

Abschlussbericht

Zuwendungsempfänger:

Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V.

(in Kooperation mit der TU Dresden)

Förderkennzeichen:

03N 4022

Vorhabensbezeichnung:

Kompetenzzentrum für Materialien im Blut- und Gewebekontakt

Laufzeit des Vorhabens:

01.03. 2001- 28.02. 2005

Berichtszeitraum

01.03. 2001- 28.02. 2006

1. Stand und Aktivitäten des Kompetenzzentrums

1.1 Stand und Aktivitäten des Zentrums

Erreichter Stand beim Aufbau der Zentrumsstruktur

Das BMBF-Kompetenzzentrum für Materialien im Blut- und Gewebekontakt Dresden wurde als gemeinsame Einrichtung der Technischen Universität Dresden und des Leibniz-Instituts für Polymerforschung Dresden e.V. unter intensiver Mitwirkung von Industriepartnern und mit erheblicher Unterstützung des Freistaates Sachsen seit Beginn der Förderung im März 2001 in der geplanten Weise aufgebaut. Bereits 2002 erhielt das Kompetenzzentrum mit dem durch die o.g. Einrichtungen gemeinschaftlich etablierten Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien Dresden eine dauerhafte Institutionalisierung.

Alle Teilvorhaben des Kompetenzzentrums konnten entsprechend der wesentlichen Vorgaben der Arbeits- Zeit und Finanzplanung realisiert werden, die Meilensteine der Projektbearbeitung wurden erreicht. Die inhaltliche Schwerpunktsetzung bei der Erschließung der molekularen und zellulären Methoden des Biosurface Engineering und Tissue Engineering erwies sich als tragfähig im Vergleich mit aktuellen Entwicklungen der internationalen Forschung zu Biomaterialien und speziell zu deren Anwendung in den dynamisch wachsenden Gebieten der Kardiologie und der Regenerativen Medizin.

Mit der Etablierung des Zentrums sind gute Voraussetzungen für eine spätere Produktentwicklung in relevanten Unternehmen erarbeitet worden. Als besondere Stärken des Zentrums werden die gesamtheitliche Bearbeitung neuer Strategien zu blutkompatiblen Coatings - Synthese von Thrombininhibitor-Derivaten und Screening der Eigenschaften von Molekülstrukturen durch Molecular Modelling, kovalente Immobilisierung dieser Inhibitoren mit Hilfe von reaktiven Polymerbeschichtungen, Bestimmung von Bindungskonstanten in Modellsystemen, anwendungsbezogene Testung durch Inkubation mit humanem Vollblut- und die Etablierung von Konzepten der Oberflächenfunktionalisierung von Polymeren zur Nutzung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark Erwachsener für Anwendungen im Bereich der Regenerativen Medizin gesehen. Gleichzeitig wurden neue Konzepte zu Scaffolds auf Basis von Biopolymeren der extrazellulären Matrix, insbesondere zur Fibrillogenese von Kollagenen mit Glucosaminoglycanen und deren Fähigkeit zur

Bindung und Freisetzung von Wachstumsfaktoren, erarbeitet und präparative Strategien zu synthetischen Hydrogelen mit besonderen Funktionseigenschaften (thermisch induzierte Strukturänderung) etabliert.

Das Zentrum wurde in der geplanten Weise durch Industriekooperationen kofinanziert, wobei sowohl mit großen, international wirkenden Unternehmen als auch mit kleinen, jungen Unternehmen aus der Region Dresden Kooperationen bestehen.

Entsprechend der in den Teilprojekten definierten Aufgaben wurde mit dem Aufbau des Zentrums die gemeinsame Arbeit der aus Mitarbeitern verschiedener Einrichtungen bzw. Organisationseinheiten gebildeten interdisziplinären Projektteams entwickelt. Als regelmäßige Basis der internen Kommunikation werden Arbeitsberatungen aller Mitarbeiter des Kompetenzzentrums durchgeführt, bei denen in Seminarvorträgen Ergebnisse berichtet werden, weiterführende inhaltliche Aspekte der einzelnen Teilprojekte sowie deren Verknüpfung diskutiert und organisatorische Fragen des Zentrums gemeinsam entschieden werden.

Durch die aktive Beteiligung am Masterstudiengang „Molecular Bioengineering“, dem internationalen PhD Programm „Molecular Cell Biology and Bioengineering“ sowie durch Diplom- und Praktikumsarbeiten von Studenten verschiedener Fachrichtungen an den am Kompetenzzentrum mitwirkenden Einrichtungen sind die Projektteams aller Teilprojekte an der Ausbildung von wissenschaftlichem Nachwuchs beteiligt. Weiterhin absolvierten Studenten europäischer und außereuropäischer Universitäten als Gäste der Technischen Universität Dresden oder des Instituts für Polymerforschung Dresden e.V. Praktika am Kompetenzzentrum. Darüber hinaus besteht mit der Berufsakademie Riesa eine enge Zusammenarbeit bei der Ausbildung von Studenten der Biotechnik.

Ein wichtiger Schritt zur Etablierung des Zentrums wurde mit der Konzentrierung des wissenschaftlichen Potentials unter einem Dach, als Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien Dresden, erreicht. 2002 konnte der Neubau eines gemeinsam vom Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V. und von der Technischen Universität Dresden errichteten Biomaterial-Forschungszentrums bezogen und damit eine räumliche Konzentration aller auf dem Gebiet der Biomaterialien tätigen Arbeitsgruppen in und um Dresden sowie ihrer instrumentellen Ressourcen erreicht. Das Gebäude verfügt über eine auf die Aufgaben des Zentrums zugeschnittene Infrastruktur und Ausstattung (Voraussetzungen für die Einrichtung von

Prüflaboratorien für Medizinprodukte und Technika für die GMP-gerechte Entwicklung von Polymer-Scaffolds für die Regenerative Medizin). Es nimmt die Core-Struktur des BMBF-Kompetenzzentrums für Materialien im Blut- und Gewebekontakt auf und bildet mit der Medizinischen Fakultät der TU Dresden die Basis der gemeinsamen Arbeit in den Teilprojekten des Zentrums. Darüber hinaus sind zahlreiche Einrichtungen des Kerngeländes der TU Dresden sowie weitere Standorte (v.a. das MPI für Molekulare Zellbiologie und Genetik) mit spezifischen Möglichkeiten einbezogen.

Ausdruck der vitalen Kooperation mit der medizinischen Forschung ist die Einbindung in einen neuen DFG-Sonderforschungsbereich „From Cells to Tissues“ (SFB 655), der 2005 unter Federführung von Professor G. Ehninger eingerichtet wurde, sowie insbesondere die erfolgreiche Bewerbung Dresdener Forschungseinrichtungen um das DFG-Forschungszentrum für Regenerative Therapien (CRTD, Sprecher Professor M. Brand). Im Rahmen des ebenfalls 2005 etablierten CRTD wurden zahlreiche Forschungskonzepte zu Polymer Scaffolds, die durch das BMBF-Kompetenzzentrum entwickelt wurden, aufgegriffen und vertieft. Insgesamt konnte eine Vielfalt von auf Stammzellen basierenden Konzepten des Tissue Engineering in der Förderperiode des Kompetenzzentrums am Standort Dresden sehr erfolgreich durch neue Verbundinitiativen untersetzt werden. Durch die resultierende Gewinnung von zahlreichen internationalen Spitzenwissenschaftlern für die biomedizinische Forschung in Dresden werden auch der Biomaterialforschung neue Impulse gegeben.

Mit dem BMBF-Kompetenzzentrum für Materialien im Blut- und Gewebekontakt bildet die im Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien Dresden zusammengeführte Forschung eine wichtige Komponente der Dresdener Biotechnologie-Initiative im Rahmen des InnoRegio-Verbundes BiologieMedizinTechnik (BioMeT) sowie der darüber hinausreichenden Initiative „Dresden Biopolis“. Beide Netzwerke zielen in besonderem Maß auf die Stimulation und Unterstützung von Ausgründungen und Industrieansiedlung.

Auf der Basis der Struktur des Zentrums konnte erwartungsgemäß die Kooperation mit Industrieunternehmen in Qualität und Quantität erheblich ausgeweitet werden. Gleichzeitig konnten neue wissenschaftlich Kontakte mit Partnern außerhalb der Dresdener Region geknüpft werden. Ein internationales Graduiertenkolleg der DFG „Advanced Polymer Materials“ verstärkte die Verbindung zum Institute of

Macromolecular Chemistry der Czech Academy of Sciences in Prag, was speziell für die Forschungen zu synthetischen Hydrogelen und durch die in Prag realisierten Arbeiten zu synthetischen, biodegradierbaren Polymeren eine wertvolle Ergänzung darstellt. Durch eine Honorarprofessur (Adjunct Professorship) des Projektkoordinators Carsten Werner an der Faculty of Applied Sciences der University of Toronto wurde eine Verbindung zum dortigen Institute of Bioengineering geschaffen, wodurch insbesondere Arbeiten des Kompetenzzentrums zu auf Stammzellen gestützten Tissue- Engineering-Konzepten profitieren.

Für die Gewährleistung der Nachhaltigkeit des Zentrums wurde in Abstimmung mit dem Sächsischen Staatsministerium für Wissenschaft und Kunst, der Universitätsleitung der Technischen Universität Dresden, dem Präsidium der Wissenschaftsgemeinschaft Gottfried Wilhelm Leibniz und dem Vorstand des Institutes für Polymerforschung Dresden e.V. die Schaffung des einrichtungsübergreifenden Max-Bergmann-Zentrums für Biomaterialien Dresden als gemeinsamer Initiative der Wissenschaftsgemeinschaft Gottfried Wilhelm Leibniz und der Technischen Universität Dresden realisiert. Diese Struktur sichert nicht nur die Nachhaltigkeit des BMBF Kompetenzzentrums für Materialien im Blut- und Gewebekontakt sondern integriert gleichzeitig inhaltlich verwandte Aktivitäten -z.B. grundlagenorientierte Arbeiten zu Grenzflächen-Wechselwirkungen an Festkörpern im Kontakt mit Biosystem und Forschungen zu biomimetischen Materialien für technische Anwendungen- an der Technischen Universität Dresden und am Institut für Polymerforschung Dresden e.V.

Maßnahmen zur Öffentlichkeitsarbeit des Kompetenzzentrums (Logo/Layout, Imagebroschüre s. Anlage, Webauftritt: <http://www.ipfdd.de/mbc>) konnten sich bereits früh auf die langfristige Struktur des Max-Bergmann-Zentrums für Biomaterialien Dresden beziehen. Meldungen in regionalen (lokale Tagespresse) und überregionalen Medien (Deutschlandfunk, Frankfurter Allgemeine Zeitung, Die Welt u.a.) berichteten über die Arbeit des BMBF-Kompetenzzentrums und über die Etablierung des Max-Bergmann-Zentrums für Biomaterialien Dresden. Ein Verein zur Förderung des Max-Bergmann-Zentrums für Biomaterialien Dresden wurde am 6. Februar 2003 gegründet, zu den Gründungsmitgliedern gehören der Präsident der Leibniz-Gemeinschaft und der Rektor der Technischen Universität Dresden.

Beschreibung der Kompetenzen und der Zentrumsstruktur

Auf materialwissenschaftlicher Seite liegt die Kernkompetenz des Kompetenzzentrums auf dem Gebiet der Biofunktionalisierung von Materialgrenzflächen („Biosurface Engineering“) und bezieht sich dabei werkstoffklassenübergreifend auf folgende Basismaterialien:

- Polymere / Biopolymere
- Metalle / Metalloxide
- Anorganisch-nichtmetallische Materialien

Für die gezielte Grenzschichtgestaltung sind dementsprechend vielfältige Erfahrungen zum Einsatz der nachfolgend genannten Methoden gegeben:

– *Physikalische Modifizierungs- und Depositionsverfahren*

- Niederdruck-Plasmabehandlungen
- Ionenstrahlprozesse
- Lasertechnologien

– *Chemische Modifizierungs- und Depositionsverfahren*

- Elektrochemisch gestützte Verfahren
- Pfropfpolymerisationen und Coating-Techniken (Hydrogele)
- Polymeranaloge Umsetzungen
- Selbstassoziierende Molekülbeschichtungen

– *Biomolekulare und biomimetische Verfahren*

- Protein- und Peptidimmobilisierung
- Immobilisierung von Polysacchariden
- Mikrostrukturierungsverfahren zur biomolekularen Funktionalisierung (Microcontact-Printing u.a.)
- Erzeugung von Kollagenbasis-Kompositen über Flüssigprecursor-Technologien

Die Entwicklung und Umsetzung von Biosurface-Engineering-Konzepten kann sich auf sehr umfassende Erfahrungen bei der Aufklärung von Grenzflächenphänomenen an allen Werkstoffklassen sowie auf ein hervorragendes analytisches Instrumentarium zur Grenzflächencharakterisierung stützen. Neben der quantitativen Erfassung von chemischen und physikalischen Grenzflächeneigenschaften werden Wechselwirkungen von Werkstoffen mit kondensierten Phasen analysiert. Quellungs-, Reorientierungs- und Adsorptionsprozesse an Materialgrenzflächen in wässrigen Lösungen bilden dabei einen langjährigen Forschungsschwerpunkt der

Partner des Zentrums. Die modernen Analysetechniken (Röntgen-Photoelektronenspektroskopie zur chemischen Analyse, Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie, Atomemissions-Spektroskopie, Oberflächentechniken der Infrarot- und Raman-Spektroskopie, Environmental Scanning Electron Microscopy, Atomic Force Microscopy, Confocal Laser Scanning Microscopy, Ellipsometrie, High Performance Liquid Chromatography mit Fluoreszenz- und Massendetektor, Mikrokalorimetrie und Micro Differential Scanning Calorimetry, Zirkulardichroismus u.a.) werden durch Eigenentwicklungen unikaler Messinstrumente für spezielle Fragestellungen (Detektion von Grenzflächenladungen durch Elektrokinetische Mikropaltzelle in Kombination mit reflektometrischer Interferenzspektroskopie u.a.) ergänzt.

Darüber hinaus wurden in Zusammenarbeit der Verbundpartner aus unterschiedlichen Fachdisziplinen Speziallabors zur anwendungsbezogenen Materialbewertung durch *in vitro* Hämkompatibilitätstests mit humanem Vollblut sowie durch Zellkulturen etabliert. Auch in diesen Labors im Umfeld materialwissenschaftlicher Institute ist adäquat qualifiziertes Fachpersonal tätig und verfügt über eine sehr gute Ausstattung, die detaillierte Untersuchungen erlaubt (Laser Scanning Cytometry, Flow Cytometry, Thermocycler mit Fluorimeter, Confocal Laser Scanning Microscopy, biophysikalische Spezialtechniken zur Untersuchung der Zelladhäsion, Environmental Scanning Electron Microscopy u.a.). Diese Kernkompetenz bei grenzflächenanalytischen Untersuchungen bilden eine essentielle Voraussetzung für die Zuordnung von Materialparametern zu Reaktionen des wechselwirkenden Biosystems und damit für die Präzisierung der Zieldefinition des Biosurface Engineering. Die Kernkompetenzen des Zentrums auf dem Gebiet der Grenzflächenforschung zu Werkstoffen werden ergänzt durch ein Umfeld sehr aktiver materialwissenschaftlicher Forschung auf den Gebieten der polymeren, metallischen und anorganisch-nichtmetallischen Werkstoffe als auch durch verarbeitungstechnisches Know How (z.B. zur Verarbeitung resorbierbarer Polymere).

Das BMBF-Kompetenzzentrum wurde durch einen Kooperationsvertrag zwischen der Technischen Universität Dresden und dem Institut für Polymerforschung Dresden e.V. mit einem rechtsverbindlichen und organisatorisch belastbaren Rahmen versehen. Dabei wurde die Verpflichtung aller Verantwortlichen der Teilprojekte zur Entwicklung und Bereitstellung der für das Zentrum benötigten Kompetenzen, zu

Pflege und Ausbau von Industriekooperationen, und zur Zusammenarbeit bei der Etablierung einer langfristigen und adaptionsfähigen Zentrumsstruktur festgelegt.

Das **Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien Dresden** wurde im Jahr 2002 als gemeinsame interdisziplinäre Initiative der Technischen Universität Dresden und der Wissenschaftsgemeinschaft Gottfried Wilhelm Leibniz durch die am BMBF-Kompetenzzentrum für Materialien im Blut- und Gewebekontakt beteiligten sowie durch weitere Partner etabliert. Diese Struktur stellt bereits zu einem frühen Zeitpunkt sicher, dass die Bündelung der Kompetenzen auf dem Gebiet der Biomaterialien in Dresden über den Zeitraum der Förderung hinaus Bestand hat und dementsprechend auch neue, längerfristige gemeinsame Projekte intern und mit Dritten entwickelt werden können. Gleichzeitig wird durch diese Institutionalisierung das Vertrauensverhältnis zu Industriepartnern erheblich gestärkt und die Erkennbarkeit nach außen erhöht.

Maßnahmen zur Öffentlichkeitsarbeit des Kompetenzzentrums (Logo/Layout, Imagebroschüre- s. Anlage, Webauftritt: <http://www.mbc-dresden.de>) konnten sich bereits auf die langfristige Struktur des Max-Bergmann-Zentrums für Biomaterialien Dresden beziehen. Ein Verein zur Förderung des Max-Bergmann-Zentrums für Biomaterialien Dresden wurde am 6. Februar 2003 gegründet, zu den Gründungsmitgliedern gehören der Präsident der Leibniz-Gemeinschaft und der Rektor der Technischen Universität Dresden.



Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien Dresden

Leitung des Kompetenzzentrums

Das Kompetenzzentrum

- bildet eine Leitung aus dem Kollegium der Antragsteller,
- wird durch einen Sprecher (TUD/ IfWW), einen stellvertretenden Sprecher (TUD/ Medizinische Fakultät) und einen Koordinator (IPF) vertreten.

Durch diese werden wahrgenommen:

- Leitung und Organisation anhand von Arbeitsplänen und Entscheidungspunkten
- Sicherstellen der Verbundstruktur sowie der Bearbeitung projektübergreifender Aufgaben
- Klärung inhaltlicher, struktureller und finanzieller Fragen zwischen den Teilprojekten
- Sicherstellung der Drittmittelinwerbung (Zuordnung, Qualität)
- Gestaltung der Präsenz des Zentrums in der fachlichen und in der nicht-fachlichen Öffentlichkeit

Indem der Sprecher des Kompetenzzentrums, Prof. Dr. Hartmut Worch, Direktor des Instituts für Werkstoffwissenschaft der TU Dresden, der stellvertretende Sprecher, Prof. Dr. Gerhard Ehninger, Direktor der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums und Mitglied des Dekanatskollegiums der Medizinischen Fakultät der TU Dresden ist und der Koordinator des Projektes, Dr. Carsten Werner, die Abteilung Biokompatible Materialien des IPF leitet, wird durch die Leitungsstruktur des Zentrums auch das effiziente Zusammenwirken der beteiligten Einrichtungen sichergestellt.

Beirat des Kompetenzzentrums

Ein Beirat des Kompetenzzentrums wurde gebildet

- aus drei Vertretern der in Verbundprojekten beteiligten Unternehmen,
- den Vertretern des Bundesministeriums für Forschung und Technologie,
- des Projektträgers für Neue Materialien und Chemische Technologien,
- des Sächsischen Staatsministeriums für Wissenschaft und Kunst.

Als Vertreter des Kompetenzzentrums nehmen Sprecher, stellv. Sprecher und Koordinator an den Sitzungen des Beirates teil.

Der Beirat trifft sich einmal im Jahr sowie nach Bedarf, seine Erweiterung durch Vertreter weiterer Industrieunternehmen wird ausdrücklich angestrebt.

Aufgaben des Beirates:

- Kontrolle und Vorbegutachtung der Arbeiten der Teilprojekte
- Empfehlungen zur Entwicklung der Struktur des Kompetenzzentrums

Entscheidungskriterien für Leitung des Kompetenzzentrums und den Beirat sind neben der Erfüllung von geplanten Zielen (Zeitplanung und Meilensteine) Materialentwicklungen, Patente, Publikationen sowie Umfang und Qualität der Industriebeauftragungen.

Wie vorgesehen umfasste das Kompetenzzentrum neben den durch die BMBF-Förderung ermöglichten Forschungen auch die auf Biomaterialien gerichtete Haushaltforschung der beteiligten Einrichtungen sowie die zu diesem Verbundprojekt erfolgende Industriebeauftragung. Dabei erfolgte eine Einwerbung von 25% Industriedrittmitteln bezogen auf die BMBF-Förderung. Industriekooperationen mit großen, internationalen Unternehmen wie auch mit kleinen, jungen Unternehmen aus der Region Dresden Kooperationen sichern die die Dauerhaftigkeit der Zentrumsstruktur ab.

Die Forschungstätigkeit der Verbundpartner im Rahmen des Kompetenzzentrums wird begleitet durch die Implementierung von neuen Lehrprojekten. So ist der Studiengang „Molecular-Bioengineering“ entstanden, der sich auf die Kompetenz mehrerer Fakultäten der Technischen Universität Dresden sowie die international renommierten Direktoren des Max-Planck-Institutes für Molekulare Zellbiologie und Genetik stützt. Mit dem Masterstudiengang „Molecular Bioengineering“ sowie mit Diplom- und Praktikumsarbeiten von Studenten verschiedener Fachrichtungen an den am Kompetenzzentrum mitwirkenden Einrichtungen wird im Rahmen der Projektteams aller Teilprojekte an der Ausbildung von wissenschaftlichem Nachwuchs mitgewirkt. Weiterhin absolvieren Studenten europäischer und außereuropäischer Universitäten als Gäste der Technischen Universität Dresden oder des Leibniz-Instituts für Polymerforschung Dresden e.V. Praktika am Kompetenzzentrum. Darüber hinaus wird mit der Berufsakademie Riesa bei der Ausbildung von Studenten der Biotechnik (Ingenieur Berufsakademie) intensiv zusammengearbeitet.

Weiterführung des Zentrums nach dem Ende der Förderperiode

Für die Gewährleistung der Nachhaltigkeit des Zentrums wurde in Abstimmung mit

dem Sächsischen Staatsministerium für Wissenschaft und Kunst, der Universitätsleitung der TU Dresden, dem Präsidium der Wissenschaftsgemeinschaft Gottfried Wilhelm Leibniz und dem Vorstand des Institutes für Polymerforschung Dresden e.V. die Schaffung des einrichtungsübergreifenden Max-Bergmann-Zentrums für Biomaterialien Dresden als gemeinsamer Initiative der Wissenschaftsgemeinschaft Gottfried Wilhelm Leibniz und der Technischen Universität Dresden realisiert. Diese Struktur sichert nicht nur die Nachhaltigkeit des BMBF Kompetenzzentrums für Materialien im Blut- und Gewebekontakt sondern integriert gleichzeitig inhaltlich verwandte Aktivitäten -z.B. grundlagenorientierte Arbeiten zu Grenzflächen-Wechselwirkungen an Festkörpern im Kontakt mit Biosystem und Forschungen zu biomimetischen Materialien für technische Anwendungen- an der Technischen Universität Dresden und am Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V.

Schwerpunkte der Weiterentwicklung des BMBF-Kompetenzzentrums für Materialien im Blut- und Gewebekontakt im Rahmen der dauerhaft angelegten Struktur des Max-Bergmann-Zentrums für Biomaterialien sind:

- Ausbau international kompetitiver Forschung zu durch den Erkenntnisfortschritt der Biologie inspirierten Materialien
- Entwicklung effektiverer Formen der Überführung von dabei erhaltenen Ergebnissen in Anwendung und wirtschaftliche Nutzung
- inhaltliche Vertiefung der im Rahmen des BMBF-Kompetenzzentrums entwickelten thematischen Schwerpunkte und Erschließung weiterer transdisziplinärer Arbeitsrichtungen
- Erschließung einer durchgängigen Kette von der Grundlagenforschung bis zur Anwendung mit erweiterten Optionen zur Einbindung der Wirtschaft in Forschungsvorhaben
- konsequent an wissenschaftlicher Leistung orientierte Förderung von Nachwuchsgruppen sowie Minimierung administrativer und hierarchischer Barrieren

Entsprechend dieser Grundausrichtung werden Maßnahmen zur Sicherung der Nachhaltigkeit der im Rahmen des BMBF-Kompetenzzentrums für Materialien im Blut- und Gewebekontakt aufgebauten wissenschaftlichen Basis-Infrastruktur für problembezogene Biomaterial-Grundlagenforschung umgesetzt, es erfolgt ein

Ausbau der Drittmittelinwerbung und es werden mit dem Max-Bergmann-Zentrum assoziierte Forschungs- und Technologie-Unternehmen aufgebaut.

Für die Sicherung der Nachhaltigkeit des im Rahmen des BMBF-Kompetenzzentrums entwickelten Profils des Max-Bergmann-Zentrums ist es erforderlich interdisziplinäre Arbeitsrichtungen der problembezogenen Biomaterial-Grundlagenforschung dauerhaft am Zentrum zu verankern und weiterzuentwickeln. Dazu wurden in Abstimmung mit den Trägereinrichtungen des Zentrums folgende Maßnahmen umgesetzt:

- Einordnung des Zentrums als gesonderte Struktureinheit innerhalb beider Trägereinrichtungen (TUD, IPF), IPF-seitige Leitung des Zentrums in Verbindung mit einer zu schaffenden Professur Biofunktionelle Polymersysteme (Ausschreibung wird bis Ende 2006 erfolgen)
- Dauerhafte Absicherung der für die interdisziplinäre Tätigkeit des Zentrums etablierten Arbeitsrichtungen durch Einstellung zusätzlicher Mittel bei den Trägereinrichtungen für grundfinanziertes wissenschaftliches und technisches Personal sowie für Erhaltung/Ausbau der guten instrumentellen Ausstattung
- Gewährleistung der professionellen Bearbeitung von organisatorischen Aufgaben, insbesondere der Verwertung von Forschungsergebnissen, sowie des Projektmanagements/Controllings durch Schaffung einer grundfinanzierten Assistentenstelle.

Alle Arbeitsgebiete des Zentrums sind gut durch Drittmittel bzw. Projektinitiativen untersetzt. Auf Basis der Beantragung neuer Förderprojekte (Verbundprojekte EU 6FP, aktive Mitwirkung an neuen SFB-Initiativen) sowie durch vielfältige Industriekooperationen (auch im Rahmen von BMBF-Verbundprojekten) soll weiterhin ein Großteil der Arbeiten durch die Einwerbung von Drittmitteln realisiert werden. Hierbei sind sowohl die durch die Einrichtung des Kompetenzzentrums in den vergangenen Jahren erzielte qualitative und quantitative Erweiterung der Industriekooperationen -insbesondere mit großen Unternehmen- als auch die für den Zeitraum 2005-2007 angestrebte Etablierung von mit dem Max-Bergmann-Zentrum assoziierten Firmen als in der Perspektive zunehmend wichtiger werdende Elemente zu sehen.

Gleichzeitig mit der Konsolidierung der Basis-Infrastruktur des Zentrums werden derzeit Forschungs- und Entwicklungsunternehmen etabliert, die die effektive Nutzung von Arbeitsergebnissen des BMBF-Kompetenzzentrums sicherstellen und

hierdurch eine weitere Dimension der Nachhaltigkeit des Zentrums bilden. Hierbei soll keine Exklusivnutzung der aufgebauten Zentrumsstruktur durch *ein* Unternehmen erfolgen, vielmehr sollen verschiedene Ausgründungen einzelne Patente der Trägereinrichtungen lizenzieren und im Rahmen von Kooperationsprojekten mit dem Zentrum verbunden bleiben. Es wird erwartet, dass in der mittelfristigen Perspektive die Geschäftstätigkeit dieser Unternehmen auch für die Trägereinrichtung durch direkte Beauftragung oder durch Einbindung in Allianzen mit Großunternehmen eine wertvolle Ergänzung der Optionen bei der Finanzierung von Forschungsvorhaben bilden kann. Insbesondere kann jedoch durch die zu etablierende Verzahnung des Zentrums mit Forschungs- und Technologieunternehmen eine raschere und konsequentere Ausrichtung der anwendungsbezogenen Forschung des Zentrums auf kommerziell relevante Innovationszielstellungen gewährleistet werden. Als erstes Beispiel einer bereits erfolgreichen Ausgründung ist die Firma ZetaScience GmbH zu nennen, die bereits 2005 ihre Geschäftstätigkeit aufnahm und für ihr innovatives Konzept beim Businessplan-Wettbewerb „FutureSax“ ausgezeichnet wurde.

1.2 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Teilprojekte

(A) Entwicklung bioaktiver, blutkompatibler Coatings für kardiovaskuläre Implantate u.a. Produkte im direkten Blutkontakt:

Antikoagulante Polymere auf der Basis synthetischer Blutgerinnungsinhibitoren zur Beschichtung von blutkontaktierenden Materialien (Projekt A1):

Es wurde ein Spektrum kopplungsfähiger, auf Benzamidin oder Guainidin beruhender synthetischer Inhibitoren präpariert, umfassend charakterisiert und für die Erzeugung blutgerinnungsneutraler Oberflächen herangezogen. Der Einfluß verschiedener PEG-Spacervarianten zur kovalenten Immobilisation von Thrombininhibitoren auf Benzamidin-Basis auf deren Aktivität wurde durch Thrombinbindungsassays nachgewiesen. Zum direkten Nachweis der Thrombinbindung an den Inhibitor-beschichteten Substraten wurde ein Immunofluoreszenz-Nachweis etabliert. Immobilisierte synthetische Thrombininhibitoren erwiesen sich anhand von *in vitro* Inkubationstests mit frisch gewonnenen humanem Vollblut als wirksam für die Vermeidung der Blutgerinnungsaktivierung durch Oberflächen (zwei Patente wurden erteilt).

Blutkompatible Materialoberflächen durch kovalente Immobilisierung rekombinanter Blutgerinnungshemmstoffe und Thrombocytenfunktionshemmer in Hydrogel-Beschichtungen (Projekt A2):

Möglichkeiten zur Elektronenstrahl- und Plasmabehandlung für die Immobilisierung von Hydrogel-Polymeren konnten zur Beschichtung von Basismaterialien mit verschiedenartigen Polymer-Hydrogelen erschlossen und für die Immobilisierung von natürlich vorkommenden Blutgerinnungsinhibitoren herangezogen werden. Durch Blutkompatibilitätsuntersuchungen mit humanem Vollblut wurde der Einfluss chemischer Funktionalitäten der Hydrogel-Polymere auf das Aktivierungspotential der Beschichtungen mechanistisch untersetzt.

Zur Freisetzung des rekombinanten Thrombocytenadhäsionshemmstoffes Saratin wurde die Netzwerkcharakteristik von Polyacrylsäure-Gelen angepasst. Antikoagulante Polymerbeschichtungen -wie Heparin-, Endurin- und Thrombomodulin-beschichtete Polymeroberflächen- wurden durch ein speziell

angepasstes Inkubationsexperiment im Blutkontakt charakterisiert und hinsichtlich ihrer Wirksamkeit verglichen.

Benzamidin-haltige Copolymere mit N-Isopropylacrylamid (NiPPam) wurden synthetisiert und charakterisiert. Verschiedene Inhibitoren wurden -gelöst und immobilisiert- hinsichtlich ihrer Hemmwirkung gegenüber Thrombin und Faktor Xa eingeordnet.

(B) Anpassung der biomolekularen Beschichtung und 3-D-Mikrostruktur von Substraten zur Zustands- und Funktionssteuerung von Zellen in Bioreaktoren und in resorbierbaren Implantaten (Tissue-Engineering):

Biofunktionalisierte Polymermatrices als Substrate für die in vitro Expansion und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) (Projekt B1):

Die Isolation von MSC mittels antikörperbasierter E-Rosette Technik ist der Isolation via Plastikadhärenz nicht überlegen. Die Analyse der MSC-relevanten Marker CD73 und CD105 mit Laser-Scanning Zytometrie ergab keinen nennenswerten Unterschied in der Expression. Somit kann postuliert werden, dass mit beiden Isolationsmethoden phänotypisch identische Zellen isoliert werden. Die Proliferation von MSC wird durch angebotene Proteine der extrazellulären Matrix beeinflusst. Nach drei Tagen zeigte sich tendenziell ein besseres Wachstum auf den mit Fibronectin und Laminin beschichteten Oberflächen verglichen mit Collagen I und Collagen IV. Eine schwache Proteinanbindung wie im Falle der hydrolysierten, hydrophilen Polymeroberflächen (Poly(propylen-alt-maleinsäureanhydrid) adsorptiv) führte insgesamt zu einer geringeren Adhärenz der Zellen. Dieses Verhalten korrelierte mit dem immunzytologischen Nachweis von Laminin und Fibronectin in MSC. Die Produktion des Chemokins SDF-1 durch MSC wird durch die Differenzierung beeinflusst. Bei Kultivierung der MSCs in Gegenwart von normalen MSC-Medium (DMEM) sowie bei der Kultivierung in Gegenwart von HSC-Expansionsmedium (CellGro) zeigte sich jeweils eine höhere SDF-1 Expression. Durch Nutzung thermoresponsiver Poly(N-alkylacryl-amide)-g-Poly(ethyleneglycol)-Hydrogele konnte ein kontrolliertes Ablöseverhalten der adhärenz wachsenden MSC erreicht werden. Die hydrophile Charakteristik der stimuliresponsiven Polymere erwies sich dabei als vorteilhaft hinsichtlich einer raschen Ablösung von Zellschichten beim Absenken der

Temperatur um nur 3K. Parathormon verbessert die supportiven Eigenschaften von MSC für hämatopoietische Stammzellen (HSC). Durch die Zugabe von Parathormon zu der Kokultur von MSC und HSC ließ sich deren Klonogenität deutlich verbessern. Der Einfluss von rekombinantem Bone-morphogenetic Protein (BMP) auf die Differenzierung von MSC. Neben der Wirkung von BMP2/4 auf die osteogene Differenzierung und Expression von alkalischer Phosphatase (ALP) konnte die Interaktion bzw. Aktivierung wichtiger Moleküle der Signaltransduktion (CBFa1 und Smad) in humanen MSC beschrieben werden. Interessant sind neuere Befunde, die für die Produktion und parakrine Aktivität von BMP in primären MSC sprechen und eine Nutzung der von MSC produzierten Mediatoren/Matrixkomponenten in Bioreaktoren denkbar erscheinen lassen.

Dreidimensional angepasste und biomolekular beschichtete Strukturen aus Poly(hydroxyalkanoat)-Fäden als resorbierbare Implantate für MSC-basierenden Blutgefäß- und Knochenersatz (Projekt B2):

Die im Rahmen des Teilprojektes erarbeiteten Möglichkeiten zur Gestaltung textiler Polymer-Scaffolds auf PHA-Basis erlauben eine weitgehende physikalische, chemische und biomolekulare Anpassung der erzeugten Strukturen an die Ziele spezifischer Tissue Engineering Konzepte. Neue Optionen zur oberflächenselektiven Funktionalisierung von PHA-Scaffolds wurden durch Plasmaprozesse (u.a. erstmalig erfolgreiche azide Modifizierung von PHA durch Behandlung in Wasserdampf-Atmosphären) sowie auch durch enzymatische und nicht-enzymatische Hydrolysebehandlungen realisiert. Die Gestaltungsoptionen für dreidimensionale Textilstrukturen wurden mit dem Aufbau eines GMP-gerechten Labors für die die Anwendung der *Tailored Fibre Placement Technology* untersetzt. Untersuchungen zur oberflächenselektiven Funktionalisierung von Polyhydroxyalkanoaten durch Niederdruck-Plasmaprozesse wurden angesichts neuer Entwicklungen auf 3HB/4HB Copolymere ausgedehnt. An mit aziden Funktionalitäten versehen Copolymersubstraten konnte die Angiogenese von Endothelzellen stimuliert werden. Aus 3HB/4HB-Copolymeren durch ein Phaseninversionsverfahren erzeugte poröse Schläuche wurden hinsichtlich morphologischer und mechanischer Eigenschaften optimiert (Kooperation mit der University of Toronto).

Steuerung der Angiogenese an biologisierten Implantatgrenzschichten und in resorbierbaren Knochenersatzwerkstoffen (Projekt B3):

Teil A: Metallische Implantate: Aufbauend auf der Oberflächenmodifizierung mit der Grundkomponente Kollagen I wurden Methoden etabliert, um TiAl6V4-Oberflächen mit dreidimensionalen artifiziellen Matrizes zu beschichten, die in der Porengröße, dem Vernetzungsgrad, dem Heparin Gehalt und der Methode der Heparinimmobilisierung variieren. Durch Anwendung elektrochemischer Methoden konnten solche Matrizes in situ verdickten Oxidschichten verankert werden sowie mittels galvanostatischer Abscheidung von Hydroxylapatit an den Kollagenfibrillen knochenanaloge Matrizes erzeugt werden. Dreidimensionale Matrizes mit ausschließlich organischer Beschichtung (Kollagen +/- Heparin) wiesen eine deutlich erhöhte Kapazität für die Bindung des VEGF im Vergleich zu unbehandelten Metalloberflächen auf. Bei der Lagerung unter weitgehend physiologischen Bedingungen konnte bei diesen Matrizes eine Zurückhaltung des Wachstumsfaktors in den ersten Stunden und im weiteren Freisetzungsverlauf eine erhöhte Freisetzung erzielt werden. Die zusätzlich mit Heparin funktionalisierten Matrizes wiesen dabei einen leicht verbesserten Eigenschaften gegenüber der reinen Kollagenmodifizierung auf, während die optional abgeschiedene mineralische Komponente keinen weiteren Einfluss auf die Bindung und Freisetzung des VEGF ausübte. Zellbiologische Untersuchungen mit humanen microvaskulären Endothelzellen bestätigten die Trends der Freisetzungsstudien.

Teil B: Resorbierbare Knochenersatzmaterialien: Ein interkonnektierendes Porensystem wurde durch den Einbau von Acetatfaser-Gewirken erreicht, die in den pastösen Zement eingebracht und nach Abbinden des Zements wieder ausgelöst wurden. BioD weist eine hohe VEGF-Bindungskapazität auf. Die Modifikation mit min. Kollagen führt zu einer leichten Reduktion, die zusätzliche Modifikation mit Heparin hingegen zu einer Erhöhung der Bindungseffizienz. Alle Zementvarianten setzten biologisch aktives VEGF frei. Die Modifikation von BioD mit min. Kollagen beeinflusst nicht Adhäsion und Proliferation von Endothelzellen auf dem Zement. Die zusätzliche Modifikation mit Phosphoserin, Citrat und Heparin begünstigt Adhäsion und Proliferation von Endothelzellen auf den Kompositen. In Gegenwart von VEGF bildeten Endothelzellen in einem Fibrin-Gel über einer BioD-Probe tubuläre Strukturen. Endothelzellen in einer 3D Matrix aus mineralisiertem Kollagen sind in der Lage die angiogene Differenzierung entsprechend ihres Zelltypes auszuführen.

Das Entstehen eines konfluenten Layers an den Wandungen des Scaffolds weist auf eine sehr gute Biokompatibilität des Materials hin.

(C) Transfer von Materialentwicklungen in medizintechnische Systeme:

Modulares Bioreaktorsystem für Stammzellkulturen (Projekt C1):

Es konnte ein funktionsfähiges, modulares Bioreaktorsystem entwickelt werden das zunächst anhand von Kulturexperimenten mit immortalisierten Zelllinien erprobt wurde. Durch die Implementierung von sensorischen Komponenten wurde das Bioreaktorsystem für die Erfassung von relevanten Kulturparametern ergänzt, die die Voraussetzung für das Monitoring von Langzeit-Zellkulturen auf biofunktionalisierten Oberflächen schaffen. Die Eignung der Anordnung für Langzeitkulturen wurde bewertet. Die Mediumkonditionierung wurde durch eine optimierte Ansteuerung verbessert. Die Adsorption von im Medium gelösten SCF (stem cell factor) an der Oberfläche der dreidimensionalen PET-Kulturträger wurde anhand der SCF-sensitiven Zelllinie M07e untersucht. Aufbau und Evaluierung des Perfusions-Bioreaktorsystems konnten soweit abgeschlossen werden dass die weiterführende Nutzung des Systems zur Kultur von mesenchymalen Stammzellen möglich ist.

1.3 Zusammenfassende Angaben zu den Punkten 2-6 nach Muster BNBest98

1.3.1 Vergleich des Standes des Vorhabens mit der ursprünglichen Planung

Der erreichte Bearbeitungsstand des Vorhabens entspricht weitgehend der vorliegenden Planung. Bei einigen Teilprojekten ergaben sich aufgrund erforderlich werdender Personalwechsel Verzögerungen, die im Rahmen der kostenneutralen Verlängerung des Projektes ausgeglichen werden konnten.

1.3.2 Haben sich die Aussichten für die Erreichung der Ziele des Vorhabens innerhalb des angegebenen Ausgabenzeitraumes gegenüber dem ursprünglichen Antrag geändert?

Nein.

1.3.3 Sind inzwischen von dritter Seite Ergebnisse bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant sind?

Neue Konzepte der Regenerativen Medizin gewinnen zunehmend an Bedeutung. Das auf diesem Gebiet rasch erweiterte Wissen bestätigt die Schwerpunktsetzung des Kompetenzzentrums und wurde bei der Detailplanung der Teilprojekte berücksichtigt.

1.3.4 Sind oder werden Änderungen der Zielsetzung notwendig?

Nein.

1.3.5 Fortschreibung des Verwertungsplanes

Eine Fortschreibung des Verwertungsplanes war nicht erforderlich.

2. Ergebnisberichte der Teilprojekte

2.1 Projektschwerpunkt A: Bioaktive, blutkompatible Coatings

Zusammenfassung der Zielstellungen

Im Projektschwerpunkt A sollen Beschichtungen mit antikoagulanter bzw. antithrombogener Wirkung für kardiovaskuläre Implantate, medizinische Membrane, Katheter u.a. blutkontaktierende Produkte durch molekulare Biomimetik auf der Basis bisher noch nicht zur Modifizierung von Werkstoffen genutzter synthetischer Molekülarchitekturen (Gerinnungsinhibitoren – Projekt A 1) sowie durch Kopplung von gerinnungs- und thrombocytenfunktionshemmenden Wirkstoffen blutsaugender Tiere (Projekt A 2) entwickelt werden. Die Motivation für diese Arbeiten ist in der gegenwärtig teilweise noch sehr unbefriedigenden Blutkompatibilität der o.g. Medizinprodukte zu sehen. Für das komplexe Gesamtgeschehen blutinkompatibilitätsauslösender Prozesse kommt der Aktivierung der Blutgerinnung und der Adhäsion und Aktivierung von Thrombocyten eine Schlüsselstellung zu.

Basismaterialien sind in der Medizintechnik für o.g. Anwendungen bereits etablierte Polymerwerkstoffe wie Polytetrafluorethylen, Polypropylen, Polydimethylsiloxan sowie Metalle, die durch oberflächenselektive Verfahren eine Primärfunktionalisierung erhalten. Im Anschluss werden an den generierten reaktiven Materialoberflächen vorzugsweise synthetische Hydrogel-Schichten (z.B. segmentierte Polyisobutylene-Polyethylenoxid-Hydrogele; mit kopplungsfähigen terminierenden Gruppen versehene Polyethylenoxide) aufgebaut, die Möglichkeiten für die anschließende kovalente Immobilisierung von synthetischen Inhibitoren bzw. von natürlichen bzw. rekombinanten Wirkstoffen schaffen. Durch dieses Konzept wird eine Kombination der weitgehenden Vermeidung prokoagulatorischer und inflammatorischer Prozesse durch die Primärbeschichtung mit der spezifischen Inhibitorwirkung von Biomolekülen bzw. deren synthetischen Imitaten angestrebt. Die zu verfolgende Entwicklung neuartiger, synthetischer Hydrogel-Strukturen zielt auf eine deutlich verbesserte Effektivität derartiger Immobilisierungsprozesse bzw. auch auf eine genaue Kontrolle des Freisetzungsverhaltens von Biopolymeren aus oberflächengebundenen Hydrogelschichten.

Für die Evaluierung der oberflächenmodifizierten Materialien werden neben der umfassenden physikalisch-chemischen Charakterisierung und der Untersuchung von

Protein-Adsorptionsprozessen insbesondere auch *in vitro* Hämokompatibilitätstests mit humanem Vollblut herangezogen. Evaluationskriterien sind die antikoagulante bzw. antithrombogene Wirksamkeit der erzeugten Beschichtungen und der Nachweis von deren toxikologischer und immunologischer Unbedenklichkeit, weiterhin die Stabilität auf Trägermaterialien, Veränderung bei Lagerung und Sterilisierbarkeit. Mit dem Projektschwerpunkt A soll eine Plattform für die gezielte Anwendung antikoagulanter/antithrombogener und antiinflammatorischer Coatings für Medizinprodukte im Blutkontakt geschaffen werden.

2.1.1 Projekt A 1: Antikoagulante Polymere auf der Basis synthetischer Blutgerinnungsinhibitoren zur Beschichtung von blutkontaktierenden Materialien

Dr. M.-F. Gouzy, Dr. C. Sperling, Dr. K. Salchert, Dr. C. Rauwolf, Dr. C. Werner, Prof. Dr. B. Voit, Dr. F. Böhme (TPL), Institut für Polymerforschung Dresden e.V., Dr. M. Bornhäuser, Med. Klinik I, Med. Fakultät der TU Dresden, Ascalon GmbH, Berggießhübel, Membrana GmbH, Wuppertal, Pharmaceutical Projects, Pirna

Zielsetzung des Teilvorhabens

Mit dem Teilprojekt soll ein neuer Weg zu blutkompatiblen Polymerbeschichtungen beschritten werden, der die Nutzung stark wirksamer synthetischer Inhibitoren des Thrombins und anderer Blutgerinnungsenzyme als polymergebundene Blutgerinnungshemmstoffe zum Ziel hat. Dabei sollen präparative Möglichkeiten zur Implementierung des sehr effektiven Thrombinhemmstoffes NAPAP und anderer Benzamidin-Derivate über polymeranaloge Umsetzung bzw. Copolymerisation von Benzamidin-Derivaten geprüft und anhand der antikoagulativen Potenz des erhaltenen Materials bewertet werden. Aufgrund der essentiellen Bedeutung der Amidineinheit für die Wirkung der Inhibitoren werden die Arbeiten ergänzt durch die Synthese und Wirksamkeitsbewertung polymergebundener Benzamidin- und Guanidinderivate.

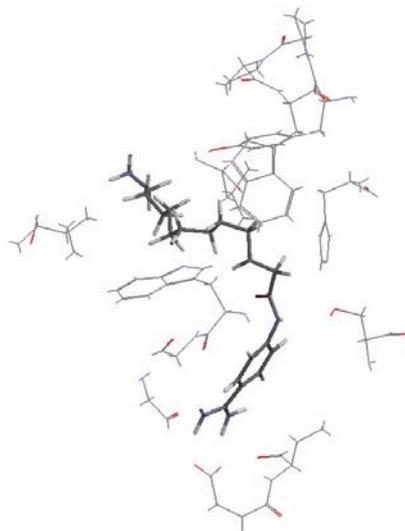


Abbildung 1

Ergebnisse der Arbeiten im Rahmen des Teilprojektes

Synthese von kopplungsfähigen Inhibitoren und Bestimmung von deren Inhibitoreigenschaften in gelöster Form

Ausgangspunkt der Untersuchungen im Rahmen dieses Teilprojektes waren Synthesearbeiten zu NAPAP-analogen Inhibitormolekülen und zu Spacer-Funktionalisierung dieser Inhibitorstrukturen für die nachfolgende Ankopplung an reaktive Oberflächen. Abb. 1 zeigt dazu exemplarisch die Syntheseroute eines NAPAP-analogen Inhibitors mit kopplungsfähiger Gruppe. Der Erfolg der Synthesearbeiten wurde ausführlich dokumentiert worauf hier nicht eingegangen wird.

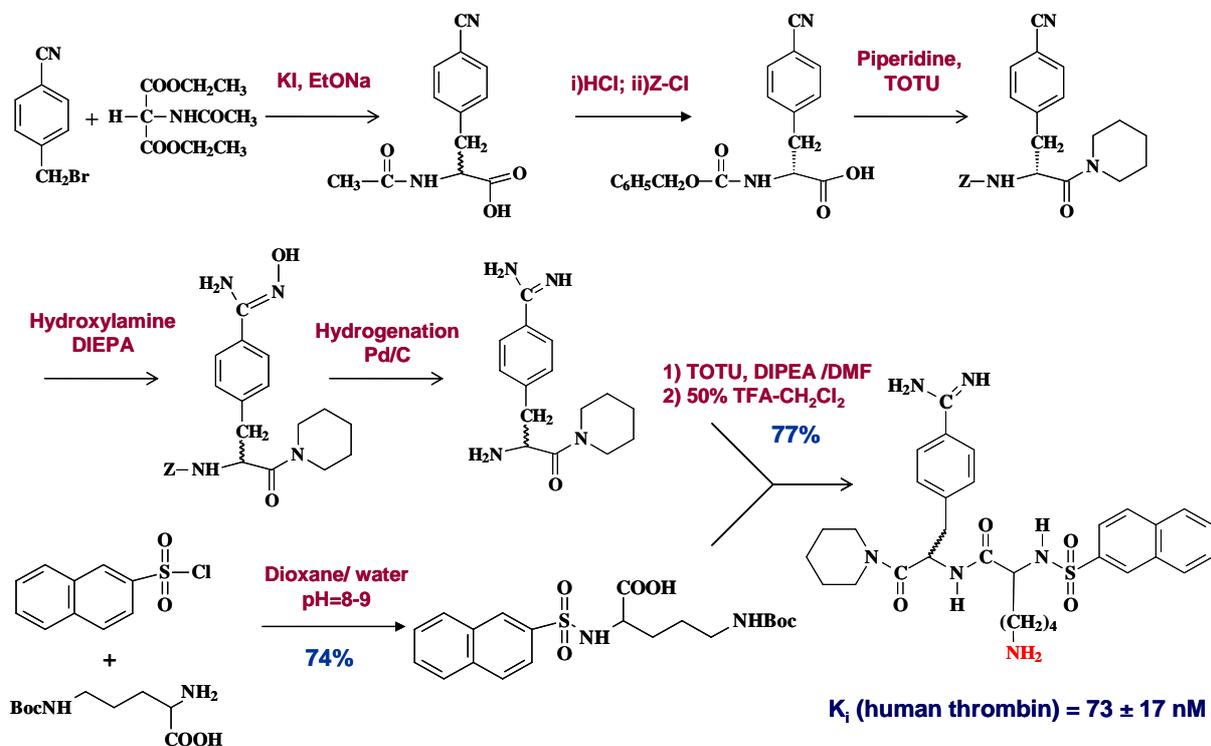


Abb. 1: Übersicht zur Synthese von kopplungsfähigen NAPAP- Derivaten

Weiterhin wurden Synthesearbeiten zur Einführung flexibler Spacer (PEG) für die Verbesserung der Zugänglichkeit und Aktivität des Inhibitors nach der Immobilisierung realisiert, exemplarisch ist eine entsprechende Umsetzung in Abb. 2 dargestellt.

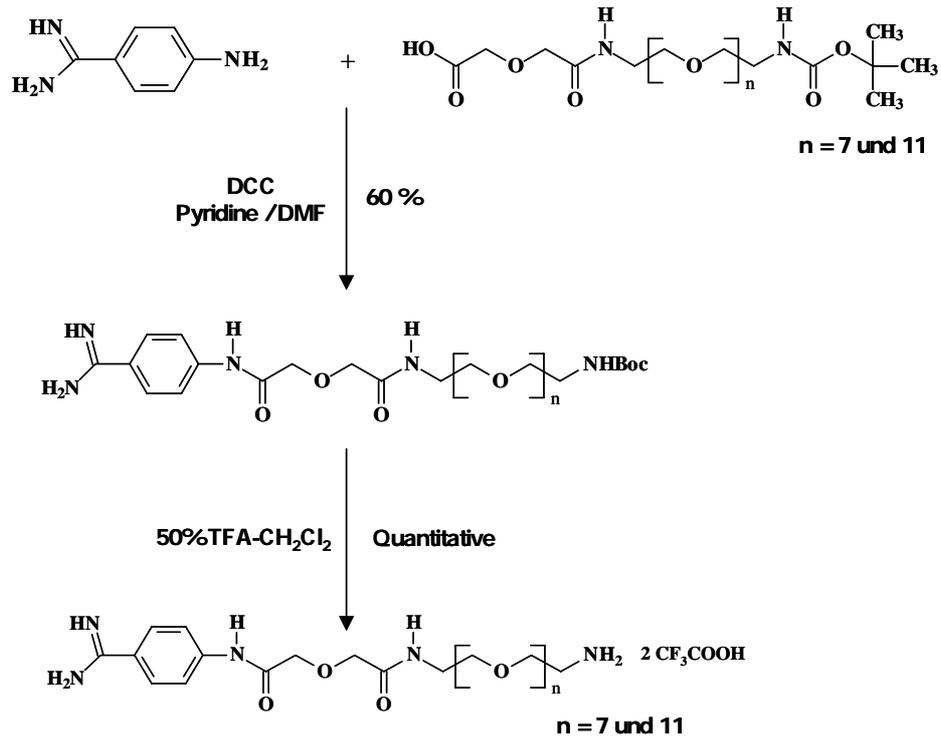


Abb. 2: Schema der Verknüpfung von Inhibitormolekülen mit Spacer-Einheiten

Die Inhibitorkonstanten der vom Benzamidin- bzw. vom Guanidin abgeleiteten Inhibitormoleküle wurden durch die Umsetzung chromogener Substrate mit Thrombin ermittelt und sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Inhibitorkonstanten der gelösten Benzamidinderivate

	R	Ki in μM		R	Ki (μM)		R	Ki (μM)		R	Ki (μM)
NAPAP	H	$0,011 \pm 0,005$	T11	H	779 ± 160	-	-	-	T16	H	-
T19	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3^+$	$0,086 \pm 0,015$	T13	$\text{CO}(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_3^+$	83 ± 17	T14	$\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3^+$	> 10.000	T17	$\text{CO}(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_3^+$	$16 \pm 7,1$
T110	$(\text{CH}_2)_4\text{NHCO}(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_3^+$	$0,015 \pm 0,006$	T15	PEG11- NH_3^+							

Voraussagen zur Effektivität der Spacer-funktionalisierten Thrombininhibitoren wurden außerdem mit Hilfe des Molecular Modelling gewonnen, dafür wurden

spezielle Programme (HyperChem) zur Erfassung des molekular-elektrostatischen Potentials herangezogen.

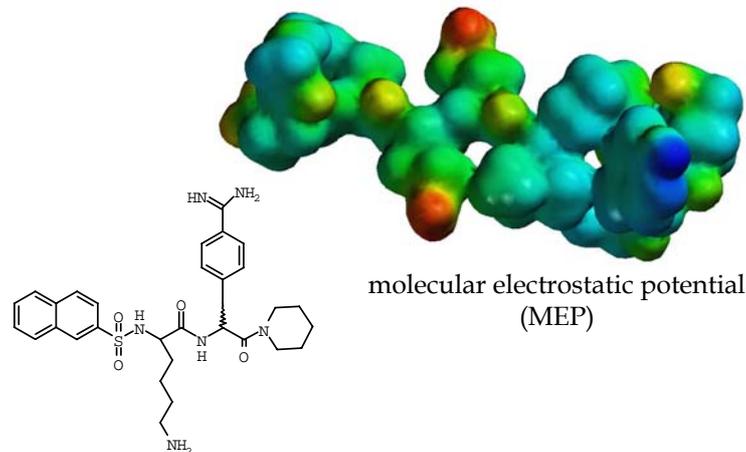


Abb. 3: Beispiel für die Bewertung der Eigenschaften kopplungsfähiger Benzamidinderivate durch Molecular Modelling (Ermittlung molekular-elektrostatischer Potentiale)

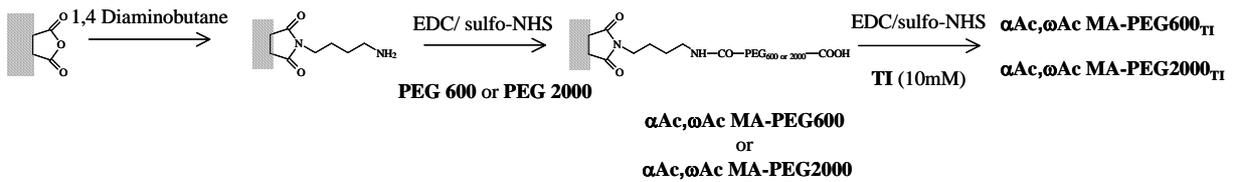
Kopplung der Inhibitoren an Oberflächen

Zur Immobilisierung der spacerfunktionalisierten Thrombininhibitoren wird eine Primärbeschichtung der zu modifizierenden Materialien durch kovalent angebundene dünne Filme von Poly(octadecen-*alt*-maleinsäureanhydrid) (PO-MA) oder Poly(propylen-*alt*-maleinsäureanhydrid) (PP-MA, Hydrophile Schichten) bzw. anderer Copolymere dieser Familie realisiert (siehe auch Teilprojekt A2).

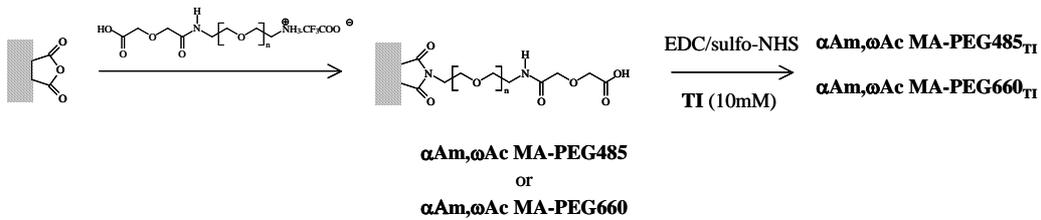
Dabei wurden entweder mit dem Inhibitor bereits verknüpfte Poly(ethylenglycol) Spacer oder mit diesem Spacersystem funktionalisierte Oberflächen (Abb. 4) zur Kopplung herangezogen.

Dieses Verfahren erwies sich als sehr vielseitig auf verschiedenste Basismaterialien nach Amin-Funktionalisierung (z.B. durch Niederdruckplasma-Behandlung in ammoniakalischen Atmosphären) anwendbar (erprobt wurden PET, PTFE, PDMS). Die systematische Charakterisierung der Inhibitor-beschichteten Copolymerfilme durch XPS und Ellipsometrie wurde durch die quantitative Auswertung der XPS-Daten zur Ermittlung der auf anderem Weg nur schwer zugänglichen Oberflächenkonzentration der gekoppelten Thrombininhibitoren untersetzt (Abb. 5).

1) Immobilisierung mit PEG 600 und PEG 2000



2) Immobilisierung mit PEG 485 (n=7) und PEG 660 (n=11)



MA = poly(octadecen (PO) oder polypropylen (PP))- alt maleinsaeure anhydride copolymer

Abb. 4: Schematische Darstellung der Funktionalisierung reaktiver Oberflächen mit PEG-Spacern

	Film thickness (nm)	Elemental atomic concentration (XPS measurements)			
		(n = 1.503)			
		%C 1s	%O 1s	%N 1s	%Si 2p
PO-MA	4.0	53.1	30.0	0.7	10.9
PO_{TI}	7.2	68.8	18.3	5.2	6.8
PO-PEG	7.9	58.0	25.5	1.1	15.1
PO-PEG_{TI}	10.1	69.2	18.1	4.9	6.7

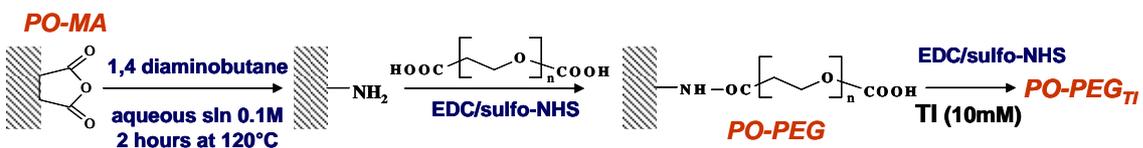


Abb. 5: Übersicht zur angewandten Oberflächenanalytik für die Charakterisierung von Inhibitor-funktionalisierten Maleinsäureanhydrid-Copolymerfilmen

Um die erfolgreiche Derivatisierung der Polymerfilme nachzuweisen, wurden insbesondere Röntgenphotoelektronenspektren (XPS) der Proben mit und ohne Modifizierung der Schichten analysiert da auf dieser Basis -unter Einbeziehung der Änderung der Schichtdicke (mittels Ellipsometrie erfasst)- eine Quantifizierung der gebundenen Inhibitoren erfolgen kann.

Tabelle 2: Ergebnisse ellipsometrisch bestimmter Schichtdickenänderungen und Oberflächen-Elementverteilungen nach Ankopplung verschiedener Inhibitoren an PP-MA

	Filmdicken (nm)	Elementare Zusammensetzung (mit XPS gemessen)			
		%C 1s	%O 1s	%N 1s	%Si 2p
PP-MA	-	53.4	32.7	0.5	13:4
PP-MA+TI3	0.4 ±0.1	50.7	32.6	2.4	14.3
PP-MA+TI7	2.4 ± 0.4	62.2	22.5	6.1	9.1
PP-MA+TI1 ^(a)	2.4 ± 0.4	67.2	21.3	5.8	5.2

Thrombin scavenging

Für den Nachweis des Einflusses immobilisierter synthetischer Thrombininhibitoren auf die Bindung von Thrombin wurden Oberflächen mit dünnen Filmen von Poly(octadecen-*alt*-maleinsäureanhydrid) (PO-MA, Hydrophobe Schichten) und Poly(propylen-*alt*-maleinsäureanhydrid) (PP-MA, Hydrophile Schichten) Copolymere auf gereinigten und aminosilanisierten Siliziumwafern/Deckgläschen angefertigt. Um die Erreichbarkeit des Thrombininhibitors zu erhöhen wurden Polyethylenglycol Spacer verwendet. PEG-Spacer wurden aufgrund ihrer Hydrophilie und ausgeprägten Flexibilität in wässrigem Milieu ausgewählt.

Die Menge des an der Oberfläche adsorbierten bzw. gebundenen Thrombin wurde unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern (AK1: polyklonaler Antikörper (Schaf) für humanes Thrombin; AK2: sekundärer Antikörper Anti-Schaf, TRITC-markiert) im Laser Scanning Cytometer bestimmt. Die Bindung von Thrombin an den modifizierten Oberflächen wurde auch durch einen chromogenen Assay entsprechend der Bestimmung der Inhibitorkonstanten in Lösung nachgewiesen.

Dabei wird die Umsetzung des chromogenen Substrates in der nach dem Kontakt mit der Oberfläche mehr oder weniger verarmten Lösung bestimmt. Die Resultate der Bindung von Thrombin an auf PP-MSA immobilisierten TI 1 sind in Abbildung 6 dargestellt (jeweils 6 Proben wurden als Doppelbestimmung gemessen). Die verminderte Freisetzung von p-Nitroanilin aus dem chromogenen Substrat nach dem Kontakt mit der TI1 immobilisierten Oberfläche im Vergleich zur nicht modifizierten Oberfläche PP-MSA konnte gezeigt werden.

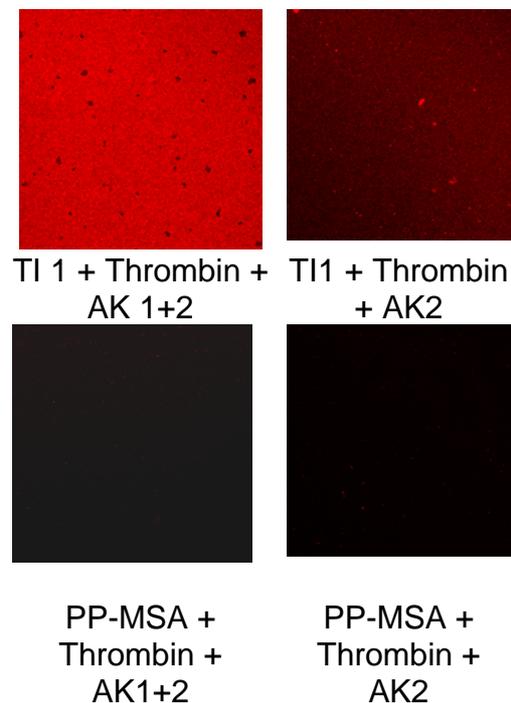


Abb. 6: Ergebnisse des Aktivitätsnachweises an TI1 durch Immunofluoreszenz zur Bestimmung der Thrombin- Anbindung

Eine deutlich stärkere Bindung von Thrombin an der Oberfläche konnte auch fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Nur bei der Inkubation der Antikörper auf der mit TI 1 immobilisierten Oberfläche konnte eine deutlich sichtbare Fluoreszenz an der Oberfläche festgestellt werden.

Ausgehend von diesem Experiment wurden auch verschiedene Polymersubstrate für die Kopplung eines Inhibitors verglichen (Abb. 7). Es war abzuleiten dass die Adsorption von Thrombin von der Hydrophobizität der Polymerschicht und auch von der Struktur der PEG-Spacer abhängig ist.

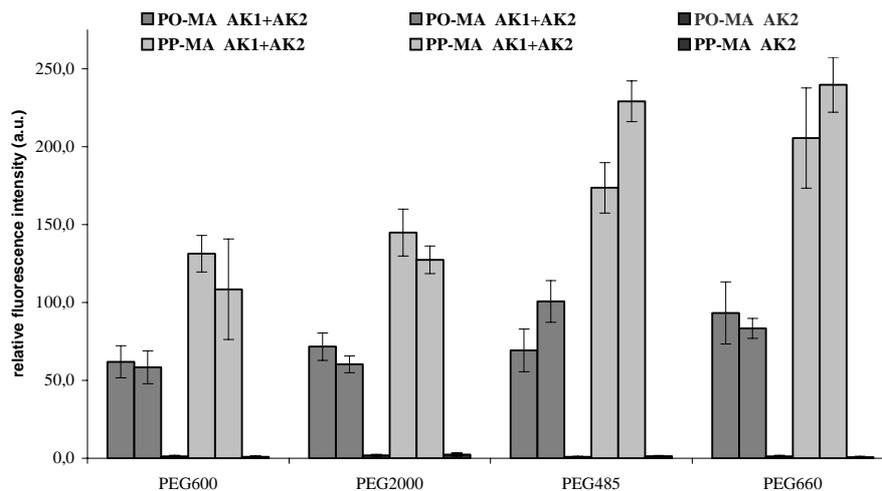


Abb. 7: Vergleich der Adsorption von (fluoreszenzmarkiertem) Thrombin an Inhibitor-funktionalisierten Oberflächen mit verschiedenen Basispolymeren bzw. PEG-Spacern

Nachweis der Wirksamkeit der Inhibitor-Beschichtungen durch Blutinkubationsexperimente

Die Thrombin-Inhibierung durch die mit verschiedenen Inhibitoren funktionalisierten Polymerschichten wurde nach deren Inkubation mit Vollblut anhand der durch Immunoassay erfassten Parameter für Gerinnungsaktivierung (Thrombin-Antithrombin-Komplex), Thrombocytenaktivierung (Adhäsion, Freisetzung von Plättchenfaktor 4) bewertet. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Verminderung des Aktivierungspotentials der mit Inhibitoren beschichteten Oberflächen.

Die Inhibitoren wurden dazu mit frisch gewonnenem humanem Vollblut *in vitro* inkubiert. Spezielle Inkubationskammern wurden mit Blut (Antikoagulation: Heparin (2 IU/ml)) luftfrei gefüllt. Während des Versuchs (37°C, 2h) wurden die Kammern rotiert, um eine Sedimentation der Zellen zu verhindern. Anschließend wurde das Blut auf Änderungen der Marker für die Aktivierung der Blutgerinnungskaskade (Thrombin-Antithrombin Komplex, TAT), die Aktivierung des Immunsystems (Komplementfragment C5a) und die Aktivierung der Thrombozyten (Plättchenfaktor 4, PF4) untersucht. Die Resultate der ELISA -Tests, die zur Quantifizierung der genannten Substanzen benutzt wurden, sind in Abb. 8 zusammengefasst. Wir konnten zeigen, dass die Immobilisierung eines Thrombininhibitors in einer Reduzierung der Aktivierung der Gerinnungskaskade sowie der Thrombozyten im Vergleich zu den Referenzmaterialien resultiert. Die Aktivierung der

Komplementkaskade weist allgemein ein sehr niedriges Niveau auf. Die Konzentration von Komplementfragment C5a im Plasma liegt bei den immobilisierten Proben zwischen den Werten für die Referenzmaterialien PTFE und Glas.

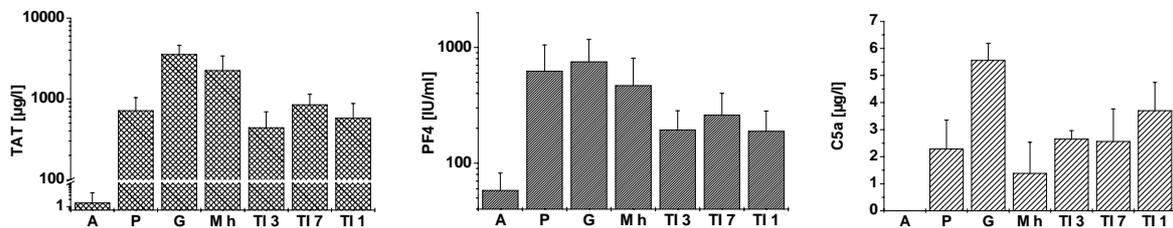


Abb. 8: Konzentration von Thrombin-Antithrombin-Komplex TAT (links), Plättchenfaktor 4 PF4 (Mitte) und Komplementfragment C5a (recht) im Blutplasma vor (A) und nach der Blutinkubation der verschiedenen Oberflächen für 2 Stunden. Als allgemeine Referenz im Hämokompatibilitätstest dient Glas (G) Poly(tetrafluoroethylen) (P) und hydrolisierte PP-MA (Mh). Die Resultate sind mit \pm Standardabweichung dargestellt.

Zusätzlich wurde die Konzentration des terminalen Komplementkomplexes C5b-9 an der Oberfläche bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dokumentiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Adsorption des terminalen Komplementkomplexes bei den immobilisierten Proben verringert ist.

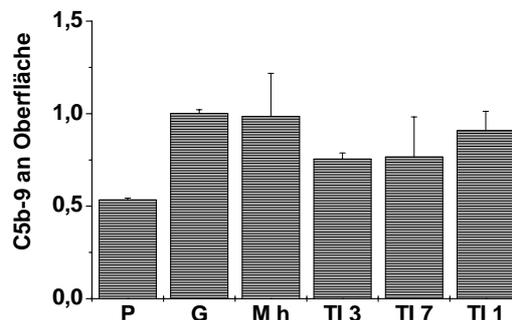
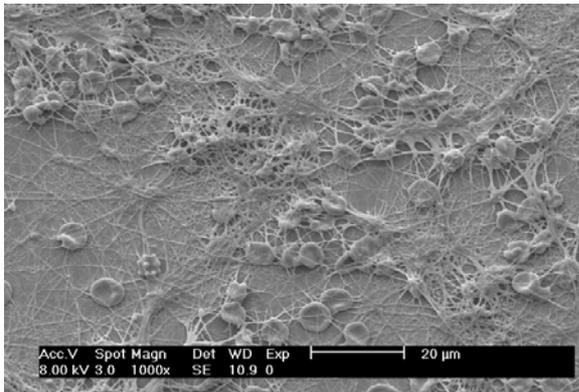
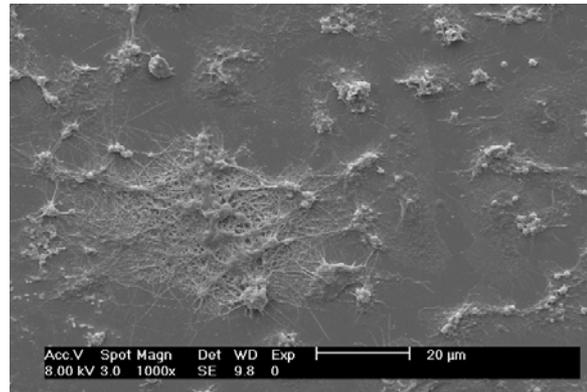


Abb. 9: Terminaler Komplementkomplex C5b-9 an der Oberfläche. Nachweis mit Horseradishmarkiertem Antikörper und photometrischer Bestimmung (450 nm) des Substratumsatzes. Angabe des relativen Wertes bezüglich der Referenz Glas (=1,0)

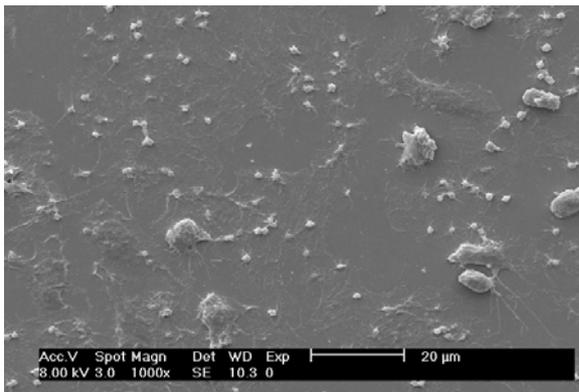
Auch anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen der Polymerschichten nach Blutkontakt konnte das antikoagulante Potential der Inhibitor-funktionalisierten Schichten klar gezeigt werden (Abb. 10). Die Ablagerung von Fibrin sowie von Thrombocyten ist durch die Funktionalisierung der Polymerfilme mit Inhibitoren deutlich reduziert.



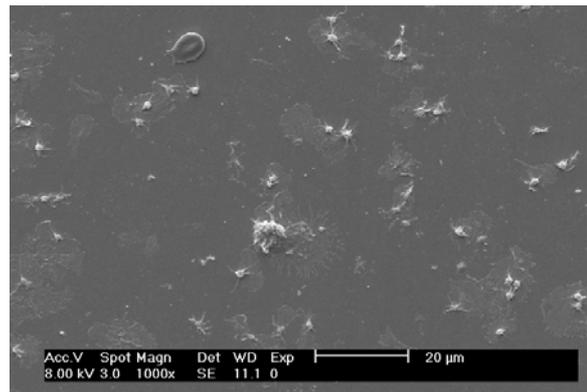
POMA (hydrolisiert)



POMA-PEG



POMA-TI1



POMA-PEG-TI1

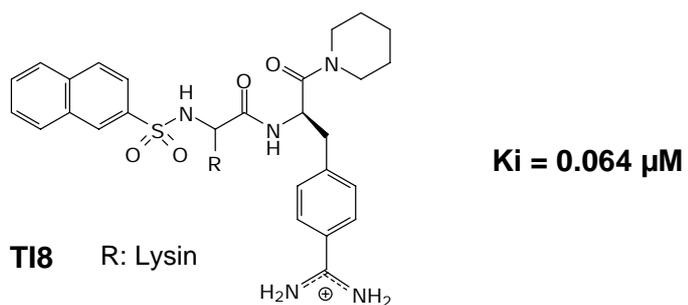
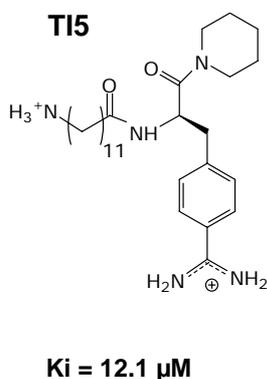
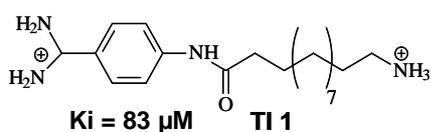
Abb. 10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von PO-MA- Oberflächen mit/ ohne Funktionalisierung nach 2h Inkubation mit humanem Vollblut

Untersuchung der Wechselwirkung der Inhibitoren mit Faktor Xa

Im Anschluss an die Arbeiten zur Darstellung verschiedener kleinmolekularer synthetischer Inhibitoren von Gerinnungsenzymen auf Benzamidinbasis und deren kovalenten Kopplung an reaktive Oberflächen (alternierende Copolymere des Maleinsäureanhydrids) wurden Experimente zur Wechselwirkung von Faktor Xa mit den durch verschiedene Inhibitoren funktionalisierten Oberflächen realisiert.

Für die gelösten Inhibitoren war festzustellen dass es eine Korrelation von besserer Inhibitorwirkung gegenüber Thrombin und geringerer Inhibitorwirkung gegenüber Faktor Xa gibt: Kleinere Inhibitorstrukturen wie das unmodifizierte Paraaminobenzamidin zeigen eine insgesamt geringere Inhibitorwirkung jedoch gleichermaßen gegenüber verschiedenen Gerinnungsenzymen; spezifischer auf das aktive Zentrum von Thrombin angepasste Inhibitoren weisen dagegen kaum Inhibitoreigenschaften gegen andere Gerinnungsenzyme wie Faktor Xa auf. Daraus war zu folgern, dass eine relativ gute Wirkung von strukturell sehr einfachen Benzamidin-basierenden Inhibitoren neben der Beeinflussung von Thrombin auch auf die Hemmung (in der Blutgerinnungskaskade) „früherer“ Enzyme zurückgehen kann während für die größeren Inhibitorstrukturen lediglich die Wirkung gegenüber Thrombin in Betracht zu ziehen ist.

In jedem Fall wird die Wirkung der Inhibitoren als Komponente von Beschichtungen stark durch deren Verfügbarkeit beeinflusst. Diese Verfügbarkeit kann als Funktion der Orientierung des Inhibitormoleküles an der Oberfläche, seines Abstands zum Träger, sowie der sekundären Belegung der aktiven Schicht mit unspezifisch angelagerten Biopolymeren verstanden werden. Um dies experimentell zu prüfen wurde die Anbindung verschiedener Gerinnungsenzyme an immobilisierte Inhibitoren durch monoklonale Antikörper untersucht. Abbildung 11a zeigt die so erfasste Anbindung von Thrombin, Abbildung 11b die entsprechende Wechselwirkung der gleichen Substrate mit Faktor Xa.



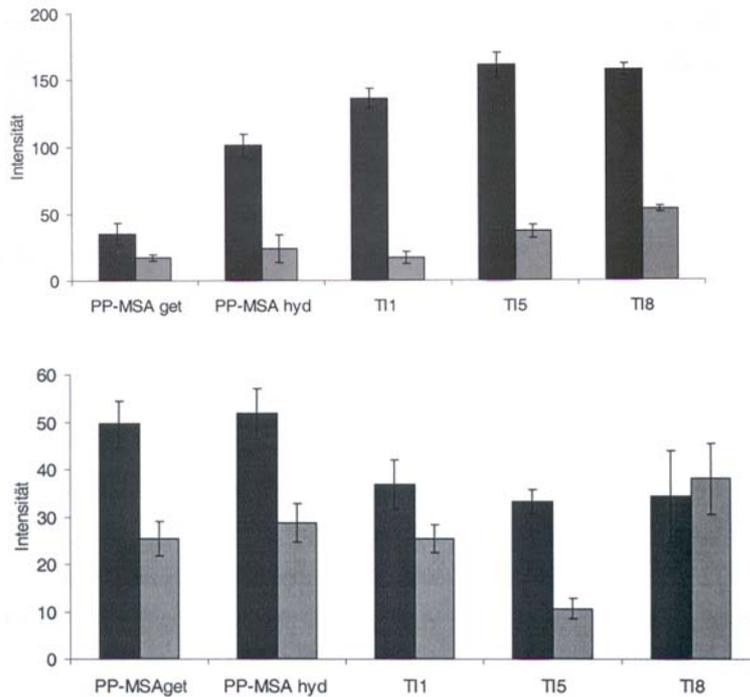


Abbildung 11: Nachweis der Verfügbarkeit von verschiedenen an Poly(propen *alt* maleinsäureanhydrid) Oberflächen immobilisierten Inhibitormolekülen. Oben (11a): Anbindung von Thrombin; Unten (11b): Anbindung von Faktor Xa (graue Säulen zeigen jeweils Referenzwerte für die Anbindung des Antikörpers ohne vorherige Beladung der Oberflächen mit den Gerinnungsenzymen)

Die Ergebnisse des Vergleichs machen deutlich dass lediglich für Thrombin eine Wechselwirkung mit immobilisierten Inhibitoren gefunden werden kann. Da für die verwendeten Inhibitormoleküle im gelösten Zustand jedoch eine Wechselwirkung auch mit Faktor Xa gefunden wurde deutet dieses Ergebnis darauf hin dass die Verfügbarkeit der immobilisierten Inhibitoren gegenüber Faktor Xa deutlich eingeschränkt ist. Als wahrscheinlichste Ursache ist hierfür die unterschiedliche Struktur der Gerinnungsenzyme (Thrombin u. Faktor Xa) zu nennen. Die Nutzung der Affinität der hier untersuchten Inhibitoren gegenüber Faktor Xa kann daher - zumindest bei Verwendung der hier verwendeten Substrat/Spacer-Systeme- nicht als aussichtsreich angesehen werden.

Synthese von Copolymeren der Benzamidin-Typ Inhibitormoleküle

In Anknüpfung an Arbeiten im Rahmen des TP A2 wurden thermoresponsive Polymere synthetisiert, die Benzamidin-Inhibitormoleküle als Co-Monomere

enthalten. Dazu wurden zunächst Derivate von Benzamidin mit einer polymerisierbaren funktionellen Gruppe hergestellt und diese dann in Co-polymere mit N-Isopropylacrylamid (NiPPam) eingebaut (s. Abb. 12). Eine eingehende Untersuchung dieser Polymere als Dünnschichten konnte im Rahmen des Projektes nicht mehr erfolgen, stellt jedoch eine interessante Option für weiterführende Arbeiten dar.

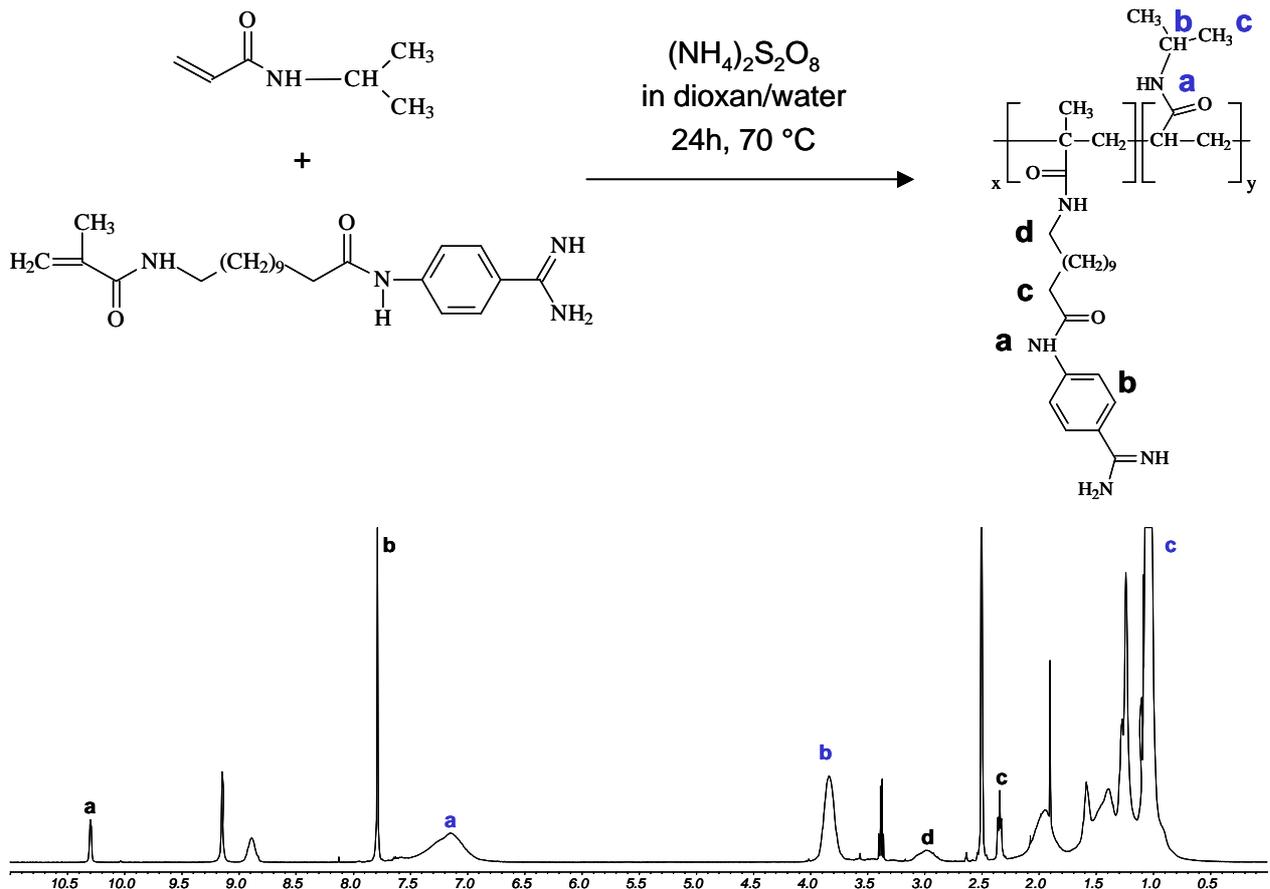


Abbildung 6

Abb. 12: Copolymere mit verschiedenem x/y Verhältnis ($x/y=0.2/0.8$; $0.1/0.9$ und $0.015/0.985$) wurden synthetisiert und mittels ^1H NMR charakterisiert. Abb. 6 zeigt als ein Beispiel das ^1H NMR-Spektrum des Moleküls $x=0.1$ und $y=0.9$. Das Spektrum zeigt eindeutig die Identität und Reinheit des Produktes.

Copolymere mit verschiedenem x/y Verhältnis ($x/y=0.2/0.8$; $0.1/0.9$, $0.05/0.95$ bzw. $0.015/0.985$) wurden durch freie radikalische Polymerisation synthetisiert. Die Eigenschaften der synthetisierten Polymere sind in der folgenden Tabelle gezeigt.

Tabelle 3: Eigenschaften Benzamidin-haltiger, thermoresponsiver Copolymere

Bezeichnung	Zusammensetzung BENZ 11/NIPAAm (molares Verhältnis)	M_n^*	M_w^*	Verteilung (M_w/ M_n)
SM 29	20/80	15000	57500	3.8
MFG 226	10/90	18000	51000	2.7
MFG 224	5/95	Nicht in DMAc löslich		
MFG 243	1.5/98.5	21000	50000	2.4

Bezeichnung	Zusammensetzung BENZ 11/NIPAAm (molares Verhältnis)	M_n^*	M_w^*	
MFG 234	10/90	12000	50500	4.2
MFG 236	5/95	43000	150500	3.5
MFG 242	1.5/98.5	32500	78000	2.4

*gemessen mittels GPC, Standard PVP

Ein Projektantrag zu einem Verbundvorhaben mit der Firma Membrana GmbH, Wuppertal, (Molekulare Steuerung von Trenneigenschaften und Biokompatibilität an Polymermembranen für medizinische Anwendungen) mit dem insbesondere die im letzten Teil dieses Berichtes zusammengefassten Forschungen des TP A1 genutzt und ausgeweitet werden, wurde erarbeitet und dem Projektträger übermittelt.

Projekt A 2: Blutkompatible Materialoberflächen durch kovalente Immobilisierung rekombinanter Blutgerinnungsinhibitoren und Thrombocytenfunktionshemmern in Hydrogel-Beschichtungen

Dr. S. Zschoche, Dr. M. Nitschke, Dr. C. Sperling, Dr. K. Salchert, Dr. C. Werner, Prof. Dr. B. Voit (TPL), Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V., Dr. M. Bornhäuser, Med. Klinik I, Med. Fakultät der TU Dresden, Merck KGaA, Darmstadt, Biotronik GmbH, Berlin, Membrana GmbH, Wuppertal, Pharmaceutical Projects, Pirna

Zielsetzung des Teilvorhabens

Ziele des Teilvorhabens sind sowohl die Erweiterung des Spektrums der für blutkompatible Coatings eingesetzten antikoagulanten bzw. antithrombogenen Biomoleküle als auch die Entwicklung von hinsichtlich geringster Beeinträchtigung des Biosystems und funktionsschonender Kopplung der Inhibitoren anpassbarer Primärbeschichtungen.

Dazu erfolgt im Rahmen des Projektes

- die Funktionalisierung von ausgewählten Basismaterialien (PTFE, PUR) durch delaminationsstabile Hydrogel-Beschichtung (Polyacrylsäure, PEO-acrylate, segmentierte, PEO-haltige Copolymere) sowie umfassende Charakterisierung der modifizierten Oberflächen/Beschichtungen.
- die kovalente Immobilisierung von natürlich vorkommenden Thrombin-Inhibitoren und Thrombocytenaggregationsinhibitoren.
- die kovalente Immobilisierung von in blutsaugenden Parasiten vorkommenden Inhibitoren von anderen Gerinnungsfaktoren (insbes. Faktor Xa Inhibitoren).
- die Bewertung der gerinnungshemmenden Wirkung der erzeugten Materialien durch Inkubation mit humanem Vollblut *in vitro*.

Ergebnisse der Arbeiten im Rahmen des Teilprojektes

Beschichtung von verschiedenen Basismaterialien durch Polymer-Hydrogele für die nachfolgende Funktionalisierung durch Blutgerinnungsinhibitoren und Thrombocytenfunktionshemmer

Zur Hydrogel-Beschichtung verschiedenster Basismaterialien wurden einerseits Beschichtungstechniken auf Basis reaktiver Maleinsäureanhydrid-Copolymere und deren nachfolgender Umsetzung zur biomolekularen Oberflächenfunktionalisierung (durch kovalente Ankopplung von Proteinen oder Umsetzung mit Amin-

/Carbonsäure-terminierten Polyethylenoxiden mit Spacern für die nachfolgende Proteinankopplung, z.B. von Thrombomodulin) entwickelt, andererseits wurden Möglichkeiten zur Immobilisierung synthetischer Hydrogel-Polymere an verschiedenen Basismaterialien mit Hilfe der Niederdruck-Plasma- oder Elektronenstrahl-Behandlung untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Anwendung der Elektronenstrahlbehandlung als Vernetzungstechnik hinsichtlich des Erhalts der chemischen Integrität der Hydrogel-Polymere sowie der Gewährleistung von deren Quellbarkeit im oberflächengebundenen Zustand sehr vorteilhaft ist. Die Charakteristik der durch die verschiedenen Vernetzungstechniken immobilisierten Gelschichten wurde umfassend analytisch untersucht (Quellung in Elektrolytlösungen verschiedener pH-Werte, Ladungscharakterisierung, Beladung mit Modellproteinen). Abb. 1 zeigt das Vorgehen zur Elektronstrahl-Fixierung voradsorbierter Hydrogelschichten, Abb. 2 und Tab. 1 fassen exemplarisch Ergebnisse der Schichtcharakterisierung von in dieser Weise auf Polyethylenterephthalat-Trägermaterialien immobilisierten Polyvinylpyrrolidon-Hydrogelschichten zusammen.

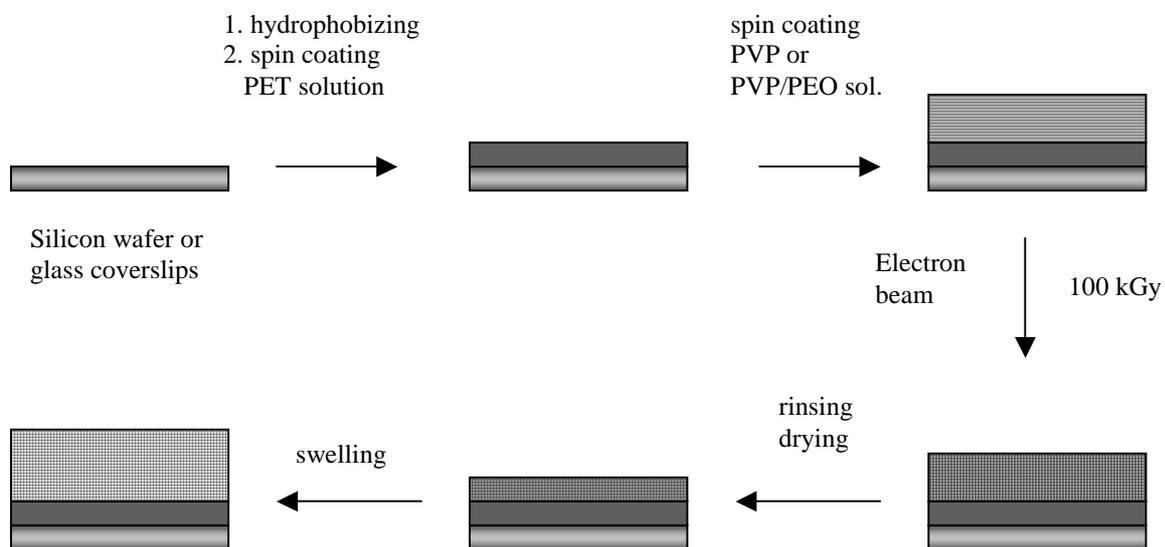
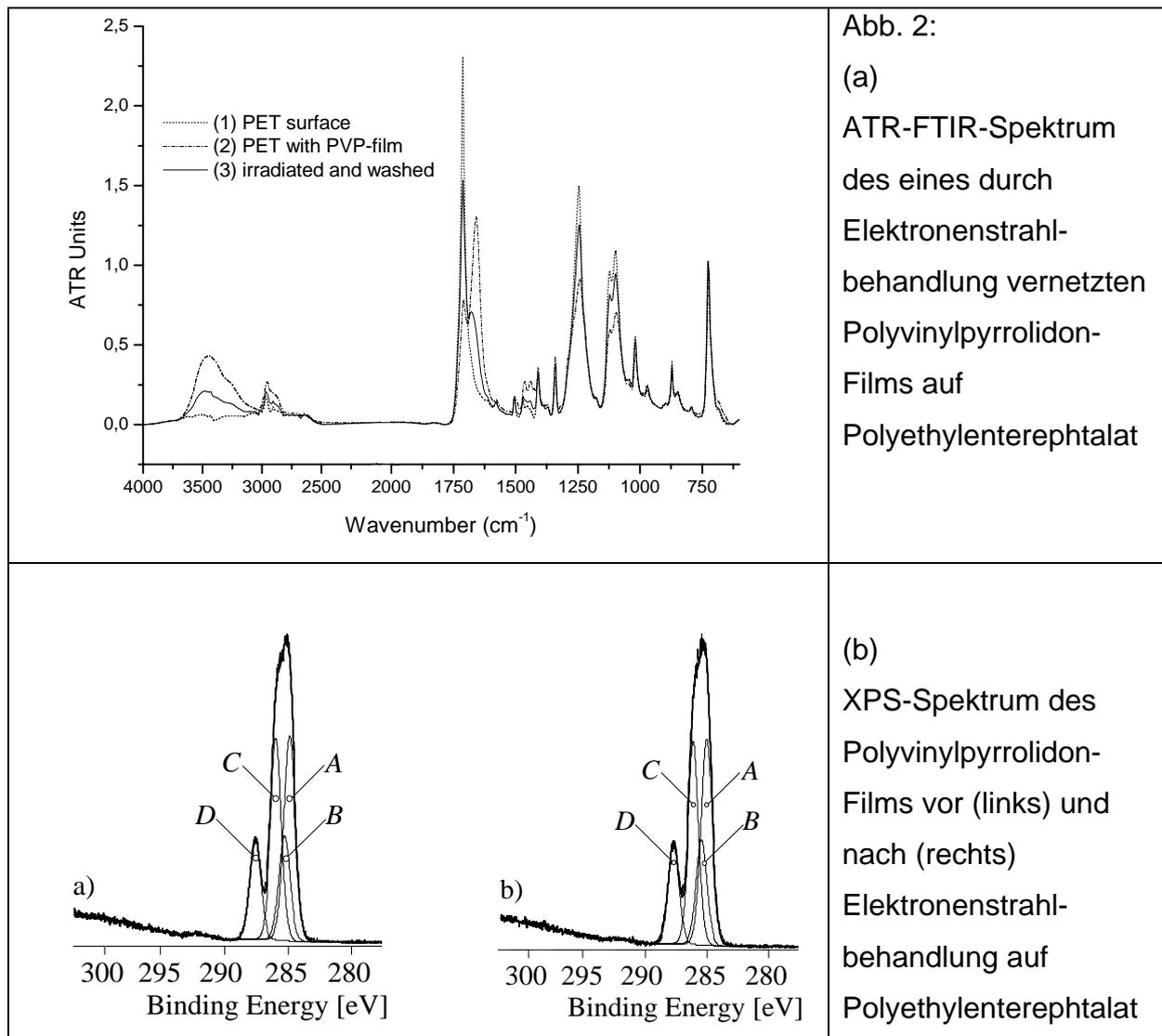


Abb. 1: Schematische Darstellung des Ablaufs der Elektronstrahl-Fixierung voradsorbierter Hydrogelschichten



Tab. 1: Schichtdickenbestimmung von Polyvinylpyrrolidonfilmen auf Polyethylenterephtalat durch Ellipsometrie und AFM (Kraft-Abstandsmessungen)- die Ergebnisse belegen in guter Übereinstimmung die uneingeschränkte Quellbarkeit der durch Elektronenstrahlbehandlung fixierten Schicht

	Brechungsindex x n (630 nm)	Schichtdicke [nm] (Ellipsometrie)	Schichtdicke [nm] (AFM)
PVP gequollen	1.35	365	378
PVP trocken	1.50	53	52

Mit Hilfe der Niederdruckplasma-Behandlung wurden drei in der Medizintechnik häufig verwendete Polymere (PTFE, PP und PET) mit anionischen (Polyacrylsäure), kationischen (Polystyren-Dimethylaminopropylamin) und nichtionischen (Polyvinylpyrrolidon) Hydrogelschichten in einer Schichtdicke von 10 bis 15 nm (solution casting) beschichtet. Durch die Anpassung der Parameter der zur Fixierung der Schichten durchgeführten (Argon) Plasmabehandlung, konnte eine hervorragende Stabilität der Schichten gegen Delamination in wässrigen Lösungen bzw. Biofluids erreicht werden. Gleichzeitig belegen oberflächenspektroskopische Untersuchungen die sehr weitgehende Erhaltung der chemischen Struktur der immobilisierten Hydrogel-Polymere. Ausgewählte Schichtsysteme werden gegenwärtig für die Kopplung von Hirudin u.a. Inhibitormolekülen angewandt.

Abb.3: Mikroglider-Aufnahme

einer durch

Niederdruckplasma-

Behandlung auf

Polyethylenterephthalat-

Oberfläche fixierten

Polyacrylsäureschicht. - Zur

Verdeutlichung der Wirkung

der Plasmabehandlung wurde

die Schicht bei der Behandlung

mit ein TEM-Netz

abgeschattet, die abgedeckten

(nicht fixierten) Bereiche der

Schicht vor der Messung durch

Spülen entfernt.



Kantenlänge des Bildes 3 mm, maximale

Konturhöhe der durch das TEM-Netz erzeugten

Struktur 18 nm

Einen Schwerpunkt der analytischen Charakterisierung oberflächengebundener Hydrogelschichten bildete die Untersuchung des Quellungsverhaltens in wässrigen Elektrolytlösungen, wofür neue Möglichkeiten zur Erfassung von Quellungszuständen in Elektrolytlösungen variierter Eigenschaften erschlossen werden konnten. Exemplarisch zeigt Abb. 4 die kombinierte Erfassung von Ladungszustand und Schichtausdehnung an auf Polyethylenterephthalat (PET)-

Trägern durch Elektronenstrahlbehandlung immobilisierten Polyvinylpyrrolidon (PVP)-Schichten.

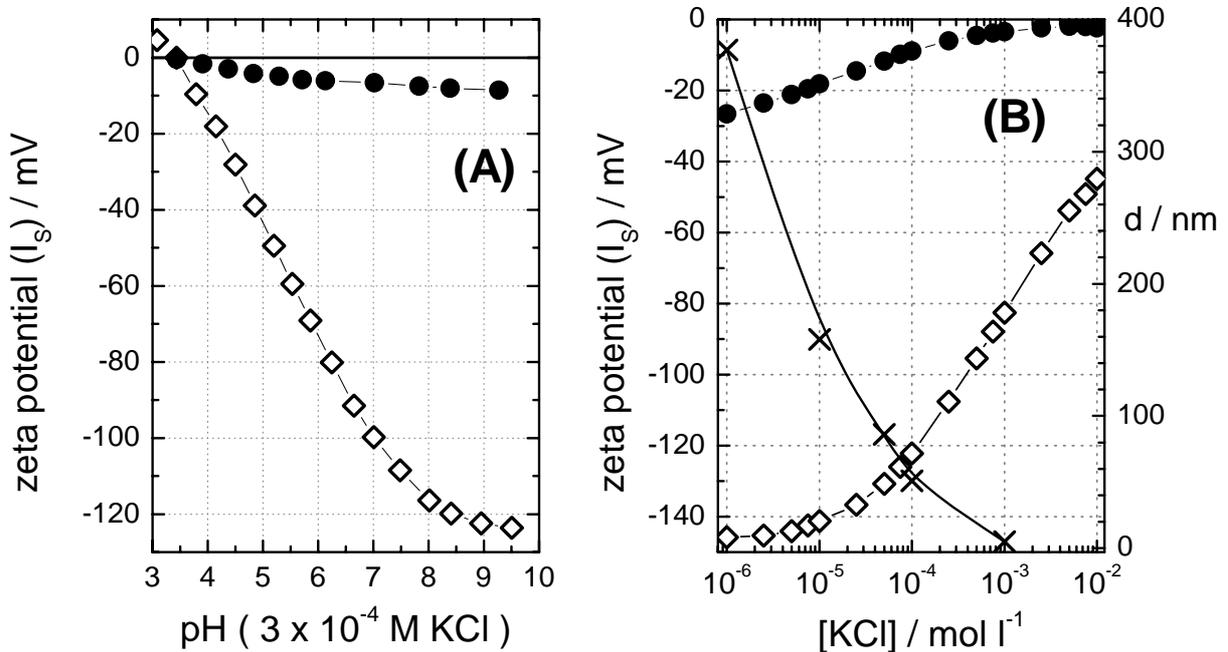


Abb. 4: Zeta-Potentiale (aus Strömungsstrommessungen) vs pH in 3×10^{-4} M KCl-Lösungen (A) und vs KCl Konzentration (B) des unmodifizierten PET (\diamond) und einer durch Elektronenstrahlbehandlung vernetzten PVP- Hydrogelschicht auf PET (\bullet), Rechte Achse in (B): aus elektrokinetischen Messungen abgeleitete hydrodynamische Schichtdicke (\times).

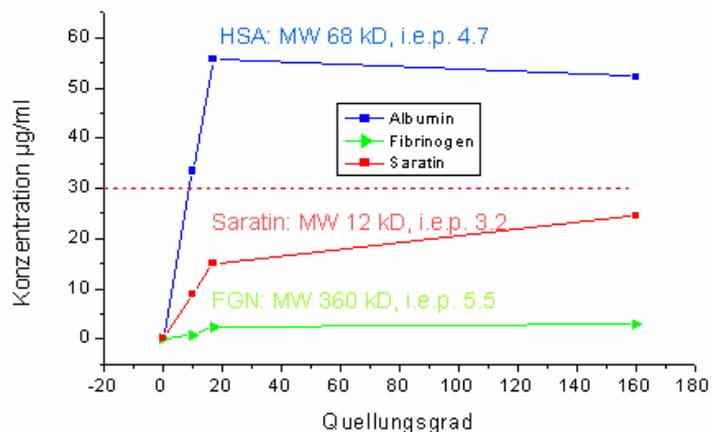
Im Ergebnis der Arbeiten zu diesem Teilvorhaben können verschiedenste Hydrogelpolymere (Polyacrylsäure, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenglycol u.a.) nach adsorptiver Beschichtung durch Plasmabehandlung bzw. Elektronenstrahlbehandlung auf verschiedensten Polymer-Basismaterialien delaminationsstabil immobilisiert und in ihren Netzwerkeigenschaften an die Erfordernisse der Anwendung angepasst werden.

Weiterhin wurden Hydrogelschichten mit Hilfe von Makroinitiatoren auf Basis von Poly(octadecen-alt-maleinsäureanhydrid) zur Beschichtung von kommerziell erhältlichen Ballonkathetern durchgeführt, die zur tierexperimentellen Prüfung eines neuen Konzepts für die Vermeidung der Restenose bei der Anwendung von

Gefäßstützen dienen. Dabei kam ebenfalls der Thrombocytenadhäsionshemmstoff Saratin zum Einsatz, die Netzwerkcharakteristik und Schichtdicke des Hydrogels wurde auf die gewünschte rasche Freisetzung des Inhibitors angepasst. Modelluntersuchungen zum Zusammenhang zwischen Vernetzungsdichte, Quellbarkeit und Protein-Aufnahme bzw. -Freisetzung wurden begleitend anhand von Hydrogel-Volumenkörpern und fluoreszenzgelabelten Modellproteinen durchgeführt.

Abb. 5: Aufnahme fluoreszenzgelabelter Proteine unterschiedlicher Größe in Polyacrylsäure-Hydrogelen verschiedener Vernetzungs- (Quellungs-) grade

Quellungsgrad (Vernetzungsgrad) vs. Aufnahme von Albumin, Saratin und Fibrinogen



Hämokompatibilitätsuntersuchungen

Untersuchung relevanter Reaktionen bei der Auslösung der Gerinnungsaktivierung an Glas und PTFE

Die Anforderungen an hämokompatible Materialien sind weit gefächert und umfassen ein breites Spektrum relevanter Oberflächeneigenschaften. Ein wichtiger Aspekt ist die Frage in welchem Umfang eine Aktivierung der Blutgerinnungskaskade erfolgt. Um relevante Oberflächeneigenschaften definieren zu können sollten die auslösenden Faktoren bekannt sein. Lange Zeit war die Aktivierung des Kontaktsystems über eine Adhäsion und nachfolgende Autokatalyse von Faktor XIIIa als entscheidend angesehen worden. Verschiedene Versuche sowie klinische Beobachtungen ließen jedoch Zweifel an dieser Theorie aufkommen. Die prominente Rollen von Tissue Factor (TF) bei der Auslösung der Blutgerinnung steht *in vivo* mittlerweile außer Zweifel. Die Rolle von TF *in vitro* ist noch nicht hinreichend geklärt worden. Da bei den *in vitro* Versuchen keine Freisetzung von TF aus dem Gewebe erfolgen kann kommt nur die Freisetzung aus Leuko- bzw. Thrombozyten in Frage.

Beide Möglichkeiten wurden nachgewiesen – allerdings sind Einflussfaktoren wie Medium (Blut oder Kulturmedium), zugesetzte Substanzen und Inkubationszeiten zu beachten. Als Vorversuch zu diesem Themenkomplex erfolgte eine Inkubation (1 h, Heparin 1,5 IU/ml) von Plättchenreichem Plasma in den Screeningkammern mit großer Kontaktfläche (Typ B). Bei dieser Art der Inkubation ist der Einfluss von Leukozyten stark minimiert.

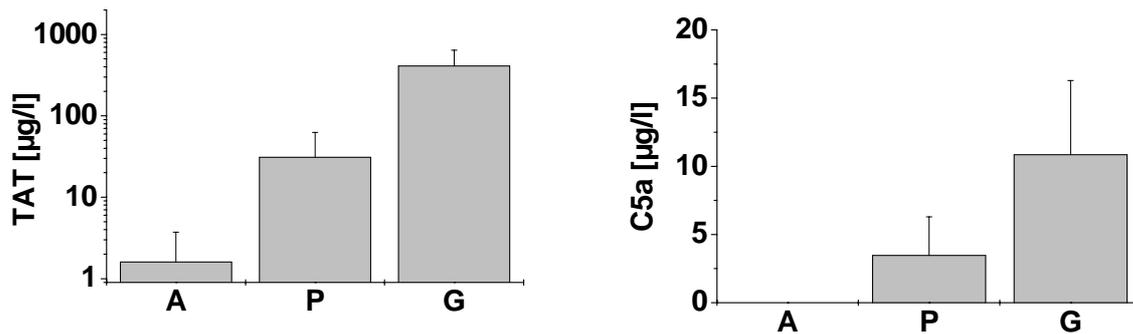


Abb. 6: Bildung von Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT) (links) bzw. von Komplement-fragment C5a im Plasma (Quantifizierung mit ELISA Assay)

Die Aktivierung der Blutgerinnung ist bei Glas um Größenordnungen höher als bei PTFE wie in Abb. 6 zu sehen ist. Auch die Aktivierung des Komplementsystems ist bei Glas höher als bei PTFE. Im ersten Teil dieses Berichts sind grundlegende Unterschiede zwischen den beiden Materialien schon zusammenfassend dargestellt worden. Wie in der folgenden Abbildung (Abb. 7) zu sehen ist sind die Unterschiede zwischen den beiden Materialien bezüglich der Freisetzung von PF4 nicht signifikant.

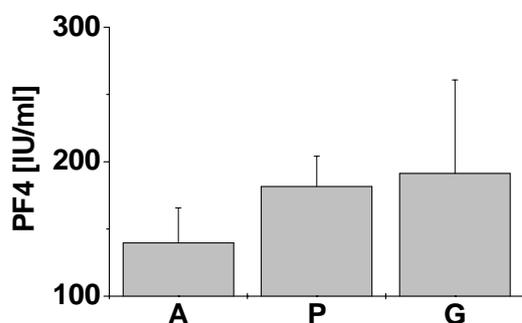


Abb. 7: Freisetzung von Plättchenfaktor 4 (PF4) ins Plasma (Quantifizierung mit ELISA Assay)

Ein Zusammenhang mit der Aktivierung von Thrombozyten - wie er teilweise auch für die Aktivierung der Blutgerinnungskaskade postuliert wird - war in unserem Versuch nicht zu beobachten. Andere Einflussfaktoren müssen entscheidend sein.

Zum Nachweis von Aktivierungsprozessen im Blut wurden auch durchflusszytometrische Untersuchungen etabliert, die sich insbesondere auf die Aktivierung von Thrombocyten bezogen.

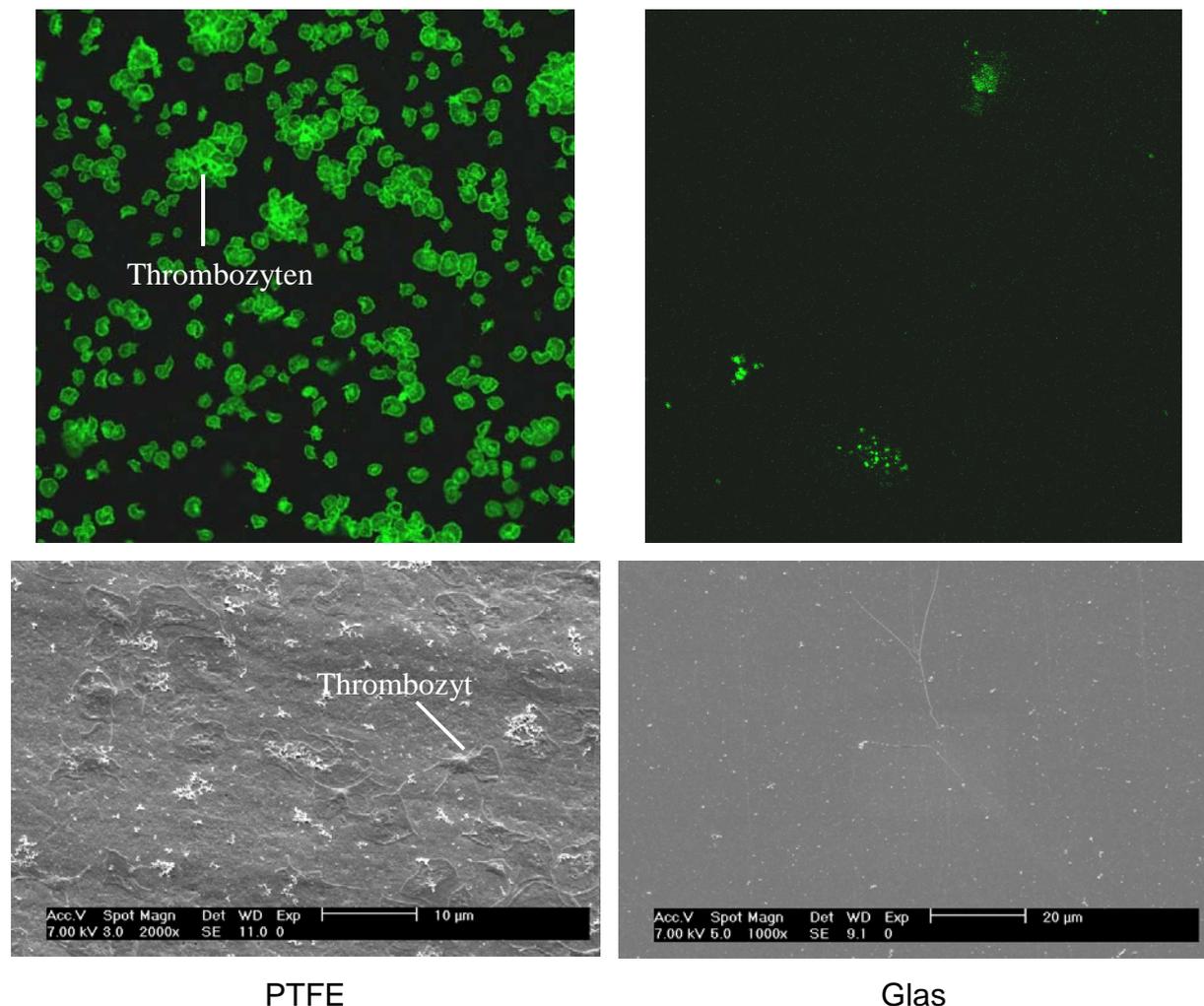


Abb. 8: Adhärente Thrombozyten an der Oberfläche von PTFE bzw. Glas (oben: Nachweis von Glycoprotein GpIIb/IIIa durch FITC markierten Antikörper CD41a; unten: rasterelektronenmikroskopischer Nachweis)

Hämokompatibilitätsuntersuchungen an dünnen organischen Modellschichten

Um die resultierenden Möglichkeiten unter Implementierung bioaktiver Komponenten für die Erzeugung antikoagulanter Beschichtungen effektiv nutzen zu können wurden weitere Untersuchungen zum Einfluss der in den Hydrogelschichten vorhandenen

funktionellen Gruppen (-Carboxylat, - Hydroxid) auf die Kurzzeit- Blutkompatibilität von Materialoberflächen durchgeführt. Um den Einfluss der Funktionalitäten von weiteren Einflussfaktoren abgrenzen zu können wurden dabei als Substrate nicht die Hydrogelschichten selbst, sondern selbstorganisierende organische Dünnschichten mit den entsprechenden Funktionalitäten als terminierenden Einheiten in Blutinkubationsexperimenten charakterisiert. Dabei wurden auch Mehrkomponenten-Schichtsysteme einbezogen um den Einfluss der Kombination verschiedener Funktionalitäten und Konzentrationsabhängigkeit der detektierten Aktivierungsphänomene berücksichtigen zu können. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei der Aktivierung des Komplementsystems und der resultierenden Leukocytenaktivierung gewidmet. Tab. 2 und 3 fassen die Zusammensetzung der untersuchten Schichtsysteme und die globale Abstufung ihrer Aktivierungscharakteristik nach Inkubation im humanen Vollblut über zwei Stunden zusammen, Abb. 9 gibt exemplarisch die Ergebnisse der Komplementaktivierung und der Leukocytenadhäsion an den verglichenen Modells substraten wieder.

Tab. 2: Zusammensetzung der charakterisierten Modell-Schichtsysteme

Komponenten der Einkomponenten-Self-Assembled Monolayers		Zusammensetzung der Zweikomponenten-Self-Assembled Monolayers		
HS-(CH ₂) ₁₁ OH	(C ₁₁ OH)	HS(CH ₂) ₁₀ COOH	(C ₁₀ COOH)	49 %
		HS-(CH ₂) ₁₁ OH	(C ₁₁ OH)	51 %
HS(CH ₂) ₁₀ COOH	(C ₁₀ COOH)	HS(CH ₂) ₁₀ COOH	(C ₁₀ COOH)	11 %
		HS-(CH ₂) ₁₁ OH	(C ₁₁ OH)	89 %
HS(CH ₂) ₁₅ CH ₃	(C ₁₅ CH ₃)	HS(CH ₂) ₁₅ COOH	(C ₁₅ COOH)	47 %
		HS(CH ₂) ₁₅ CH ₃	(C ₁₅ CH ₃)	53 %

Tab. 3: Qualitative Gesamtbewertung der charakterisierten Modell-Schichtsysteme nach Inkubation mit humanem Vollblut über 2h hinsichtlich Zelladhäsion und Fibrinbildung

terminierende Funktionalitäten der Schicht	Leukocyten-adhäsion	Thrombozyten-adhäsion	Fibrinbildung
-OH	ausgeprägt, starke Deformation der Zellen	keine	kaum
-CH ₃	keine	ausgeprägt, starke Deformation	kaum
-COOH	gering	ausgeprägt, starke Deformation der Zellen	kaum
-OH 51% -COOH 49%	ausgeprägt, starke Deformation der Zellen	gering, geringe Deformation der Zellen	gering
-OH 89% -COOH 11%	ausgeprägt, starke Deformation der Zellen	gering, geringe Deformation der Zellen	mittelstark
-CH ₃ 53% -COOH 47%	kaum	ausgeprägt, starke Deformation der Zellen	stark ausgeprägt

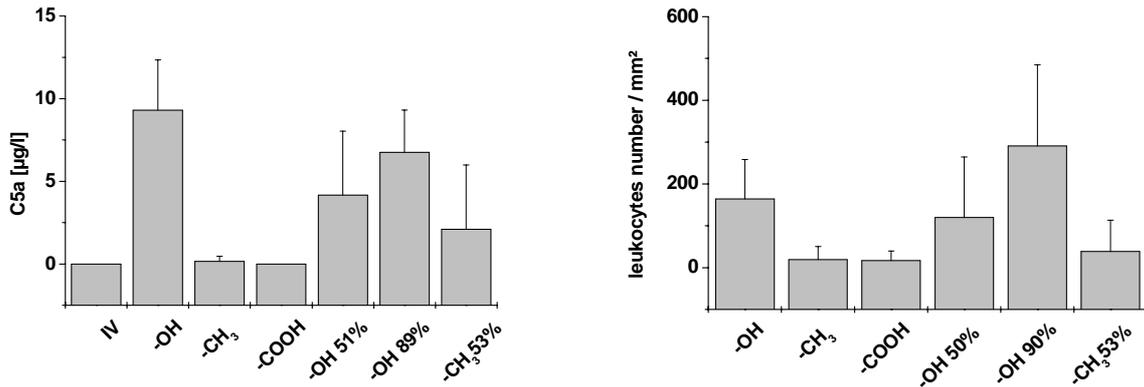


Abb. 9: Komplementaktivierung (links) und Leukocytenadhäsion (rechts) an Self-Assembled Monolayers mit verschiedenen terminierenden Funktionalitäten nach Inkubation mit humanem Vollblut für 2h.

Die Ergebnisse belegen klar den Zusammenhang zwischen Hydroxid-Funktionalitäten und der Aktivierung des Komplementsystems, wie auch die Stimulation der Leukocytenadhäsion durch diesen Prozess. Weiterhin konnten Oberflächeneigenschaften der Substrate mit Aktivierungsreaktionen von Thrombocyten (Hydrophobizität der Oberfläche) und der plasmatischehn Gerinnung korreliert werden.

Vergleichende Hämokompatibilitätsuntersuchungen an Thrombomodulin- und Benzamidin-funktionalisierten Oberflächen

Thrombomodulin-funktionalisierte Oberflächen, die nach einer Primärfunktionalisierung durch Maleinsäureanhydrid-Copolymere mit Polyethyenglykol-Spacer-Strukturen modifiziert worden waren wurden in vitro Blutkompatibilitätsuntersuchungen mit humanem Vollblut bewertet. Es konnte klar belegt werden, dass die Molekülstruktur des antikoagulant Proteins eine Vorzugsorientierung bei der kovalenten Anbindung über Lysin-Seitenketten ergibt (Abb. 10), die einen weitgehenden Funktionserhalt des so immobilisierten Thrombomodulins gewährleistet. Die antikoagulante Wirkung konnte anhand von systematischen Inkubationsexperimenten mit humanem Vollblut mit einer signifikant verminderten Aktivierung des Kininsystems korreliert werden.

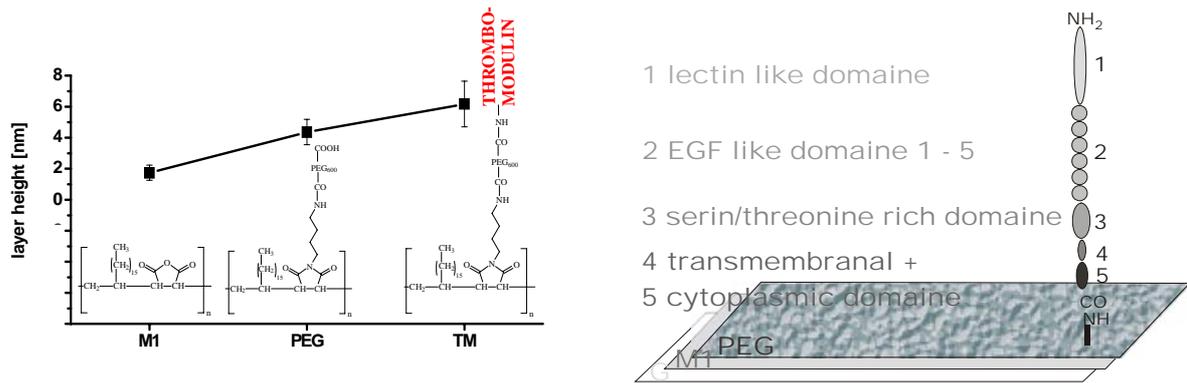


Abb. 10: Schichtaufbau und wahrscheinliche molekulare Orientierung bei der kovalenten Anbindung von Thrombomodulin an mit Carbonsäure-terminiertem Polyethyenglykol funktionalisierten Maleinsäureanhydrid-Copolymeroberflächen

Daran anknüpfend wurde die Hämokompatibilität von zwei auf unterschiedlichen Prinzipien beruhenden antikoagulativen Polymerbeschichtungen vergleichend getestet wobei durch die Anpassung der Bedingungen der Vollblutinkubation eine Differenzierung der Proben auch bei geringer Aktivierungswirkung erreicht werden sollte. Die Immobilisierung beider Substanzen erfolgte auf PP-MSA (Polypropylen-alt-maleinsäureanhydrid-Copolymer-Filmen). Beide Substanzen hemmen Thrombin, allerdings auf unterschiedlichem Weg. Thrombomodulin, ein auch in den Endothelzellen vorkommendes Transmembranprotein, bildet einen Komplex mit Thrombin. Dadurch wird die aktivierende Wirkung von Thrombin durch eine Veränderung der Proteinkonformation gehemmt und gleichzeitig erfolgt durch den TM-Thrombin-Komplex eine Aktivierung des als Blutgerinnungsinhibitor wirkenden Protein C. Der verwendete Thrombininhibitor TI (siehe A1) wirkt kompetitiv indem eine Bindung des Inhibitors im aktiven Zentrum von Thrombin erfolgt.

Die Materialien wurden mit frisch gewonnenem humanem Vollblut inkubiert (2 h; 37°C). Zur Antikoagulation wurde dem Blut Heparin (1,5 IU/ml; Sigma-Aldrich) zugesetzt. Analysiert wurde die Bildung von Aktivitätsmarkern im Blut für die Blutgerinnung (TAT), die Thrombozytenaktivierung (PF4) sowie die Komplementkaskade (C5a) mittels ELISA. Weiterhin wurde die Anzahl der Zellen im Blut bestimmt (Coulter AcTdiff.) und die Oberfläche mit REM auf adhäsive Zellen und Fibrinlagerungen untersucht.

Die Immobilisierung der beiden Substanzen führt zu einer Verringerung der Gerinnungsaktivierung gegenüber dem Vergleichsmaterial Glas. Thrombomodulin

erweist sich als starke antikoagulant wirkende Substanz und erreicht eine starke Verminderung der Thrombinbildung auch gegenüber dem Referenzmaterial PTFE sowie dem Vergleichsmaterial mit immobilisiertem TI.

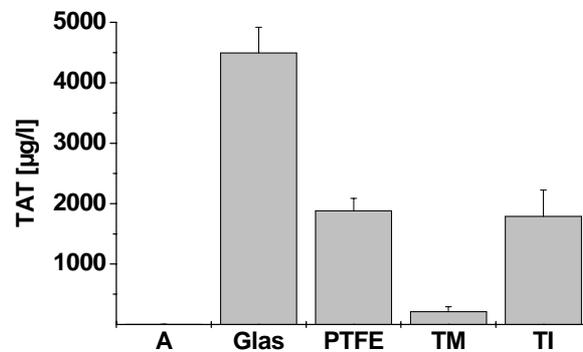


Abb. 11: Bildung von Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT) im Plasma (Quantifizierung mit ELISA Assay)

Die Freisetzung von Plättchenfaktor 4 wird in Abb. 12 dargestellt. Die Ergebnisse der einzelnen Proben weisen außer bei TM sehr starke Schwankungen auf. Beide Referenzmaterialien und die Probe mit immobilisiertem TI zeigen keine signifikanten Unterschiede untereinander wobei bei PTFE eine leicht höhere Tendenz sowie bei TI ein etwas geringerer Wert zu beobachten ist. Der Wert bei TM ist gegenüber dem Ausgangswert nur geringfügig erhöht. Es erfolgt somit keine direkte Adhäsion/Aktivierung der Thrombozyten und die sekundäre Aktivierung durch aktivierte Gerinnungsfaktoren ist minimal.

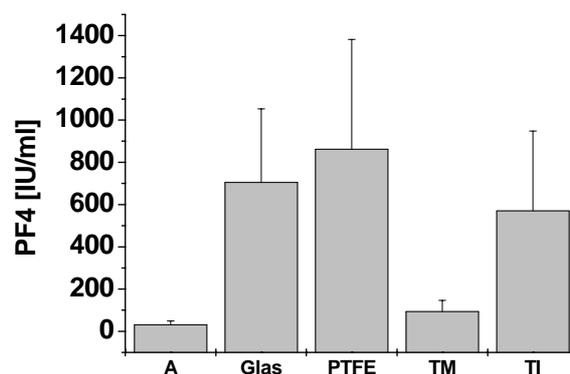


Abb. 12: Freisetzung von Plättchenfaktor 4 (PF4) ins Plasma (Quantifizierung mit ELISA Assay)

Die Anzahl der Thrombozyten - dargestellt in Abb. 13 - zeigt eine deutliche Verminderung der Thrombozytenzahl in Folge der Inkubation bei den Referenzmaterialien während beide modifizierten Materialien fast auf dem Ausgangsniveau bleiben - allerdings ist auch hier eine etwas höhere Zahl bei der TM Probe zu sehen.

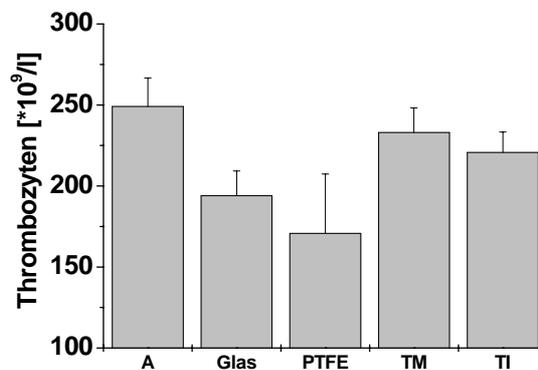


Abb. 13: Anzahl der Thrombozyten im Blut vor (A) und nach der *in vitro* Inkubation

Die Bildung von Komplementfragment C5a lag in allen Fällen sehr niedrig. Im Ausgangsblut konnte kein C5a nachgewiesen werden. Der Wert lag bei PTFE bei ca. 1 $\mu\text{g/l}$, bei den anderen 3 Proben zwischen 3 und 4 $\mu\text{g/l}$ (keine signifikanten Unterschiede untereinander). Obwohl sowohl bei TM als auch bei dem verwendeten TI eine Hemmung der Komplementkaskade zu erwarten ist gehen wir davon aus, dass die allgemeine Aktivierung zu gering ist um eine deutliche Verminderung zu beobachten.

Hämokompatibilität von an PES immobilisiertem Heparin

Die Wirkung von immobilisiertem Heparin an Polyethersulfonfolien wurde durch *in vitro* Hämokompatibilitätstests bewertet. Dabei wurden 4 Materialien vergleichend getestet. Als Referenz diente das Ausgangsmaterial der Immobilisierung: Polyethersulfon (Goodfellow). Darauf wurde entweder Serumalbumin, Heparin oder Endurin (isoliert aus Heparin, relativ hohes Molekulargewicht, besonders geeignet für Oberflächenimmobilisierung) vernetzt. Die endgültige Schicht besteht dabei aus 3 einzeln aufgetragenen und vernetzten Schichten. Diese Arbeiten wurden von Kooperationspartnern durchgeführt.

Die Materialien wurden in Perfusionskammern mit frisch gewonnenem humanem Vollblut inkubiert (1,5 h; 37°C). Zur Antikoagulanz wurde dem Blut Heparin (1,5 IU Heparin/ml; Sigma-Aldrich) zugesetzt. Das Blut zirkulierte mit ca. 6 ml/min.

Analysiert wurde die Anzahl der Zellen im Blut bzw. an der Materialoberfläche (REM), sowie die Bildung von Aktivitätsmarkern im Blut für Blutgerinnung (TAT), Thrombozytenaktivierung (PF4) sowie die Komplementkaskade (C5a). Weiterhin wurde die Adsorption des terminalen Komplementkomplexes C5b-9 an der Oberfläche verfolgt und der Heparin Gehalt im Blut bestimmt (um ein Ablösen des immobilisierten Heparins zu überprüfen).

Die rasterelektronenmikroskopische Analyse der Oberflächen zeigt in Abb. 14, dass die reine PES Folie eine relativ starke Zelladhäsion sowie die Bildung und Anlagerung von Fibrin bewirkt. Die Immobilisierung von BSA an der Oberfläche führt zu einer deutlichen Verringerung der Zelladhäsion. Allerdings kann diese durch die Immobilisierung von Heparin bzw. Endurin noch weiter verringert werden.

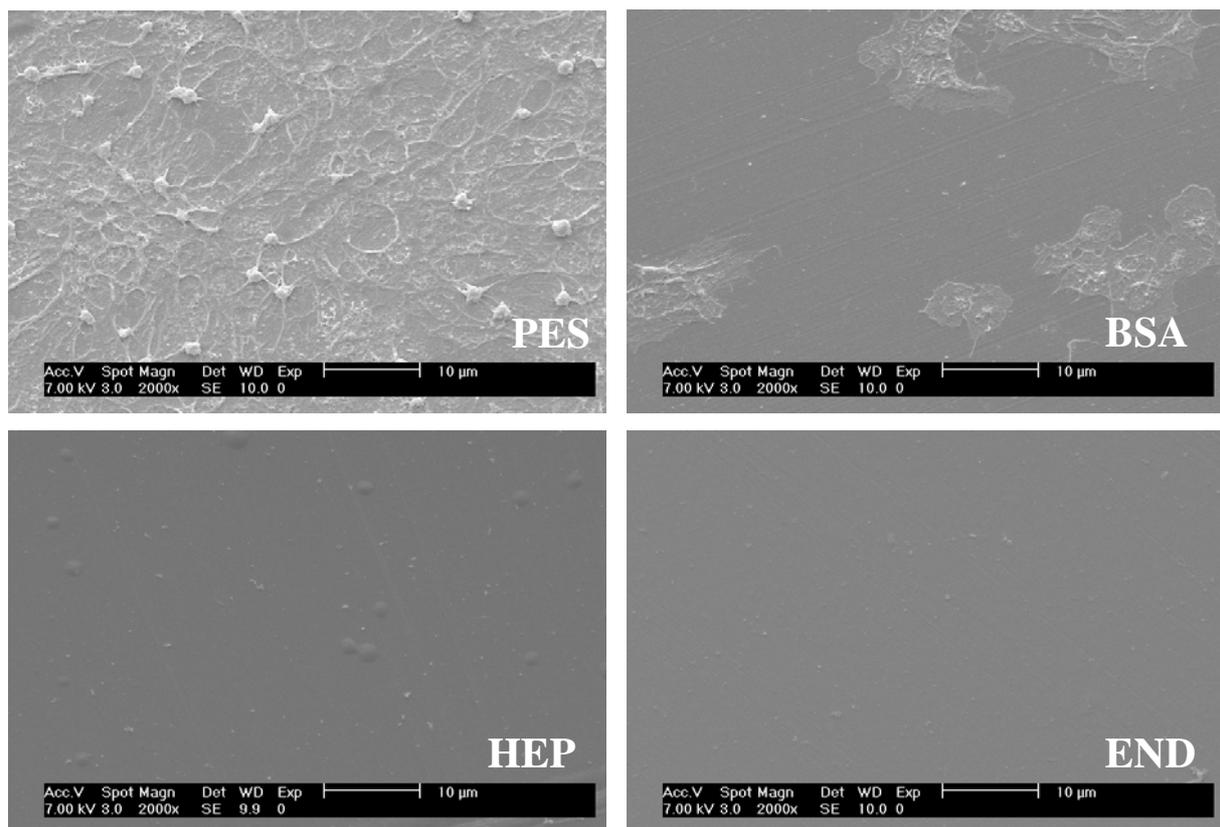


Abb. 14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der inkubierten Materialien nach *in vitro* Inkubation (humanes Vollblut, 1,5 h; 37°C, ca. 6ml/min, Heparinzusatz im Blut: 1,5 IU/ml)

Die Bestimmung der Anzahl der Thrombozyten an der Oberfläche zeigt deutlich (Abb. 14; links), dass an PES deutlich mehr Thrombozyten adhären als an den beschichteten Materialien. Die Immobilisierung von BSA erreicht eine ca. 10 fache Verringerung der Zelldichte. Die Immobilisierung von Heparin erzielt eine fast völlige Verhinderung der Thrombozytenadhäsion. Allerdings zeigt die Freisetzung von PF4 aus Plasma (Abb. 14; rechts) nicht so eine deutliche Abstufung. Den höchsten Wert weist PES auf. Die Werte der beschichteten Proben sind davon signifikant verschieden ($p < 0,05$), unterscheiden sich untereinander jedoch nicht deutlich.

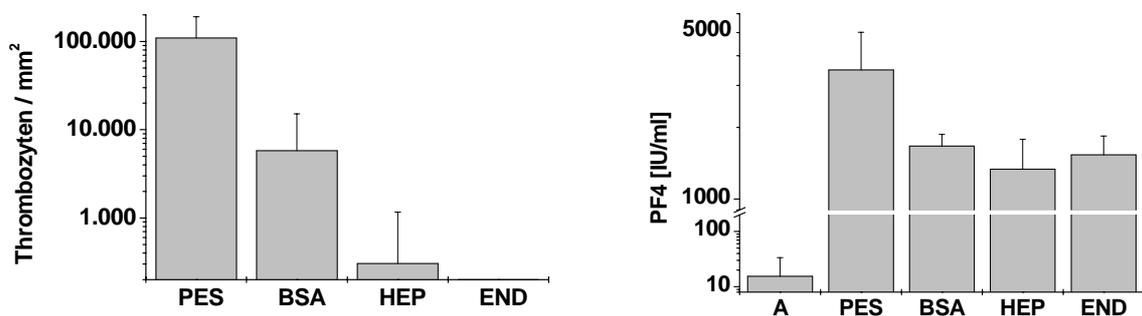


Abb. 15: Anzahl der adhärenen Thrombozyten an der Oberfläche (links, Quantifizierung anhand der REM Aufnahmen) sowie Freisetzung von PF4 aus Thrombozyten ins Plasma (rechts, Quantifizierung mit ELISA Assay)

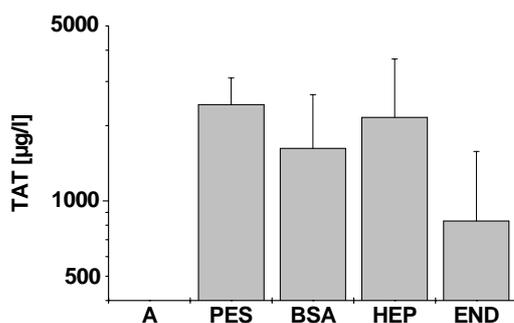


Abb. 16: Bildung von Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT) im Plasma (Quantifizierung mit ELISA Assay)

Die Aktivierung der Gerinnungskaskade im Blut zeigt (Abb. 16), dass sich die Beschichtung mit Endurin positiv auf die Verminderung der TAT Bildung auswirkt. Die TAT-Bildung ist bei den Proben BSA und PES höher, wobei PES im Mittel den höchsten Wert aufweist. Allerdings sind die Ergebnisse für die Immobilisierung von HEP sehr schwankend und die TAT Werte liegen im Durchschnitt zwischen dem

Ergebnis für BSA bzw. PES. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der anderen Parameter nicht überein – eventuelle Fehlerquellen müssten in Wiederholungsversuchen ausgeschlossen werden.

Die Auswirkung von Heparin auf die Komplementaktivierung ist bekannt. Wir konnten eine Hemmung der Bildung von Komplementfragment C5a im Blut nachweisen (Abb. 17, links). Auch die Adhäsion des terminalen Komplementkomplexes C5b-9 an der Oberfläche weist bei PES und BSA höhere Werte auf als bei den mit HEP bzw. END beschichteten Oberflächen.

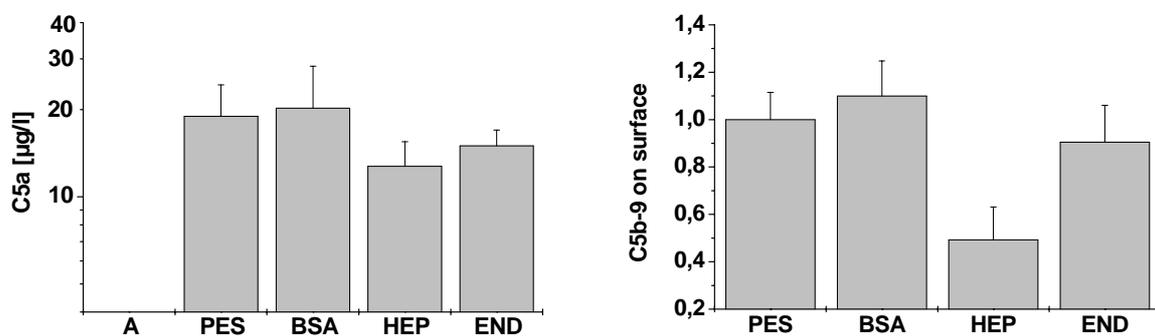


Abb. 17: Bildung von Komplementfragment C5a im Plasma (links, Quantifizierung mit ELISA Assay) sowie Adhäsion des terminalen Komplementkomplexes C5b-9 an der Oberfläche (rechts, Quantifizierung mit enzymmarkiertem Antikörper, Bestimmung der Absorption des gebildeten Substrates bei 450 nm). Der positive Einfluss ist bei HEP relativ stark ausgeprägt während sich END nur gering von den Referenzmaterialien unterscheidet.

2.2 Projektschwerpunkt B: Substrate für Zelltherapien/ Tissue Engineering

Zusammenfassung der Zielstellungen

Ziel des Projektschwerpunktes B ist die Bereitstellung und anwendungsnahe Erprobung von biofunktionalisierten Substraten für neue Zelltherapien und Tissue-Engineering-Strategien. Die Motivation für die durchzuführenden Arbeiten ist mit einer Vielzahl von durch Erkenntnisfortschritten auf dem Gebiet der Zellbiologie möglich gewordenen neuartigen Therapieansätzen gegeben, die insbesondere auf den Ersatz von kardiovaskulären und lasttragenden Gewebestrukturen und auf onkologische Behandlungsstrategien gerichtet sind. Zentraler Ausgangspunkt der hier bearbeiteten Teilprojekte ist die unter B1 verfolgte kulturelle Amplifikation und Vordifferenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC). Dazu wird durch biomolekulare Multikomponentenbeschichtung von Trägermaterialien wie Polyethylenterephthalat, Polyethersulfon und Zellulose (Membranen) angestrebt, Eigenschaften grenzflächenassoziierter MSC in Bioreaktoren gezielt zu beeinflussen. Die entsprechende Modifizierung der Zellkulturträger soll alternativ oder in Kombination durch segmentierte, amphiphile Hydrogele sowie durch Heparansulfate erfolgen, wobei beide Basisbeschichtungen durch Cytokine, Wachstumsfaktoren und ECM-Proteine zu beladen sind. Neben der molekularen Grenzschichtgestaltung soll insbesondere auch die chemische und morphologische Mikrostrukturierung der Zellkulturträger zur Steuerung der MSC genutzt werden. Die anwendungsnahe Evaluierung der entwickelten Trägerstrukturen soll sich auf Arbeiten zum Teilprojekt C1 (Entwicklung eines modularen Bioreaktorsystems für Stammzellkulturen) stützen. Zur Anwendung von MSC bzw. MSC-abgeleiteten Zellen in Tissue-Engineering-Strategien sollen dreidimensionale Templatstrukturen aus resorbierbaren Polymeren (Polyhydroxybuttersäure und andere Polyhydroxyalkanoate), Adhäsionsproteinen/extrazellulärer Matrix und Cytokinen bzw. Wachstumsfaktoren entwickelt werden. Für die Verarbeitung der resorbierbaren Polymere zu Fäden und textilen Trägerstrukturen werden am IPF etablierte Technologien herangezogen, deren besondere Möglichkeiten bereits in Vorarbeiten belegt werden konnten. Die daran anknüpfenden Forschungsaktivitäten zur Optimierung der Trägerstruktur und deren biomolekularer Funktionalisierung werden sich hier auf das hämatolymphopoetische Potential der MSC zur Nutzung in der Hämatologie/Onkologie (Entwicklung von Substraten für Bioreaktoren, B1) sowie auf

die in resorbierbaren Gefäßersatzstrukturen (biofunktionalisierten PHB-Templaten) stattfindende Differenzierung von MSC in Myocyten und Endothelzellen (B1/B2) konzentrieren. Darüber hinaus soll auf resorbierbaren Templaten die Differenzierung von MSC in Osteoblasten für die Entwicklung von Knochenersatz realisiert werden (B1/B2).

In einem auf umfassende Vorarbeiten des IfWW basierenden Projekt sollen weiterhin in neuen Kollagenbasismaterialien für den Ersatz von Hart- und Weichgewebe über eine gezielte Entwicklung der Gefüge sowie durch Aktivierung mit Wachstumsfaktoren (VEGF) eine hinreichende Integration von Blutgefäßen ermöglicht werden, um somit einen biologisch getragenen Umbau des Implantates zu gewährleisten (B3). Auch hier bildet die Integration von aus MSC gewonnenen autologen Endothelzellen und Fibroblasten (B1/B2) eine interessante Option für weiterführende Arbeiten.

2.2.1 Projekt B1: Steuerung der Expansion und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen durch Funktionalisierung von Zellkulturträgern

Dipl.-Biol. S. Boxberger, Prof. Dr. M. Bornhäuser, Prof. Dr. G. Ehninger (TPL), Med. Klinik und Poliklinik I, Med. Fakultät der TU Dresden
Dr. K. Salchert, Dr. T. Pompe, M. Markowski, Dr. S. Zschoche, Prof. Dr. C. Werner
Leibniz-Institut für Polymerforschung e.V.

Zielsetzung des Teilvorhabens

Neben den Vorläuferzellen für die Blutbildung, den hämatopoietischen Stammzellen, befinden sich im Knochenmark ebenso Vorläuferzellen für verschiedene mesodermale Gewebe. Diese Vorläuferzellen (mesenchymale Stammzellen, MSC) sind zum einen relativ leicht aus dem Knochenmark isolierbar und zeigen zum anderen *in vitro* und *in vivo* eine breite Differenzierungskapazität. Neben der schon länger beschriebenen Differenzierung in Knochen, Knorpel und Fettgewebe konnte in neuerer Zeit auch die Differenzierung in neuronale sowie endotheliale Gewebe gezeigt werden. Diese Fähigkeiten prädestinieren mesenchymale Stammzellen für den Einsatz als potentiellen Therapeutika in der regenerativen Medizin. Neben der relativ einfachen Isolation zeichnen sich MSCs auch durch eine sehr geringe immunologische Reaktivität aus, so dass nach der Transplantation von Fremdspender-Zellen nur mit einer geringen Abstossungsreaktion zu rechnen ist. Somit könnten neben autologen (d.h. körpereigenen) auch allogene (von Fremdspendern gewonnene) MSCs in vielen Bereichen Verwendung finden. In den kommenden Jahren sind verschiedene *in vitro* und *in vivo* Anwendungen im Bereich der Hartgewebe (Knochen und Knorpel) denkbar. Für weitere Anwendungen von MSCs im Rahmen von regenerativen Therapieansätzen ist es unerlässlich, die Kulturbedingungen zu standardisieren sowie für die Differenzierung in verschiedene Gewebetypen gezielte Strategien zu entwickeln. Ziel des Teilprojekts ist eine gerichtete Differenzierung von MSCs auf biomolekular funktionalisierten Kulturträgern.

Ergebnisse der Arbeiten im Rahmen des Teilprojektes

Optimierung der Isolationsmethoden für MSCs

Die Anreicherung von MSCs aus Knochenmarkaspirat erfolgt in aller Regel über die selektive Adhärenz der Zellen an Zellkulturschalen. Die Ausbeute an MSCs kann optimiert werden durch eine vorherige Anreicherung der im Aspirat befindlichen Zellen durch die so genannte Rosette Technologie. Dabei werden vor dem Ausplattieren der Zellen durch eine spezielle

Immunreaktion die nicht verwendeten Zellen vernetzt („rosettiert“) und durch eine anschließende Dichtegradientenzentrifugation von den MSCs abgetrennt. Alternativ wurden Zellen desselben Spenders klassisch über die Plastikadhärenz isoliert. Anschliessend wurden die Zellen kultiviert und mit Laser-scanning Zytometrie (LSC) auf die Expression der beiden relevanten Marker CD73 und CD105 hin untersucht. Für die LSC Analyse müssen die Zellen nicht von dem Substrat entfernt werden, sondern können direkt auf dem Kulturträger kultiviert, mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt und nachfolgend analysiert werden. Die Analyse der beiden MSC-relevanten Marker CD73 und CD105 mit Laser-scanning Zytometrie ergab keinen nennenswerten Unterschied in der Expression. Somit kann postuliert werden, dass mit beiden Isolationsmethoden phänotypisch identische Zellen isoliert werden.

Wachstum von MSCs auf verschiedenen immobilisierten extrazellulären Matrixmolekülen

Viele Zellen benötigen zum Anheften an artifizielle Materialien wie zum Beispiel Kulturschalen die Unterstützung von extrazellulären Matrixmolekülen. Im Berichtszeitraum wurde systematisch der Effekt von unterschiedlichen Matrixmolekülen auf die Anheftung und das weitere Wachstum von MSCs untersucht. Dazu wurde die vier exemplarischen Moleküle Fibronectin, Laminin, Collagen I und Collagen IV an zwei unterschiedliche Polymersubstrate (Poly(octadecen-alt-maleinsäureanhydrid)) und (Poly(propylen-alt-maleinsäureanhydrid)) sowohl kovalent als auch adsorbtiv angebunden.

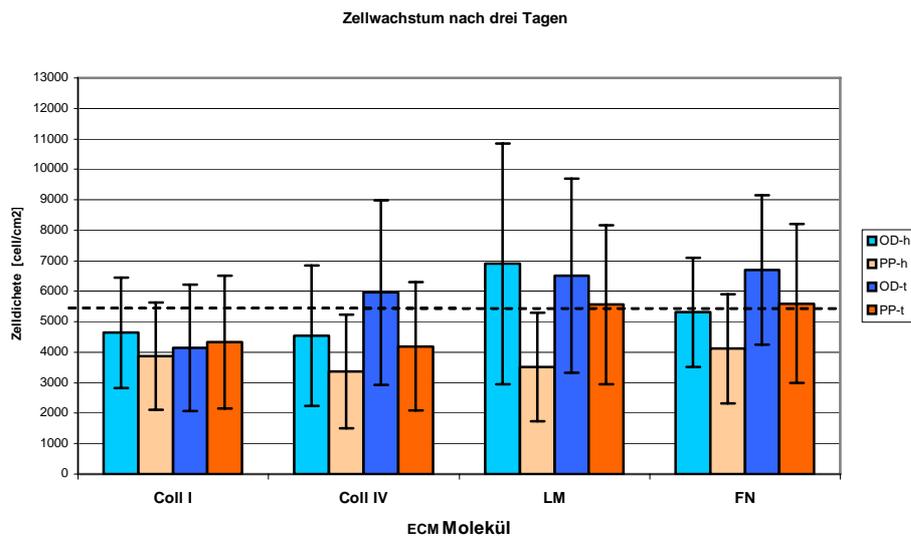
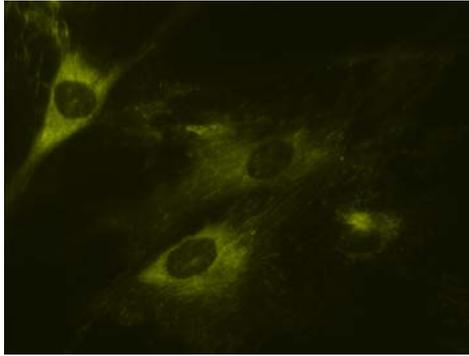


Abb. 1 zeigt das Wachstum von MSCs auf vier verschiedenen ECM Molekülen, welche an die Polymersubstrate OD (Poly(octadecen-alt-maleinsäureanhydrid)) und PP (Poly(propylen-alt-maleinsäureanhydrid)) entweder adsorbtiv (h) oder kovalent (t) angebunden wurden.

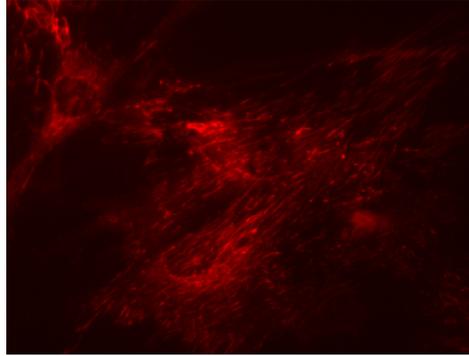
Nach drei Tagen zeigte sich tendenziell ein besseres Wachstum auf den mit Fibronectin und Laminin beschichteten Oberflächen verglichen mit Collagen I und Collagen IV. Eine schwache Proteinanbindung wie im Falle der hydrolysierten, hydrophilen Polymeroberflächen (Poly(propylen-alt-maleinsäureanhydrid) adsorbtiv) führte insgesamt zu einer geringeren Adhärenz der Zellen.

Expression von ECM-Molekülen

Mit Immunfluoreszenzfärbung wurde die Expression von vier ECM Molekülen (Fibronectin, Laminin, Collagen I, Collagen IV) untersucht. Von Endothelzellen ist bekannt, dass sie wenige Stunden nach Passagieren grössere Mengen Fibronectin exprimieren und sezernieren. Somit bilden Endothelzellen ihre eigene extrazelluläre Matrix, welche einerseits die Adhäsion der Zellen an der Unterlage fördert und zum anderen Signale für die Proliferation vermittelt. MSCs zeigten eine deutliche Expression von Fibronectin und Laminin, wogegen Collagen I und Collagen IV nicht nachgewiesen werden konnten.



Laminin



Fibronectin

Abb. 2 zeigt die Expression von Laminin und Fibronectin in MSCs. Während Fibronectin eine deutliche fibrilläre Struktur vor allem in der Peripherie der Zellen zeigt ist Laminin eher zentral in der Nähe des Zellkerns lokalisiert.

Thermoresponsive Hydrogele

Weitere Fortschritte wurden darüber hinaus im Berichtszeitraum bei der Nutzung thermoresponsiver Poly(*N*-alkylacryl-amide)-*g*-Poly(ethyleneglycol)-Hydrogele zur Beschichtung von Zellkulturträgern erreicht. Wie in vorangegangenen Berichten zu diesem Projekt dargestellt konnten die neuartigen Kamm-Copolymere durch die Niederdruckplasma-Behandlung dünner Schichten auf Fluorpolymerträgern delaminationsstabil angebunden und in dieser Form der temperaturinduzierten, reversiblen Phasenumwandlung unterzogen werden. Die hydrophile Charakteristik der stimuliresponsiven Polymere erwies sich dabei als vorteilhaft hinsichtlich einer raschen Ablösung von Zellschichten beim Absenken der Temperatur um nur 3K (schematische Darstellung in Abb. B1-5). Experimente zur Aufklärung der Ablösedynamik der Zellen wurden mit Hilfe von time-lapse-Mikroskopie dokumentiert.

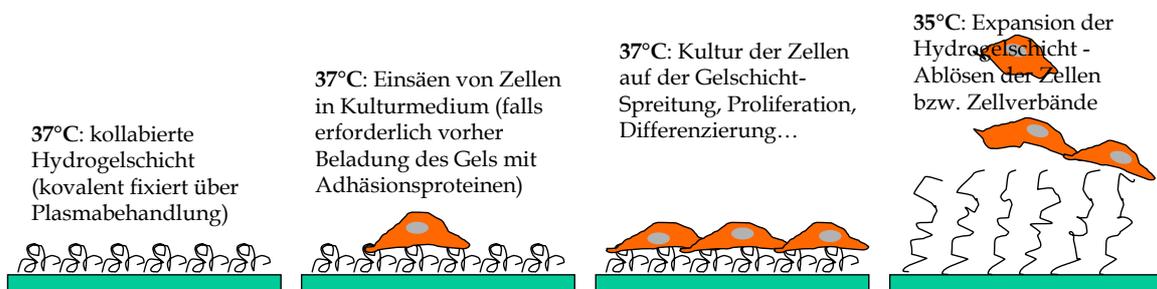


Abb. 3: Prinzip der schonenden Ablösung von Zellen von mit Poly(*N*-alkylacryl-amide)-*g*-Poly(ethyleneglycol)-Hydrogelen beschichteten Oberflächen beim Absenken der Temperatur um 3 K

Einfluß von Parathormon auf das supportive Potential von MSC

Um in einem Screeningverfahren festlegen zu können, welche Faktoren am geeignetsten für eine Immobilisierung bzw. Verwendung auf Polymerträgern sein könnten, wurden auch u.a. osteogene Faktoren wie Parathormon getestet, dass in-vivo zu einer Osteoklastenaktivierung führt.

Von Juli bis Dezember 2004 wurde der direkte Einfluß von exogenem Parathromon auf die Expansion von LTC-IC (Langzeitkulturinitiiierenden Zellen) über 4 Wochen überprüft. Ausgangsmaterial waren MSC eines Patienten, der im Rahmen eines individuellen Heilversuches Parathormon erhalten hatte. Diese aus dem Knochenmark isolierten MSC wurden nach Erreichen von Subkonfluenz mit CD34+ Blutstammzellen eines gesunden Spenders für 4 Wochen kokultiviert. Als Positivkontrolle wurde in einem Ansatz über 4 Wochen bei jedem Mediumwechsel wieder Parathormon zugesetzt. Die Negativkontrolle bestand aus MSC des gleichen Patienten bevor er mit Parathormon behandelt worden war.

Bereits nach 15 Tagen konnte man, wie in der nachfolgenden Abbildung dargestellt, deutlich den Effekt von Parathromon auf die Proliferation der hämatopoietischen Zellen im Phasenkontrastmikroskop erkennen. Makroskopisch fand sich in der Kontrolle ohne in-vivo und in-vitro Einsatz von Parathormon ein wesentlich geringere Zahl von runden, leuchtenden hämatopoietischen Zellen (A). Im Gegensatz waren die MSC nach Therapie mit Parathormon in-vivo (B) aber besonders unter Zugabe in-vitro (C) stärker dazu in der Lage, die Proliferation von Blutstammzellen zu induzieren.

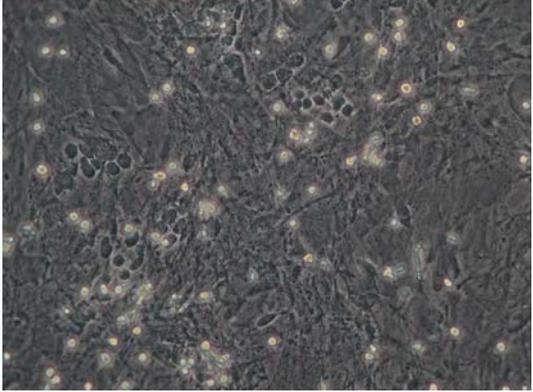
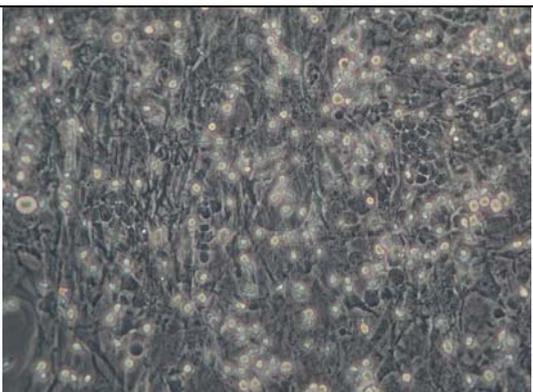
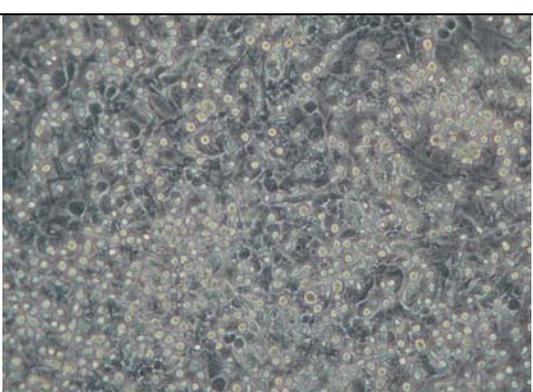
	<p>A UPN 01 1.Abnahme (vor PTH) 15 Tage in LTC-IC-Kultur (ohne Zusatz von PTH) [mit CD 34+/ Apheresat 1]</p>
	<p>B UPN 01 Nach 9 Wochen Therapie mit PTH 15 Tage in LTC-IC-Kultur (ohne Zusatz von PTH) [mit CD34+/Apheresat 1]</p>
	<p>C UPN 01 2.Abnahme (nach 9 Wochen mit PTH) 15 Tage in LTC-IC-Kultur (unter 10e-7 M PTH) [mit CD 34+/Apheresat 1]</p>

Abb. 4

Wesentlich bedeutsamer als die Expansion von hämatopoietischen Zellen im Kulturüberstand ist die Frequenz von klonogenen Zellen nach 4 Wochen Kultur auf den entsprechend vorbehandelten MSC. Hierbei zeigt sich, dass ebenfalls die Zugabe von Parathormon in-vitro die besten Ergebnisse zeigt. Wie in der nachfolgenden Tabelle gezeigt, lassen sich die Koloniebildenden Stammzellen (CFU-GM) auf dem MSC Layer, der in-vitro unter PTH-Einfluss steht im Vergleich zur Kontrolle annähernd verdoppeln. Dies zeigt erstmalig, dass der Einfluss von Parathormon zu einem verbesserten Support von Blutstammzellen durch MSC führt.

Kontrolle	2. Abnahme mit PTH
Zellzahl/ml: 7,90x10e5	Zellzahl/ml: 1,264x10e6
CFU-GM: 1 x 10e4/ml	CFU-GM: 1 x 10e4/ml
CFU-GM/1x 10e4: 34	CFU-GM/1x10e4 42
Kolonien gesamt: 2.686	Kolonien gesamt: 5.292

Titration von Bone morphogenetic protein (BMP) in Kultur von mesenchymalen Stammzellen (MSC)

BMP-2 und BMP-4 gehören einer Familie von Proteinen an, welche die Osteogenese in MSC befördern. Die osteogene Induktionsfähigkeit dieser Proteine ist, verglichen mit dem osteogenem Standardmedium (10mM β 2-Glycerophosphat, 0,2M Ascorbat und 10⁻⁸ M Dexamethason), relativ gering³.

Um BMP in weiteren Versuchen an 3D - Strukturen zu binden, ist es notwendig eine optimale Konzentration für die Zellkulturen zu ermitteln. In Vorversuchen wurden Konzentrationen von 50 – 600 ng/ml BMP-2 und BMP-4 titriert. Eine statistisch signifikante Induktion der Alkalischen Phosphatase konnte für den Einsatz von 300 ng/ml gefunden werden (Abb.1) Gleichfalls zeigten sich analoge morphologischen Unterschiede, wie sie für die osteogene Differenzierung von MSC beschrieben sind. Dabei vergrößern sich die Zellen, der Layer reißt z.T auf und es kommt zur Ablagerung von gebildetem Ca-phosphat. (Abb.2)

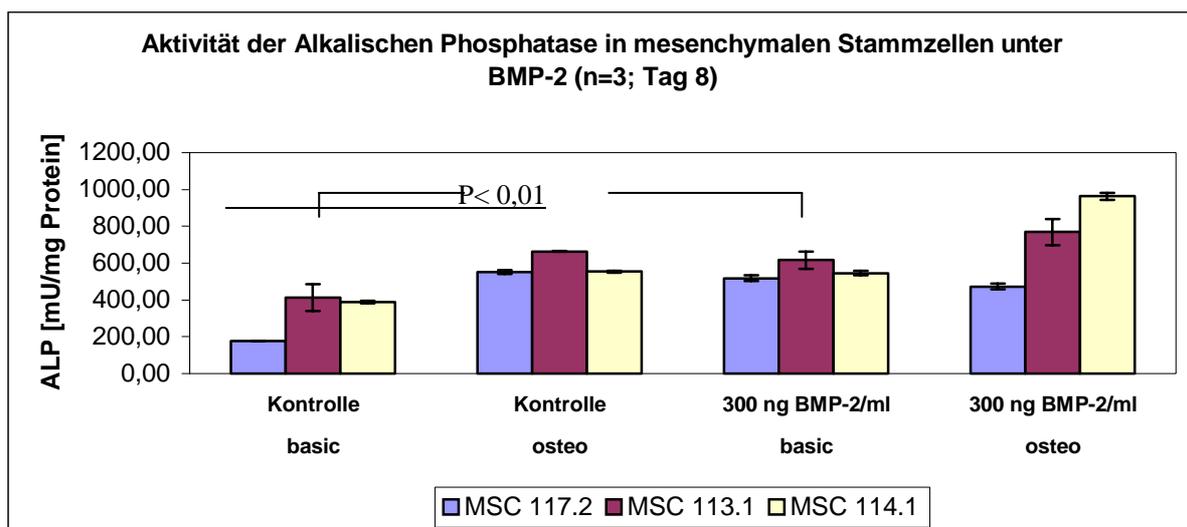


Abb. 5: Induktion der Alkalischen Phosphatase unter Kontrollbedingungen (DMEM+10%FCS) und osteogenen Differenzierungsbedingungen (DMEM+10%FCS mit 10mM β 2-Glycerophosphat, 0,2M Ascorbat und 10⁻⁸ M Dexamethason) mit und ohne Zusatz von BMP-2 (300 ng/ml)

Expression der Rezeptoren für BMPs auf MSC

Nachdem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CBFa1 in primären MSC nur in eingeschränktem Ausmaß möglich war, stellte sich die Frage nach den spezifischen Effekten von z. Bsp. BMP-2 auf MSC. Von prinzipiellem Interesse war hierbei die Expression der BMP Rezeptoren I bzw. II. auf MSC im Vergleich zu der CBFa1 stark nukleär exprimierenden Zell-Linie Saos-2.

Wie im folgenden Western-Blot zu sehen, scheint der BMP Rezeptor 2 zumindest etwas schwächer auf MSC als auf Saos-2 exprimiert zu werden.

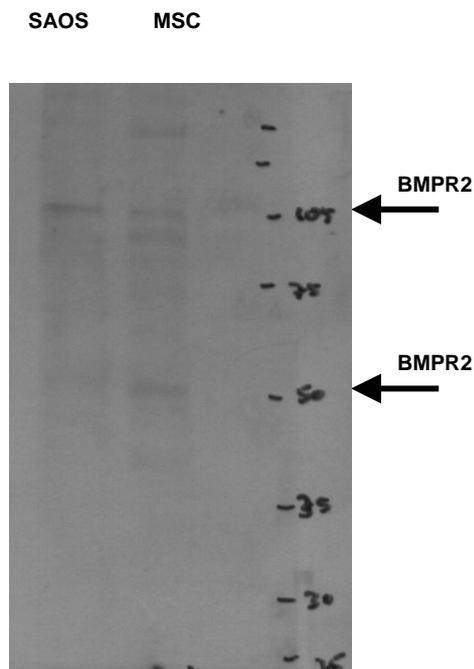


Abb. 5: Schwache Expression des BMP Rezeptors II in primären MSC

Signaltransduktion von exogenem BMP via pSmad

Bei der Analyse der Expression von phosphoryliertem Smad (pSmad) als primäres Target der BMP Aktivität zeigte sich in primären MSC eine fast vollständige Translokation von pSmad in den Nukleus, was für die konstitutive Aktivierung dieses Signalwegs spricht. Dementsprechend ließ sich dieser Effekt nur durch einen sehr häufigen Mediumwechsel aufheben. Wie in der nachfolgenden Abbildung dargestellt, führt ein täglicher Mediumwechsel zu einer deutlichen Reduktion des p-Smad Signals im Zellkern.

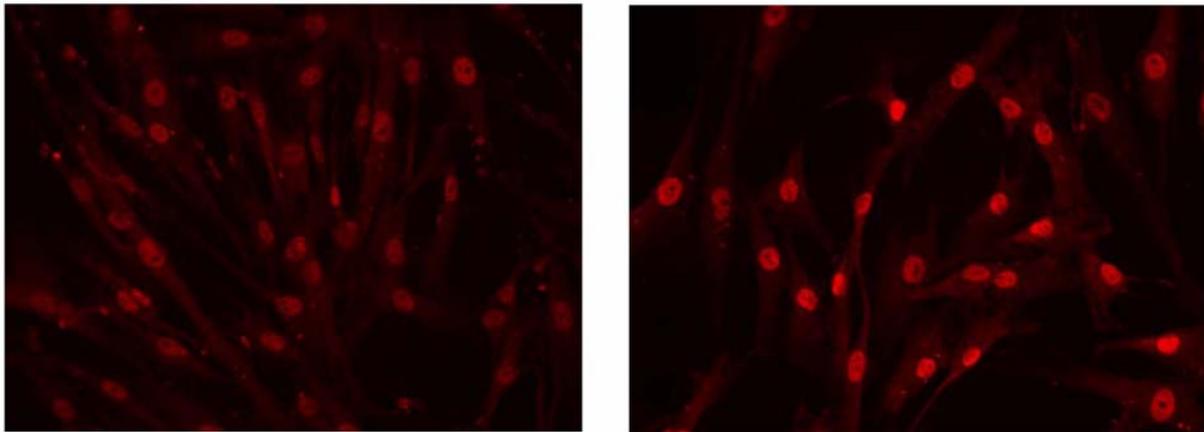


Abb. 6: Häufiger Mediumwechsel (links) führt zu einer deutlichen Reduktion des Signals für p-Smad im Vergleich zur Standardkultur mit FKS (rechts).

Produktion von BMPs durch MSC

Die o.g. Befunde legten den Verdacht nahe, dass evtl. MSC selbst BMP produzieren und dadurch eine parakrine Stimulation von BMP-Rezeptoren und des pSmad Signalwegs induziert wird. Dies war in so fern von Bedeutung, da evtl. eine Immobilisierung von BMP auf einem entsprechend funktionalisierten Kulturträger durch MSC selbst erreicht werden kann und evtl. durch das Anbieten bestimmter ECM-Komponenten wie z. Bsp. Kollagen I unterstützt werden könnte. Immunzytologische Befunde (Fluoreszenzmikroskopie) sprechen für die Expression von BMP-2 durch primäre MSC bereits im Basismedium.

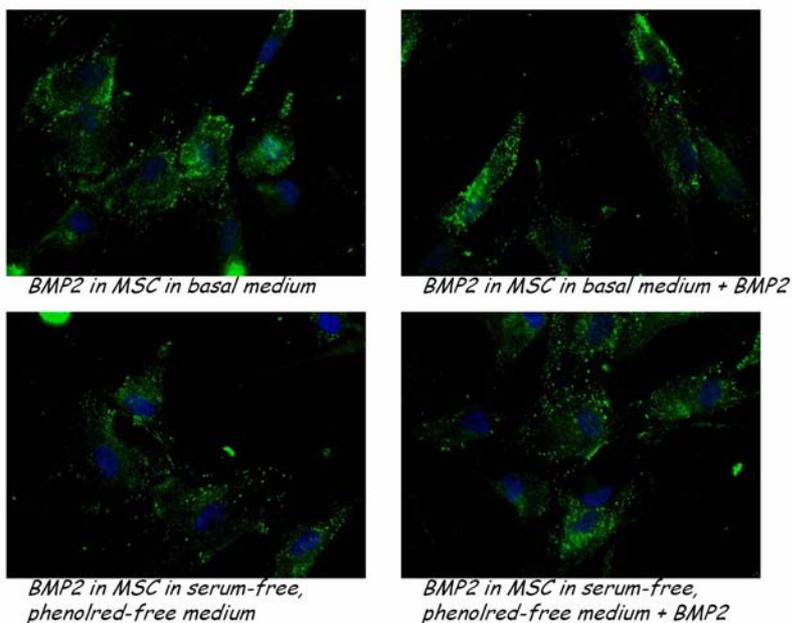


Abb. 7: Nachweis von BMP2 mittels Fluoreszenzmikroskopie unter verschiedenen Kulturbedingungen

2.2.2 Projekt B 2: Herstellung und Biofunktionalisierung von resorbierbaren Templaten auf Basis von Poly(hydroxyalkanoat)-Fäden für Blutgefäß- und Knochen-Ersatz

Dr. G. Schmack, Dr. K. Gliesche, Dr. K. Salchert, Dr. T. Pompe, Dr. M. Nitschke, Dr. C. Werner (TPL), Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V.

Dr. D. Scharnweber, Prof. H. Worch, Institut für Werkstoffwissenschaft, TU Dresden

Dr. M. Bornhäuser, Prof. G. Ehninger, Med. Klinik und Poliklinik I, Med. Fakultät der TU Dresden

Zielsetzung des Teilvorhabens

Dreidimensionale Strukturen aus resorbierbaren Polymeren bilden die Grundlage für Implantate, die nach biomolekularer Funktionalisierung die Regeneration von Gewebe nach Tissue-Engineering-Konzepten unterstützen sollen. Ziel des Teilprojektes ist die Erzeugung, anwendungsspezifische Biofunktionalisierung und *in vitro* Erprobung neuartiger Implantatstrukturen auf Basis von resorbierbaren Polymerfäden. Die Arbeiten sollen Grundlagen für die mittelfristige Entwicklung einer kleinlumigen Gefäßprothese und eines Knochenersatzmaterials durch Tissue Engineering unter Verwendung mesenchymaler Stammzellen schaffen. Basismaterial des Projektes sind biotechnologisch gewonnene Poly(hydroxyalkanoate) (PHA). Die am IPF bereits etablierte Verarbeitungstechnik für PHB soll optimiert und auf weitere Poly(hydroxyalkanoate) übertragen werden. Durch textiltechnische Verarbeitung mittels der in diesem Zusammenhang erstmalig anzuwendenden Taylor Placement Technology werden aus PHA-Fäden 2- und 3-D-Strukturen (schlauchförmige Netzwerkstruktur mit variabler Maschenweite) erzeugt. Für die anzuschließende Biofunktionalisierung werden je nach beabsichtigter Anwendung Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) und Wachstumsfaktoren aufgebracht.

Ergebnisse der Arbeiten im Rahmen des Teilprojektes

Herstellung von degradierbaren Polymerfilamenten und Schlauchmaterialien auf Basis von Poly(hydroxyalkanoaten)

Für die Herstellung von degradierbaren Polymerfilamenten durch Schmelzspinnprozesse konnte eine GMP-gerechte Anlage aufgebaut werden. Die Anlage wurde durch die Fachabteilung Fadenbildung des IPF (Leitung Prof. R.

Beyreuther) in enger Abstimmung mit den Bearbeitern des Teilvorhabens definiert und durch Beauftragung verschiedener Spezialunternehmen unter erheblicher Eigenleistung errichtet (Förderung in Zusammenarbeit mit der TU Dresden als GMP-Gründerlabor). Weiterhin konnte am IPF ein neues GMP-gerechtes Technikum zur Anwendung der Technologie des „Tailored Fibre Placement“ (TFP) mit einer für die Erzeugung von Polymer-Scaffolds geeigneten textiltechnischen Anlage (Stickautomat) ausgestattet und in Betrieb genommen werden. Das TFP-Verfahren ermöglicht eine sehr weitgehende Variation der Geometrie der textilen Struktur unter begrenztem Materialverbrauch. Die auf Basis der verfügbaren PHB-Fäden durch Tailored Fibre Placement Technology erzeugten Zellträger wurden systematisch optimiert. Dabei erwies sich die Verdichtung der Textilstruktur durch Pressen als geeignet um die erreichbare Zelldichte pro Volumeneinheit des Scaffolds signifikant zu erhöhen und die mechanischen Eigenschaften der Struktur in gewünschter Weise zu verändern. Für die Steuerung der Abbaudynamik der so hergestellten Scaffolds wurde die Elektronenstrahl-Behandlung erprobt. Das Verfahren erscheint grundsätzlich für diesen Zweck geeignet.

Weiterhin wurden hochporöse Schlauchstrukturen aus P3HB/4HB-Copolymeren durch ein Phaseninversionsverfahren (aus DMSO/Wasser-Gemischen) hergestellt (Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. M. Shoichet, Institute of Biomaterials der University of Toronto, Kanada). Untersuchungen zu mechanischen Eigenschaften wurden realisiert da sich aus den Experimenten zur Oberflächenmodifizierung der porösen Schläuche Hinweise auf eine variierende Stabilität des Schlauchmaterials in Abhängigkeit von der Wahl des Polymers, Lösungsmittels und der Prozessbedingungen ergaben. Der zur Herstellung der Schläuche genutzte Phaseninversionsprozess war insbesondere durch die Wahl des Lösungsmittels zu optimieren (Das Verfahren beruht auf der Injektion einer heißen Lösung des P3HB/4HB Copolymers in DMSO/Wasser-Gemischen in ein Glasrohr zur Ausbildung einer gleichmäßigen dünnen Polymerschicht und nachfolgender Abkühlung auf -10°C). Die morphologische Struktur der erhaltenen Schläuche wies deutliche Unterschiede in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel (reines DMSO vs. DMSO/Wasser-Gemisch) auf (Abb. 1) und bestätigten die bessere Eignung der Gemische mit Wasseranteilen von 5% für die Herstellung der Schläuche. Die Ergebnisse von Spannungs-Dehnungs-Experimenten (Abb. 2) zeigen

eine deutliche Abhängigkeit der mechanischen Eigenschaften der Schlauchmaterialien sowohl von der Polymerzusammensetzung (4HB-Gehalt des Copolymers) als auch von der Wahl des Lösungsmittels, wobei der Einfluss der Lösungsmittelzusammensetzung bei Verwendung des Polymers mit dem geringsten 4HB-Anteil (8%) am stärksten ausgeprägt war. Insgesamt erwiesen sich die aus Copolymeren mit 8 bzw. 11 % 4HB-Anteil nach dem oben beschriebenen Verfahren hergestellte Schlauchproben als hinsichtlich mechanischer und morphologischer Charakteristik geeignet.

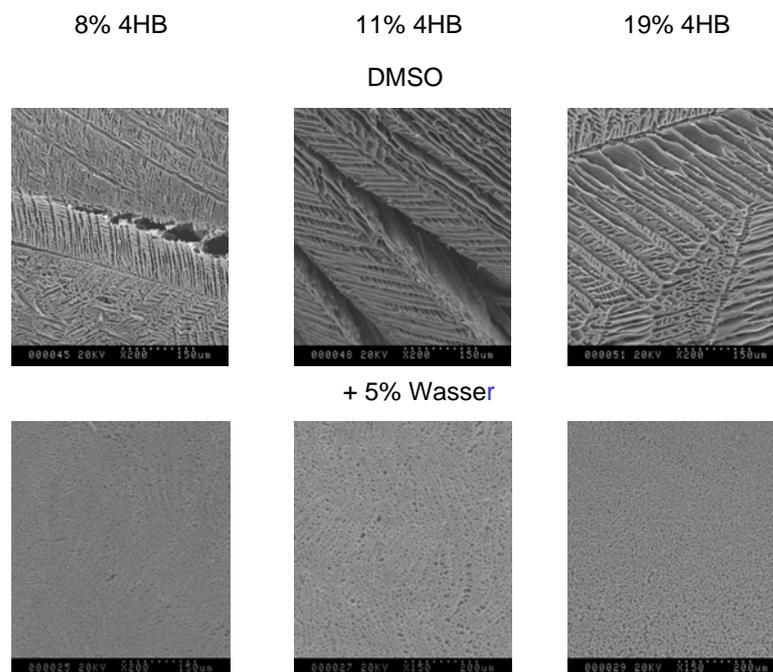


Abb. 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zur Charakterisierung der Außenoberfläche der PHB-Schläuche in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Copolymers (8 vs. 11 vs. 19 % 4HB) und der Wahl des Lösungsmittels (oben: reines DMSO; unten: DMSO-Wasser-Gemisch mit Wasseranteil von 5%)

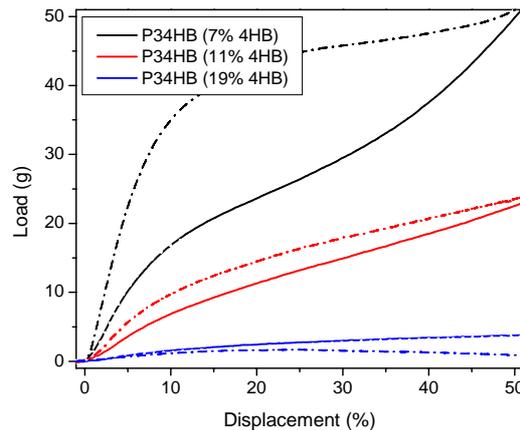


Abb. 3: Spannungs-Dehnungs-Charakteristik der PHB-Schläuche in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Copolymers (8 vs. 11 vs. 19 % 4HB) und der Wahl des Lösungsmittels (durchgezogene Linie: reines DMSO; Strich-Punkt-Linie: DMSO-Wasser-Gemisch mit Wasseranteil von 5%)

Oberflächenmodifizierung und Grenzflächencharakterisierung der PHA-Materialien

Zur Entwicklung grenzflächenselektiver Modifizierungsverfahren gelang es dünne, in wässrigen Elektrolytlösungen bzw. Zellkulturmedien delaminationsstabile Polyhydroxybutyrat-Filme (Schichtdicke ca. 40 nm) auf Glasträgern und Silizium-Wafern zu präparieren, die die Anwendung sensitiver oberflächenanalytischer Methoden (XPS, ATR-FTIR, Ellipsometrie, AFM) erlauben. Für die Herstellung dieser Dünnschichten war die oxidative Vorbehandlung der SiO₂-Trägeroberflächen zu optimieren. Die Morphologie der durch Spin-Coating aus Chloroform-Lösungen des Polymers gebildeten Dünnschichten zeigte die für PHB charakteristische, ausgeprägte Bildung spherulitischer Kristalle, die durch die Filmbildungsbedingungen oder nachträgliche Temperungsschritte nur wenig beeinflussbar war (Abb. 4).

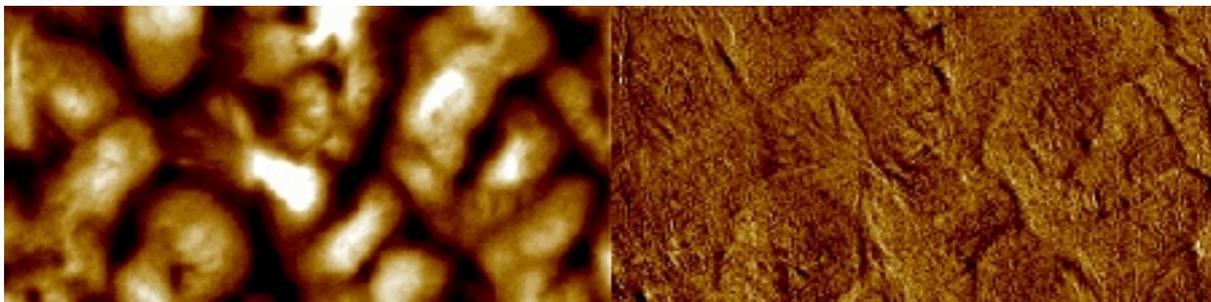


Abb. 4: Morphologie einer durch Spin-Coating erzeugten PHB-Dünnschicht (AFM, links Höhenbild, rechts Phasenbild, Bildbreite jeweils 5 µm, z Range links 60 nm, rechts 30 nm)

Anhand der so erzeugten PHB-Modellsubstrate wurden verschiedene Oberflächenmodifizierungsverfahren zur Funktionalisierung des Materials angewandt und verglichen:

- Niederdruck-Plasmabehandlung in NH_3 - und H_2O -Atmosphären
- Hydrolyse in alkalischen Lösungen (NaOH)
- Enzymatische Behandlung durch Inkubation mit Esterase aus der Schweinleber bzw. bakterielle Lipase

Für alle Verfahren konnten Prozessbedingungen aufgefunden werden, die eine wirksame Hydrophilierung der hydrophoben PHB-Oberfläche herbeiführen lassen. Sowohl NH_3 - als auch H_2O -Plasmabehandlungen ergaben eine gut abstufbare Hydrophilierung in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer (Abb. 5). Der Vergleich der enzymatischen Behandlungen ergab in beiden Fällen eine sehr ausgeprägte Hysterese des Wasserkontaktwinkels (26° bzw. 75°) beim Vergrößern/Verkleinern des liegenden Tropfens, für die Esterase wurden Werte des Rückzugswinkels $> 20^\circ$ gefunden werden. Bei der enzymatischen Behandlung beeinflussten adsorptiv am Material abgeschiedene Enzyme und Abbauprodukte den Modifizierungsprozess. Für die nasschemische (alkalische) Hydrolyse war es insbesondere schwierig, die Behandlungswirkung auf die Materialgrenzfläche zu begrenzen.

Insgesamt erwies sich das Verfahren der Niederdruck-Plasmabehandlung als am besten geeignet für die oberflächenselektive, chemisch steuerbare Modifizierung, die vorteilhafterweise die Hydrophilierung der PHB-Oberfläche sowohl unter Einführung basischer wie auch azider Funktionalitäten erlaubt (Abb. 6).

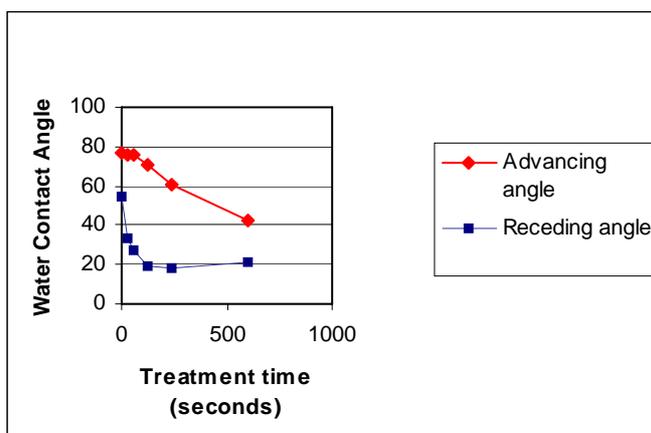


Abb. 5:
Wasserkontaktwinkel von PHB-Oberflächen nach NH_3 -Plasmabehandlung, Vergleich von unterschiedlichen Behandlungszeiten

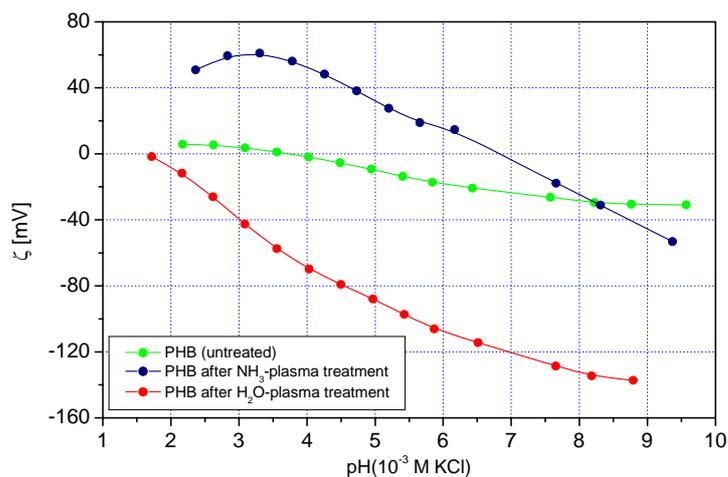


Abb. 6:
pH-Wert-Abhängigkeit des Zeta-Potentials von PHB-Oberflächen nach bzw. NH₃- bzw. H₂O Plasmabehandlung

Im Anschluss wurden entsprechende Oberflächenmodifizierungsverfahren an aus verschiedenen 3HB-co-4HB Copolymeren hergestellten Polymerfilmen angewandt. Die Modifizierungswirkung verschiedener Behandlungsprozesse wurde dazu eingehend auf Basis von Ergebnisse der Röntgen-Photoelektronenspektroskopie analysiert. Tabelle 1 gibt hierzu exemplarisch die Elementverhältnisse, Tabelle 2 die Ergebnisse der Auflösung des C1s Kohlenstoffspektrums für die Oberflächen von Poly3-hydroxybutyrat und Poly3-hydroxybutyrat co 4-hydroxybutyrat-Proben (19% 4HB-Anteil).

Tabelle 1: XPS-Daten an PHA- Oberflächen nach verschiedenen Modifizierungsprozessen- Elementverhältnisse (Übersichtsspektrum)

Polymer und Behandlung	[O]:[C]	[N]:[C]
P(3HB) unbehandelt	0.45	
P(3HB) NaOH	0.52	
P(3HB) H ₂ O Plasma	0.52	
P(3HB) NH ₃ Plasma	0.41	0.07
P(3HB-co-4HB) unbehandelt	0.46	
P(3HB-co-4HB) NaOH	0.46	
P(3HB-co-4HB) H ₂ O Plasma	0.68)	
P(3HB-co-4HB) NH ₃ Plasma	0.48	0.06

Tabelle 2: XPS-Daten an PHA- Oberflächen nach verschiedenen Modifizierungsprozessen- Zuordnung der Subsignale im C1s Kohlenstoffspektrum

	A	B	C	D	E
	CxHx	$\underline{\text{C}}-\text{C}(\text{O})-$ O-C C-NR	$\text{O}=\underline{\text{C}}-\text{O}-$ $\underline{\text{C}}$ $\underline{\text{C}}-\text{OH}$	$\text{O}=\underline{\text{C}}-$ O-C	$\text{O}=\underline{\text{C}}<$ Keto
P(3HB-co-4HB) NaOH	32,42	20,81	25,94	20,83	0
P(3HB) NaOH	32,11	21,89	24,1	21,89	0
P(3HB-co-4HB) H ₂ O Plasma	30,85	22,2	24,73	22,22	0
P(3HB) H ₂ O Plasma	28,94	24	23,04	24,02	0
P(3HB-co-4HB) NH ₃ Plasma	34,4	23,66	21,58	17,71	2,64
P(3HB) NH ₃ Plasma	36,11	22,47	21,06	16,33	4,03
P(3HB-co-4HB) unbehandelt	48,22	16,66	18,48	16,65	0
P(3HB) unbehandelt	32,84	22,53	22,08	22,55	0

Ergebnisse zur Reorganisation oberflächengebundener Matrixproteine an mit aziden Funktionalitäten versehenen Copolymersubstraten konnte bestätigt werden. Die schwächere Verankerung des Proteins an den entsprechenden Oberflächen nach Wasserdampf-Plasma bzw. NaOH-Behandlung wurde als Ursache für die beobachtete Abstufung herausgearbeitet. - Abb. 7 zeigt dazu die zeitabhängige Verdrängung von adsorbiertem Fibronectin durch Serumalbumin an den Poly3-hydroxybutyrat co 4-hydroxybutyrat-Proben (19% 4HB-Anteil)-Oberflächen nach unterschiedlicher Vorbehandlung.

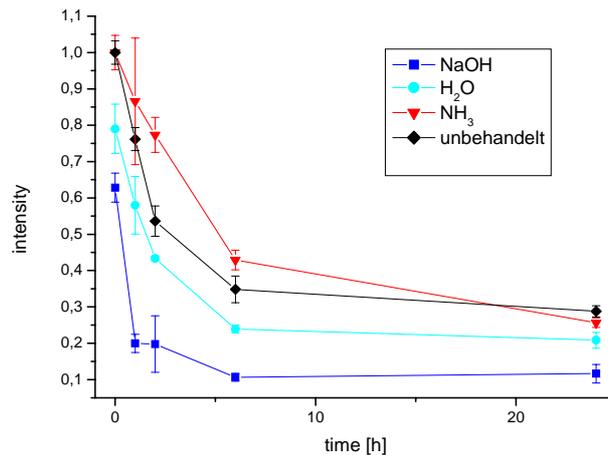


Abb. 7: zeitabhängige Verdrängung von adsorbiertem Fibronektin durch Serumalbumin an den Poly3-hydroxybutyrat co 4-hydroxybutyrat-Proben (19% 4HB-Anteil)-Oberflächen nach unterschiedlicher Vorbehandlung (in situ Detektion durch Erfassung von TRITC-markiertem Fibronektin mittels CLSM)

Weiterhin wurde die Reorganisierbarkeit von präadsorbierten Fibronektinschichten auf oberflächenfunktionalisierten PHB-Proben durch adhärenzte Endothelzellen untersucht. 50 Minuten nach dem Einsäen der Zellen sind Unterschiede in der Fibrillendichte zu erkennen, die eine Reorganisierbarkeit in der Reihenfolge unbehandelte Probe \leq NH₃-Plasma < H₂O-Plasma \ll NaOH-Behandlung belegen. Auch hier konnten für P3HB/4HB(8%)-Proben die nach der Anwendung von verschiedenen Behandlungsverfahren für P3HB und P3HB/4HB(19%)-Proben gefundenen Ergebnisse bestätigt werden.

Für die unter den verglichenen Behandlungen effektivste Modifizierung durch NaOH-Lösungen wurde weiterhin die Abhängigkeit der Behandlungswirkung von der NaOH-Konzentration (bei einer Behandlungszeit von 5 Minuten) erfasst. Wie in Abb. 3 zu sehen war gegenüber der unbehandelten Probe eine etwas stärkere Umordnung des voradsorbierten Fibronektins durch Endothelzellen schon bei den in 10mM NaOH behandelten Proben zu sehen. Eine deutlich stärkere Reorganisation ergab sich für die in 100mM NaOH behandelten Proben während eine sehr starke Umordnung für die in 1M NaOH modifizierten Proben gefunden wurde. Für diese Proben wurde teilweise das Ablösen der Fibronektinfibrillen von der Polymeroberfläche beobachtet. P3HB und P3HB/4HB(8%)-Proben verhielten sich auch hier sehr ähnlich.

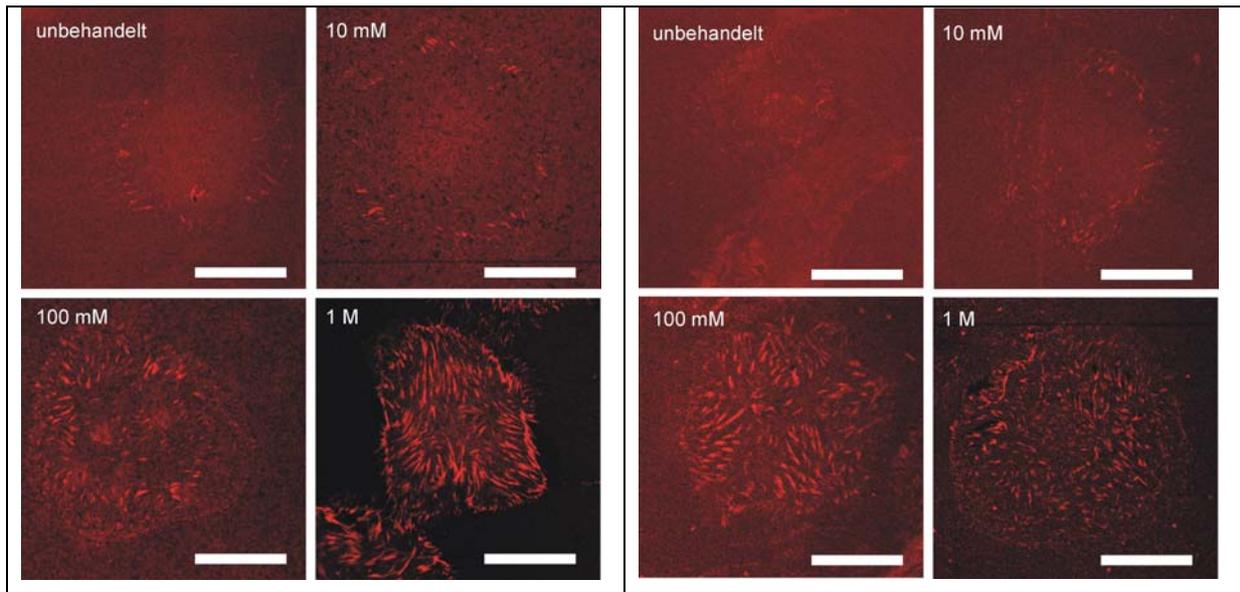


Abb. 8: Reorganisation voradsorbierter Fibronektinschichten auf P3HB (links) P3HB/4HB(8%) (rechts) nach 5 Minuten NaOH-Behandlung in verschiedenen konzentrierten NaOH-Lösungen (konfokale Lasermikroskopie, Skala 20 μ m, Fibronektin rot)

Um ausschließen zu können dass Morphologieeffekte die Zell-Matrix-Adhäsion an den modifizierten Proben zusätzlich beeinflussen wurden modifizierte Polymeroberflächen auch rasterkraftmikroskopisch untersucht (Abb. 9). Es war zu konstatieren dass die angewandten Methoden keine signifikante Veränderung der Schichtmorphologie bewirken so dass die oben diskutierten Effekte klar der Veränderung der chemischen Konstitution der Polymere zuzuordnen sind. Auch dies gilt gleichermaßen für P3HB und P3HB/4HB(8%).

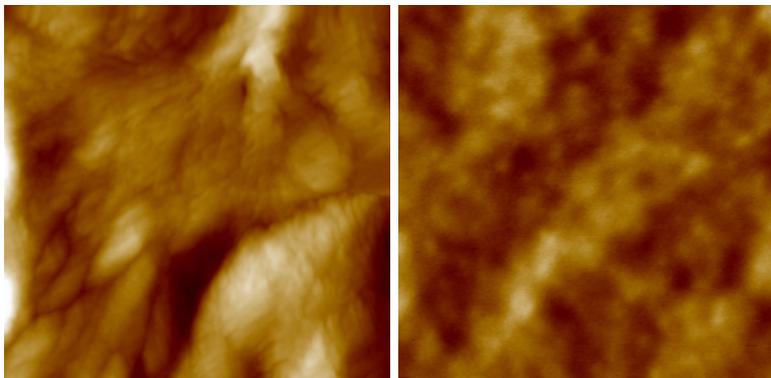


Abb. 9: Morphologie von NaOH-behandelten P3HB-Oberflächen (AFM-Aufnahmen, Bildgröße 1 μ m, Höhenskala links 40nm, rechts 20 nm)

Auf der Basis dieser Untersuchungsergebnisse wurden schließlich auch makroskopische Volumenproben aus P3HB und P3HB/4HB(8%) modifiziert. Dabei wurde einerseits die Langzeitstabilität der Behandlungswirkung an textilen P3HB-Strukturen untersucht. Um die allseitige Hydrophilierung der Scaffolds zu gewährleisten kam eine spezielle Mikrowellen-Plasmaapparatur mit rotierender Trommel zum Einsatz (Buck Darius 10HM). Zur Beurteilung des Langzeitverhaltens der Benetzungsverbesserung wurde in geeigneten Abständen die Zeit bis zum Einsinken des Scaffolds in ein mit Wasser gefülltes Gefäß gemessen (ein unbehandeltes Scaffold sinkt überhaupt nicht ein). Die Untersuchungen erfolgten für mehrere Plasmaparameter sowie für unterschiedlich dichte Scaffolds. Im folgenden sind exemplarisch die Ergebnisse für zwei Plasmaparameter (270W, 18Pa, 300s bzw. 600s) sowie zwei Scaffold-Strukturen A und B dargestellt.

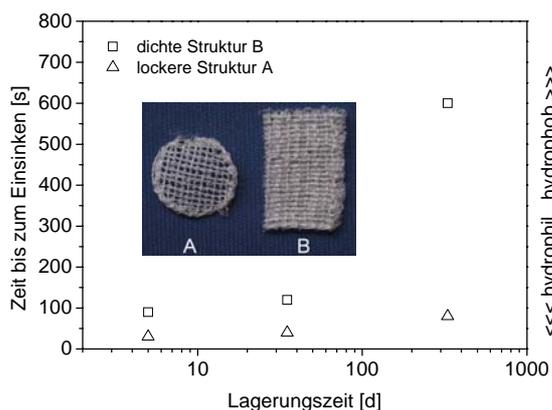


Abb. 10: Einfluß der Scaffold-Struktur

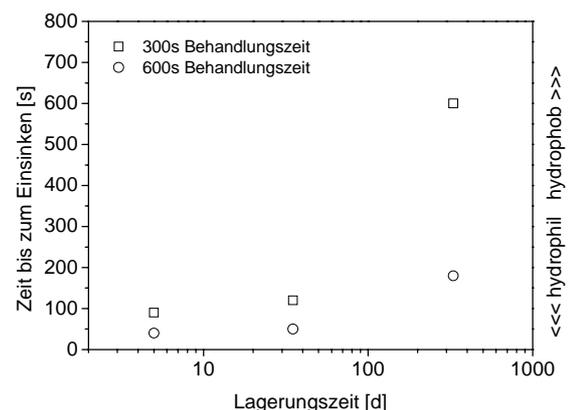


Abb. 11: Einfluß der Plasmabehandlungszeit für die Struktur B

Abb. 10 verdeutlicht, daß mit der verwendeten Methode unter geeigneten Bedingungen (hier: eine eher lockere Scaffold-Struktur) eine hervorragende Langzeitstabilität erzielt werden kann. Die Hydrophilierung bleibt über ca. ein Jahr nahezu unverändert. Eine dichtere Scaffold-Struktur zeigt zunächst ein weniger günstiges Verhalten. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die Plasmawirkung Hohlräume der dichteren Struktur nicht oder nur in abgeschwächter Form erreicht. Bis zu einem gewissen Grad kann dem jedoch durch eine intensivere bzw. längere Plasmabehandlung entgegengewirkt werden (Abb. 11).

Endothelzellkultur auf oberflächenmodifizierten Schlauchstrukturen auf Basis von PHA-Copolymeren

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. M. Shoichet, Institute of Biomaterials der University of Toronto, Kanada, wurden durch ein Phaseninversionsverfahren hergestellte, hochporöse Schlauchstrukturen aus P3HB/4HB-Copolymeren hergestellt und bezüglich ihrer mechanischen sowie auch der Degradationseigenschaften verglichen. Aus diesem Vergleich, der in einer Masterarbeit an der University of Toronto dokumentiert wurde, ergab sich eine klare Präferenz für Copolymere mit 8% 4HB-Anteil. Copolymere mit diesem Anteil wurden dementsprechend mit Hilfe der oben diskutierten Modifizierungsverfahren behandelt. Durch Kulturexperimente mit Endothelzellen wurde geklärt, welche Behandlung für die porösen Zellträgerstrukturen geeignet ist (Abb. 12).

Obwohl die initiale Zelldichte auf den im NH_3 -Plasma behandelten und mit Fibronectin vorbeschichteten Proben am höchsten war konnte an den im H_2O -Plasma behandelten Proben eine stärker ausgeprägte Tendenz der zur Bildung gestreckter Zellformen zu erkennen, die die Hohlräume der porösen Struktur durchziehen (Abb. 13).

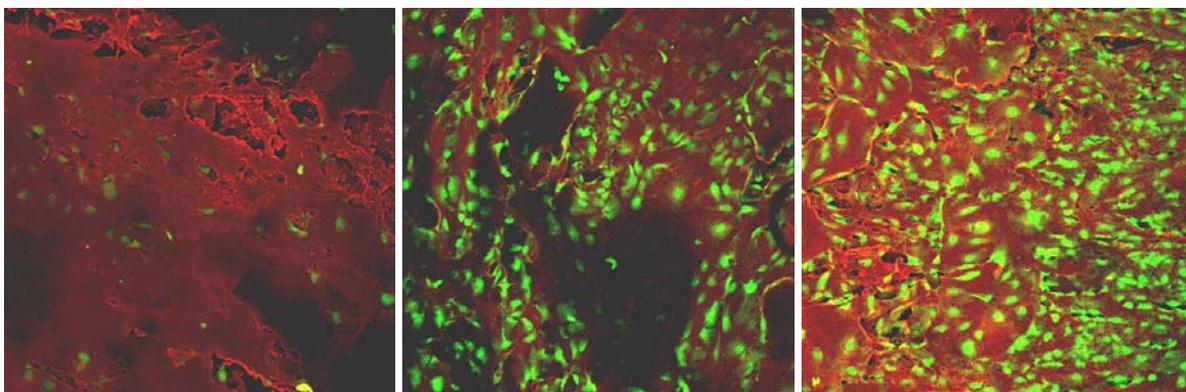


Abb. 12: Übersichtsbilder (Bildgröße 1mm) zur Adhäsion und Proliferation von Endothelzellen in porösen P3HB/4HB(8%) 3D-Strukturen nach Fibronectin-Vorbeschichtung und 4 Tagen Kultur- links unbehandelte Probe, Mitte H_2O -Plasmabehandlung, rechts NH_3 -Plasmabehandlung (Fibronectin rot, Zellen grün markiert)

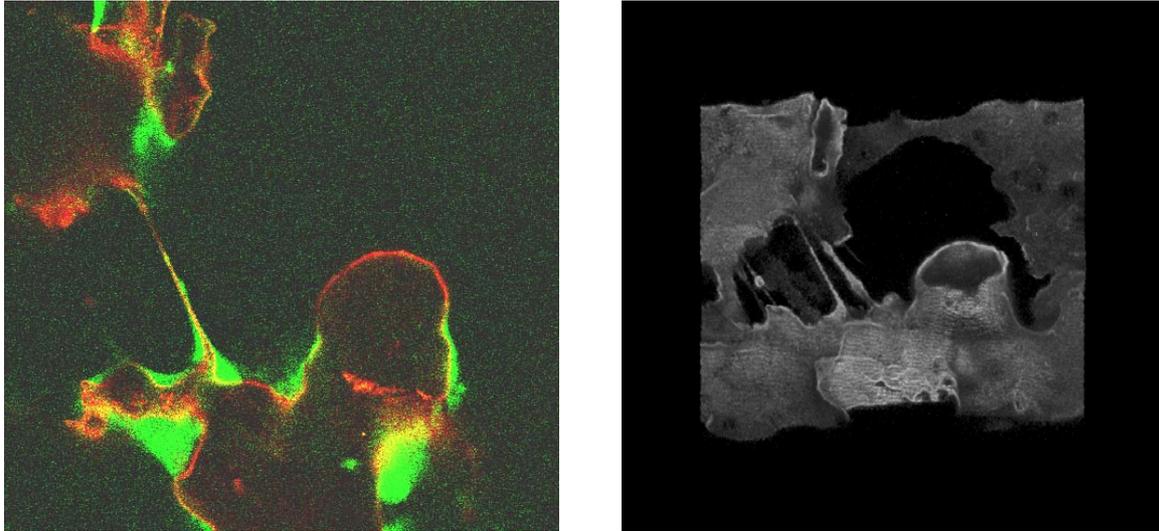


Abb. 13: Gestreckte Endothelzellen überbrücken Hohlräume der im H₂O-Plasma modifizierten porösen P3HB/4HB(8%)-Strukture (Bildgröße 250 µm); links Fibronectin rot, Zellen grün markiert, rechts 3D Visualisierung der Fibronectinverteilung

Rekonstitution von Collagen I Fibrillen in Gegenwart von Glycosaminoglycanen in vitro

Die im Rahmen des Teilprojektes erarbeiteten Möglichkeiten zur Gestaltung textiler Polymer-Scaffolds auf PHB-Basis erlauben eine weitgehende physikalische, chemische und biomolekulare Anpassung der erzeugten Strukturen an die Ziele spezifischer Tissue Engineering Konzepte. Da die Anbindung von extrazellulären Matrices im Rahmen dieses Teilprojektes eine wichtige Option zur Einstellung der bioaktiven Charakteristik degradierbarer Scaffolds (Steuerung der Zell-Matrix-Adhäsion und Bindung von Wachstumsfaktoren) ist, wurden Arbeiten zur sterilen Rekonstitution von Kollagen-Fibrillen und Kollagen-Glucosaminoglycan-Cofibrillen realisiert und analytisch untersucht.

Die Erzeugung von Collagen-Cofibrillen mit den Glucosaminoglycanen Heparin und Hyaluronsäure ist dabei insbesondere durch die eingeschlossene Implementierung spezifischer Bindungsstellen für Wachstumsfaktoren für die Entwicklung von bioaktiven Polymer Scaffolds attraktiv. Dabei konnten bereits früher beobachtete charakteristische Unterschiede in der Morphologie der Cofibrillen je nach Art und Konzentration des zugesetzten Glucosaminoglycan durch rasterkraftmikroskopische Untersuchungen (Abb. 14) erhärtet und mit Mikro-DSC-Experimenten zum

thermischen Denaturierungsverhalten der entsprechenden Cofibrillen (Abb. 14) untersucht werden.

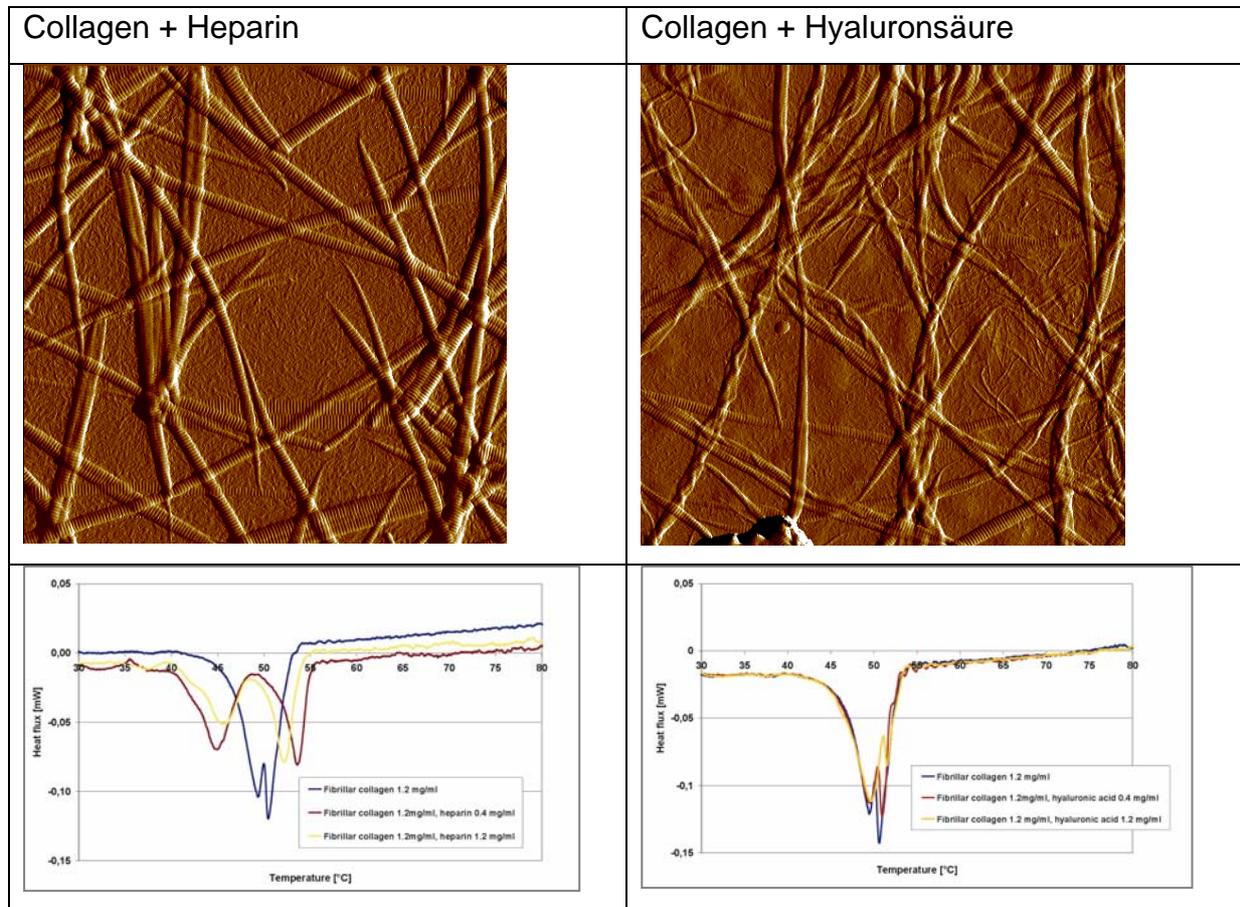


Abb. 14: Charakterisierung von Collagen I – Heparin bzw. Collagen I – Hyaluronsäure-Cofibrillen durch (oben) Rasterkraftmikroskopie (Bildgröße 10x10 μm^2) und (unten) Mikro-DSC (Heizrate 0.5K/min).

2.2.3 Projekt B3: Steuerung der Angiogenese an biologisierten Implantatgrenzschichten und in resorbierbaren Knochenersatzwerkstoffen

Dr. C. Wolf, Dr. A. Lode, Dr. Th. Hanke, Dr. D. Scharnweber, Dr. M. Gelinsky, Prof. Dr. W. Pompe, Prof. Dr. H. Worch (TPL), Institut für Werkstoffwissenschaft der TU Dresden, BIOMET Merck Biomaterials GmbH, Darmstadt

Zielsetzung des Teilvorhabens

Für das Langzeitverhalten von Implantaten im Knochenkontakt ist entscheidend, dass in möglichst kurzen Zeiträumen qualitativ hochwertiges Gewebe um das Implantat neu gebildet wird. Wesentliche Voraussetzung dafür ist eine schnelle und native Vaskularisierung des Umgebungsgewebes. Ziel des Vorhabens ist es deshalb, durch Aufbau mineralisierter Matrices aus Biopolymeren (Kollagen Typ I) unter Einbeziehung von Glykosaminoglykanen auf Implantatoberflächen (Titan) bzw. durch Erzeugung von mit Kollagen funktionalisierten Calciumphosphat-Knochenzementen biomimetische und knochenähnliche Schichtsysteme bzw. 3D-Materialien zu erzeugen, diese als Substrate für die Immobilisierung von VEGF zu nutzen und an ihnen Untersuchungen zur Angiogenese *in vitro* durchzuführen.

Zusammenstellung der Ergebnisse

Teil A: Metallische Implantate

Erzeugung biologischer Matrices aus Kollagen bzw. mineralisierten Kollagenfibrillen auf metallischen Implantatoberflächen bzw. von porösen Calciumphosphat-Knochenzementen mit Faserverstärkung aus Kollagen/ mineralisiertem Kollagen.

Durch Adsorption sowie kovalente Vernetzung von fibrillärem Kollagen an TiAl6V4-Oberflächen konnten Matrices geschaffen werden, die hinsichtlich der Schichtdicke sowie Strukturierung variiert werden können. Dies kann durch die Methode der Erzeugung der fibrillären Strukturen (separate Fibrillogenese oder Fibrillogenese direkt auf den Oberflächen sowie weitere Parameter wie z.B. Kollagenkonzentration) als auch durch die Anwendung verschiedener Gefriertrocknungsparameter (Einfriergeschwindigkeit) erreicht werden. Die immobilisierten Kollagenmengen liegen im Bereich von $7,5 \pm 1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ für adsorbierte Kollagenschichten und bis $503 \pm 48 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ für dreidimensionale vernetzte Kollagenschichten. Durch Variation der Gefriertrocknungsparameter wurde die Porengrößenverteilung gezielt beeinflusst.

Für optimales Einwachsen von Zellen wurden vergleichsweise große Poren im Bereich von 50 - 100 μm eingestellt.

Die kovalente Vernetzung im Schichtsystem erfolgte mit einem wasserlöslichem Carbodiimid-Derivat (EDC), welches rückstandsfrei anwendbar ist, jedoch einen geringeren Vernetzungsgrad erreicht als das langjährig eingesetzte Glutaraldehyd. Durch Veränderung der Vernetzungsparameter (Konzentration des Vernetzungsmittels, Temperatur und Vernetzungsdauer) konnten verschiedene Vernetzungszustände eingestellt werden (TP 1.1.1.).

Bei Ausbildung offenporiger Netzwerkstrukturen gelang es, die am Titan adsorbierten Kollagenschichten durch anodische Polarisation in die Oxidschicht zu integrieren (TP 1.1.2.).

Durch elektrochemisch gestützte Abscheidung wurden an der TiAl6V4-Oberfläche Hydroxyl-apatitschichten erzeugt. In Kombination mit fibrillärem Kollagen konnten auf diesem Weg mineralisierte knochenanalogue Matrices bereitgestellt werden (TP 1.2).

Die Kombination von sandgestrahlten Ti-Oberflächen, porösen dreidimensionalen Kollagenstrukturen sowie einer gepulsten Abscheidung des Hydroxylapatits ermöglichte es, mineralisierte Kollagenmengen mit 650 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Kollagen und ca. 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Hydroxylapatit zu generieren (Abb. 1). Bereits die Verwendung von sandgestrahlten anstelle von polierten Oberflächen führte zu einer starken Vergrößerung der abgeschiedenen HAP-Mengen.

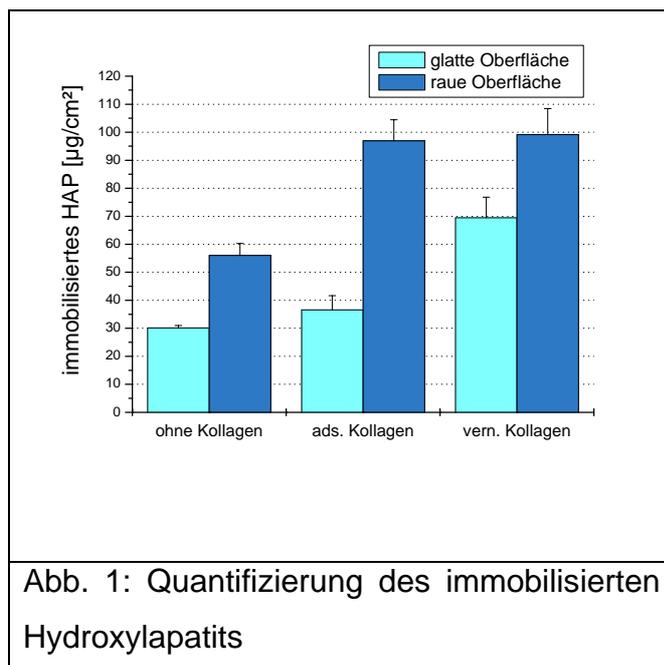
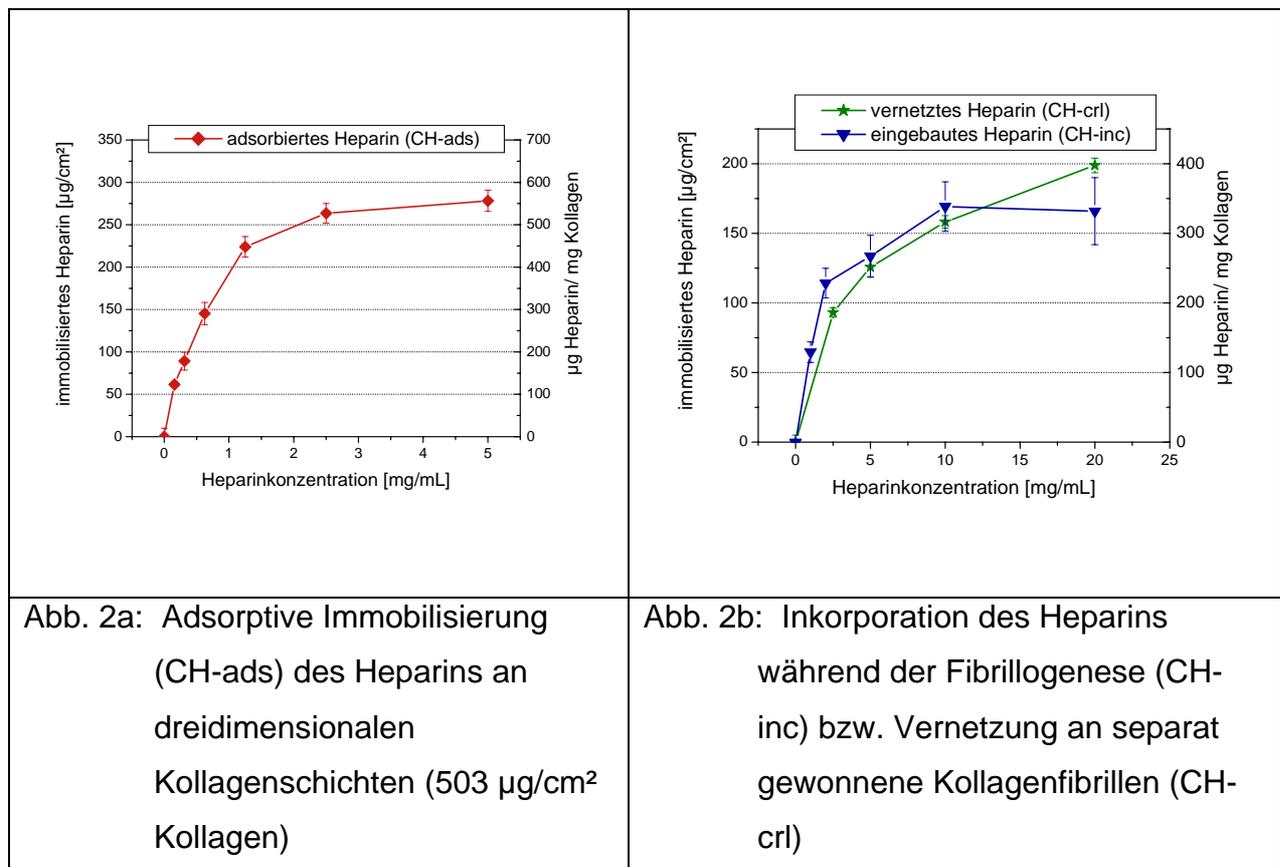


Abb. 1: Quantifizierung des immobilisierten Hydroxylapatits

Im Fall der polierten Proben wurde durch die Immobilisierung einer dicken Kollagenschicht ebenfalls eine deutliche Erhöhung des abgeschiedenen HAP erzielt. Die Haftfestigkeit dieser Schichten war jedoch nicht zufrieden stellend. Bei den rauen Oberflächen wurde die HAP-Menge durch die dicke Kollagenschicht nur noch geringfügig vergrößert, jedoch die immobilisierte Kollagenmenge von $\sim 40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf $\sim 650 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ gesteigert.

Funktionalisierung der Matrizes durch Anbindung von VEGF

Da VEGF als heparinbindender Wachstumsfaktor beschrieben wird, bestand die Zielsetzung, VEGF über die natürliche Affinität zu Heparin an artifiziellen Matrizes zu immobilisieren. Dazu wurden verschiedene Wege der Heparinimmobilisierung verfolgt: 1.) Adsorption, 2.) Einbau in die Kollagenmatrix in der Phase der Fibrillogenese 3.) kovalente Bindung an die Kollagenmatrix. In Abhängigkeit von der eingesetzten Heparinkonzentration konnten mit allen 3 Methoden definiert verschiedene Heparinhalte der Matrizes eingestellt werden (Abb. 2).



Als entscheidende Parameter für die Menge des immobilisierten Heparins erwiesen sich die Konzentration des Heparins sowie die eingesetzte Kollagenmenge. An adsorbierten Kollagenschichten konnten nur vergleichsweise geringe Heparinmengen immobilisiert werden.

Für die Untersuchungen zur Bindung und Freisetzung des VEGF wurden Matrizes mit den jeweils höchsten erzielten Heparinmengen eingesetzt (Ch-ads: 278 ± 12 µg/cm², CH-crl: 169 ± 18 µg/cm², CH-inc: 195 ± 8 µg/cm²).

Während für das durch Vernetzung immobilisierte bzw. das während der Fibrillogenese eingebaute Heparin keine Freisetzung über einen Zeitraum von 14

Tagen beobachtet werden konnte, zeigte sich für das adsorbierte Heparin eine starke Freisetzung, die bereits in den ersten 2 h Lagerung bei 37°C in PBS zu einer Verminderung der immobilisierten Menge um 50 % führte (TP 2.2.1).

Untersuchungen zum Einfluss der organischen Modifizierung (Kollagen, Heparin) bzw. der anorganischen Modifizierung (HAP) (TP 2.1. und 2.2.) auf Adsorptionsisothermen für ausgewählte Oberflächenzustände zeigten, dass dreidimensionale vernetzte Kollagenschichten gegenüber adsorbierten Kollagenschichten ein wesentlich größeres Potential zur Wachstumsfaktorbindung aufweisen, so dass diese weitergehend für die Freisetzungsstudien eingesetzt wurden.

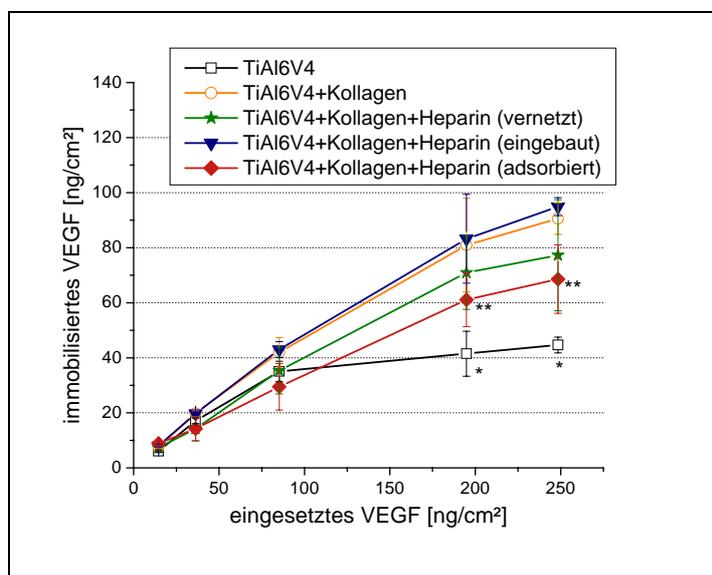


Abb. 3: Bindung von VEGF an dreidimensionale Kollagenmatrizes im feuchten Milieu (Adsorption 18h bei Raumtemperatur, *p < 0,01 gegenüber allen anderen Zuständen, **p < 0,05)

Während für nicht modifizierte Referenzoberflächen eine Sättigung bei 85 ng/cm² eingesetztem VEGF beobachtet wurde, trat für alle dreidimensionalen Matrizes im untersuchten Bereich von 0 – 256 ng/cm² keine Sättigung auf. Die Unterschiede in der Bindungskapazität des VEGF in Bezug auf den Zusatz und die Art der Immobilisierung von Heparin in den Matrizes waren nur für adsorbiertes Heparin signifikant.

Durch die zusätzliche Mineralisierung der dreidimensionalen Kollagenschichten, die wie oben beschrieben zur Erzeugung knochenanaloger Matrizes führte, wurde keine weitere Erhöhung der Bindungskapazität für VEGF erzielt.

Charakterisierung der Schichtmatrizes

Die Einbeziehung von Heparin in die Fibrillogenese führte zu deutlichen Änderungen der Kinetik der Fibrillenbildung sowie der Struktur der sich bildenden Kollagenfibrillen (Abb. 4).

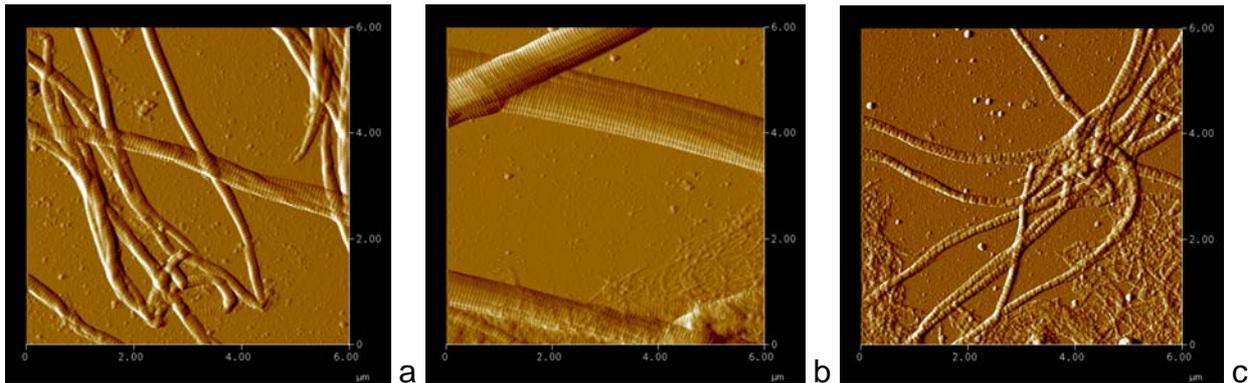
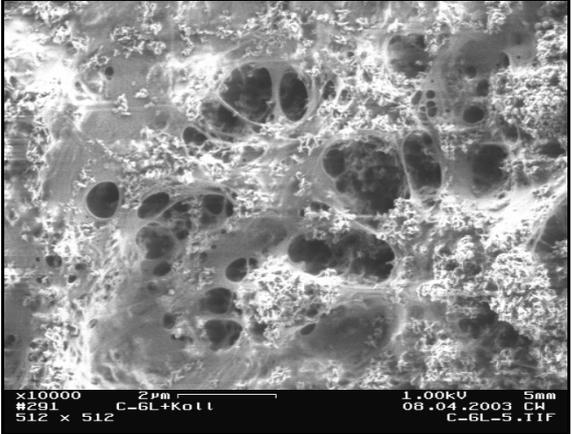
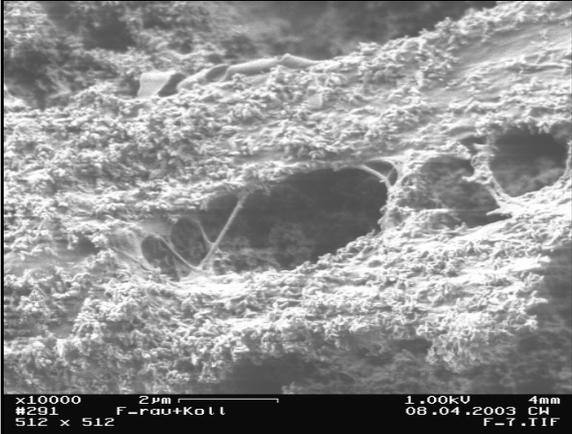


Abb. 4: Veränderung der Struktur der Kollagenfibrillen bei Einbau von Heparin während der Fibrillogenese; Verhältnis Heparin/Kollagen: a) Referenz ohne Heparin b) 0,005 c) 2

Dies beeinflusst die weitere Verarbeitung zu vernetzten 3d-Schichten insofern, dass die Ausbildung einer porösen Struktur beim Gefriertrocknungsprozess erschwert wird und sich größere zusammenhängende dichte Matrixabschnitte ausbilden (Abb. 5). Die nachträgliche Einbeziehung des Heparins im Vernetzungsschritt (CH-crl) führte zu keiner Veränderung der Matrixstruktur bzw. -verteilung.

<p>Abb. 5a: TiAl6V4 modifiziert mit dreidimensionaler Kollagenmatrix und vernetztem Kollagen (CH-crl)</p>	<p>Abb 5b: TiAl6V4 modifiziert mit dreidimensionaler Kollagenmatrix mit eingebautem Heparin (CH-inc)</p>

Für die mineralisierten Matrizes konnte anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 6) eine gleichmäßige Strukturierung und homogene Verteilung des sich bildenden Minerals festgestellt werden (TP 3.1).

	
<p>Abb. 6a: Mineralisiertes Kollagen auf polierten Proben mit adsorbierter Kollagenschicht (23 µg/cm² Kollagen, 36 µg/cm² HAP)</p>	<p>Abb. 6b: Mineralisiertes Kollagen auf polierten Proben mit vernetzter Kollagenschicht (650 µg/cm² Kollagen, 99 µg/cm² HAP)</p>

Aufgrund der starken Autofluoreszenz des vernetzten Kollagens über einen sehr breiten Wellenlängenbereich war es nicht möglich, mittels Immunfluoreszenz die Verteilung des VEGF in den Matrizes zu beurteilen (TP 3.1).

Problematisch erwies sich die quantitative Ermittlung der Haftfestigkeit der erzeugten Matrizes. Beim 3-Punktbiegeversuch wurde eine Penetration des Klebstoffes durch die Matrizes bis zur Titanoberfläche beobachtet, so dass die Messergebnisse verfälscht wurden. Bei Kraftmessungen mittels AFM erfolgt eine starke Kontamination der Spitzen mit Protein, so dass mit dieser Methode ebenfalls keine exakten Werte ermittelt werden konnten. Abreißversuche mit Klebeband führen zu keiner quantifizierbaren Aussage, zeigten aber, dass die vernetzten Schichten unter den verwendeten Vernetzungsbedingungen in sich stabil sind. Entscheidend für die Haftfestigkeit erwies sich die Grenzfläche TiAl6V4 – Kollagenmatrix, wobei diese durch Einsatz sandgestrahlter Oberflächen so gestaltet werden konnte, dass alle Behandlungsschritte im Rahmen der Freisetzungs- und Zellversuche zu keiner Ablösung der Schichten führten. Durch den Einbau der oberflächennahen Kollagenschichten in die Oxidschicht konnte keine zusätzliche Stabilisierung der

Schichten erreicht werden. Aufgrund des hohen zeitlichen Aufwandes für die Probenpräparation bei keiner Verbesserung der Haftfestigkeit der erzeugten Schichten wurde im Folgenden auf den elektrochemischen Einbau des Kollagens verzichtet (TP 3.1).

Die Ausbildung von kristallinem HAP wurde für alle mineralisierten Matrizes mittels FTIR-Spektroskopie abgesichert (TP 3.1.).

Ein enzymatischer Abbau mittels bakterieller Kollagenase führte zu stärkerem Kollagenabbau, je weniger die Schichten vernetzt waren. Das Ausmaß des Proteinabbaus ist jedoch neben dem Vernetzungsgrad auch sehr stark von der eingesetzten Enzymkonzentration abhängig (TP 3.2). In Adaption an die *in vivo* relevanten Bedingungen wurden verschieden modifizierte Proben einer Freisetzung unter Anwesenheit von Matrixmetalloproteinasen (MMP) unterworfen. Unter Verwendung von aktiviertem MMP1 und MMP2 zeigte sich, dass bei Einsatz käuflich erworbener MMPs die eingesetzte Kollagenaseaktivität unabhängig vom gewählten Vernetzungszustand nicht ausreicht (in vertretbarem finanziellen Rahmen), um signifikante Kollagenmengen abzubauen.

Biochemische Charakterisierung der Freisetzungskinetik von VEGF

Das Freisetzungsverhalten von VEGF wurde unter nahezu physiologischen Bedingungen in 1%-iger BSA in PBS bzw. mit serumhaltigen Endothelzellmedium bei 37 °C untersucht (Abb. 7). Unmodifizierte Oberflächen, welche die geringste Bindungskapazität für VEGF aufweisen (s. o.), führten zur Freisetzung der höchsten VEGF-Mengen innerhalb der ersten 24 h (entsprechend 60% der immobilisierten Ausgangsmenge). Alle modifizierten dreidimensionalen Matrizes und insbesondere die heparinhaltigen wiesen eine deutlich geringere initiale Freisetzung auf.

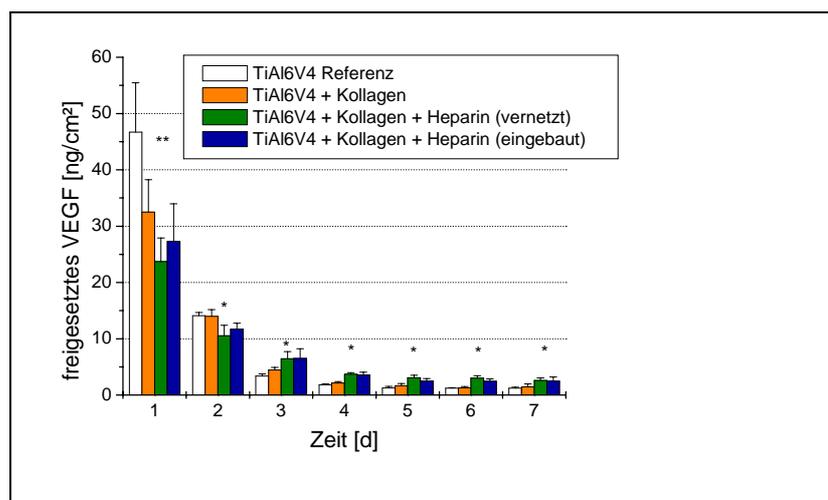
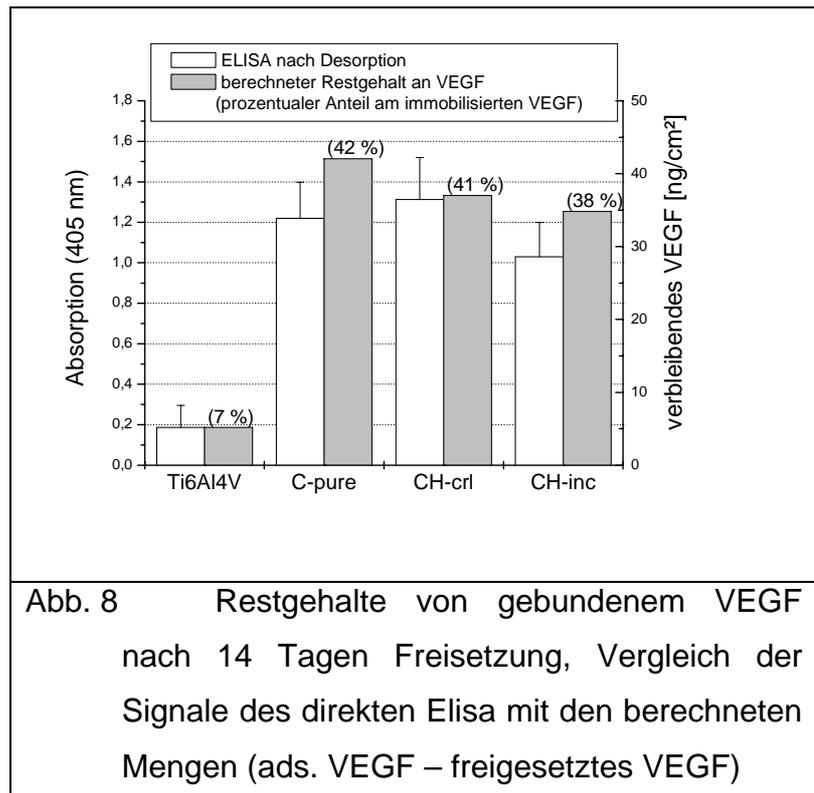


Abb. 7 Freisetzung von VEGF bei Lagerung in 1%igem BSA in PBS bei 37 °C, eingesetzte VEGF-Menge: 256 ng/cm²

Von einer solchen verzögerten Freisetzung ist zu erwarten, dass sie den physiologischen Anforderungen besser entspricht. Eine zu hohe initiale VEGF-Menge könnte eher zu unkontrolliertem, nicht funktionsfähigem Kapillarwachstum führen.

Ab dem dritten Tag der Freisetzungsdauer wurde von den heparinhaltigen Matrices mehr VEGF als von der unmodifizierten Oberfläche bzw. der reinen Kollagenreferenz freigesetzt.

Während bei den unmodifizierten Zuständen im beobachteten Zeitraum nahezu alles gebundene VEGF wieder freigesetzt wurde, blieb bei den dreidimensionalen Matrices ein Großteil des immobilisierten VEGF gebunden (je nach Zustand zwischen 38 und 42%, s. Abb. 8).



Bei zusätzlicher Mineralisierung der dreidimensionalen Matrices erfolgte keine Änderung des Freisetzungsverhaltens im Vergleich zu den jeweils nicht mineralisierten Ausgangszuständen. Dies legt nahe, dass das Freisetzungsverhalten des VEGF nur durch die Zusammensetzung der organischen Komponente maßgeblich beeinflusst wird.

Die Verminderung des Vernetzungsgrades innerhalb der artifiziellen Matrices (20 % freie Aminogruppen bei maximalem Vernetzungsgrad gegenüber 75 % freien Aminogruppen bei teilvernetzten Matrices) bewirkte eine erhöhte Freisetzung des VEGF in den ersten 3 Tagen in Bezug auf maximal vernetzte Matrixzustände. Im weiteren Freisetzungsverlauf zeigten sich keine weiteren Verschiebungen im Vergleich zu den maximal vernetzten Zuständen. (TP3.3) Das Freisetzungsverhalten der teilvernetzten Matrices war somit zwischen dem der unbehandelten

Oberflächenzustände und den maximal vernetzten Matrixzuständen angesiedelt. Idealerweise sollte der Vernetzungsgrad optimal am Degradationsverhalten *in vivo* ausgerichtet werden, da durch den Matrixabbau ein deutlich verändertes Freisetzungsverhalten erwartet werden kann. Diesbezüglich sind jedoch speziell konzipierte Tierversuche erforderlich.

Zur Einschätzung der Bioaktivität des freigesetzten VEGF wurde ein rezeptorbasierter Bioassay etabliert (BioLisa, Reliatech), der auf der Bindung der aktiven Form des VEGF durch den *in vivo* verantwortlichen VEGF-Rezeptor basiert. Auf diesem Weg ist eine Beurteilung der biologischen Aktivität des Wachstumsfaktors unabhängig von der zellbiologischen Reaktion möglich. Es konnte gezeigt werden, dass das gesamte freigesetzte VEGF, das mittels Elisa bestimmt wird, für alle untersuchten Zeitpunkte und Oberflächenmodifikationen biologisch aktiv ist. Es konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit vom Freisetzungsmedium (1% BSA in PBS oder Zellkulturmedium mit 10% Serum) festgestellt werden.

Zur Sterilisation der modifizierten Oberflächen wurden die Behandlung mit Ethylenoxid und die Gammabestrahlung bezüglich des Einflusses auf die VEGF-Bindungskapazität untersucht. Dabei erwies sich die Gammabestrahlung als die günstigere Methode, da unabhängig von der gewählten Dosis (5 kGy – 20 kGy) keine Beeinträchtigung des Bindungsverhaltens von VEGF auftrat, während durch die Ethylenoxidbehandlung je nach Modifizierung 25 – 40% weniger VEGF gebunden wurde (TP 3.5).

Durch gezielte Einstellung des Heparin Gehaltes sollte die Bindung und Freisetzung von VEGF und BMP aufeinander abgestimmt werden (TP 3.4). Es zeigte sich jedoch, dass die Bindung von BMP durch Heparinzusätze in der Matrix nur geringfügig beeinflusst wird. Ein wesentlich größerer Effekt hinsichtlich der Bindung von BMP wurde durch den Einbau von Chondroitinsulfat in die Kollagenmatrizes erzielt, so dass eine Kombination dieser beiden Matrixkomponenten sinnvoll erscheint. Im Rahmen dieses Projektes konnte dieser Schwerpunkt nicht weiter untersucht werden.

Biologische Charakterisierung in Zell- und Tierexperimenten (TP 4)

Für die biologische Beurteilung wurden Modifizierungen mit dreidimensionalen Kollagenmatrizes (mit und ohne Heparin) im Vergleich zu unbehandelten TiAl6V4-

Oberflächen ausgewählt. Da im Tiermodell die Einsprossung von neuen Kapillaren in matrixgefüllte Defekte untersucht werden sollte, wurden in Absprache mit den für die Tierversuche verantwortlichen Medizinern nicht mineralisierte Zustände ausgewählt, da bei diesen Zuständen die Einsprossung im Vergleich zu den unbehandelten Referenzzuständen durch die mineralische Komponente nicht erschwert sein sollte. Als entscheidender Parameter für zellbiologische Untersuchungen wurde die Proliferation von humanen mikrovaskulären Endothelzellen unter Einwirkung des von den verschiedenen modifizierten Probekörpern freigesetzten VEGFs herangezogen (Abb. 9).

Da in den ersten 24 h von den unmodifizierten Oberflächen die Freisetzung der höchsten VEGF-Mengen erfolgt, wurde durch das Freisetzungsmittel nach 2 h und 24 h auch eine dementsprechend starke Proliferation festgestellt.

Im Vergleich dazu führten auch die heparinisierten Matrizes zu einer verstärkten Proliferation. Nach 7 Tagen Freisetzungsdauer bewirkten die heparinisierten Matrizes eine deutliche Erhöhung der Proliferation im Vergleich zur unmodifizierten Referenz als auch zur reinen Kollagenmodifikation, wobei der Effekt im Vergleich zum Freisetzungsbeginn deutlich geringer ausfiel.

Für alle getesteten Freisetzungszeiträume konnte eine gute Korrelation zwischen der Zunahme der Zellzahl und

der Menge an freigesetztem VEGF festgestellt werden. Vergleiche der wachstumsfördernden Wirkung des freigesetzten VEGF mit frisch zugesetztem VEGF ergaben, dass die mittels ELISA detektierten freigesetzten Mengen biologisch aktivem VEGF entsprechen.

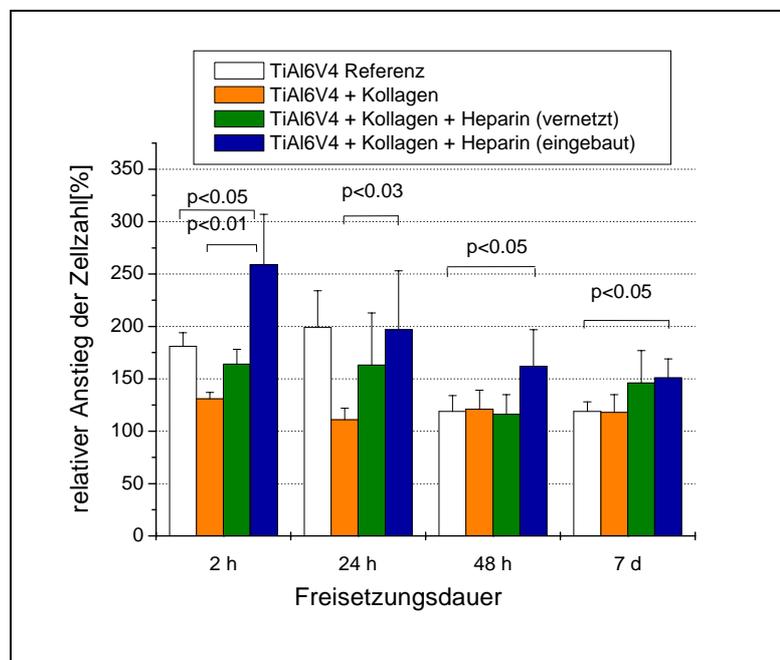


Abb. 9: Proliferationsassay mit freigesetztem VEGF;

72 h Inkubation von 2000 HDMEC/ well mit den entsprechenden Freisetzungsmitteln, Negativkontrolle: EC-Medium ohne VEGF

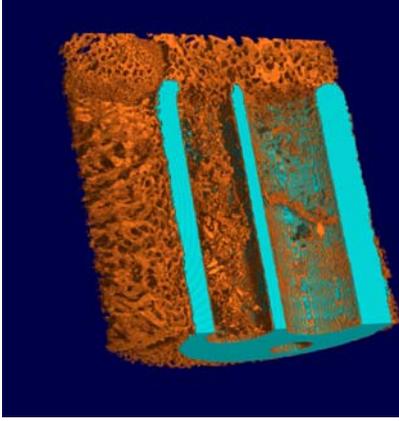
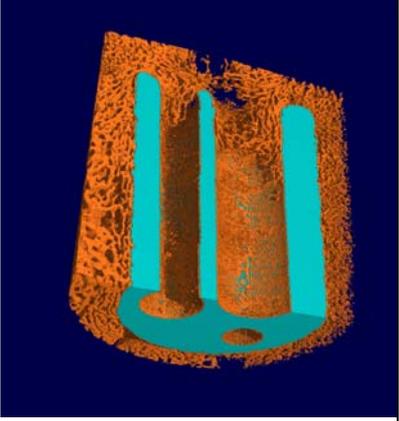
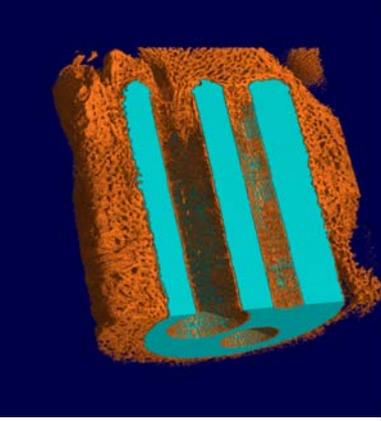
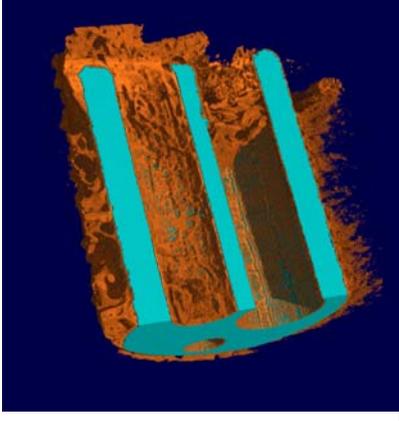
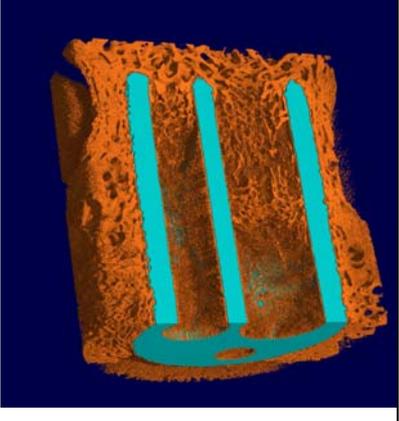
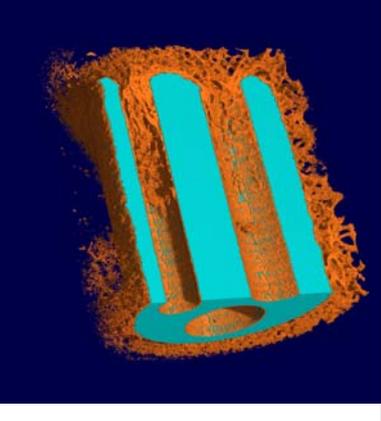
Für die tierexperimentelle Studie wurde ein Modell entwickelt, bei der die Oberflächenmodifizierung innerhalb von 3 unterschiedlich großen Bohrungen (2 mm; 1,5 mm; 1 mm) in einem zylindrischen Titankörper (0,5 cm) erfolgte. Die zunächst für Titanscheiben entwickelte Oberflächenmodifizierung wurde entsprechend adaptiert. Die Probekörper wurden in die Tibia von Kaninchen implantiert. Nach einem drei- bzw. fünfwöchigem Implantationszeitraum wurden die Explantate mittels Mikrocomputertomografie (μ -CT) ausgewertet. Die histologische Aufarbeitung der Explantatschnitte ist gegenwärtig noch nicht abgeschlossen.

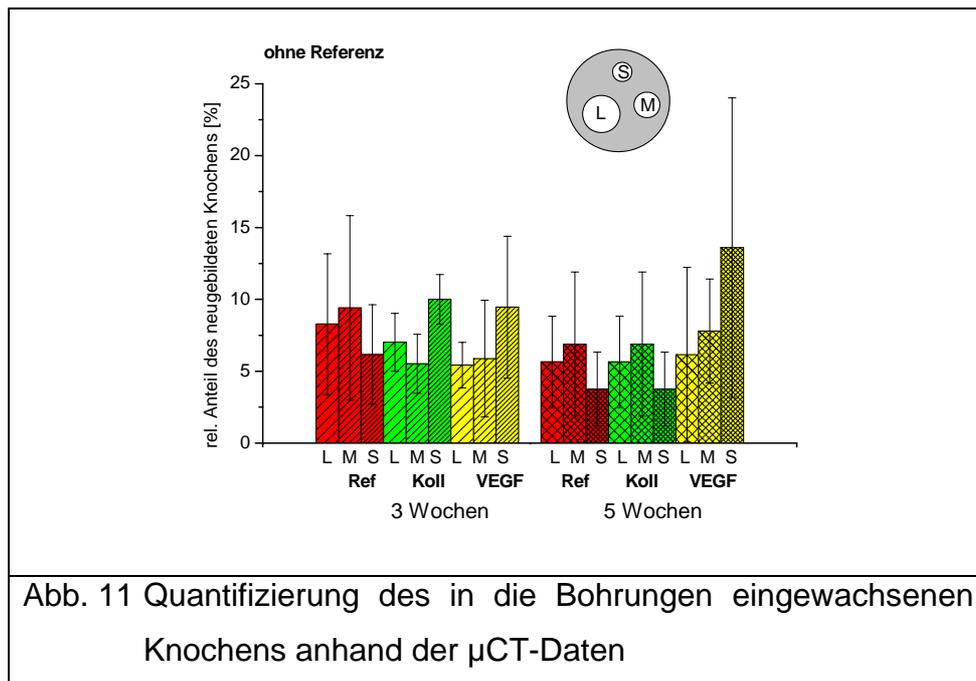
Die untersuchten Zustände waren:

- a. 3d-Kollagenmodifizierung mit Heparin vernetzt mit VEGF (Beladung: 1 μ g absolut)
- b. 3d-Kollagenmodifizierung mit Heparin vernetzt ohne VEGF
- c. Unbehandelte Oberfläche (Referenz)

Anhand von Abb. 10 wird ersichtlich, dass mittels Computertomographie das Einwachsverhalten von Knochen in die Bohrungen hinein sehr gut verfolgt werden kann, aber stark von der Dichte des Knochenlagers unmittelbar über den Bohrungen abhängig ist (Abb. 10).

Insofern ist der Einfluss der Matrix bzw. des Wachstumsfaktors schwer zu beurteilen. Die gemittelten Werte des Anteils von neu gebildetem Knochen zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen implantierten Proben nach 3 Wochen Implantationszeit, auch nicht im Hinblick auf die Größe der eingebrachten Bohrung (Abb. 11). Nach 5 Wochen Implantationszeit ist ein geringer Effekt des VEGF bei der kleinsten Bohrung zu verzeichnen. Da mittels μ -CT nur Hartgewebe erfasst wird, ist zur abschließenden Bewertung die Auswertung der histologischen Schnitte erforderlich, um beurteilen zu können, inwieweit die Angiogenese durch das VEGF beeinflusst wurde.

		
Ti (Ref) nach 3 Wochen	Ti + Koll nach 3 Wochen	Ti + VEGF nach 3 Wochen
		
Ti (Ref) nach 5 Wochen	Ti + Koll nach 5 Wochen	Ti + VEGF nach 5 Wochen
Abb.10 3D-Visualisierung der CT-Daten		



Teil B: Resorbierbare Knochenersatzmaterialien

Erzeugung eines resorbierbaren Hydroxylapatit-Knochenzementes mit mineralisiertem Kollagen als Faserverbundverstärkung und einem perkolierenden Porensystem (TP 1)

Wie im Antrag dargestellt, wurden Proben aus resorbierbarem Calciumphosphat-Knochenzement (Biozement D (BioD) – inzwischen am Markt eingeführt unter der Bezeichnung „Calcibon[®]“) hergestellt und mit mineralisiertem Kollagen I modifiziert. Dafür wurden verschiedene Kollagene getestet, der Anteil an mineralisiertem Kollagen (min. Kollagen) und der Mineralisierungsgrad variiert. Das BioD/Kollagen-Komposit (BioD/Koll) wurde zusätzlich durch Einmischen von Natriumcitrat (BioD/Koll/Cit) bzw. O-Phospho-L-serin (BioD/Koll/PS) optimiert. Ein Schwerpunkt des Projektes lag auf der Generierung eines interkonnektierenden Porensystems. Die erzeugten Porenstrukturen wurden charakterisiert.

Optimierung der Zementmodifikation

Für die Modifizierung des BioD wurden verschiedene säurelösliche bovine Kollagene Typ I (Collaplex 1.0 GFN; IBFB; und Innocoll) getestet. Alle Kollagene ließen sich gut verarbeiten. Trotz unterschiedlicher Fibrillendimensionen zeigten sich keine grundlegend verschiedenen Zementeigenschaften. Auf Grund der zuverlässigen Verfügbarkeit und des günstigen Preises wurde das Collaplex 1.0 ausgewählt.

Außerdem zeigte sich, dass ein getrocknetes, vormineralisiertes Kollagen zur Modifizierung des BioD am besten geeignet war, da es sich besser lagern und im Zement verarbeiten lässt (TP 1.1).

Weiterhin wurden dem BioD unterschiedliche Mengen (2,5%, 10%, 20% und 40% (w/w)) an min. Kollagen zugesetzt. In allen Fällen lässt sich der Zement gut verarbeiten. Jedoch nahm die Druckfestigkeit mit steigendem Gehalt an min. Kollagen so stark ab, dass nur ein Zusatz von 2,5% für weitere Untersuchungen geeignet erschien (TP1.1).

Die Bestimmung der BET-Oberfläche ergab eine deutliche Erhöhung der spezifischen Oberfläche, wenn die Zemente mit Kollagen modifiziert wurden (Tab. 1).

Tabelle 1: Überblick zu	Probe	BET-Oberfläche [M ² /G]
den ermittelten	Biozement D	20,5
spezifischen BET-	Biozement D + 2,5% min. Koll	43,2
Oberflächen	Biozement D + 10% min. Koll	76,1

Wie Porositäts-Untersuchungen bestätigen, ist die beträchtliche Oberflächenvergrößerung der Zemente mit Kollagen-Einmischung größtenteils durch eine Zunahme des Porenanteils bedingt. Dies ergibt sich dadurch, dass min. Kollagen während des Zementierungs-Prozesses in Flüssigkeit quillt und nach dem Trocknen der Proben wieder schrumpft.

In weiteren Experimenten wurde der Mineralisierungsgrad von Collaplex variiert. In Abhängigkeit davon zeigten sich keine wesentlichen Änderungen der Zementeigenschaften, so dass die Modifizierung mit min. Kollagen ohne weitere Zusätze beibehalten wurde (TP 1.1).

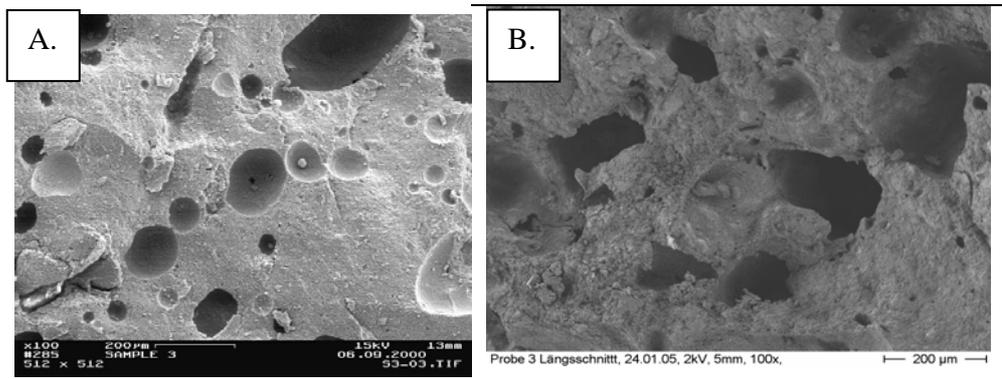
Die Zugabe von 3% (w/w) Natriumcitrat bzw. 2,5% (w/w) Phosphoserin wirkte sich positiv auf die Eigenschaften des BioD/Koll-Komposites aus. Einerseits wiesen diese Modifikationen eine höhere Druckfestigkeit auf und andererseits ergaben Experimente mit Calvaria-Osteoblasten aus der Ratte, dass Proliferation und Differenzierung der Zellen auf diesen Zementen deutlich erhöht ist. Aus diesem Grund wurden diese Zementvarianten in die Untersuchungen zur VEGF-Funktionalisierung einbezogen.

Generierung eines Porensystems; Charakterisierung der porösen Zementkörper

Es konnten poröse Zementstrukturen durch die Zugabe von Zitronensäure (> 50 mg Zitronensäure/g Zement) sowie durch die Zugabe von Natriumcarbonat und Ammoniumdihydrogenphosphatlösung erzeugt werden (Abb. 1). In beiden Verfahren wird die CO₂-Entwicklung zur Porenbildung genutzt (TP 1.2).

Die Zugabe von Zitronensäure führte zur Bildung von z. T. großen Poren, aber auch zur Bildung von Calciumcitrat. Eine gleichmäßigere Porosität ohne Nebenphasen wurde mit der zweiten Methode erzeugt. Jedoch konnte mit beiden Methoden kein vollständig interkonnektierendes Porensystem erreicht werden.

Abb. 1: REM-Aufnahmen von Porenstrukturen eines BioD/Koll-Komposites



A. mit Zitronen-säure erzeugt,

B. mit Natrium-carbonat und Ammoniumdihydrogenphosphat erzeugt.

Ein interkonnektierendes Porensystem wurde durch den Einbau von Acetatfaser-Gewirken erreicht, die in den pastösen Zement eingebracht und nach Abbinden des Zements mit Aceton wieder ausgelöst wurden (Abb. 2). Dieses Verfahren ist jedoch nur bedingt für eine *in vivo* Anwendung geeignet. Hier muss noch eine geeignete Faserart gefunden werden, die sich als gut verträglich und schnell resorbierbar erweist. Außerdem eignete sich diese Methode nur für mehrere cm große Zementkörper (TP 1.2).

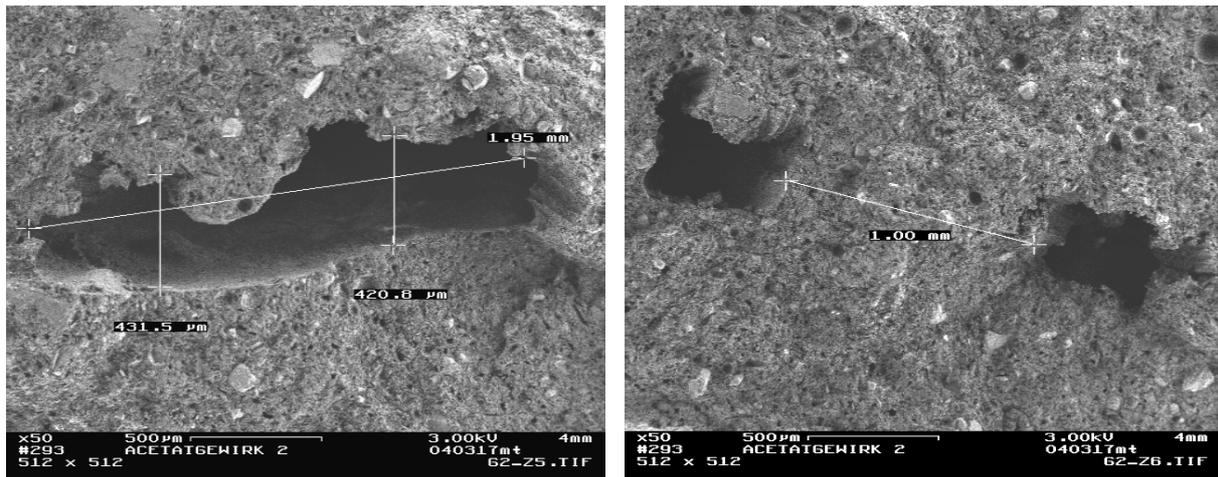


Abbildung 2: REM-Aufnahmen der Porenstruktur im Material nach Herauslösen des Acetat-Gewirkes

Mit allen erwähnten Verfahren zur Erzeugung von Porenstrukturen lassen sich größere Zementkörper herstellen. Kleinere Plättchen, wie sie für Zellkultur-Experimente benötigt werden, erwiesen sich als instabil und besaßen eine große Rauigkeit, die besonders für die zellmikroskopische Analytik nachteilig sind. Untersuchungen der Druckfestigkeit ergaben, dass die porösen Probenkörper keine ausreichende Festigkeit besaßen: in allen Fällen lag die Druckfestigkeit unter der Mindestanforderung für Calciumphosphatzemente von 10 MPa. Eine Steuerung von Porendurchmesser und -verteilung war mit den genannten Methoden nur sehr bedingt oder nicht möglich.

Veränderungen der Bruchzähigkeit konnten nur bei den mit Kollagen modifizierten Zementen beobachtet werden. Auswertungen der Kraft-Verschiebungs-Kurven zeigen deutlich, dass es schon durch die Einmischung von 2,5% min. Kollagen zur Beeinflussung der Rissausbreitung kommt. Der entstehende Riss wird durch Kollagen-Zumischungen stabilisiert und der absolute Abfall der Druckspannung im Material verzögert. Ursache für das beobachtete Materialverhalten sind die mit dem Zementapatit verbundenen Kollagenfibrillen. Diese können zwar kritische Defekte darstellen, die bei Druckspannungen zur Rissbildung führen und damit zur Abnahme der absoluten Belastbarkeit. Aber das min. Kollagen verbessert auch den Zusammenhalt des Zements in kleineren Bereichen.

Funktionalisierung der unter TP 1 beschriebenen Matrizes durch Anbindung von VEGF; Modifizierung des BioD/Koll-Komposites mit Heparin (TP 2)

Die Immobilisierung des Wachstumsfaktors sollte einerseits adsorptiv durch Auftropfen/Eintrocknen und andererseits durch eine spezifische Bindung an Heparin erfolgen. Für letztere Variante wurde eine zusätzliche Modifikation des BioD/Koll-Komposites mit Heparin durchgeführt.

Zunächst wurden die unter TP 1 beschriebenen Komposit-Varianten (BioD/Koll, BioD/Koll/CS, BioD/Koll/PS) hinsichtlich Bindung, Freisetungsverhalten (siehe TP 3) und biologischer Aktivität (siehe TP 4) nach Adsorption von VEGF untersucht. Zusätzlich wurde der unmodifizierte BioD in die Untersuchungen einbezogen, um den Einfluss des Kollagen-Anteiles bewerten zu können. Für diese Experimente wurden Zementplättchen (Dicke 1 mm, Durchmesser 12 mm) verwendet, die 4 d in Wasser ausgehärtet, getrocknet und anschließend Gamma-sterilisiert wurden.

Anschließend wurde BioD/Koll mit Heparin modifiziert, um eine spezifische Bindung von VEGF zu ermöglichen. Dazu wurden verschiedene Mengen an Heparin mit dem Zement-Precursorpulver vermischt und daraus die üblichen Zementplättchen hergestellt. Neben einer Charakterisierung von Bindung, Freisetzung (siehe TP 3) und biologischer Aktivität (siehe TP 4) von VEGF erfolgte eine umfangreiche physikochemische Charakterisierung der Heparin-modifizierten Zemente (siehe TP 3).

Adsorption von VEGF an BioD, BioD/Koll, BioD/Koll/CS und BioD/Koll/PS:

Die Zementplättchen wurden mit 400 ng VEGF in 50 µl 1% BSA/PBS beladen und über Nacht bei Raumtemperatur in feuchter Atmosphäre inkubiert. Durch Spülen der Proben (3 x 5 min in je 500 µl Freisetzungsmidium) wurde nicht-gebundenes VEGF entfernt. Um die Bindungseffizienz zu bewerten, wurde VEGF mittels ELISA in der Ausgangs- und in der Spüllösung quantifiziert.

In den Spüllösungen aller untersuchten Proben wurden nur geringe Mengen an VEGF detektiert, was für eine hohe Bindungseffizienz spricht (Abb. 3). Dabei wurde die geringste Menge für den unmodifizierten BioD bestimmt (ca. 2,5% der ursprünglich eingesetzten 400 ng). Die Modifikation des BioD mit min. Kollagen führte zu einem leicht erhöhten VEGF-Gehalt in der Spüllösung (4,2%). Der VEGF-Anteil in den Spüllösungen von BioD/Koll/Cit betrug ca. 3,9% und von BioD/Koll/PS 6,2% (TP 2.1).

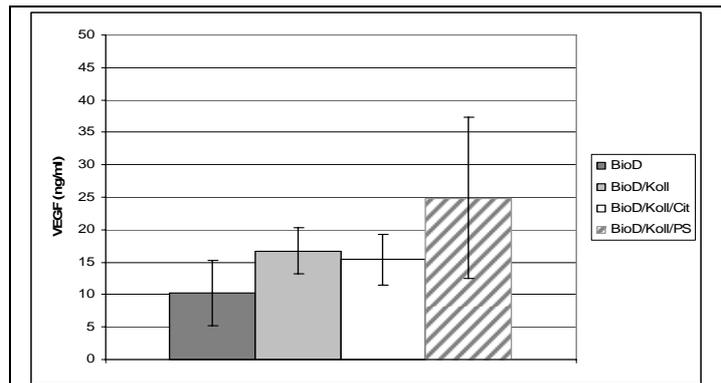


Abb. 3: Quantifizierung des nicht-gebundenen VEGF in den Spüllösungen mittels ELISA. In der Grafik sind die Daten aus 3 Experimenten zusammengefasst (n=12, ± Standardabweichung)

Adsorption von VEGF an heparin-modifizierten BioD/Koll:

Um den Einfluss von Heparin auf die Bindung von VEGF an das BioD/Koll-Komposit zu untersuchen, wurden BioD/Koll mit verschiedenen Mengen an Heparin modifiziert (20 mg/g: BioD/Koll/Hep20; 50 mg/g: BioD/Koll/Hep50; 100 mg/g: BioD/Koll/Hep100) und hinsichtlich der VEGF-Bindung mit Heparin-freiem BioD/Koll verglichen. Die Zementplättchen wurden wie oben beschrieben mit 400 ng VEGF beladen und nach Inkubation über Nacht gespült. VEGF wurde wiederum in der Ausgangs- und in der Spüllösung quantifiziert, um die Bindungseffizienz zu bewerten.

Wiederum wurden für alle Varianten nur geringen Mengen an nicht-gebundenem VEGF in den Spüllösungen detektiert (Abb. 4). Mit steigendem Heparin Gehalt der Proben nimmt der VEGF-Anteil in den Spüllösungen ab, was auf eine Erhöhung der

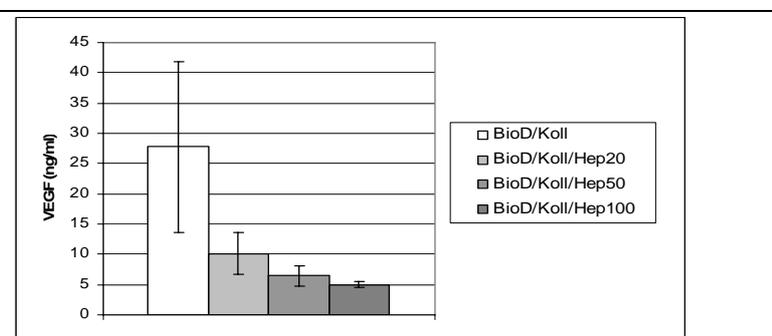


Abb. 4: Quantifizierung des nicht-gebundenen VEGF in den Spüllösungen mittels ELISA. (n=4, ± Standardabweichung)

Bindungseffizienz der Komposite durch Modifikation mit Heparin hindeutet (TP 2.2).

Charakterisierung der Knochenersatzwerkstoffe (TP 3)

Der Schwerpunkt dieses Teiles des Arbeitsprogramms lag auf der Untersuchung der Freisetzung von VEGF nach Funktionalisierung der unter TP 1 und 2 beschriebenen Zementvarianten. Untersuchungen zur Abstimmung der Freisetzung von VEGF und BMP-2 wurden nicht durchgeführt, da parallel in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Experimente zur BMP-2-Freisetzung nach Funktionalisierung von Scaffolds aus min. Kollagen zeigten, dass HAP-haltige Matrices diesen Wachstumsfaktor so stark binden, dass keine Freisetzung erfolgt. Ein weiterer wesentlicher Punkt umfasste die physikochemische Charakterisierung der Heparin-modifizierten Zementkomposite.

Freisetzung von VEGF nach Funktionalisierung von BioD, BioD/Koll, BioD/Koll/CS und BioD/Koll/PS:

Für die Freisetzungsexperimente wurden die funktionalisierten Zementplättchen in Freisetzungsmedium (Endothelzell-Medium ohne VEGF) unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Dieses Vorgehen simuliert einerseits die *in vivo* Bedingungen und erlaubt andererseits die Analyse der biologischen Aktivität des freigesetzten VEGF (siehe TP 4) parallel zur Quantifizierung mittels ELISA.

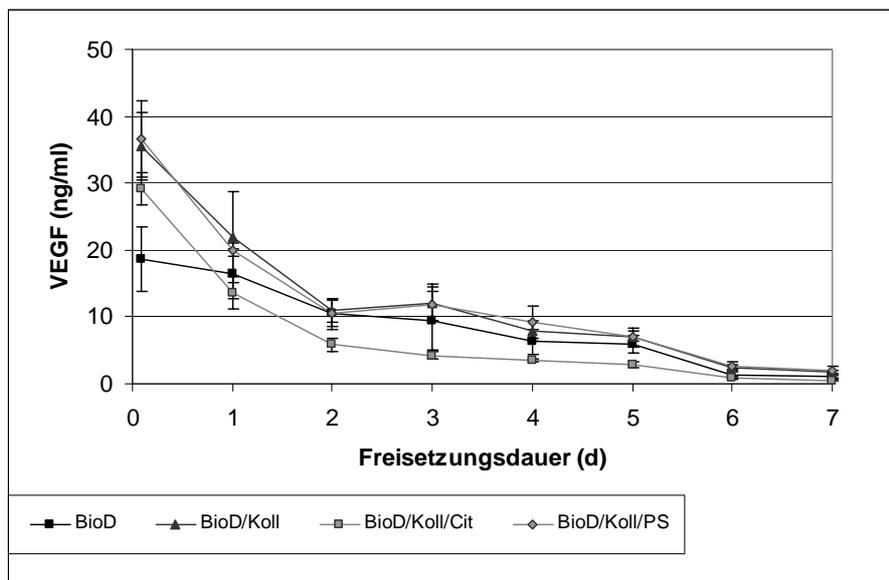


Abb. 5: Absolut freigesetzte VEGF-Mengen. Die Freisetzung erfolgte in Endothelzellmedium ohne VEGF. (n=4, \pm Standardabweichung)

Die Zementproben wurden mit jeweils 400 ng VEGF funktionalisiert (siehe TP 2). Nach Entfernen des nicht gebundenen Anteils durch Spülen der Proben wurde je 1 ml Freisetzungsmilieu zu den Proben gegeben. Zuerst nach 2 h und anschließend 24-stündlich wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Quantifizierung von VEGF in den Freisetzungsmilieus erfolgte über einen Zeitraum von 7 d. In Abb. 5 sind die mittels ELISA bestimmten absoluten Mengen an VEGF zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt; Abb. 6 zeigt die summierten Mengen.

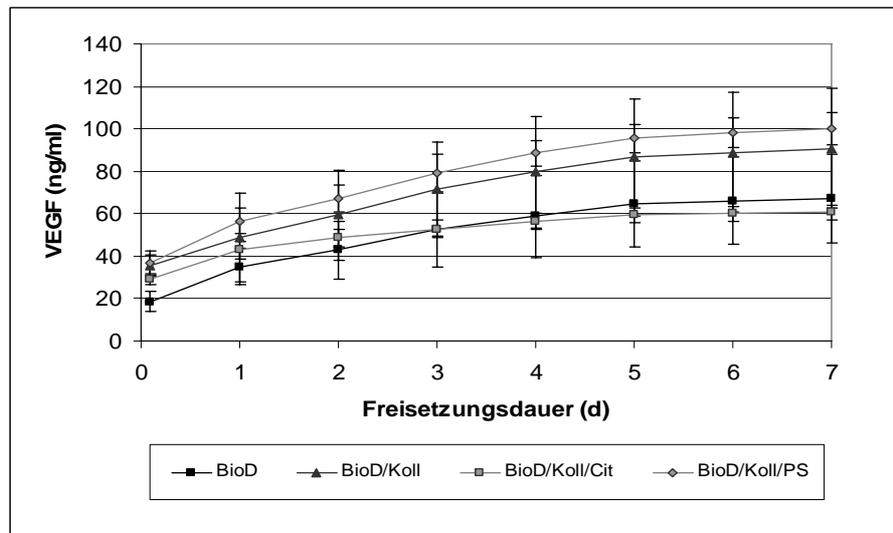


Abb. 6: Summierte freigesetzte VEGF-Mengen. (n=4, \pm Standardabweichung)

Die Menge an VEGF, die täglich freigesetzt wurde, nahm bei allen Varianten kontinuierlich ab (Abb. 5). Innerhalb der ersten 2 h setzte der unmodifizierte BioD ca. 5% der ursprünglich eingesetzten 400 ng VEGF frei. Die Modifikation mit min. Kollagen resultierte in einer Erhöhung der initialen Freisetzungsrates (9% innerhalb der ersten 2 h). Diese Beobachtung deutet ebenfalls darauf hin, dass das Einmischen von Kollagen zu einer reduzierten Bindungseffizienz des BioD führt. Während die zusätzliche Modifikation des BioD/Koll mit Phosphoserin das Freisetzungsverhalten nicht veränderte, resultierte aus der Zugabe von Natriumcitrat eine deutliche Minimierung der VEGF-Freisetzung. Nach 7 d setzten alle Varianten nur noch minimale Mengen frei. Aus Abb. 6 wird ersichtlich, dass alle Varianten nach 7 d nur einen Teil des VEGF freigesetzt haben (BioD/Koll und BioD/Koll/PS ca. 25%, BioD ca. 17% und BioD/Koll/Cit ca. 15% der ursprünglich eingesetzten 400 ng). Somit scheint ein großer Teil des VEGF am Zement gebunden zu bleiben (TP 3.3).

Einfluss der Heparin-Modifikation auf das VEGF-Freisetzungsverhalten des BioD/Koll-Komposites:

Um den Einfluss von Heparin auf die VEGF-Freisetzung zu untersuchen, wurden Komposite mit unterschiedlichem Heparin Gehalt sowie Heparin-freies BioD/Koll mit 400 ng VEGF funktionalisiert. Die Durchführung des Freisetzungsexperimentes erfolgte wie oben beschrieben. In Abb. 7 sind die mittels ELISA bestimmten absoluten Mengen an VEGF, die über einen Zeitraum von 7 d bestimmt wurden, dargestellt. Abb. 8 zeigt die summierten Mengen über einen Zeitraum von 22 d. Abb. 9 zeigt einen Vergleich der VEGF-Freisetzung der verschiedenen Modifikationen zu früheren und späteren Zeitpunkten.

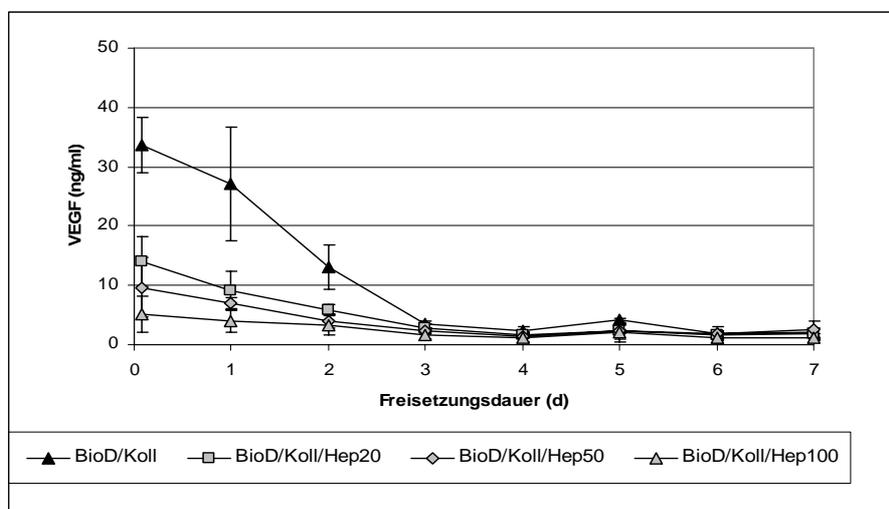


Abb. 7: Absolut freigesetzte VEGF-Mengen. Die Freisetzung erfolgte in Endothelzellmedium ohne VEGF. (n=4, \pm Standardabweichung)

Aus Abb. 7 wird ersichtlich, dass die hohe initiale Freisetzungsrates des BioD/Koll durch eine Modifikation mit Heparin drastisch reduziert werden konnte. Dieser Effekt des Heparin ist konzentrationsabhängig und kehrt sich interessanterweise zu späteren Zeitpunkten um: So zeigten nach 17 bzw. 22 d die Proben mit dem höchsten Heparin Gehalt die höchsten Freisetzungsrates (Abb. 9). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Modifikation des BioD/Koll-Komposites mit Heparin nicht nur die Bindungseffizienz, sondern auch das Freisetzungsverhalten günstig beeinflusst. Die hohe initiale Freisetzung, die sich *in vivo* nachteilig auf die Bildung funktioneller Blutgefäße auswirken könnte, wird deutlich reduziert und die Freisetzung erfolgt leicht verzögert. Insgesamt setzten die Heparin-haltigen Zemente nach 22 d deutlich weniger VEGF frei (Abb. 8: BioD/Koll ca. 25%, Heparin-modifizierte BioD/Koll zwischen 7,5 und 10% der ursprünglich eingesetzten 400 ng) (TP 3.3).

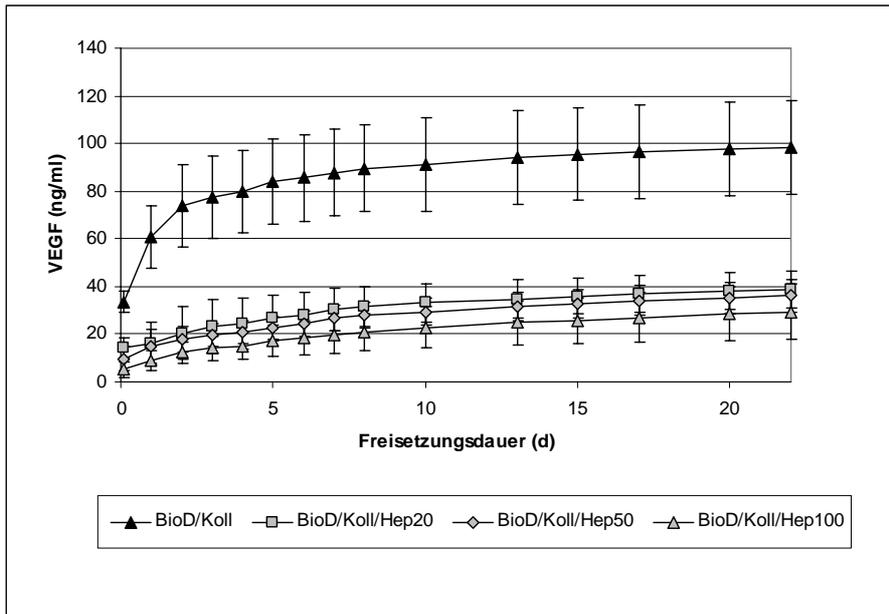


Abb. 8: Summierte freigesetzte VEGF-Mengen. (n=4, ± Standardabweichung)

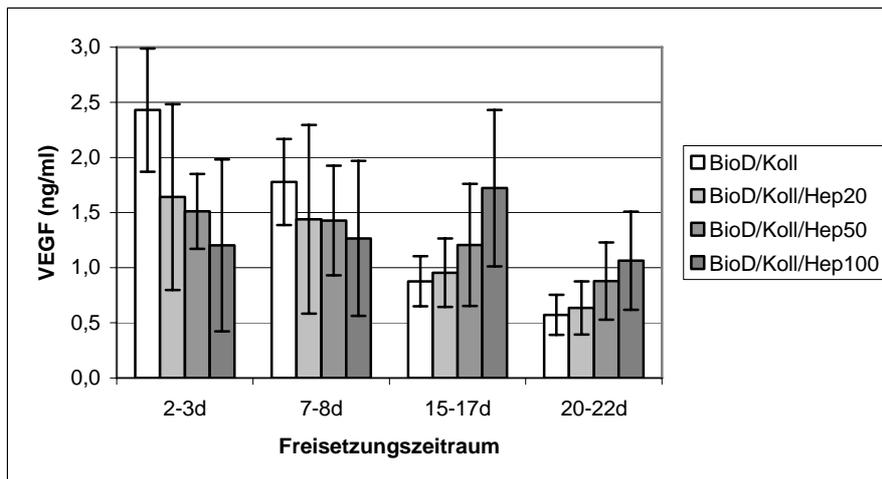


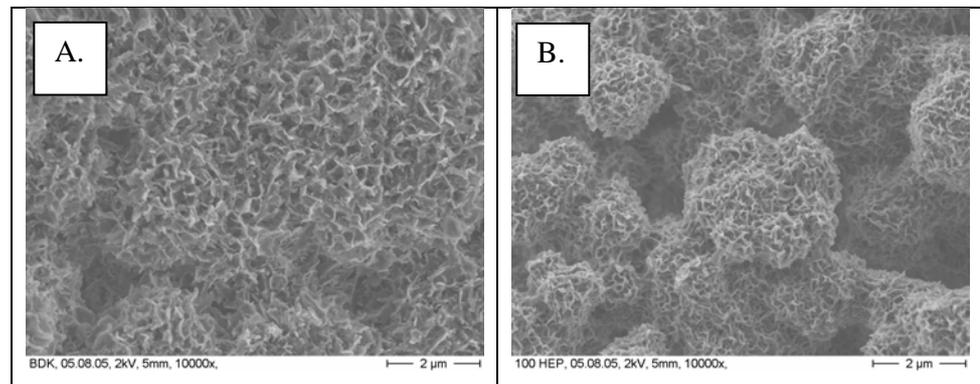
Abb. 9: Freigesetzte VEGF-Mengen zu ausgewählten Zeitpunkten. (n=4, ± Standardabweichung)

Materialeigenschaften der Heparin-modifizierten Zemente

Die Verarbeitbarkeit der Heparin-modifizierten Komposite unterschied sich bei allen getesteten Heparinmengen nicht wesentlich von der des Heparin-freien BioD/Koll; es konnte jedoch eine Verkürzung der Abbindezeiten festgestellt werden. Anhand von Röntgenbeugungsuntersuchungen der Heparin-modifizierten, über 7 d ausgehärteten Zemente zeigte sich, dass wie beim nicht-modifizierten BioD/Koll ein carbonathaltiger HAP als Endprodukt der Zementumsetzung vorliegt. Untersuchungen der spezifischen BET-Oberfläche ergaben für die Heparin-haltigen Zemente eine Erhöhung von 37 m²/g (BioD/Koll) auf 54 m²/g (BioD/Koll/Hep100). Ursache könnte

eine durch Heparin veränderte Zement-Mikrostruktur sein. REM-Analysen der Mikrostruktur von Heparin-haltigen und -freien BioD/Koll-Proben zeigten geringfügige Unterschiede. Beide Varianten bestehen aus plättchenförmigen HAP-Kristallen, aber die Heparin-haltigen Komposite, insbesondere die mit einem hohen Heparinegehalt, scheinen stärker aggregierte und geringfügig kleinere HAP-Partikel aufzuweisen (TP 3.1).

Abb 10. REM-Aufnahmen der Mikrostruktur eines Heparin-freien BioD/Koll-Komposites (A)



und eines mit 100 mg/g Heparin modifizierten BioD/Koll-Komposites (B).

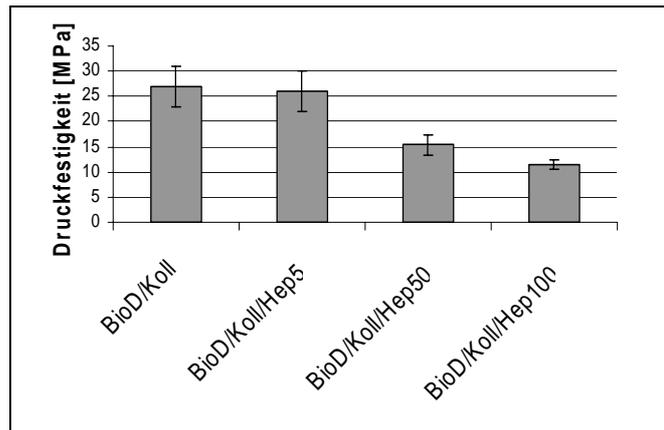
Jedoch unterschieden sich die mit Natriumcitrat bzw. Phosphoserin modifizierten Komposite in ihrer Mikrostruktur viel deutlicher von den unmodifizierten Kompositen als die Heparin-modifizierten. Das HAP-Kristallwachstum war bei diesen Varianten stärker inhibiert, so dass noch kleinere HAP-Plättchen und damit verbunden eine Erhöhung der spezifischen BET-Oberfläche von über 75 m²/g resultierten (TP 3.1).

Analysen zur Heparin-Freisetzung aus den Zementproben zeigten, dass bei Einmischen von 20 bzw. 50 mg Heparin pro g Zement ca. 80% und von 100 mg noch ca. 60% des ursprünglich eingesetzten Heparin in den Proben gebunden werden.

Die Phosphatkonzentration im Überstand der Komposite erhöhte sich, wenn mehr Heparin zum Zement-Precursor zugefügt wurde. Dagegen unterschieden sich die Konzentration an Calcium-Ionen und der pH-Wert im Überstand von BioD/Koll und Heparin-haltigen BioD/Koll-Proben nicht (TP 3.2).

Die Druckfestigkeit der Heparin-modifizierten Zemente nahm mit zunehmendem Heparinegehalt der Proben ab (Abb. 11).

Abb 11: Druckfestigkeit der Heparin-modifizierten Zemente im Vergleich zu Heparin-freiem BioD/Koll. Die Zemente härteten über 100 h in SBF aus. (n=5, ± Standardabweichung)



Zellbiologische Untersuchungen (TP 4)

Ein Schwerpunkt der zellbiologischen Untersuchungen lag in der Charakterisierung der biologischen Aktivität des von den Zementen freigesetzten VEGF. Dazu wurde die proliferationsfördernde Wirkung des VEGF auf Endothelzellen getestet.

Da im Laufe der Neovaskularisierung eines Implantates *in vivo* Endothelzellen in direkten Kontakt zum Implantatmaterial kommen, wurde weiterhin die Adhäsion und Proliferation von Endothelzellen auf den Zementoberflächen charakterisiert. Dazu wurde die Zellzahl auf den Proben zu verschiedenen Zeitpunkten indirekt ermittelt, indem die Aktivität des „Housekeeping“-Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) nach Lyse der Zellen bestimmt und mit der Zellzahl korreliert wurde.

Ein wesentlicher Teil des Arbeitsprogrammes beschäftigte sich mit der *in vitro* Vaskularisierung von Endothelzellen, auf/in resorbierbaren Knochenimplantat-Materialien. Da gezeigt werden konnte, dass Endothelzellen eine 3D extrazelluläre Matrix benötigen, um tubuläre Strukturen zu bilden, wurden in einem Ansatz die Endothelzellen in eine Gelmatrix gemischt und auf eine BioD-Probe gegeben. Um dieses *in vitro*-Angiogenese-System auf poröse 3D Scaffolds zu übertragen, wurde ein Scaffold aus min. Kollagen verwendet, das über ein zusammenhängendes Porensystem mit Porendurchmessern von bis zu 200 µm verfügt.

Biologische Aktivität von VEGF nach Bindung und Freisetzung von BioD, BioD/Koll, BioD/Koll/CS und BioD/Koll/PS:

Die Freisetzungsexperimente wurden wie unter TP 3 beschrieben durchgeführt. Parallel zur VEGF-Quantifizierung mittels ELISA wurden die nach 2 h, 24 h, 48 h bzw. 7 d gewonnenen Freisetzungsmedien eingesetzt, um die proliferationsfördernde Wirkung des VEGF nach Bindung an und Freisetzung von den Zementen zu testen.

Für diese Proliferationsassays wurden humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC) in 96-well-Platten ausgesät und in dem von den VEGF-funktionalisierten Zementproben gewonnenen Freisetzungsmedium 72 h im Brutschrank inkubiert. Als Negativkontrolle diente Freisetzungsmedium, dass von Proben der jeweiligen Zementvariante ohne VEGF entnommen wurde. Mittels Hoechst-Test wurde der DNA-Gehalt in den einzelnen Ansätzen bestimmt und mit der Zellzahl korreliert.

Abb. 12 zeigt eine grafische Darstellung der in den Freisetzungsmedien ermittelten Proliferationsraten bezogen auf die Proliferationsraten der jeweiligen Negativkontrolle (in %). Bei allen Varianten wurde nach 2, 24 und 48 h Freisetzung ein gegenüber der Negativkontrolle stärkeres Wachstum der Zellen beobachtet, was für die biologische Aktivität des VEGF nach Adsorption und Freisetzung spricht. Nach 7 d konnte nur bei dem mit Phosphoserin modifizierten BioD/Koll-Komposit eine im Vergleich zur Negativkontrolle deutlich erhöhte Proliferationsrate festgestellt werden.

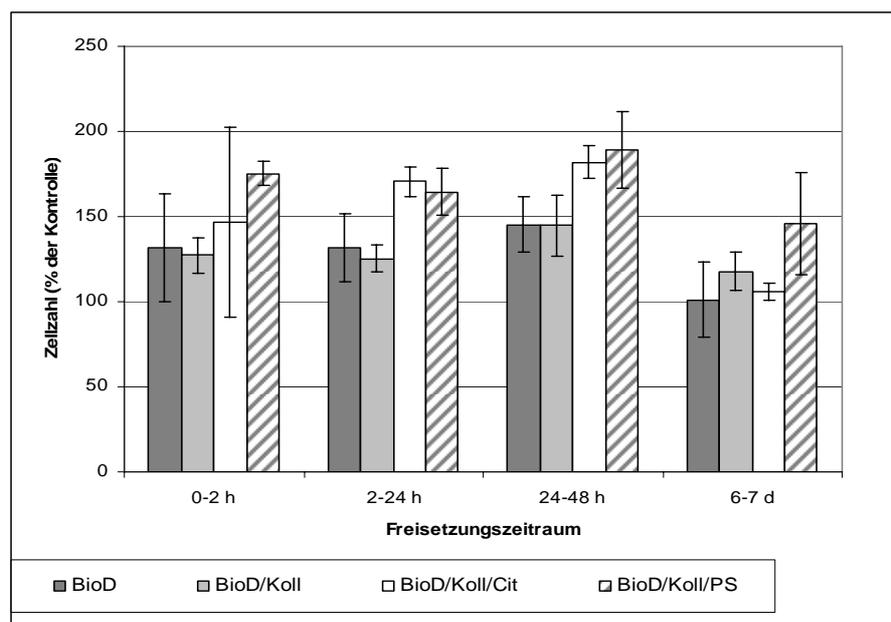


Abb. 12: Proliferationsassay mit freigesetztem VEGF. Die jeweiligen Negativkontrollen entsprechen 100 % (n=4, ± Standardabweichung)

Werden die Daten des Proliferationsassays den absoluten Mengen an freigesetztem VEGF (Abb. 5) gegenübergestellt, so wird deutlich, dass eine stärkere Freisetzung von VEGF nicht unbedingt mit einer verstärkten Zunahme des Zellwachstums einhergeht. Da der ELISA sowohl aktive als auch inaktive VEGF-Moleküle erfasst,

spricht diese Beobachtung für eine unterschiedliche biologische Wirksamkeit des von den verschiedenen Varianten freigesetzten Wachstumsfaktors.

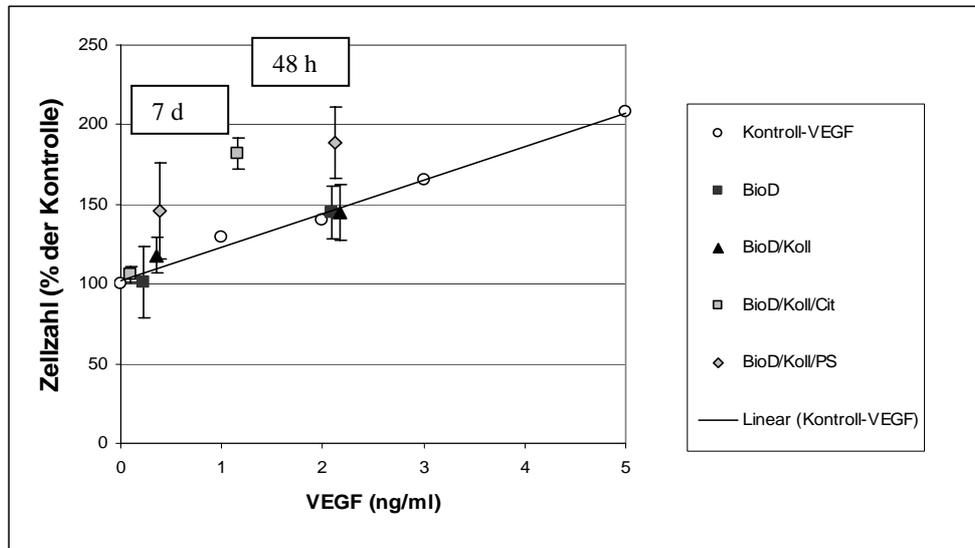


Abb. 13: Biologische Aktivität von freigesetztem VEGF im Vergleich zu „frischem“ Kontroll-VEGF. Die Zellzahlen wurden im Proliferationsassay ermittelt. Die Menge an freigesetztem VEGF wurde mittels ELISA bestimmt. Für diese Darstellung wurden die Freisetzungzeitpunkte 48 h und 7 d ausgewählt. (n=4, ± Standardabweichung)

In Abb. 13 wird die biologische Wirksamkeit des von den Zementproben freigesetzten VEGF (proliferationsfördernde Wirkung bezogen auf die im Proliferationsassay eingesetzte Menge) mit der von „frischem“ VEGF verglichen. Dabei zeigt sich, dass die Modifikation von BioD mit min. Kollagen günstig für den Erhalt der biologischen Aktivität ist und dass die zusätzliche Modifikation mit Phosphoserin und in geringerem Maße mit Citrat die biologische Aktivität des VEGF sogar noch erhöht.

Biologische Aktivität von VEGF nach Bindung und Freisetzung von heparin-modifizierten Kompositen:

Die Untersuchung der biologischen Aktivität des VEGF nach Freisetzung von den Heparin-modifizierten Kompositen im Vergleich zu Heparin-freiem BioD/Koll wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Proliferationsassays ergaben eine stärkere proliferationsfördernde Wirkung des VEGF nach Freisetzung von den Heparin-haltigen Proben im Vergleich zum Heparin-freien BioD/Koll. Für einen anschaulichen Vergleich der verschiedenen Freisetzungzeitpunkte wurde die für die Heparin-freien Proben erzielte Steigerung der Proliferationsrate gleich 100% gesetzt und die für die

Heparin-haltigen Proben gemessene Steigerung darauf bezogen (Abb. 14). Insbesondere nach 24 und 48 h war eine deutlich stärkere Zunahme der Proliferationsraten in Gegenwart des freigesetzten VEGF bei den Heparin-haltigen Zementen zu beobachten. Dabei waren die Abstufungen zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen an Heparin marginal. Nach 7 d zeigten nur noch die Zementproben mit der höchsten Heparin-Konzentration (BioD/Koll/Hep100) eine Erhöhung gegenüber den BioD/Koll-Proben.

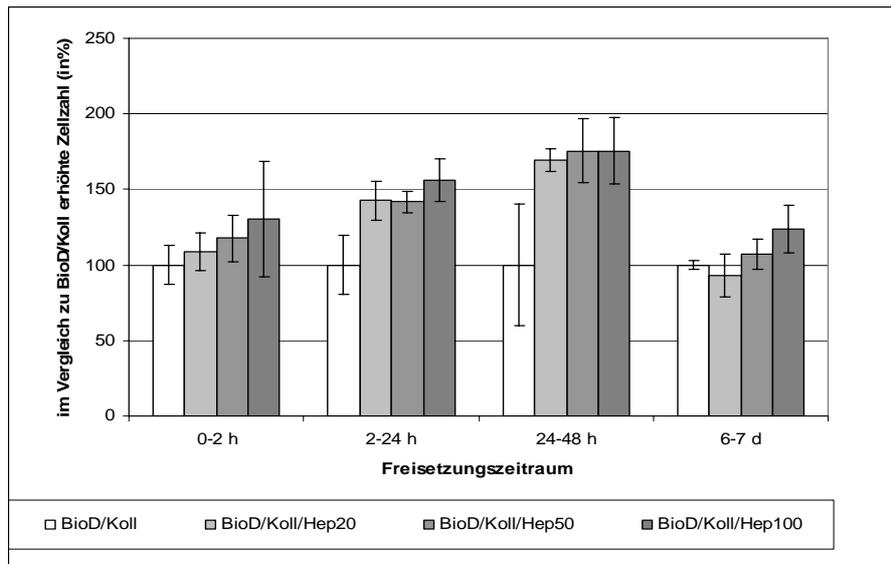


Abb. 14: Proliferationsassay mit freigesetztem VEGF. Die Zunahme der Zellzahl nach Inkubation mit von BioD/Koll freigesetztem VEGF entspricht 100%. In der Grafik sind die Daten aus 2 Experimenten zusammengefasst (n=6, ± Standardabweichung)

Werden die Daten des Proliferationsassays den absoluten Mengen an freigesetztem VEGF (Abb. 7) gegenübergestellt, zeigt sich, dass die Heparin-haltigen Proben zwar weniger VEGF freisetzen, das freigesetzte VEGF aber eine effektivere Förderung des Endothelzell-Wachstums bewirkt. Dies könnte wiederum auf eine höhere biologische Wirksamkeit des von den Heparin-haltigen Varianten freigesetzten VEGF hindeuten.

Adhäsion und Proliferation von HDMEC auf die Zementoberflächen

Die Zementplättchen wurden mit $1,5 \times 10^4$ HDMEC besiedelt und über 22 d in Endothelzell-Medium kultiviert. Nach 24 h wurde die LDH-Aktivität bestimmt, um die Adhäsion der Zellen beurteilen zu können. Aus Abb. 15 wird ersichtlich, dass nur etwa 20% der

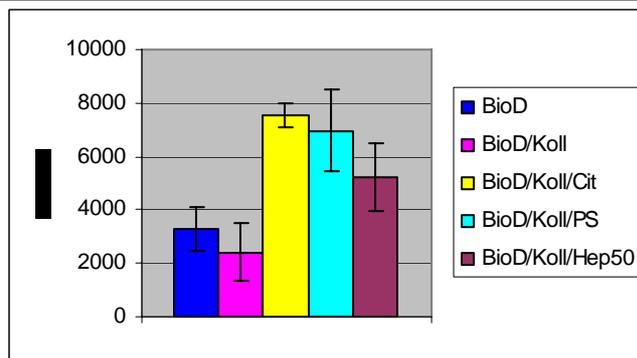


Abb. 15: Adhäsion von HDMEC auf den Zementoberflächen. Von den Heparin-modifizierten Varianten wurde BioD/Koll/Hep50 ausgewählt. Die Zellzahl wurde nach 24 h durch LDH-Aktivitätsmessung bestimmt (n=3, ± Standardabweichung).

ausgesäten Zellen auf den BioD- und BioD/Koll-Proben adherierten. Im Gegensatz dazu konnten auf den Phosphoserin- und Citrat-haltigen Kompositen ca. 50% der Ausgangszellzahl und auf den Heparin-modifizierten Proben ca. 35% detektiert werden.

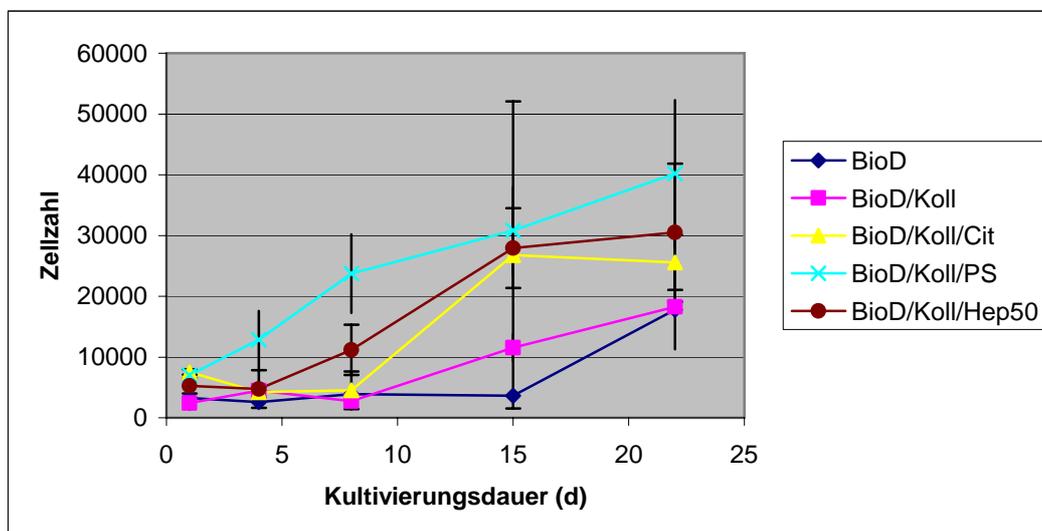


Abb. 16: Proliferation von HDMEC auf den Zementoberflächen. Von den Heparin-modifizierten Varianten wurde BioD/Koll/Hep50 ausgewählt. Die Zellzahl wurde nach 1, 4, 8, 15 und 22 d durch LDH-Aktivitätsmessung bestimmt (n=3, ± Standardabweichung).

Das Wachstum der Zellen auf den Zementoberflächen wurde untersucht, indem die LDH-Aktivität nach 4, 8, 15 und 22 d bestimmt und mit der Zellzahl korreliert wurde

(Abb. 16). Auf allen untersuchten Varianten konnte eine Zunahme der Zellzahl innerhalb der 22 d beobachtet werden. Bei den BioD- BioD/Koll- und BioD/Koll/Cit- Proben zeigte sich ein Anstieg der Zellzahl erst nach einer langen lag-Phase. Die Modifikation des BioD nur mit min. Kollagen hat keinen positiven Effekt, aber die zusätzliche Modifikation mit Phosphoserin und in geringerem Maße auch Heparin und Citrat resultiert in einer stärkeren Zellzahl-Zunahme. Die Ergebnisse zeigen, dass die Modifikation des Komposites mit Phosphoserin, Citrat und Heparin die Adhäsion und Proliferation von Endothelzellen auf dem Zement begünstigen (TP 4.2).

In vitro-Angiogenese

Um die *in vitro* Vaskularisierung von Endothelzellen auf BioD-Proben zu untersuchen, wurden HDMEC in einem Fibrin-Gel resuspendiert und auf die Probe aufgebracht.

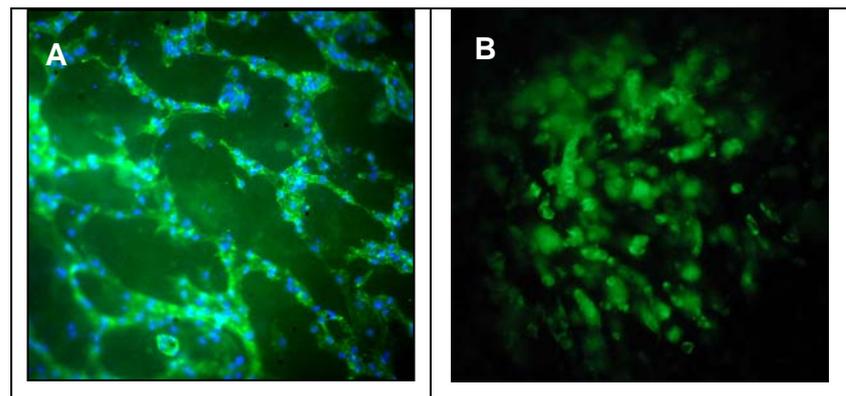


Abb. 17: Kultivierung von HDMEC in einer 3D-Gelmatrix über einer BioD-Probe. A: VEGF stimuliert die Bildung von tubulären Strukturen; B: ohne VEGF keine Organisation in tubulären Strukturen. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau) und der Cytoskelette mit Phalloidin/Alexa 488 (grün).

In Gegenwart von VEGF begannen die HDMEC, ein kapillarähnliches Netzwerk zu bilden (Abb. 17 A). Erfolgte die Kultivierung ohne VEGF, blieben die Zellen vereinzelt (Abb. 17 B).

Anschließend sollte dieses *in vitro*-Angiogenese-System in einem porösen 3D Scaffold getestet werden. Da die porösen Zemente für diese Untersuchungen nicht geeignet waren, wurde stattdessen eine Matrix aus min. Kollagen verwendet, die über ein offenes, zusammenhängendes Porensystem mit Porendurchmessern von

bis zu 200 µm verfügt. In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Kirsten Peters (Arbeitsgruppe von Prof. Kirckpatrick, Universitätsklinikum Mainz) wurden in einem Fibrin/Kollagen-I-Gel suspendierte HDMEC unter Verwendung von leichtem Unterdruck in die porösen Scaffolds eingesaugt und in VEGF-haltigem Endothelzell-Medium über 7 d kultiviert. Nach Fixierung der Zellen im Scaffold erfolgte neben einer Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne (mit DAPI) und des F-Aktin-Zytoskeletts (mit Phalloidin-Alexa546) eine Anfärbung von CD31 mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers. CD31 ist ein integrales Membranprotein, das an der Vermittlung der endothelialen Zell-Zell-Adhäsion bei der Angiogenese beteiligt ist. Mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (cLSM) wurden sowohl auf der Oberfläche als auch im Innern des Scaffolds konfluente Endothelzellschichten detektiert. Außerdem gelang es, die Bildung tubulärer Strukturen im Inneren des porösen Scaffolds nachzuweisen (Abb. 18). Die Verteilung der CD31-spezifischen Färbung im wesentlichen an den Kontaktstellen der Zellen spricht dafür, dass es sich bei diesen Strukturen tatsächlich um *in vitro*-Kapillaren handelt.

Aus den durchgeführten Experimenten kann geschlussfolgert werden, dass die Endothelzellen in den Scaffolds in der Lage sind, die angiogene Differenzierung entsprechend ihres Zelltypes auszuführen. Das Entstehen eines konfluenten Layers an den Wandungen des Scaffolds weist auf eine hohe Endothelzellkompatibilität

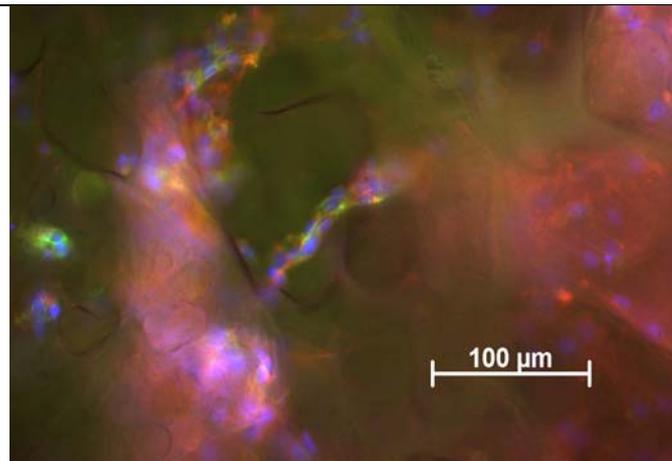


Abb. 18: cLSM-Aufnahme einer *in vitro*-Kapillare in einem 3D-Scaffold aus min. Kollagen. Nach Fixierung der Zellen erfolgte eine Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne (blau), des Zytoskeletts (rot) und des Membranproteins CD31 (grün).

und damit sehr gute Biokompatibilität des Materials hin, da erfahrungsgemäß ein konfluentes Wachstum im Falle materialbedingter Freisetzung beeinträchtigender Substanzen nicht erreicht wird. Auch die Freisetzung Entzündungs-induzierender Faktoren würde zur Erhöhung der endothelialen Permeabilität und damit Öffnung der Endothelzellschicht führen (TP 4.3).

2.3 Projektschwerpunkt C: Transfer von Materialentwicklungen in medizinische Systeme

Zusammenfassung der Zielstellungen

Mit der materialwissenschaftlichen Schwerpunktsetzung des Zentrums bei der Biofunktionalisierung von etablierten Materialien zur Anwendung im direkten Blutkontakt (Projektbereich A) sowie zur Steuerung von grenzflächenassoziierten Zellen (Projektbereich B) werden innovative medizintechnische Systeme durch neue Materialien unterstützt. Darüber hinaus sollen im Rahmen des Kompetenzzentrums Bioreaktoren und Monitoringsysteme für die GMP-gerechte Kultur von mesenchymalen Stammzellen entwickelt werden.

2.3.1 Projekt C 1: Modulares Bioreaktorsystem für Stammzellkulturen

Dr. J. Oswald, Dr. M. Bornhäuser, Prof. G. Ehninger, Med. Klinik und Poliklinik I, TU Dresden

U. Steller, H. Körber (TPL), Dr. T. Pompe, Dr. C. Werner, Leibniz-Institut für Polymerforschung, Dresden e.V.

Zielsetzung des Teilvorhabens

Voraussetzung für die anwendungsnahe Erprobung und klinische Applikation von Zellkulturträgern ist die Verfügbarkeit von Bioreaktoren, die eine GMP-gerechte Handhabung von Zellkulturen gestatten. Neben dem eigentlichen Kulturraum sind darunter auch Peripheriekomponenten zu verstehen, die die Perfusion des Mediums und insbesondere ein automatisiertes Monitoring realisieren und damit eine geschlossene Gesamteinheit bilden. Die Anforderungen an Bioreaktorsysteme ergeben sich einerseits aus der Notwendigkeit einer kurzfristigen und anwendungsbezogenen Erprobung neuer Zellkulturträger (Projekte B1 und B2) unter gut definierten Bedingungen. Davon ausgehend soll parallel zur Entwicklung und Testung adäquater Zellkultursubstrate die Bereitstellung kliniktauglicher Module vorbereitet werden, die sich einerseits an die für den Laborversuch entwickelten Lösungen anlehnen, diese aber soweit möglich vereinfachen, sowie zusätzliche Anforderungen an Sicherheit und Routinefähigkeit erfüllen. Aus diesem Anforderungspaket ergibt sich als Konzept die Entwicklung eines modularen Bioreaktorsystems, das eine Plattform für die Durchführung unterschiedlicher

Zelltherapieformen bildet. Gegenstand dieses Projektes waren daher Entwurf, Aufbau und Erprobung eines modularen Bioreaktorsystems für Zelltherapien. Das Anforderungsprofil für die aufzubauende Anordnung soll im Rahmen dieses Projektes in enger Verzahnung mit dem Projekt B1 aus den Bedingungen für Stammzellkulturen abgeleitet werden, eine modulare Bauweise soll jedoch die kurzfristige Adaption des Systems an die Erfordernisse anderer Zelltherapieformen ermöglichen. Speziell zu entwickeln sind verschiedene Kulturkammern und ein Monitoring des Gesamtsystems. Daneben sind Sensoren, Dosimaten und Pumpen auszuwählen und in das System zu implementieren.

Ergebnisse der Arbeiten im Rahmen des Projektes

Es wurde ein modulares Bioreaktorsystems für die Langzeit-Kulturführung von mesenchymalen Stammzellen (bzw. aus diesen abgeleiteten Zellen) entwickelt.

Dazu waren geeignete Bedingungen für die Perfusion des Kulturraumes (Auswahl geeigneter mikroporöser, transparenter Flachmembranen) aufzufinden und eine Konzeption für das Monitoring der Anordnung (Sauerstoff, Laktat, pH Wert, Temperatur durch kommerziell verfügbare Sensortechnik) zu erarbeiten. Durch die Nutzung von Spezialobjektiven konnten Möglichkeiten zur interventionsfreien lichtmikroskopischen Untersuchung der Kulturen im Bioreaktor geschaffen werden. Es wurden Kulturexperimente mit immortalisierten Zelllinien (Mo7e, L929 u.a.) durchgeführt, um die Charakteristik des Aufbaus zu erfassen und die Praktikabilität des Aufbaus zu erproben und zu verbessern.

Zur Absicherung der Langzeit-Tauglichkeit des Bioreaktorsystems wurden im Rahmen einer Graduierungsarbeit theoretische und experimentelle Untersuchungen zur Konditionierung des Zellkulturmediums in einem Oxygenatormodul auf der Basis eines dünnwandigen gaspermeablen Silikonschlauches untersucht. Der Gasaustausch im Oxygenatormodul konnte hierbei auf das Modell „Homogene Gasphase – porenfreie Membran – laminar fließende Flüssigkeit“ reduziert und mit Hilfe der Zweifilmtheorie detailliert beschrieben. Wesentliche Zusammenhänge sowie Parameter und Stoffkennzahlen wurden herausgearbeitet. Für die Steuerung der Gaszusammensetzung wurden die für verschiedene Gase (O_2 , CO_2 , N_2) experimentell ermittelten Übertragungsfunktionen ermittelt. Die Umsetzung der Steuerung wurde durch ein auf Testpoint beruhendes Programm realisiert, das Magnetventile anspricht. Langzeittests konnten die Eignung der so realisierten

Gasregelung belegen. Um eine Steuerung zur gezielten Einstellung der Gasphase zu realisieren, wurde für jedes Gas (O_2 , CO_2 , N_2) eine lineare Übertragungsfunktion ermittelt, die den Zusammenhang zwischen Ventilschaltzeiten und der dadurch bedingten Änderung des Gaspartialdruckes in der Gasphase beschreibt. Diese wurde in das Steuerprogramm implementiert und dient als Grundlage für die automatisierte Betätigung der Magnetventile. Tests zeigten, dass mit dieser Steuerung die Gaszusammensetzung über mehrere Tage konstant und mit nur geringen Abweichungen im Bereich von $\pm 2\%$ auf einem vorgegebenen Niveau gehalten werden kann. Abbildung 1 zeigt das Meßmenü der Steuersoftware. Wie man daraus erkennt, werden außerdem die Mediumparameter (pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck sowie Temperatur) aufgezeichnet.

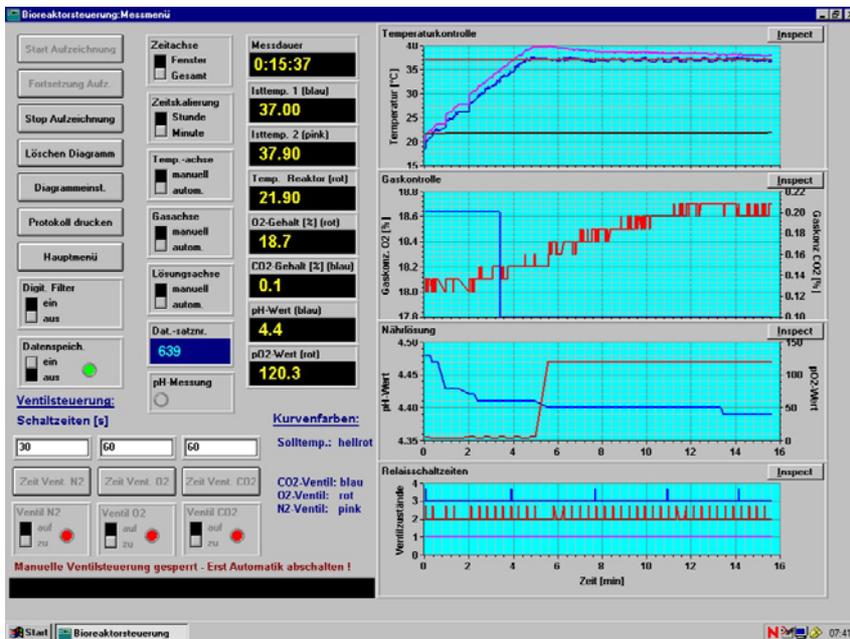


Abb. 1: Messmenü des Steuerprogramms

Es wurde in mehreren Versuchsreihen gezeigt, daß es einen direkten Zusammenhang zwischen der Gasphase und den Mediumparametern gibt, und dass über den Silikonschlauch eine Konditionierung des Mediums realisiert werden kann. Dabei sind Sauerstoffpartialdruck und pH-Wert unabhängig voneinander und nur von der Temperatur sowie vom entsprechenden Gaspartialdruck (O_2 bzw. CO_2) abhängig. Aus Abbildung 2 geht die Abhängigkeit der Mediumparameter von der Gaszusammensetzung im Oxygenator hervor. Nach einer Konditionierungszeit gehen sowohl pH-Wert als auch der Wert für pO_2 in ein Plateau über und werden auf

diesem Wert konstant gehalten. Dieser ist abhängig vom verwendeten Medium (Puffersystem) sowie der eingestellten Gaspartialdrücke. Dabei ist der Plateauwert nicht abhängig vom Ausgangswert des Mediums (große Fehlerbalken zu Inkubationsbeginn bei pH-Wert Kurve deuten auf unterschiedliche Ausgangswerte hin).

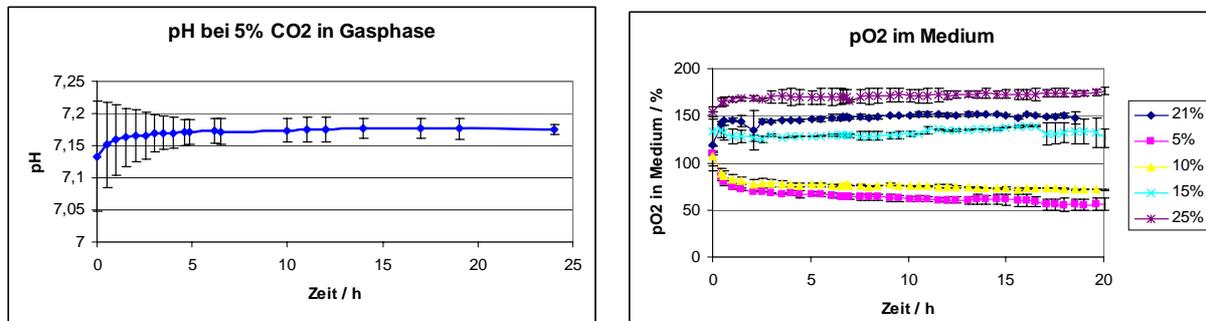


Abb. 2: Verlauf der Mediumparameter (pH-Wert und pO_2) in Abhängigkeit von der Gasphase

Zu klären war als nächstes die Cytokompatibilität der verwendeten Materialien. Dazu wurden Kulturexperimente durchgeführt, die den Einfluss aller direkt mit dem Kulturmedium in Kontakt kommenden Systemkomponenten (mikroskopierbare Kulturkammer (PEEK) mit hydrophiler PET-Membran, Schlauchsystem (Schläuche, Verbindungsstücke aus Polypropylen), Dichtungen, Sensorelemente) auf die Vitalität der kultivierten Zellen erfassen ließen. Abb. 3 zeigt die Expansion von HL60-Zellen nach 7 Tagen Inkubation. Dabei wurden die Zellen sowohl direkt mit den Materialien inkubiert (rot) als auch im Medium, das vorher 4 Tage Materialkontakt hatte (blau). Während es zwischen den meisten Materialien und der Kontrolle keine wesentlichen Unterschiede gab, wurde beim zunächst verwendeten Dichtungsmaterial EPDM eine signifikant schlechtere Expansion festgestellt während bei Tygon® die Zellen komplett abstarben. Offenbar wurden hier aus den kommerziellen Kunststoffen cytotoxische Substanzen ins Medium freigesetzt. Daher wurden diese Materialien durch Silikon bzw. Pharmed® ersetzt.

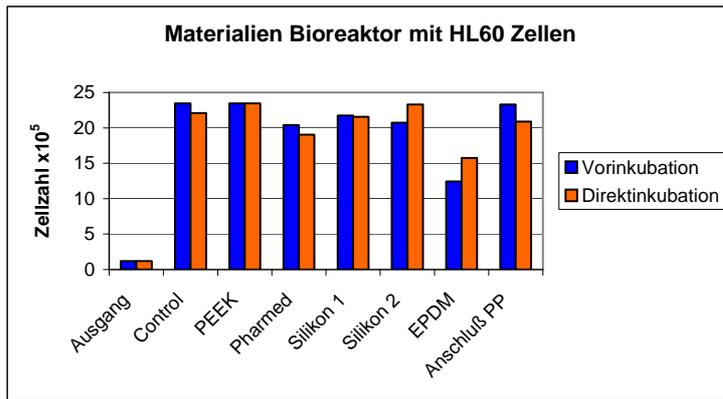


Abb. 3: Einfluß von Konstruktionswerkstoffen des Bioreaktors auf HL60 Zellen

Der Bioreaktor wurde mit HL60 Zellen über längere Zeiträume im Perfusionsbetrieb getestet. Die Mediumkonditionierung wurde dabei durch gaspermeable Silikonschläuche im CO₂-begasten Inkubator realisiert. Durch verschiedene konstruktive Anpassungen an den Kammern (Einfügen von Dichtungen, Form der Kammern) konnte das System bezüglich der Langzeitstabilität (Dichtheit, Sterilität) bzw. der Handhabbarkeit (Blasenfreiheit, Mediumbedarf) verbessert werden.

Zur Nutzung des Systems für Langzeitkulturen von adulten Stammzellen wurden Textilscaffolds auf Basis von Polyethylenterephthalat-Filamenten herangezogen, die durch Beschichtung mit reaktiven Polymerdünnschichten für die nachfolgende Kopplung von Matrix-Biopolymeren vorbereitet wurden. Nachdem geklärt werden konnte, dass die Verarmung des Kulturmediums an Zytokinen und Wachstumsfaktoren ein erhebliches Problem für die definierte Kulturführung darstellt sowie auch weitere Einflussfaktoren durch die relativ große Wechselwirkungsfläche des Kulturträgers mit dem Medium eine Veränderung der Zusammensetzung des Mediums bewirken wurden verschiedene Substitutmedien und eine Vorkonditionierung der Textil-Kulturträger erprobt. Hierzu wurden erneut M07-Zellen und Kulturzeiträume von 7 Tagen herangezogen. Die in dieser Weise abgeleiteten Kulturbedingungen werden nun auf die Kultivierung von adulten Stammzellen angewandt.

Die Optimierung textiler Trägerstrukturen (siehe auch Projekt B2) für die Nutzung im Bioreaktor bildete einen weiteren Schwerpunkt der Arbeiten. Dabei konnten durch Tailored Fibre Placement hergestellte und durch Pressen verdichtete dreidimensionale Textilstrukturen mit fibrillärem Collagen, das in der Fasermatrix steril rekonsituiert wurde, kombiniert werden um eine adhäsive Volumenphase mit einer hohen Zelldichte zu realisieren. Vorteilhafterweise können die so mit ECM

vorbeschichteten Kulturträger effektiv mit Wachstumsfaktoren aus dem Kulturmedium beladen und so weiter funktionalisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass bei geeigneter Wahl der Matrixeigenschaften sowie des Collagennetzwerkes eine höhere Expansion von verschiedenen Zelltypen, insbesondere auch von CD34+ Stammzellen, als in der Suspensionskultur erreicht werden kann.

Weiter wurde der Einfluss des Gewebes (mit und ohne Collagenfibrillen) auf die Cytokinkonzentration im Kulturmedium anhand von FLT-3 und SCF getestet. Dabei wurde mit ELISA-Tests festgestellt, dass offenbar eine Verarmung dieser Zusätze im Medium erfolgt (Abb. 4). Diese ist unter anderem auch auf eine Anbindung der Cytokine an die Gewebeoberfläche zurückzuführen. Dies bestätigen Experimente mit spezifischen fluoreszenzgelabelten Antikörpern (Abb. 5).

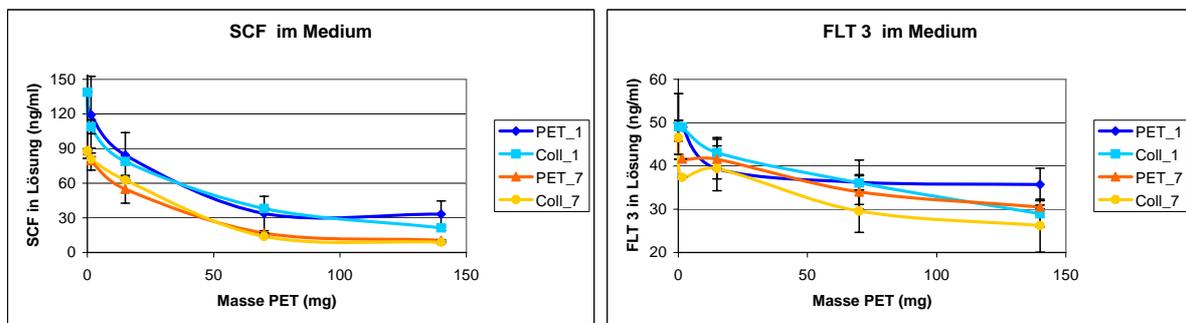


Abb. 4: Verarmung von Zusätzen im Medium in Anwesenheit von PET Gewebe (mit/ ohne Collagen I. Besonders SCF zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Gewebefläche (proportional zur Masse) sowie der Zeit (1 Tag / 7 Tage).

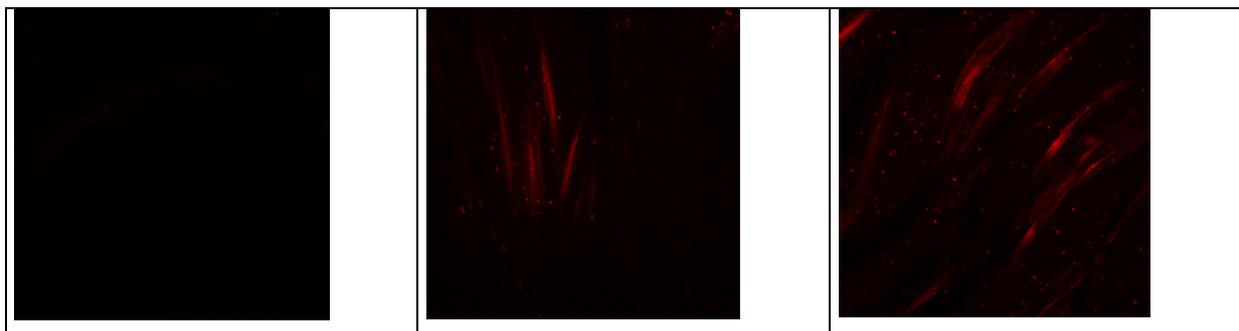


Abb. 5: LSM-Aufnahmen zum Nachweis von SCF an PET-Gewebe über fluoreszenzgelabelte Antikörper: Gewebe ungelabelt (links), Gewebe mit SCF (TRITC gelabelt) (Mitte), Gewebe mit Collagenfibrillen mit SCF (TRITC gelabelt) (rechts)

Die Adsorption von im Medium gelösten Zytokinen an der Oberfläche der dreidimensionalen PET - Scaffolds wurde anhand der SCF - sensitiven Zelllinie M07e für SCF (stem cell factor) untersucht. Dabei wurden unterschiedlich große Gewebeprouben (mit und ohne Collagenbeschichtung) in SCF - haltigem Medium vorkonditioniert. Nach 6 Stunden Inkubation wurde das Medium gegen neues mit und ohne SCF ausgetauscht und für 7 Tage mit M07 Zellen inkubiert. Als Vergleich wurden nicht vorkonditionierte Gewebeprouben sowie eine Vergleichsreihe mit unterschiedlichen SCF Konzentrationen mitgeführt (Abbildung 6). Es wurde deutlich die Verarmung des Mediums an SCF in Abhängigkeit der Gewebegröße indirekt über die Zellexpansion nachgewiesen. Das adsorbierte SCF ist aber offenbar zumindest teilweise noch aktiv. Das ergibt sich aus der Tatsache, dass auch auf den vorkonditionierten Proben ohne extra SCF Zugabe (blau) Zellen wachsen (im Gegensatz zur Kontrolle ganz ohne SCF) und die vorkonditionierten Proben mit SCF Zugabe (rot) eine leicht erhöhte Zellexpansion aufweisen als die nicht vorkonditionierten (grün). Das Medium zum Vorkonditionieren wurde ebenfalls für 7 Tage mit Zellen inkubiert. Erstaunlicherweise wurde bei extra Zugabe von SCF kein Anstieg der Zellzahl registriert, dafür eine Abhängigkeit von der Gewebegröße und dem Vorhandensein von Collagen. Dies legt den Schluß nahe, daß entweder andere wichtige Bestandteile des Mediums an der Gewebeoberfläche adsorbieren oder aus dem PET Bestandteile ins Medium herausgelöst werden.

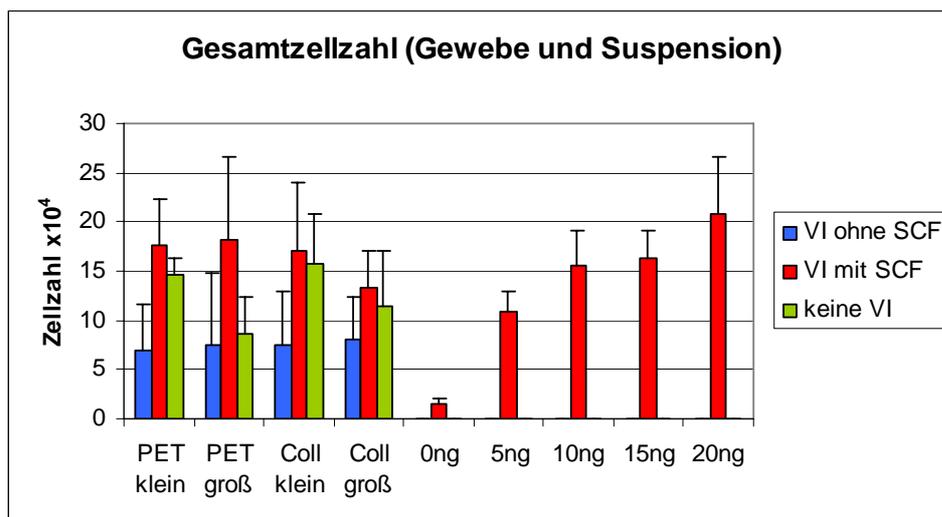


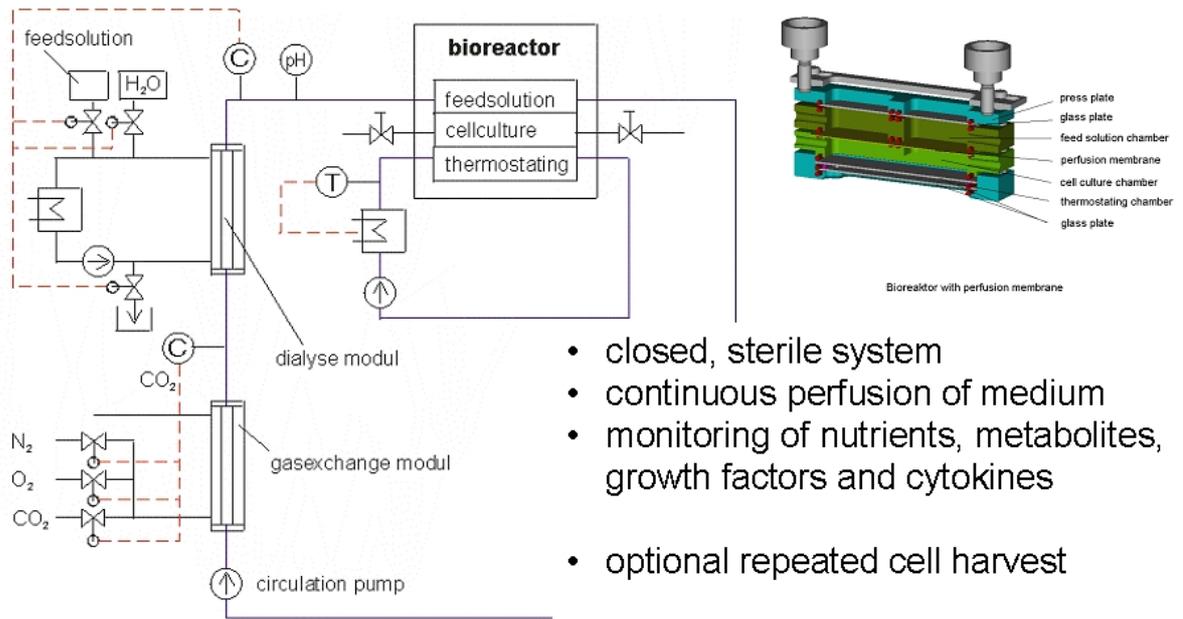
Abb. 6: Adsorption von im Medium gelösten Zytokinen an der Oberfläche der dreidimensionalen PET - Scaffolds wurde anhand der SCF - sensitiven Zelllinie M07e für SCF

Die wesentlichen Ziele des Vorhabens sind erreicht worden, im Ergebnis steht ein vielseitig anpassbares Bioreaktorsystem zur Kultur von Stammzellen zur Verfügung, das insbesondere für Langzeitkulturen unter sterilen Bedingungen und umfassender Überwachung geeignet ist.

Weiterführend wird angestrebt, das Bioreaktorsystem in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. U. Ravens, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der TU Dresden, zur Konditionierung von mesenchymalen Stammzellen auf verschiedenen Matrixbeschichtungen zu nutzen. Hierbei soll insbesondere die Differenzierung der Zellen in Myocyten untersucht werden. Es wurde eine Kulturkammer entwickelt und erprobt, die die Entdehnung und Dehnung der Herzmuskelzellen bei gleichzeitiger elektrischer Stimulation erlaubt. Im Berichtszeitraum wurden Experimente zur Evaluierung dieser Konditionierungskammer realisiert. Obwohl der Funktionsnachweis erbracht werden konnte, waren aus diesen Experimenten Änderungen des Designs abzuleiten, um sterile Kulturbedingungen auch über längere Zeiträume sicherstellen zu können.



Abb. 1: Fotografische Abbildung und schematische Darstellung (unten) zum Aufbau des entwickelten Bioreaktorsystems für Langzeitkulturen adulter Stammzellen



- closed, sterile system
- continuous perfusion of medium
- monitoring of nutrients, metabolites, growth factors and cytokines
- optional repeated cell harvest

Anlage: Publikationen

Publikationen in Fachzeitschriften

Zimmermann, R., Osaki, T., Kratzmüller, T., Gauglitz, G., Dukhin, S. S., and Werner, C.
Electrostatic Switching of Biopolymer Layers. Insights from Combined Electrokinetics and Reflectometric Interference
Analytical Chemistry, 2006, **78**, 5851-5851

Reinstorf, A., Hempel, U., Olgemöller, F., Domaschke, H., Schneiders, W., Mai, R., Stadlinger, B., Rösen-Wolff, A., Rammelt, S., Gelinsky, M., Pompe, W.:
O-phospho-L-serine modified calcium phosphate cements - material properties, *in vitro* and *in vivo* investigations.
Materialwiss. Werkstofftech. 2006, **37**, 491-503.

Wolf-Brandstetter, C., Lode, A., Hanke, T., Scharnweber, D., Worch, H.:
Influence of modified extracellular matrices on Ti6Al4V implants on binding and release of VEGF.
J Biomed Mat Res A
2006 (in press, Epub ahead of print: PMID 16941591)

Lode, A., Wolf-Brandstetter, C., Reinstorf, A., Bernhardt, A., König, U., Pompe, W., Gelinsky, M.:
Calcium phosphate bone cements, functionalized with VEGF: release kinetics and biological activity.
J. Biomed. Mater. Res. A (akzeptiert).

Brandes, N., Welzel, P., Werner, C., Kroh, L.:
Adsorption-induced Conformational Changes of Proteins onto Ceramic Particles: Differential Scanning Calorimetry and FTIR Analysis
Journal of Colloid and Interfacial Science, 2006, **299**, 56-59

Werner, C., Pompe, T., Salchert, K.:
Modulating Extracellular Matrix at Interfaces of Polymeric Materials
Advances in Polymer Science, 2006, **203**, 63-93

Osaki, T., Renner, L., Herklotz, M., Werner, C.:
Hydrophobic and Electrostatic Interactions in the Adsorption of Fibronectin at Maleic Acid Copolymer Films
Journal of Physical Chemistry B, 2006, **110**, 12119-12124

Grombe, R., Gouzy, M.F., Nitschke, M., Komber, H., Werner, C.:
Preparation and Characterization of Glycosylated Maleic Anhydride Copolymer Thin Films
Colloids and Surfaces A, 2006, **284-285**, 295-300

- Oswald, J., Steudel, C., Salchert, K., Joergensen, B., Thiede, C., Ehninger, G., Werner, C., Bornhäuser, M.:
Gene-Expression Profiling of CD34⁺ Hematopoietic Cells Expanded in a Collagen I Matrix
Stem Cells, 2006, **24**, 494-500
- Nitschke, M., Uhlmann, S., Schulze, R., Werner, C.:
Plasma Polymerization of Tetrafluoroethylene – Towards CF₂ Dominated Fluorocarbon Films
e-Polymers, 2006, **T006**, 1-10
- Sperling, C., Houska, M., Brynda, E., Streller, U., Werner, C.:
In Vitro Hemocompatibility of Albumin-heparin Multilayer Coatings on Polyethersulfone Prepared by the Layer-by-layer Technique
Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2006, **76**, 681-689
- Voit, B., Baier, A., Gramm, S., Nitschke, M., Rueda-Sanchez, J. C., Schmaljohann, D., Steinert, V., Werner, C., Zschoche, S:
Hydrophilic, Amphiphilic and Thermo-responsive Gels Synthesized for Biomedical Applications
e-polymers, 2006, **T001**, 1-8
- Sperling, C., Schweiss, R. B., Streller, U., Werner, C.:
In vitro hemocompatibility of self-assembled monolayers displaying various functional groups
Biomaterials, 2005, **26**, 6547-6557
- Sperling, C., Gouzy, M. F., Salchert, K., Streller, U., Rauwolf, C., Werner, C.:
Bestimmung der Blutverträglichkeit von Materialoberflächen mit immobilisiertem Thrombininhibitor
BIOmaterialien, 2005, **6**, 147-154
- Pompe, T., Renner, L., Grimmer, M., Herold, N., Werner, C.:
Functional Films of Maleic Anhydride Copolymers under Physiological Conditions
Macromolecular Bioscience, 2005, **5**, 890-895
- Pompe, T., Keller, K., Mitdank, C., Werner, C.:
Fibronectin Fibril Pattern Displays the Force Balance of Cell-Matrix Adhesion
European Biophysics Journal, 2005, **34**, 1049-1056
- Uhlmann, P., Skorupa, S., Werner, C., Grundke, K.:
Characterization of Maleic Acid/Anhydride Copolymer Films by Low-Rate Dynamic Liquid-Fluid Contact Angle Measurements Using Axisymmetric Drop Shape Analysis
Langmuir, 2005, **21**, 6302-6307

Salchert, K., Gouzy, M.-F., Glorius, M., Kühn, A., Nitschke, M., Werner, C.:
Immobilization of an Anticoagulant Benzamidine Derivative: Effect of Spacer Arms and Carrier
Hydrophobicity on Thrombin Binding
Acta Biomaterialia, 2005, **1**, 441-449

Renner, L., Pompe, T., Salchert, K., Werner, C.:
Fibronectin Displacement at Polymer Surfaces
Langmuir, 2005, **21**, 4571-4577

Freudenberg, U., Zschoche, S., Simon, F., Janke, A., Schmidt, K., Behrens, S.H., Auweter, H.,
Werner, C.:
Covalent Immobilization of Cellulose Layers onto Maleic Anhydride Copolymer Thin Films
Biomacromolecules, 2005, **6**, 1628-1634

Zimmermann, R., Norde, W., Stuart, M.A., Werner, C.:
Electrokinetic Characterization of Poly(acrylic acid) and Poly(ethylene oxide) Brushes in Aqueous
Electrolyte Solutions
Langmuir, 2005, **21**, 5108-5114

Salchert, K., Oswald, J., Streller, U., Grimmer, M., Herold, N., Werner, C.:
Fibrillar Collagen Assembled in the presence of Glycosaminoglycans to Constitute Bioartificial Stem
Cell Niches in vitro
Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2005, **16**, 581-585

Schmaljohann, D., Nitschke, M., Schulze, R., Eing, A., Eichhorn, K.-J., Werner, C.:
In Situ of the Thermoresponse Behavior of Micropatterned Hydrogel Films by Imaging Ellipsometry
Langmuir, 2005, **21**, 2317-2322

Pompe, T., Renner, L., Werner, C.:
Nanoscale Features of Fibronectin Fibrillogenesis Depend on Protein-Substrate Interaction and
Cytoskeleton Structure
Biophysical Journal, 2005, **88**, 527-534

Faucheux, N., Schweiss, R., Lutzow, K., Werner, C., Groth, T.:
Self-assembled Monolayers with Different Terminating Groups as Model Substrates for Cell Adhesion
Studies
Biomaterials, 2004, **25**, 2721-2730

Gouzy, M. F., Sperling, C., Salchert, K., Pompe, T., Uhlmann, P., Streller, U., Rauwolf, C., Simon, F., Böhme, F., Voit, B., Werner, C.:

In vitro Blood Compatibility of Polymeric Biomaterials through Covalent Immobilization of an Amidine Derivative

Biomaterials, 2004, **25**, 3493-3501

Meinhold, D., Schweiss, R., Zschoche, S., Janke, A., Baier, A., Simon, F., Dorschner, H., Werner, C.: Hydrogel Characteristics of Electron-Beam-Immobilized Poly(vinylpyrrolidone) Films on Poly(ethylene terephthalate) Supports

Langmuir, 2004, **20**, 396-401

Nitschke, M., Zschoche, S., Baier, A., Simon, F., Werner, C.:

Low Pressure Plasma Immobilization of Thin Hydrogel Films on Polymer Surfaces

Surface & Coatings Technology, 2004, **185**, 120-125

Oswald, J., Boxberger, S., Joergensen, B., Feldmann, S., Ehninger, G., Bornhäuser, M., Werner, C.: Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In Vitro

Stem Cells, 2004, **22**, 377-384

Oswald, J., Joergensen, B., Pompe, T., Kobe, F., Salchert, K., Bornhäuser, M., Ehninger, G., Werner, C.:

Comparison of Flow Cytometry and Laser Scanning Cytometry for the Analysis of CD34(+) Hematopoietic Stem Cells

Cytometry Part A, 2004, **57A**, 100-107

Pompe, T., Markowski, M., Werner, C.:

Modulated Fibronectin Anchorage at Polymer Substrates Controls Angiogenesis

Tissue Engineering, 2004, **10**, 841-848

Pompe, T., Mitdank, C., Werner, C.:

Quantitative Analysis of Fibronectin Fibrillogenesis by Endothelial Cells on Biomaterials

Journal of Physics: Condensed Matter, 2004, **16**, 2421-2426

Renner, L., Pompe, T., Salchert, K., Werner, C.:

Dynamic Alterations of Fibronectin Layers on Copolymer Substrates with Graded Physicochemical Characteristics

Langmuir, 2004, **20**, 2928-2933

Renner, L., Joergensen, B., Markowski, M., Salchert, K., Werner, C., Pompe, T.:

Control of Fibronectin Displacement on Polymer Substrates to Influence Endothelial Cell Behaviour

Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 2004, **15**, 387-390

Reinstorf, A., M. Ruhnow, M. Gelinsky, W. Pompe, U. Hempel, K.-W. Wenzel, P. Simon:
Phosphoserine - a convenient compound for modification of calcium phosphate bone cement collagen
composites.

Journal of Materials Science-Materials in Medicine 2004, **15**, 451-455.

Hempel, U., M. Poppe, A. Reinstorf, U. Geißler, M. Gelinsky, W. Pompe, K.-W. Wenzel
Proliferation and differentiation of osteoblasts on Biocement D modified with collagen type I and citric
acid.

Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials 2004, **71B**, 130-143.

Bornhäuser, M., Eger, L., Oelschlaegel, U., Auffermann-Gretzinger, S., Kiani, A., Schetelig, J., Illmer,
T., Schaich, M., Corbeil, D., Thiede, C., Ehninger, G.:

Rapid reconstitution of dendritic cells after allogeneic transplantation of CD133(+) selected
hematopoietic stem cells.

Leukemia 2004, **19**, 161-165.

Salchert, K., Streller, U., Pompe, T., Herold, N., Grimmer, M., Werner, C.:

In vitro Reconstitution of Fibrillar Collagen Type I Assemblies at Reactive Polymer Surfaces

Biomacromolecules, 2004, **5**, 1340-1350

Schmaljohann, D., Beyerlein, D., Nitschke, M., Werner, C.:

Thermo-Reversible Swelling of Thin Hydrogel Films Immobilized by Low-Pressure Plasma

Langmuir, 2004, **20**, 10107-10114

Sperling, C., Salchert, K., Streller, U., Werner, C.:

Covalently Immobilized Thrombomodulin Inhibits Coagulation and Complement Activation of Artificial
Surfaces in Vitro

Biomaterials, 2004, **25**, 5101-5113

Osaki, T. and Werner, C.:

Ionization Characteristics and Structural Transitions of Alternating Maleic Acid Copolymer Films

Langmuir, 2003, **19**, 5787-5793

Pompe, T., Kobe, F., Salchert, K., Joergensen, B., Oswald, J., Werner, C.:

Fibronectin Anchorage to Polymer Substrates Controls the Initial Phase of Endothelial Cell Adhesion

Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2003, **67A**, 647-657

Pompe, T., Zschoche, S., Herold, N., Salchert, K., Gouzy, M. F., Sperling, C., Werner, C.:

Maleic Anhydride Copolymers - a Versatile Platform for Molecular Biosurface Engineering

Biomacromolecules, 2003, **4**, 1072-1079

- Salchert, K., Pompe, T., Sperling, C., Werner, C.:
Quantitative Analysis of Immobilized Proteins and Protein Mixtures by Amino Acid Analysis
Journal of Chromatography A, 2003, **1005**, 113-122
- Schmaljohann, D., Oswald, J., Joergensen, B., Nitschke, M., Beyerlein, D., Werner, C.:
Thermo-Responsive PNiAAm-g-PEG Films for Controlled Cell Detachment
Biomacromolecules, 2003, **4**, 1733-1739
- Streller, U., Sperling, C., Hübner, J., Hanke, R., Werner, C.:
Design and Evaluation of Novel Blood Incubation Systems for in vitro Hemocompatibility Assessment of Planar Solid Surfaces
Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials, 2003, **66B**, 379-390
- Heubach, J., Körber, H., Jenschke, W., Wettwer, E., Werner, C., Ravens, U.:
Elektrische und mechanische Stimulation kultivierter Herzmuskelzellen
Wissenschaftliche Zeitschrift der TU Dresden: Medizin - neue Verfahren, Methoden und Therapien, 2002, **3**, 15-18
- Nitschke, M., Schmack, G., Janke, A., Simon, F., Pleul, D., Werner, C.:
Low Pressure Plasma Treatment of Poly(3-hydroxybutyrate): Toward Tailored Polymer Surfaces for Tissue Engineering Scaffolds
Journal of Biomedical Materials Research, 2002, **59**, 632-638
- Roessler, S., Zimmermann, R., Scharnweber, D., Werner, C., Worch, H.:
Characterization of Oxide Layers on Ti6Al4V and Titanium by Streaming Potential and Streaming Current Measurements
Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2002, **26**, 387-395
- Schmack, G., Gliesche, K., Nitschke, M., Werner, C.:
Implantate auf Basis von Poly (3-hydroxybuttersäure)
Biomaterialien, 2002, **3**, 21-25
- Werner, C.:
Biomimetische Polymerbeschichtungen für innovative Therapien
Wissenschaftliche Zeitschrift der TU Dresden: Medizin - neue Verfahren, Methoden und Therapien, 2002, **3**, 19-23

Vorträge

Pompe, T.:

Nanoscale Features of Fibronectin Fibrillogenesis Depend on Protein-Substrate and Cytoskeleton Structure

Annual Meeting of the American Society of Cell Biology, San Francisco, CA, USA, 10.12. - 14.12.2005

Pompe, T.:

Physicochemical Modulation of Biomolecular Signals at Polymer Surfaces

Materials and Devices Colloquium, Philips Research, Eindhoven, Netherlands, 23.09.2005

Renner, L., Pompe, T., Osaki, T., Werner, C.:

Analyzing protein conformation and lipid membranes on polymer supports

QSense-User Meeting, Leuven, Belgium, 06.10. - 07.10.2005

Werner, C.:

Biomimetic Surface Engineering of Biomaterials

European Congress on Advanced Materials and Processes (EUROMAT) 2005, Prague, Czech

Republic, 05.09. - 08.09.2005

Werner, C.:

Cell-Matrix Adhesion on Biomimetic Materials

DFG Round Table Meeting "Biomaterials", Dresden, 19.07.2005

Werner, C.:

Molecular Bioengineering - Research Capabilities of the Max Bergmann Center of Biomaterials

NittoDenko Headquarters, Osaka, Japan, 26.10.2005

Werner, C.:

Biosurface Engineering - New Options for Biomimetic Materials

National University of Singapore, Singapore, 28.10.2005

Werner, C.:

Molecular Engineering of Maleic Anhydride Copolymer Coatings

Pacific Polymer Conference IX, Lahaina, HI, USA, 11.12. - 14.12.2005

Werner, C.:

Biomimetic and Nanostructured Polymers for Advanced Medical Devices

Nanotechnology Symposium of the Saxonian Governmental Delegation, Kyoto, Japan, 26.10.2005

Werner, C.:

Modulation bioaktiver Moleküle an Polymer-Grenzflächen
Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 21.07.2005

Werner, C.:

Grenzflächenphänomene an Cellulose-Materialien
BASF AG, Ludwigshafen, 21.09.2005

Werner, C., Dukhin, S. S., Zimmermann, R.:

Extended Electrokinetic Characterization of Grafted Polyelectrolyte Layers - Experiment and Theory
XVIIth European Chemistry at Interfaces Conference, Loughborough University, Loughborough, UK,
27.06 - 01.07.2005

Zimmermann, R.:

Charakterisierung von Ladungsbildungsprozessen an planaren fest/flüssig-Grenzflächen
Vortrag, Institut für Chemie, GKSS-Forschungszentrum, Teltow, 12.07.2005

Markowski, M.:

Wechselwirkung zwischen Zellen und Oberflächen
Sommerkurs des Deutschen Hygiene Museums, Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik,
TU Dresden, Dresden, 28.07.2005

Nitschke, M.:

Plasmabehandlung von Polymeroberflächen und Plasmapolymerisation
GdCh Kurs "Polymeroberflächen und -grenzflächen: Charakterisierung, Modifizierung, Anwendungen",
Dresden, 10.10. - 12.10.2005

Osaki, T., Renner, L., Markowski, M., Werner, C.:

Hydrophobic and Electrostatic Interactions in the Adsorption of Proteins to Polymer Surfaces
54th Polymer Discussion (Society of Polymer Science Japan), Yamagata, Japan, 20.09. - 22.09.2005

Pompe, T., Starrau, J., Bobeth, M., Pompe, W.:

Stochastic Model Resembles Nanoscale Features of Fibronectin Fibrillogenesis
European Conference on Mathematical and Theoretical Biology (ECMTB 2005), Dresden, 18.07. -
22.07.2005

Werner, C.:

Grenzflächenphänomene an Biomaterialien - Übersicht und aktuelle Forschung
GdCh Kurs "Grenzflächenphänomene", Dresden, 12.10.2005

Werner, C.:

Unravelling Cell-Matrix Adhesion of Hematopoietic Stem Cells on Polymer Substrates Towards the Bioartificial Bone Marrow Niche

The 8th Annual Tissue Engineering Society International (TESI), Shanghai, China, 22.10. - 25.10.2005

Zimmermann, R., Osaki, T., Gauglitz, G., Werner, C.:

Monitoring von Grenzflächenprozessen durch elektrokinetische Messungen und Reflektometrische Interferenzspektroskopie

7. Dresdner Sensorsymposium, Dresden, 12.12. - 14.12.2005

Gouzy, M. F.: Benzamidine Derivates for Hemocompatible Polymer Coatings.

2nd Max Bergmann Symposium, Max Bergmann Center of Biomaterials, Dresden, 17.-18.02.05

Gouzy, M. F., Sperling, C., Salchert K., Voit, B., Werner C.:

In Vitro Blood Compatibility of Polymeric Biomaterials Through Immobilization of Synthetic Thrombin Inhibitors.

46. Sitzung des DECHEMA-Arbeitsausschusses "Polyreaktionen", Frankfurt a.M., 24.-25.01.05

Pompe, T.: From Substrate Physicochemistry to New Features of Fibronectin Fibrillogenesis

2nd Max Bergmann Symposium, Max Bergmann Center of Biomaterials, Dresden, 17.-18.02.2005

Werner, C.:

Self Assembly for the Design of Biomimetic Materials.

iNano Meeting, University of Aarhus, Dänemark, 19.01.2005

Werner, C.:

Modulation of Bioactive Molecules at Interfaces – New Options and Challenges for Polymeric Biomaterials.

Besuch W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, Arizona, USA, 30.03.2005

Gouzy, M. F.:

Benzamidin-basierende Beschichtungen für blutkontaktierende Oberflächen.

BMOZ Workshop Blutkontakt, Tübingen, Germany, 7./8.04.2005

Welzel, P. B., Freudenberg, U., Grimmer, M., Behrens, S.-H., Werner, C.:

Beeinflussen salzinduzierte Strukturänderungen in Kollagenfibrillen deren Säure-Base-Verhalten?

16. Freiburger Kalorimetrietage, Freiberg, Sachsen, Germany, 16.-18.03.2005

Werner, C.:

Polymers for Regenerative Medicine.

EGC Course and Workshop, Prague, Czech Republic, 09-13.05.2005

Werner, C.:

Matrix Engineering: Materials Science for Regenerative Medicine.

Round Table Meeting with European Science Foundation Member Organisations, Almeria, Spain, 16.-17.06.2005

Gouzy, M.F., Sperling, C., Salchert, K., Streller, U., Werner, C.:

Haemocompatibility of polymer surfaces functionalized with amidine-type thrombin inhibitors. 7th World Biomaterials Congress, Sydney, Australia, 17.05.-21.05.04

Werner, C., Pompe, T., Teese, M., Nitschke, M.:

Molecular Surface Engineering Platforms to Switch the Characteristics of Immobilised Biopolymers. 7th World Biomaterials Congress, Sydney, Australia, 17.05.-21.05.04

Werner, C., Pompe, T., Markowski, M., Gouzy, M.F., Sperling, C., Salchert, K., Zschoche, S.:

Physicochemical Modulation of Bioactive Molecules Attached to Maleic Acid Anhydride Copolymer Films.

International Conference & Workshop on Physical Chemistry of Bio-Interfaces, The Ian Wark Research Institute, South Australia, 23.05.-26.05.04

Werner, C.:

Physicochemical Modulation of Bioactive Molecules Attached to Maleic Acid Anhydride Copolymer Films.

43rd Microsymposium "Polymer Biomaterials: Biomimetic and Bioanalogous Systems", Prag, 11.07.-15.07.04

Wolf, C., Hanke, T., Scharnweber, D., Peters, K., Kirkpatrick, C.J., Worch, H.:

Influence of Modified Extracellular Matrices on Ti6Al4V Implants on Binding and Release of VEGF. 7th World Biomaterials Congress, Sydney, Australia, 17.05.-21.05.04

Oswald, J.:

Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Endothel-Like Cells.

Symposium Mesenchymale Stammzellen -Aktuelle Projekte und neue Entwicklungen-, Köln, 28.06.04

Markowski, M., Pompe, T., Renner, L., Werner, C.:

Fibronectin Anchorage Influence Generation of Vascular Like Structures by Endothelial Cells.

ECM V, Davos, Schweiz, 28.06.-30.06.04

Werner, C., Pompe, T., Jørgensen, B., Markowski, M., Renner, L., Salchert, K.:

Modulated Anchorage of Fibronectin at Polymer Substrates Controls Angiogenesis.

7th World Biomaterials Congress, Sydney, Australia, 17.05.-21.05.04

Werner, C., Oswald, J., Boxberger, S., Jørgensen, B., Bornhäuser, M., Ehninger, G.:
Mesenchymal Stem Cells (MSC) Can Be Differentiated into Endothelial Cells in Vitro.
7th World Biomaterials Congress, Sydney, Australia, 17.05.-21.05.04

Gouzy, M.F.:

Short Term Hemocompatibility of Polymeric Biomaterials Enhanced by the Covalent Immobilization of a Small Synthetic Thrombin Inhibitor
Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz, 25.07.2003

Gouzy, M.F., Sperling, C., Salchert, K., Streller, U., Werner, C.:

Improvement of the Short-term Blood Compatibility by Covalent Attachment of a Benzamidine-type Inhibitor on to a Polymeric Support.
UWEB 7th Summer Symposium, University of Washington, Seattle, USA, 27.-29.08.2003

Gouzy, M.F., Sperling, C., Salchert, K., Streller, U., Werner, C.:

Short-term Hemocompatibility of Polymeric Biomaterial Enhanced by Covalent Immobilization of a Small Synthetic Thrombin Inhibitor. Dresden (IPF/BM)- Toronto (UofT/BM) Microsymposium, University of Toronto, Kanada, 03.09.2003

Sperling, C., Gouzy, M.F., Salchert, K., Streller, U., Voit, B., Werner, C.:

Hemocompatibility of Polymer Surfaces Functionalized with Small Synthetic Thrombin Inhibitors.
European Society for Biomaterials, Stuttgart, 01.10.-04.10.2003

Gouzy, M.F.:

Hemocompatible Coatings Based on Synthetic Thrombin Inhibitors.
Doktorandenworkshop der TU München, Thurnau, 24.-26.10.2003

Renner, L., Pompe, T., Jørgensen, B., Markowski, M., Salchert, K., Werner, C.:

Physicochemical Modulation and Characterisation of the Kinetic Interactions of Fibronectin with Polymer Substrates to Control Adhesion and Differentiation of Endothelial Cells
European Society for Biomaterials, Stuttgart, 01.10.-04.10.2003

Werner, C., Pompe, T., Osaki, T., Gouzy, M.F., Salchert, K., Sperling, C., Markowski, M.:

Biomolecular Surface Engineering Based on Maleic Anhydride Copolymer Films.
University of Sherbrooke, Canada 04.12.2003

Werner, C., Pompe, T., Osaki, T., Markowski, M., Renner, L.:

Maleic Anhydride Copolymer Films for Molecular Surface Engineering.
11th International Conference on Surface and Colloid Science, Iguassu Falls, Brasilien, 15.-19.09.2003

Oswald, J., Bornhäuser, M., Boxberger, S., Jörgensen B., Feldmann, S., Salchert, K., Pompe, T., Ehninger, G., Werner, C.:

Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Endothel-like Cells.

European Life Scientist Organization (ELSO) Meeting, Dresden 20.-24.09.2003

Nitschke, M.:

Plasmabehandlung und Oberflächenchemie, Reaktionen und Plasmapolymerisation. GDCh Kurs

"Polymeroberflächen und Grenzflächen: Charakterisierung, Modifizierung und Anwendung", Dresden, 08.-10.10.2003

Werner, C.:

Biomimetische Grenzflächengestaltung von Polymermaterialien. Eingeladener Vortrag,

Forschungszentrum Rossendorf, 13.11.2003

Werner, C.:

Tarnkappenbeschichtungen für biokompatible Kunststoffe.

Eingeladener Vortrag beim Wissenschaftspodium des Sächsischen Landesgymnasiums Sankt Afra, Meißen, 15.05.03

Werner, C., Salchert, K., Streller, U., Sperling, C.:

Beschichtungskonzepte für Implantate in der endovaskulären Therapie.

Eingeladener Vortrag bei der Sitzung des Wissenschaftlichen Beirates der Firma Dendron GmbH, Bochum

Nitschke, M., Schmaljohann, D., Beyerlein, D., Werner, C.:

Plasmaimmobilisierung von Hydrogelen mit thermo-reversiblen Eigenschaften.

Vortrag zum Symposium Oberflächentechnologie mit Plasmaprozessen, Mühlleithen, 18.03.03-20.03.03

Werner, C., Oswald, J., Boxberger, S., Salchert, K., Pompe, T., Markowski, M., Bornhäuser, M., Ehninger, G.: Endothelial-Like Differentiation and Capillary Formation of Human Mesenchymal Stem Cells Grown on Biofunctionalized Polymer Substrates.

Conference "Engineered Tissue Growth", Pittsburgh PA, 18.03.-21.03.03

Pompe, T., Jørgensen, B., Markowski, M., Renner, L., Salchert, K., Werner, C.:

Physicochemical Modulation of Interactions of Fibronectin with Polymer Substrates to Control Adhesion, Proliferation, and Differentiation of Endothelial Cells.

International Symposium: Interface Biology of Implants, Warnemünde, 15.05.03-16.05.03

Werner, C.: New Options for Biomimetic Materials.

Eingeladener Vortrag an der Università degli Studi di Trento, Dipartimento di Ingegneria dei Materiali - Biomateriali, Trento, 24.01.03

Gouzy, M.F.:

Hemocompatible Surfaces Based on Benzamidine Derivatives

MPI-P/MBC Seminar, Mainz, 8.-9.11.2004

Nitschke, M., Schmaljohann, D., Gramm, S., Werner, C.:

Low Pressure Plasma Immobilization – a Promising Approach to Tailored Polymer Surfaces

MPI-P/MBC Seminar, Mainz, 8.-9.11.2004

Osaki, T., Renner, L., Markowski, M., Werner, C.:

Fibronectin Adsorption onto Maleic Acid Copolymer Films

MPI-P/MBC Seminar, Mainz, 08.-09.11.2004

Pompe, T., Franke, K., Oswald, J., Bornhaeuser, M., Werner, C.:

Analysing Microenvironmental Cues for the in vitro Expansion of Hemapoietic Stem Cells

TESI-ETES Meeting, Lausanne, 11.10.-13.10.2004

Pompe, T., Markowski, M., Renner, L., Werner, C.:

Fibronectin Anchorage at Polymer Substrates Controls Angiogenesis

TESi-ETES Meeting, Lausanne, 11.10.-13.10.2004

Salchert, K.:

Reconstitution of Functional Biopolymer Matrices

MPI-P/MBC Seminar, Mainz, 8.-9.11.2004

Streller, U., Oswald, J., Spiske, C., Werner, C.:

Entwicklung und Charakterisierung eines Screening-Bioreaktorsystems zur in Vitro Kultivierung
Hämatopoetischer Stammzellen

12. Heiligenstädter Kolloquium: Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt, Heiligenstadt,
27.09.-29.09.04

Werner, C.:

Modulation bioaktiver Moleküle an Grenzflächen: Neue Optionen für biomimetische Materialien

Biophysikalisches Symposium, Universität Heidelberg, 06.07.2004

Werner, C.:

Physicochemical Modulation of Bioactive Molecules Attached to Maleic Acid Anhydride Copolymer Films

eingeladener Vortrag zum 43rd Microsymposium "Polymer Biomaterials: Biomimetic and Bioanalogous Systems", Prag, 11.07.-15.07.04

Pompe, W., Reinstorf, A., Knepper-Nicolai, B., Flade, K., Ruhnow, M.:

Untersuchungen zum Einfluss von Biomolekülen auf die Materialeigenschaften von Calciumphosphat-Zementen.

Tagung „Keramische Biomaterialien“ der DKG, **2002** in Freiberg.

Wolf, C., Hanke, T., Scharnweber, D., Worch, H.:

Surface Modification of Ti6Al4V Implants with Different Collageneous Matrices for Controlled Release of VEGF.

17th European Conference on Biomaterials, Barcelona **2002**

Wolf, C., Hanke, T., Scharnweber, D., Worch, H.:

Modifizierung von Titanoberflächen zur kontrollierten Freisetzung von VEGF an metallischen Implantaten im Knochenkontakt.

Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Dresden **2002**

Poster

Bauer, N., Fonseca, A-V., Freund, D., Boxberger, S., Oswald, J., Werner, C., Ehninger, G.,
Bornhäuser, M., Corbeil, D.:

Cellular and Molecular Events Underlying the Interaction of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells
with Mesenchymal Stem Cells

2005 American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting, Atlanta, GA, USA, 10.12. - 13.12.2005

Franke, K., Pompe, T., Bornhäuser, M., Werner, C.:

Mimicking the Niche - Adhesion of Hematopoietic Stem Cells Onto Extracellular Matrix Coatings

European Life Scientist Organization 2005, Dresden, 03.09. - 06.09.2005

Freudenberg, U., Zimmermann, R., Schmidt, K., Behrens, S.-H., Auweter, H., Pompe, W., Werner, C.:

Electrokinetic Characterization of Charge Formation Processes on Collagen Type I Layers

Gordon Research Conference "Collagen", New London, NH, USA, 24.07. - 29.07.2005

Grombe, R., Gouzy, M.-F., Nitschke, M., Komber, H., Werner, C.:

Characterization of Immobilized Glycosides on Polymeric Supports

The 25th Japan Society of Carbohydrate Research Annual Meeting, Otsu, Japan, 20.07. - 22.07.2005

Grombe, R., Gouzy, M.-F., Nitschke, M., Komber, H., Werner, C.:

Preparation and Characterization of Glycosylated Maleic Anhydride Copolymer Thin Films

The 11th International Conference on Organized Molecular Films (LB11), Sapporo, Japan, 26.06. -
30.06.2005

Osaki, T., Renner, L., Drechsel, D., Werner, C.:

Bilayer Lipid Membranes on Soft Polymer Supports for the Incorporation of Transmembrane Proteins

Statusseminar InnoRegio Netzwerk BioMeT Dresden, Dresden, 05.12.2005

Osaki, T., Werner, C.:

Ionization Characteristics and Structural Transitions of Alternating Maleic Acid Copolymer Films

54th Polymer Discussion (by The Society of Polymer Science Japan), Yamagata, Japan, 20.09. -
22.09.2005

Pompe, T., Markowski, M., Renner, L., Werner, C.:

From Controlled Substrate Physiochemistry to New Features of Fibronectin Fibrillogenesis

Gordon Research Conferences - Biomaterials: Biocompatibility / Tissue Engineering, Holderness
School, Plymouth, NH, USA, 31.07. - 05.08.2005

Zimmermann, R., Birkert, O., Gauglitz, G., Werner, C.:
Charge Characteristics of Polymer Films for Biosensor Applications
7. Dresdner Sensorsymposium, Dresden, 12.12. - 14.12.2005

Welzel, P. B., Werner C.:
Adsorption and Adsorption-Induced Structural Changes of Proteins on Silica.
2nd Max Bergmann Symposium, Max Bergmann Center of Biomaterials Dresden, 17.-18.02.05

Renner, L., Pompe, T., Salchert K., Werner C.:
Fibronectin Displacement on Polymer Surfaces.
2nd Max Bergmann Symposium, Max Bergmann Center of Biomaterials Dresden, 17.-18.02.05

Franke, K., Pompe, T., Werner C.:
Analysing Hematopoietic Stem Cell Interaction with Niche Microenvironment.
2nd Max Bergmann Symposium, Max Bergmann Center of Biomaterials Dresden, 17.-18.02.05

Markowski, M., Pompe, T., Werner C.:
Fibronectin Anchorage Influences Endothelial Cell Behaviour on Polymer Substrates.
2nd Max Bergmann Symposium, Max Bergmann Center of Biomaterials Dresden, 17.-18.02.05

Schluttig, B, Rauwolf, C., Werner C.:
Computational Study of Small Collagen-like Peptides.
2nd Max Bergmann Symposium, Max Bergmann Center of Biomaterials Dresden, 17.-18.02.05

Klose T., Welzel, P. B., Werner C.:
Protein Adsorption under Dynamic Conditions.
2nd Max Bergmann Symposium, Max Bergmann Center of Biomaterials Dresden, 17.-18.02.05

Franke, K, Pompe, T., Bornhaeuser, M., Werner, C.:
Mimicking the Niche - Hematopoietic Stem Cell Interaction with Extracellular Matrix Components under Spatial Constraints.
Wilsede Meeting. XVI / Modern Trends in Leukaemia, Hamburg, Germany, 18.-22.06.2005

Grombe, R., Gouzy, M. F., Nitschke, M., Komber, H., Werner, C.:
Preparation and Characterization of Glycosylated Maleic Anhydride Copolymer Thin Films.
The 11th International Conference on Organized Molecular Films (LB11), Sapporo, Japan, 26.-30.06.2005

Osaki, T., Renner, L., Markowski, M., Werner, C.:
Hydrophobic and Electrostatic Interactions in the Adsorption of Protein to Polymer Surfaces.
10th Dresden Polymer Discussion, Meißen, Germany, 10.-13.04.2005

Rauwolf, C, Sperling, C, Gouzy, MF; Werner, C.:

Study of thrombin inhibitors of NAPAP analogues and amidine derivatives with hydrocarbon spacers for surface immobilization.

7th World Biomaterials Congress, Sydney, Australia, 17.05.-21.05.04

Salchert, K., Oswald, J., Streller, U., Welzel, P. B., Werner, C.:

Fibrillar Collagen Assembled in Presence of Glycosaminoglycans to Constitute Artificial Stem Cell Niches.

7th World Congress on Biomaterials, Sydney, Australia, 17.05.-21.05.04

Markowski, M., Pompe, T., Salchert, K., Jørgensen, B., Werner, C.:

Physicochemical Modulation of Fibronectin Interactions with Polymer Substrates to Control Adhesion and Differentiation of Endothelial Cells.

European Life Scientist Organization (ELSO) Meeting, Dresden 20.-24.09.2003

Pompe, T., Jørgensen, B., Markowski, M., Renner, L., Salchert, K., Werner, C.:

Physicochemical Modulation of Interactions of Fibronectin with Polymer Substrates to Control Adhesion, Proliferation and Differentiation of Endothelial Cells Biological Surfaces and Interfaces – EuroConference on Understanding and Improving Specific Interactions,

Castelvecchio Pascoli, Italien, 21.-26.06.2003

Rothe, R., Reinstorf, A., Gelinsky, M., Peters, K., Kirkpatrick, C.J., Pompe, W.:

Studies on *in vitro*-Angiogenesis on Resorbable Calcium Phosphate Bone Cements,

ELSO (European Life Science Organisation) Jahrestagung, September **2003** in Dresden.

Pompe, T., Kobe, F., Salchert, K., Oswald, J., Jørgensen, B., Werner, C.:

Binding Strength of Fibronectin to Polymer Substrates Controls the Initial Phase of Endothelial Cell Adhesion.

1st Max-Bergmann-Symposium, Dresden, 06.02.03 - 07.02.03

Oswald, J., Boxberger, S., Jørgensen, B., Feldmann, S., Salchert, K., Pompe, T., Ehninger, G., Werner, C., Bornhäuser, M.:

Differentiation of MSCs into Endothelial Progenitor Cells.

9th Annual Meeting of the International Society of Cytotherapy, Phoenix AZ, 29.05.2003-01.06.2003

Schmaljohann, D., Gramm, S., Zschoche, S., Oswald, J., Pompe, T., Werner, C.:

Novel Hydrogels with Thermo-Reversible Properties Based on Poly(*N*-alkylacrylamide).

1st Max-Bergmann-Symposium, Dresden, 06.02.03 - 07.02.03

Wolf, C., Hanke, T., Scharnweber, D., Peters, K., Kirkpatrick, C. J., Worch, H.:
Influence of Artificial extracellular matrices on Ti6Al4V implants on Binding and release of VEGF,
IBI (Interface Biology of Implants) Mai 2003 in Rostock-Warnemünde.

Freund, D., Oswald, J., Feldmann, S., Boxberger, S., Ehninger, G., Bornhaeuser, M., Corbeil, D.:
Comparative Analysis of Enrichment Procedures Using CD34 versus CD133 Microbeads - The Impact
of Immunomagnetic Isolation on the Clonogenicity of Hematopoietic Stem Cells
European Life Science Organization (ELSO), Nizza, 4.-8.09.04

Osaki, T., Renner, L., Markowski, M., Werner, C.:
Fibronectin Adsorption onto Maleic Acid Copolymer Films Analyzed by Electrokinetic Experiments
Combined with Reflectometric Interference Spectroscopy and by Quartz Crystal Microbalance
Measurements
13th Ostwald Colloquium, Ludwigshafen, 14./15.10.2004

Osaki, T., Markowski, M., Werner, C.:
Fibronectin Adsorption onto Maleic Acid Copolymer Surfaces Analysed by Combined Determination of
Zeta Potential, Surface Conductivity and Optical Layer Thickness
International Electrokinetics Conference ELKIN 2004, Pittsburgh, USA, 13.06.-17.06.04

Pompe, T., Renner, L., Werner, C.:
Nanoscale Features of Fibronectin Fibrillogenesis on Polymer Scaffolds
Lausanne, TESI-ETES Meeting, 11.10.-13.10.2004

Pompe, T., Teese, M., Nitschke, M., Zimmermann, R., Renner, L., Mothes, G., Werner, C.:
Surface Modification of Polyhydroxalkanoate Films - Towards Polymer Scaffolds Supporting
Angiogenesis
Lausanne, TEST-ETES Meeting, 11.10.-13.10.2004

Salchert, K., Oswald, J., Jørgensen, B., Werner, C.:
Expansion and Migration of Hematopoietic Stem Cells on Bioartificial Substrates Reconstituted from
Collagen and Glycosaminoglycans
Lausanne, TESI-ETES Meeting, 11.10.-13.10.2004

Schluttig, B., Rauwolf, C., Werner, C.:
Computational Investigations of Structure-Property Relationships at Collagen
6th IPF Colloquium - Advanced Heterogeneous Polymer Materials, 18./19.11.2004

Stedel, C., Bornhäuser, M., Oswald, J., Joergensen, B, Salchert, K., Thiede, C., Ehninger, G.,
Werner, C.:

Fibrillar Collagen I as matrix for the ex vivo Expansion of Haematopoietic Stem Cells

Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO), Innsbruck, 3.-6.10.04

Lode, A., Wolf-Brandstetter, C., Bernhardt, A., Reinstorf, A., König, U., Pompe, W., Gelinsky, M.:

In vitro Studien zur VEGF-Freisetzung verschiedener Modifikationen eines Calciumphosphat-
Knochenzementes.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM), Oktober **2005** in Würzburg.

Schutzrechtsanmeldungen

Grombe, R., Gouzy, M.-F., Voit, B., Werner, C.:

Beschichtungssystem für Biomaterialien

10329296.4, 2003

Gouzy, M.-F., Werner, C., Sperling, C., Salchert, K., Steller, U., Voit, B., Böhme, F.:

Modulares Beschichtungssystem für Biomaterialien

DE 10330900.4, 2003

Körber, H., Steller, U., Werner, C.:

Vorrichtung zur Ex-vivo Zellvermehrung

DE 10244.859.0-41, 2002

Pompe, T., Markowski, M., Werner, C.:

Verfahren zur Vaskularisierung von künstlichen Zellkulturträgern

DE 10315930.4, 2006