich ganz herzlich für die vielen Jahre der Unterstützung und des gemeinsamen Schaffens!

Prof. Ruth Freitag und vor allem Dr. Valérie Jérôme gilt ein großer Dank für die vielen Stunden interdisziplinären Austauschs in organisatorischen und fachlichen Gesprächen, Meetings sowie den Einladungen zu den Vorträgen ihrer fleißigen Studenten: Moritz Helm, Oliver Riester, Martin Schmidt, Gissela Katherine C. Ibarra, Ioannis Chontzoglou und Mairon Trujillo Miranda, die mit ihren Zellkulturexperimenten einen wichtigen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben. Ich bedanke mich für die gute Zusammenarbeit, die vielen schönen und anregend fachlichen Gespräche.

Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. Martina Stenzel und Mingxia Lu (Universität New South Wales, Sydney) für die Unterstützung bei Design und Synthese des PLA-*b*-PAGP Copolymers für meine Forschungen. Frau Carmen Kunert danke ich für die Durchführung einer Vielzahl an TEM-Messungen welche leider nicht mehr ihren Weg in diese Arbeit gefunden haben.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Annette Krökel für die vielen schönen Gespräche und die wahrlich unzähligen selbstlosen, großen und kleinen Hilfestellungen im Alltag. Ich möchte mich auch ganz besonders bei Martina Heider, ihrer ausgiebigen technischen Hilfe bei SEM-Fragen und den vielen schönen Gesprächen und Keksen „für nette Kollegen und Kolleginnen“ bedanken.

### **Mein größter Dank gilt meiner großartigen Familie!**

Meinen Großeltern Gerda & Werner, Eltern Edith & Werner, meinem Bruder und seiner Verlobten Florian & Sandra sowie meiner Lebensgefährtin Katharina und der gesamten Familie Ottermann.

Ohne eure unglaubliche Unterstützung und liebevolle Fürsorge wäre ich nie so weit gekommen.

**Vielen  lichen Dank!**





## 8 Eidesstattliche Versicherungen und Erklärungen

### (Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

*Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).*

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

*Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.*

(§ 9 Satz 2 Nr. 4 PromO BayNAT)

*Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.*

(§ 9 Satz 2 Nr. 7 PromO BayNAT)

*Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.*

(§ 9 Satz 2 Nr. 8 PromO BayNAT)

*Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.*

.....

Ort, Datum, Unterschrift