

Aus dem GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH, Institut für
Polymerforschung, Teltow / Klinik für Chirurgie der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

In vitro Untersuchungen zur Wechselwirkung von Endothelzellen mit
Multiblock Copolymeren für Anwendungen als Implantatmaterial

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Claudia Weckwerth

aus Meißen

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. J.-P. Ritz
 2. Prof. Dr. med. A. Stier
 3. Priv.-Doz. Dr. med. habil. H. Bergert

Datum der Promotion: 16.05.2010

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis		Seite
1	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Polymere als Implantatwerkstoffe	2
1.1.1	Biomaterialien	2
1.1.2	Biokompatibilität	3
1.1.3	Herkömmliche Nahtmaterialien	4
1.1.4	Formgedächtnispolymere	5
1.2	Endothelzellen	7
1.2.1	Struktur und Funktion	7
1.2.2	Morphologie – Aktin-Zytoskelett	8
1.2.3	Rolle in inflammatorischen Prozessen	9
1.3	Endothelzellen und Biomaterialien	11
1.4	Ziele der Arbeit	12
2	<u>Material</u>	13
2.1	Polymere	13
2.1.1	Bioabbaubare Multiblock Copolymere	13
2.1.2	Referenzpolymere	17
2.2	Modelloberflächen	17
2.3	Zellen	17
2.3.1	HUVEC	17
2.3.2	Fibroblasten	17
2.4	Medien	17
2.5	Stammlösungen	18
2.6	Puffer	18
2.7	Eindeckmedium	18
2.8	Beschichtungsproteine	19
2.9	Wachstumsfaktoren	19
2.10	Antikörper	20
2.11	Phallotoxine	20
2.12	Chemikalien und Reagenzien	21
2.13	Verbrauchsmaterial	21
2.14	Geräte	22

3	<u>Methoden</u>	23
3.1	Zellkultur	23
3.2	Herstellung von Modelloberflächen	23
3.2.1	Herstellung hydrophober Oberflächen	23
3.2.2	Herstellung hydrophiler Oberflächen	24
3.3	Zytotoxizitätstest	24
3.4	Adhäsion und Proliferation auf unterschiedlichen Polymeren	25
3.4.1	Neubauer-Zählkammer	25
3.4.2	Zellzahlbestimmung mit CASY	25
3.5	MTT- und XTT-Test	26
3.6	LDH – Test	28
3.7	Vitalfärbung der Zellen mittels FDA – Methode	30
3.8	Immunfluoreszenz	31
3.9	Antikoagulante Wirkung von HUVEC mittels Prostacyclin – Assay	33
3.10	Datenbearbeitung	34
4	<u>Ergebnisse</u>	35
4.1	Zytotoxizität	35
4.2	Zelladhäsion und -proliferation	36
4.3	Viabilität von HUVEC	37
4.4	Bestimmung der LDH – Aktivität	39
4.5	Adhäsionsverhalten und Morphologie von Zellen	40
4.5.1	FDA – Färbung von Humanfibroblasten	40
4.5.2	FDA – Färbung von HUVEC	41
4.6	Morphologische Beurteilung des Aktin – Zytoskeletts von HUVEC	43
4.6.1	Immunfluoreszenz auf Glas	43
4.6.2	Immunfluoreszenz auf Modelloberflächen	44
4.6.3	Immunfluoreszenz auf proteinbeschichteten APS – Oberflächen	45
4.6.4	Immunfluoreszenz auf Multiblock Copolymeren und Polypropylen	47
4.7	Antikoagulante Wirkung von HUVEC	51
4.8	Dedifferenzierung von HUVEC (von Willebrand Faktor)	53

5	<u>Diskussion</u>	54
	HUVEC	56
	1. Führen die Materialien zu einem Zellschaden? Sind sie toxisch?	57
	2. Unterscheiden sich die Polymere hinsichtlich der Adhäsion und Proliferation von HUVEC?	58
	3. Wie muss der Zellumsatz von HUVEC auf den untersuchten Polymeren beurteilt werden?	60
	4. Werden Unterschiede in der Adhärenz und Morphologie der Zellen beobachtet?	61
	5. Wird die Funktionalität der Zellen auf den FG-Polymeren verändert?	63
	6. Welche Faktoren beeinflussen die Aktin-Zytoskelett-Organisation und fokale Adhäsionskontakte?	65
6	<u>Zusammenfassung</u>	69
	Abkürzungsverzeichnis	71
	Literaturverzeichnis	73
	Anhang	82
	Erklärung der Selbständigkeit	
	Danksagung	
	Curriculum vitae	
	Publikationen / wissenschaftliche Beiträge	

1 Einleitung

Um bei operativen Eingriffen eine regelrechte Wundheilung zu gewährleisten, sind viele Faktoren von essentieller Bedeutung. Zunächst müssen biokompatible Nahtmaterialien zum Einsatz kommen, die keinen Schaden an dem umliegenden Gewebe verursachen. Die Wunde muss durch die Nähte suffizient verschlossen werden, damit die Wundränder gut zusammenwachsen können. Die Naht darf allerdings nicht zu fest sein, um die Durchblutung des Wundgewebes nicht zu beeinträchtigen. Außerdem werden bioabbaubare Nahtmaterialien bevorzugt. Denn sie bieten die Möglichkeit, die Wundränder so lang wie nötig, aber nicht länger, zusammenzuhalten, ohne dass das Nahtmaterial entfernt werden muss oder die Gefahr von Nahtfisteln entsteht. Trotz Berücksichtigung der o. g. Anforderungen an Wundverschlussmaterialien kommt es derzeit bei dem Einsatz von herkömmlichen Nahtmaterialien (siehe 1.1.3) in der chirurgischen Praxis immer wieder zu einer beträchtlichen Anzahl an Nahtinsuffizienzen, die den Wundheilungsprozess verzögern. Anastomoseninsuffizienzen am unteren Gastrointestinaltrakt treten z. B. mit einer Häufigkeit von 1%-12% auf (Willis und Stumpf 2004). Deren Auftreten stellt dabei eine der schwerwiegendsten Komplikationen in der Chirurgie mit unverändert hoher Morbidität und Letalität dar (Stumpf et al. 2004). Diese Insuffizienzen sind durch viele Faktoren bestimmt (Willis und Stumpf 2004), werden aber u. a. auch durch die Festigkeit des Knotens beeinflusst. Eine zusätzliche Herausforderung stellt die eine immer größere Bedeutung gewinnende minimal invasive Chirurgie dar. Denn bei dieser Operationsform muss auf engstem Raum, Nahtmaterial in den Körper eingebracht und geknotet werden. Hier besteht v. a. die Schwierigkeit darin, die optimale Festigkeit des Nahtverschlusses unter eingeschränkter Sicht einzustellen.

Ein möglicher Lösungsansatz könnte in der Entwicklung von abbaubaren, intelligenten Nahtmaterialien aus Polymeren liegen. Aufgrund der Kombination aus Polymerarchitektur und ausgebildeter Morphologie, es handelt sich um Multiblock Copolymere mit einer phasensegregierten Struktur (siehe 1.1.4), ist es möglich, in dem Material nach Anwendung einer Programmierungstechnologie einen thermisch induzierten Formgedächtniseffekt zu erzielen. Auf diese Weise kann eine komplexe mechanische Umformung, das heißt das Verknoten des Nahtmaterials, automatisch durchgeführt werden, ohne dass eine raumgreifende Manipulation durch den Chirurgen notwendig wird. Dadurch sollten neben dem einfacheren Handling auch eine Straffung der Nähte und eine optimale Festigkeit der Knoten möglich sein, was v.a. im Hinblick auf eine mögliche Reduzierung von Nahtinsuffizienzen, eine kürzere Genesungszeit zur Folge hätte. Voraussetzung für den Einsatz der Formgedächtnismaterialien als Biomaterialien

(siehe 1.1.1) in der Praxis ist allerdings deren zuvor gesicherte Biokompatibilität (siehe 1.1.2). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Biokompatibilität an hand eines *in vitro* Modells zu überprüfen und die Formgedächtnismaterialien mit konventionellen Nahtmaterialien zu vergleichen. Zur Durchführung der Versuche wurden Zellen auf den verschiedenen Materialien kultiviert, um deren Wechselwirkungen mit den Nahtmaterialien beurteilen zu können. Hierfür wurden speziell Humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) (siehe 1.2.1-1.2.3) genutzt, weil gerade sie bei der Wundheilung und in der Interaktion mit Biomaterialien (siehe 1.3) eine sehr wichtige Rolle spielen. Zur Auswertung der Ergebnisse bzgl. der Biokompatibilität der getesteten Nahtmaterialien wurden einzelne Fragestellungen (siehe 1.4) entworfen, die mittels der aufgestellten Versuche beantwortet werden sollten.

1.1 Polymere als Implantatwerkstoffe

1.1.1 Biomaterialien

Materialien für den medizinischen Einsatz werden als Biomaterialien bezeichnet, wenn diese in zeitweiliger oder dauerhafter Wechselwirkung mit dem biologischen System zur Diagnostik, Behandlung, Unterstützung oder dem Ersatz von Geweben, Organen und Körperfunktionen dienen sollen (Williams 1986). Andere Definitionen beschränken sich auf die Aussage, dass Biomaterialien unbelebte Materialien repräsentieren, die in Wechselwirkung mit dem biologischen System treten (Black 1992). Eine etwas detailliertere Definition umschreibt den Begriff des Biomaterials als einen Werkstoff synthetischen, aber auch natürlichen Ursprungs, der in Kontakt mit Gewebe, Blut und Körperflüssigkeiten kommt oder für deren Lagerung dient oder für prothetische, therapeutische und diagnostische Anwendungen benutzt wird, ohne den Organismus oder dessen Komponenten zu schädigen (Bruck 1980).

Für eine spezifische Anwendung der Biomaterialien sind verschiedene Anforderungen, wie ausreichende mechanische Festigkeit und Korrosionsstabilität, notwendig. In der Medizin werden die aus technischen Anwendungen verfügbaren Materialklassen wie Metalle, Keramiken und Polymere eingesetzt. Dabei sind Polymere die am häufigsten verwendete Materialklasse in der Medizin. Auf Grund ihrer guten Verarbeitung, ihrer meist guten chemischen Beständigkeit und vor allem wegen ihres breiten Eigenschaftsspektrums bei einem i.A. relativ geringen Preis haben sie sehr vielfältige Anwendungen in der modernen Medizin gefunden. Nachteile von Polymeren bestehen in ihrer oft geringeren mechanischen Stabilität, die zur Deformation der daraus gefertigten Produkte führen kann, und bei längerer Anwendung im Organismus im unvermeidbaren Abbau durch Hydrolyse (Groth 2003).

1.1.2 Biokompatibilität

Während die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Biomaterialien über weite Bereiche gezielt steuerbar sind, kann eine Vorhersage der Wechselwirkungen mit den verschiedenen Komponenten des Organismus, wie Proteinen aus Blut und anderen Körperflüssigkeiten, sowie den Zellen aus Blut und Gewebe i.A. nicht gemacht werden. Diese werden überwiegend durch die Oberflächeneigenschaften der Materialien bestimmt, wobei weiterhin die Zeitdauer der Wechselwirkung, der Einsatzort, aber auch der physiologische Status des Patienten von Bedeutung sind (Klinkmann 1995). Die Verträglichkeit von Biomaterialien, die allgemein als Biokompatibilität bezeichnet wird, lässt sich dabei als die Reaktion des Empfängers auf den Kontakt mit dem körperfremden Material definieren. Biokompatibel bedeutet hierbei im weitesten Sinne, dass der Einsatz des Materials keine schädigenden Auswirkungen auf die Gesundheit des Empfängers haben darf (Williams 1986). Ein biokompatibles Material darf keinen negativen Einfluss auf die umgebenden Strukturen ausüben, so dass möglichst keine Veränderungen an Proteinen und Zellen nachgewiesen werden können, dass keine abnormale Entzündungsreaktion verursacht wird, dass allergische und immunologische Reaktionen ausbleiben und keine teratogene oder kanzerogene Wirkung auf den Organismus ausgeübt wird (Klinkmann et al. 1984). Dabei muss auch festgestellt werden, dass es keine Biokompatibilität an sich gibt, sondern diese i.A. für eine bestimmte Anwendung definiert werden muss (Wolf et al. 1988). Andere Kompatibilitätskriterien betreffen die Funktionalität der Biomaterialien bzw. daraus gefertigter Implantate, Vorrichtungen und Geräte (Park 1995). Dazu gehören der Anwendung genügende mechanische Eigenschaften, wie Elastizität, Steifheit, Stärke und Ermüdungsverhalten.

Die Testung der Biomaterialien folgt im Allgemeinen einem hierarchischen Prinzip, wobei zunächst deren physikalisch-chemische Eigenschaften bestimmt werden. Dazu gehören Eigenschaften, wie Zug- und Biegefestigkeiten, Korrosionsstabilität, Hydrolysebeständigkeit, etc. (Park 1995). Anschließend werden *in vitro* Untersuchungen mit Hilfe von Zellkultursystemen durchgeführt. Sie sollen eine Aussage über die Biokompatibilität erlauben. Dazu zählen eine Reihe von Parametern wie beispielsweise die Zellvitalität, Zelladhäsion, das Zellwachstum und der Zellstoffwechsel sowie die Stabilität spezifischer Zellfunktionen (Kirkpatrick und Mittermayer 1990). Nachdem erfolgreiche *in vitro* Untersuchungen durchgeführt wurden, können bestimmte tierexperimentelle Untersuchungen und nachfolgend erste klinische Tests vorgenommen werden (ISO 10993 1992 ff).

1.1.3 Herkömmliche Nahtmaterialien

Die Entwicklung von medizinischen Nahtmaterialien lässt sich weit zurückverfolgen. Ständig wird an der Verbesserung entscheidender Einsatzparameter gearbeitet. Dazu gehören quantifizierbare Werte für lineare Reißfestigkeit, Knotenreißfestigkeit, Knotenrutschfestigkeit und Quelfähigkeit sowie semiquantitative Aspekte wie Knotungskomfort, Handling, Gewebspassage, Sichtbarkeit u.a.m. (Nockemann 2001).

Beispiele für natürliche Materialien sind in Tabelle 1.1 aufgeführt. Katgut und Chromkalgut aus der Submukosa des Schafes oder der Subserosa des Rinderdarms waren lange Zeit die einzigen zur Verfügung stehenden resorbierbaren Fäden. Da die Resorption enzymatisch erfolgt, sind lokale Entzündungsreaktionen um das Fadenmaterial die Regel. Früher wurden auch Zwirn und Seide wegen ihrer angenehmen Knüpfeigenschaften genutzt. Heutzutage finden sie keine Verwendung mehr. Stahldraht als nichtresorbierbares Material kommt in Klammernahtgeräten und in der Unfallchirurgie zur Anwendung.

Tab. 1.1: Herkömmliche Fäden für die chirurgische Naht (Koslowski et al. 1999).

Quelle	Nahtmaterial	Resorptionszeit	Zerfallszeit	Verarbeitung
Organisch	Katgut	8-12 Tage	–	Monofil
	Chromkalgut	6-24 Tage	–	Monofil
	Zwirn/Seide	nicht resorbierbar	0,5-4 Jahre	Polyfil
Anorganisch	Stahl	nicht resorbierbar	kein Zerfall	Monofil

Einen Durchbruch bei den fortbestehenden Problemen mit natürlichen resorbierbaren Fäden brachte von etwa 1970 an die klinische Einführung synthetischer Materialien durch Fortschritte der organischen Polymerchemie auf der Basis verschiedener Grundsubstanzen (Nockemann 2001). Synthetische Fäden (Tab. 1.2) sind Polymerisationsprodukte, die entweder nicht resorbierbar sind oder sich durch Hydrolyse zersetzen und sich in gleichbleibender Qualität mit konstanten und definierten physikalischen Eigenschaften, vor allem in Bezug auf Reiß- und Knotenfestigkeit, herstellen lassen. Seit es synthetische resorbierbare Fäden mit unterschiedlicher, dem jeweiligen Zweck angepasster Haltbarkeit gibt, die im Gegensatz zu den organischen resorbierbaren Materialien (Kalgut) keine relevanten lokalen Entzündungsreaktionen induzieren, verlieren nicht resorbierbare Fäden, die als bleibende Fremdkörper Fadenfisteln verursachen und bakterielle Infekte unterhalten können, an Bedeutung.

Tab. 1.2: Synthetische Fäden für die chirurgische Naht (Koslowski et al. 1999).

	schnell resorbierbar (Reißkraftverlust: 7-21 Tage)	langsam resorbierbar (Reißkraftverlust: 14-70 Tage)	nicht resorbierbar, Zerfall nach 1-4 Jahren	nicht resorbierbar, kaum Zerfall, kaum Gewebe- reaktion
Monofil	Poliglecapon: * Monocryl [®]	Polydioxanon: * PDS [®] Polyglycolsäure: * Maxon [®]	Polyamide: * Dafilon [®] * Dermalon [®] * Ethilon [®] * Seralon [®]	Polyester: * Novafil [®] * Miralene [®] * Surgilene [®] * Prolene [®]
Pseudo- monofil oder Beschichtet	Polyglycolsäure: * Dexon II [®] * Dexon R [®] Polyglactin: * Vicryl [®] * Vicryl rapid [®]		Polyamide: * Supramid [®] * Suturamid [®]	Polyester: * Cardiofil [®] * Synthofil [®] * Ethibond [®]
Geflochten	Polyglycolsäure: * Dexon [®]			Polyester: * Dagrofil [®] * Mersilene [®]

1.1.4 Formgedächtnispolymere

Da es trotz synthetischer Fäden in der chirurgischen Praxis immer noch einen nicht unerheblichen Prozentsatz an Nahtinsuffizienzen gibt und gerade bei kleinen Operationsflächen die Materialien auf engem Raum schwer eingebracht und geknotet werden können, ist der Bedarf an der Weiterentwicklung verbesserter Materialien sehr groß. Dabei wird zur Optimierung von Wundverschlüssen der Einsatz biodegradierbarer Materialien angestrebt, die im physiologischen Milieu des Körpers hydrolytisch abgebaut werden und somit nicht in einer Folgeoperation entfernt werden müssen (Lendlein und Langer 2002, Lendlein et al. 2001). Durch Formgedächtnis (FG)-Polymere können zusätzlich verschiedene Eigenschaften, wie mechanische Eigenschaften, Abbaurate und Abbauverhalten sowie Biokompatibilität (siehe 1.1.2) und Funktionalität, spezifisch und individuell kombiniert werden.

FG-Polymere sind „stimuli-sensitive“ Materialien. Nach Anwendung eines externen Stimulus besitzen sie die Fähigkeit, ihre Form zu ändern (Lendlein und Kelch 2005). Als strukturelles Konzept für thermoplastische FG-Kunststoffe wurden lineare Multiblock Copolymere ausgewählt, die mittels Co-Kondensation zweier verschiedener Makrodiole mit einem aliphatischen Diisocyanat synthetisiert wurden. Die thermoplastischen Elastomere zeigen zwei unterschiedliche separate Phasen. Die Phase, die die höhere Übergangstemperatur T_{perm} besitzt,

agiert als physischer Vernetzer (Hartsegment) und ist für die permanente Form verantwortlich. Oberhalb T_{perm} schmilzt das Polymer und kann durch konventionelle Prozess-Techniken wie Extrusion oder Spritzguss verformt werden. Eine zweite, das Schaltsegment bildende Phase fungiert als molekularer Schalter mit einer niedrigeren Übergangstemperatur T_{trans} . Sie ermöglicht die Fixierung der temporären Form und gewährleistet bei $T > T_{trans}$ die Rückstellung der permanenten Form.

Die mechanischen Eigenschaften dieser Polymere werden dabei über den Gewichtsanteil an kristallisierbarem Hartsegment eingestellt. Die Einstellung der Abbaugeschwindigkeit erfolgt über die Anzahl und die Verteilung leicht hydrolysierbarer Esterbindungen in den Blöcken der Polymerketten. Die Schaltsegmente sind für die Dehnungs-Rückstellung verantwortlich (Lendlein und Kelch 2005). Indem man das Verhältnis der beiden Komponenten, Hartsegment- und Schaltsegment bildende Phasen, oder das Molekulargewicht der als Makrodiole eingesetzten Polymerblöcke verändert, lassen sich die mechanischen Eigenschaften, die Übergangstemperatur und die Geschwindigkeit des hydrolytischen Abbaus im Körper gezielt einstellen.

Der FG-Effekt ist keine spezifische Materialeigenschaft eines einzelnen Polymers. Er resultiert eher aus einer Kombination von Polymerstrukturen bzw. der Polymer-Morphologie zusammen mit der applizierten Prozess- und Programmierungstechnologie (Lendlein und Kelch 2005). Der Prozess der Programmierung und Wiederherstellung einer Form ist schematisch in der Abbildung 1.1 gezeigt (Lendlein und Kelch 2002).

Ein-Wege-Formgedächtniseffekt

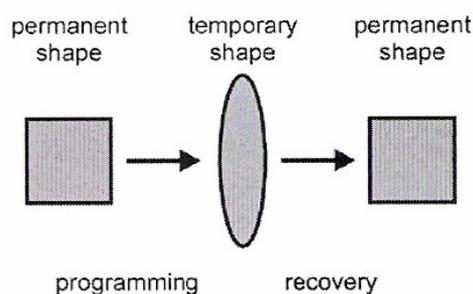


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des thermisch induzierten Ein-Wege-Formgedächtniseffekts. Durch den Programmierungsprozess wird die permanente Form in die temporäre Form umgewandelt. Erwärmen der Proben auf eine Temperatur über der Schalttemperatur T_{trans} resultiert in der Wiederherstellung der permanenten Form (Lendlein und Kelch 2002).

1.2 Endothelzellen

1.2.1 Struktur und Funktion

Endothelzellen (EC) sind vom Mesoderm abstammende Zellen, die Blutgefäße auskleiden und dadurch in engem Kontakt mit Blut stehen (Jaffe et al. 1973). Man schätzt, dass die ca. 1,2 Trillionen EC in einem durchschnittlichen erwachsenen Menschen eine Gefäßwand von etwa 400 m² auskleiden (Anggard 1990). Erste bahnbrechende Versuche, EC zu isolieren, gelang Lewis 1922. Ein großer Durchbruch in der EC-Isolierung wurde durch Jaffe et al. (1973) und Gimbrone et al. (1974) erreicht. Ihnen gelang es, isolierte EC in Kulturen zu bewahren, zu passagieren und eine Charakterisierung vorzunehmen.

Eigenschaften

Das Endothelium stellt nicht nur eine passive Struktur zum Umschließen von Blut oder Plasma dar, es handelt sich vielmehr um ein reaktionsfreudiges, metabolisch aktives Gewebe (Ziats und Anderson 1993). EC nehmen an zahlreichen Vorgängen im Körper, z.B. an der Blutstillung, Fibrinolyse, Inflammation, Wundheilung, Gefäßtonusregulierung und Angiogenese teil (Gimbrone 1986, Anggard 1990, Fajardo 1989, Pearson 1991).

EC können durch Tight junctions, der Präsenz von Faktor VIII-Antigen (Faktor VIII/von Willebrand Faktor), Weibel-Palade Körper oder Zytoskelettproteine identifiziert werden.

Sie produzieren eine Anzahl an einzigartigen zellspezifischen Charakteristika, die diesen Zelltyp definieren. Primäre EC bilden z.B. eine große Menge an von Willebrand Faktor (vWF) (Jaffe et al. 1974), platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1, CD 31) (Albelda et al. 1990), ebenso wie vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF) (Hewett und Murray 1996, Thomas 1996). Von besonderer Wichtigkeit sind spezielle Moleküle, die sich auf der EC-Oberfläche befinden bzw. von ihr abgesondert werden, sogenannte Zelloberflächenmoleküle (Ziats und Anderson 1993).

Die Bedeutung des Endotheliums als effizienteste antithrombotische Oberfläche hängt von der Produktion einer Vielzahl von Faktoren ab, die entweder als Antikoagulantien oder als Organisatoren für die Fibrinolyse agieren (Matsuda 1989). Zu den antithrombotischen Faktoren gehören Prostacyclin (PGI₂), das den Gefäßspasmus reduzierende Nitritoxid (NO), Thrombomodulin, Heparansulfat-Proteoglykane sowie tissue plasminogen activator (t-PA) und urokinase type plasminogen activator (u-PA). Obwohl unter physiologischen Bedingungen die antithrombotische Aktivität der EC vorherrscht, kann die prothrombotische schnell, z.B. durch Gewebsverletzung, proinflammatorische Zytokine und bakterielle Toxine aktiviert werden (Nawroth et al. 1986).

Typen

Zwischen den einzelnen Arten der EC gibt es, z.B. im Hinblick auf phänotypische Merkmale, große Unterschiede, die von der Gefäßlage oder dem Organ abhängen, in dem sie sich befinden (Lelkes 1991, Kumar et al. 1987, Wagner et al. 1988).

Isolierte humane EC erfordern für die Kultivierung Oberflächenbeschichtungen mit Proteinen (Fibronectin, Collagen, Gelatin, geronnenes Blut), zusätzlich exogene Wachstumsfaktoren (endothelial cell growth factor (ECGF), acidic FGF), Heparin und einen hohen Serumgehalt, um sie für eine lange Zeitperiode zu erhalten und zu passagieren (Tab. 1.3).

Tab. 1.3: Endothelzellen in Kultur (Ziats und Anderson 1993).

Endothelzell-Typ	Kulturoberfläche	Wachstumsfaktoren	Serumgehalt	Begrenzung der Passage
Menschliche Arterien, Venen	Collagen 1 Fibronectin, Laminin	ECGF, Heparin	hoch	3-4
Speziell: HUVEC (venös)	Fibronectin, Collagen	ECGF, Heparin	hoch	3-5
Menschliche Kapillaren	Fibronectin, Gelatin Geronnenes Blut	ECGF, Heparin	hoch	3-6
Rinder-Aorta	keine	keine	niedrig, serumfrei	12-20
Hund, Schaf, Schwein	keine, Fibronectin Geronnenes Blut	keine, ECGF Heparin	verschieden	3-7

1.2.2 Morphologie – Aktin-Zytoskelett

Zu den Zelloberflächenmolekülen gehören die Zelladhäsionsmoleküle (z.B. Integrine, Cadherine), die sogenannte Transmembranproteine sind. Durch ihren Cytoplasmateil binden diese an Zytoskelett- und Signalproteine und erlauben somit die Verankerung der Adhäsionsproteine an Aktinmikrofilamente und den Transfer von intrazellulären Signalen (Matter und Balda 2003, Braga 2002, Wheelock und Johnson 2003, Bazzoni et al. 1999).

Die Formation und Aufrechterhaltung der Aktin-Bündel, auch als Stressfasern bezeichnet, wird durch spezielle Aktin-Regulatorproteine kontrolliert (Petit und Thiery 2000).

Die Zusammenarbeit der Adhäsionsproteine, die die Zell-Zell-Kontakte (junctions) vermitteln, mit Aktin ist nicht nur für die Stabilisierung der Zelle, sondern auch für das Öffnen und Schließen der Junctions erforderlich. Sie besitzt außerdem eine bedeutsame Relevanz für Zellform und -polarität (Stevens et al. 2000, Dudek und Garcia 2001, Sheldon et al. 1993, Lampugnani et al. 2002) und kann einen Wechsel in der Zytoskelett-Organisation herbeiführen.

Diese Wechsel werden von Aktinfilamentumformungen und einer ansteigenden Anzahl an Vinculin-positiven fokalen Kontakten begleitet (Dejana 2004).

Während sich EC im intakten Organismus durch eine typische „Pflasterstein“-Morphologie mit einem Epitheloidphänotyp auszeichnen (Dejana 2004), in ihrem Wachstum gehemmt und vor Apoptose geschützt werden (Fagotto und Gumbiner 1996, Vinals und Pouyssegur 1999), herrscht bei einer geringen Zellanzahl oder defekten Junctions eine fibroblastoide, mesenchymale Morphologie vor (Dejana 2004).

1.2.3 Rolle in inflammatorischen Prozessen

Implantation stellt ein Gewebetrauma dar, das eine inflammatorische Antwort, gekoppelt an Wundheilungsprozesse, Angiogenese, Fibroblastenaktivierung und Matrix-Umgestaltung, bewirkt (Kirkpatrick et al. 2002). Das Immunsystem besitzt bei der Wundheilung eine zentrale Bedeutung. Immunkompetente Zellen interagieren mit den mesenchymalen Zellen des neuen Granulationsgewebes und steuern so ein komplexes Netzwerk aus Zellen, Extrazellulärmatrix (ECM) und zellulären Mediatoren.

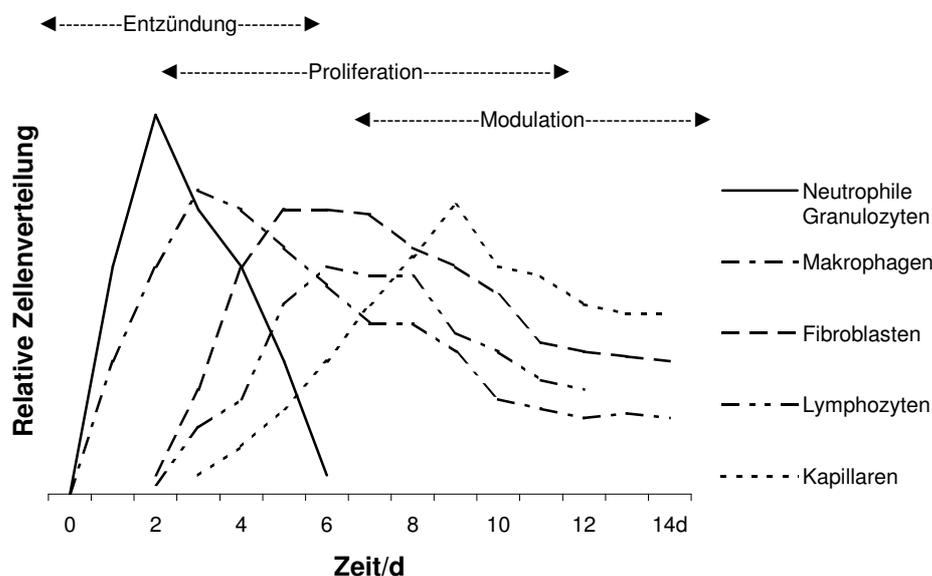


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der relativen Verteilung verschiedener Zelltypen im Verlauf der Wundheilung (modifiziert nach Schäffer und Becker 2000).

Die Wundheilung kann in drei sich überlappende Phasen eingeteilt werden (Abb. 1.2): Entzündung, Proliferation und Modulation (Schäffer und Becker 2000), wobei die beiden letztgenannten zur Reparatur zusammengefasst werden können (Slavin 1996).

- Entzündungsphase

Die Aktivierung der Gerinnungs- und Komplementkaskade sowie die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (z.B. Interleukine, Interferone, Tumornekrose Faktor) aus Thrombozyten stehen am Anfang der Entzündungsphase. Neutrophile Granulozyten sind die ersten Zellen, die aktiv in die Wunde einwandern (Schäffer und Becker 2000) und schnell eine maximale Zelldichte erreichen (Lendlein 1999). Wundmakrophagen erscheinen ab dem 2. Tag in der Wunde, Lymphozyten in signifikanten Zahlen um den 5. Tag (Schäffer und Becker 2000).

- Reparatur

Regenerative Prozesse haben die Absicht, das betroffene Gewebe in einen Zustand geringer Entropie zu bringen, bevorzugt ohne permanenten Schaden (= restitutio ad integrum). Das involviert die Regeneration von verletzten Zellpopulationen und die Angiogenese (Vernon und Sage 1995), Matrix-Neusynthese und Umgestaltung (Raghow 1994), ebenso wie Reduktion von sich regenerierenden Zellpopulationen durch programmierten Zelltod (Apoptose) (Desmoulière et al. 1995, Dimmeler und Zeiher 2000).

- Proliferationsphase

Die Infiltration der Wunde mit Entzündungszellen überschneidet sich mit der Proliferationsphase die durch die Bildung des Granulationsgewebes gekennzeichnet ist. Granulationsgewebe besteht aus einem losen Netzwerk ECM bildender Fibroblasten, Entzündungszellen und EC. Mit der Abnahme von Entzündungszellen in der Wunde werden Wachstumsmediatoren zunehmend von anderen Zellen, wie Fibroblasten, EC und Keratinozyten synthetisiert. EC produzieren z.B. transforming growth factor β (TGF- β), bFGF, PDGF, VEGF. Die Bildung neuer Gefäße durch einwandernde EC steht unter dem Einfluss lokaler Faktoren, wie Hypoxie und Laktat, und wird durch ein komplexes Zusammenspiel Angiogenese stimulierender (z.B. VEGF oder FGF) und hemmender (z.B. Angiostatin) Faktoren reguliert (Schäffer und Becker 2000).

- Wundmodulation

Die Phase der Wundmodulation, die bis zu einem Jahr dauert, beginnt um den 7. Tag und umfasst die Strukturierung der ECM. Anfangs werden Fibrin, später auch das von aktivierten Makrophagen gebildete Fibronectin und Thrombospondin-1 sowie andere (Glyco-) Proteine, nach und nach durch Kollagen ersetzt (Schäffer und Becker 2000).

1.3 Endothelzellen und Biomaterialien

Interaktionen

Werden Biomaterialien bei Implantation in Kontakt mit dem Gewebe gebracht, kommt es zunächst zur Adsorption von Proteinen. Dies ist auf die Blutung, die durch den chirurgischen Eingriff entsteht, zurückführbar. Neben den Blutproteinen können auch die verschiedenen Blutzellen auf dem Material adhären. Mit diesem Vorgang wird eine akute Entzündungsreaktion eingeleitet, die bei ungenügender Biokompatibilität des Materials zu einer chronischen Entzündung führen kann (Clark 1997). Die Adsorption von Proteinen und deren damit einhergehenden Konformationsänderungen sind auch Ursache dafür, dass Biomaterialien *in vivo* als fremd erkannt werden (McNally und Anderson 1994; Falck 1994, Kao et al. 1999).

Der Einfluss der Oberflächen auf die Zusammensetzung und Konformation der adsorbierten Proteine und die nachfolgende Wechselwirkung mit Zellen ist für die Aussage über die Einsatzmöglichkeiten des Materials von besonderem Interesse (Groth 2003).

Adhäsionsfördernde Proteine

Die Adhäsion von EC auf verschiedenen Materialien kann durch spezielle Proteine, die sich normalerweise in der ECM von Gewebe oder im Blut befinden, verbessert werden. Diese ECM-Proteine ermöglichen eine interstitielle Gewebsverbindung bzw. bilden eine Basalmembran und bestehen aus einer Mischung von Collagenen, Glycoproteinen und Proteoglycanen (Ruoslahti et al. 1985). Das meist studierte Protein ist Fibronectin, ein Glycoprotein (MG = 440.000), das in der ECM und im Blutplasma vorkommt oder von EC sezerniert wird. Eine wichtige Domäne dieses Proteins enthält eine spezielle Sequenz von Aminosäuren, Arginin-Glycin-Asparaginsäure (ARG-GLY-ASP oder RGD). Diese einzelne Sequenz von Aminosäuren ist dafür bekannt, mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche, sogenannten Integrinen, zu interagieren. Integrine (vgl. 1.2.2) sind die Hauptrezeptoren, durch die die Zellen an der ECM oder anderen Oberflächen anhaften (Hynes 1992). Proteine, die diese RGD Sequenz aufweisen, sind in Tabelle 1.4 aufgelistet. Der Nutzen dieser Proteine ist sowohl allein als auch in Kombination zur Oberflächenbeschichtung und zur Förderung der EC-Adhäsion auf Biomaterialien sehr groß.

Tab. 1.4: Adhäsionsproteine mit einer ARG-GLY-ASP (RGD) Sequenz (Ziats und Anderson 1993).

Fibronectin	Fibrinogen	Vitronectin	von Willebrand factor
Laminin	Thrombospondin	Collagen	Tenascin

1.4 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die bioabbaubaren Nahtmaterialien mit FG-Effekt in ihrer Biokompatibilität mit den etablierten Nahtmaterialien wie Polypropylen vergleichbar bzw. ihnen überlegen sind. Zur genaueren Charakterisierung der Biokompatibilität sollten folgende Fragen beantwortet werden:

Führen die Materialien zu einem Zellschaden? Sind sie toxisch?

Unterscheiden sich die Polymere hinsichtlich der Adhäsion und Proliferation von HUVEC?

Wie muss der Zellumsatz von HUVEC auf den untersuchten Polymeren beurteilt werden?

Werden Unterschiede in der Adhärenz und Morphologie der Zellen beobachtet?

Wird die Funktionalität der Zellen auf den FG-Polymeren verändert?

Welche Faktoren beeinflussen die Aktin-Zytoskelett-Organisation und fokale Adhäsionskontakte?

2 Material

2.1 Polymere

2.1.1 Bioabbaubare Multiblock Copolymere

Die Kultivierung der untersuchten Zelltypen erfolgte auf Multiblock Copolymeren, die sich aus kombinierbaren Einzelkomponenten (Makrodiolen) zusammensetzen. Es wurden Diole von Poly(p-dioxanon) (PPDO), Poly(ϵ -caprolacton) (PCL) und Poly(alkylenglycoladipinat) (Diorez750) verwendet.

Die Polymere PPDO/PCL 40/60 und 50/50 zeigen bei entsprechender Programmierung im Bereich der Körpertemperatur einen Formgedächtniseffekt. PPDO/Diorez ist ein Multiblock Copolymer ohne FG-Effekt.

Die hier verwendeten Polymere wurden im August 2003 im Institut für Polymerforschung des GKSS-Forschungszentrums in Teltow hergestellt und charakterisiert (Tab. 2.1 und Tab. 2.2). Die Polymere wurden zu Scheiben mit einem Durchmesser von 13 mm und einer Dicke von 0,5 mm geformt und mit Ethylenoxid sterilisiert.

Tab. 2.1: Materialcharakteristik der verwendeten Polymere (K: Molgewicht der Makrodiolen in kDalton).

Polymer	Zusammensetzung		Zusammensetzung [Masse-%]	Gewichtsmittel der Molmasse M_w [g/mol]	Zahlenmittel der Molmasse M_n [g/mol]	Uneinheitlichkeit $D = M_w/M_n$
	Hartsegment	Schaltsegment				
I	PPDO	PCL	40/60	92.000	28.000	3,3
II	PPDO (5,9K)	PCL (2K)	50/50	181.000	60.000	3,0
III	PPDO (5,9K)	Diorez750 (1,85K)	50/50	167.000	50.000	3,4

Tab. 2.2: Zug-Dehnungs-Prüfung (E-Modul: Elastizitätsmodul).

Polymer	Zusammensetzung		Prüftemperatur T [°C]	maximale Dehnung bei F_{max} ϵ_M [%]	Reißkraft		E-Modul [MPa]
	Hartsegment	Schaltsegment			F_{max} [N]	σ_M [MPa]	
I	PPDO	PCL	22	724		13	77
II	PPDO (5,9K)	PCL (2K)	20	710	22,3	15	22
			37	570	11,5	8	15
III	PPDO (5,9K)	Diorez750 (1,85K)	20	685	17,7	10	13
			37	187	14,8	7	12

Die angewendeten FG-Polymere PPDO/PCL 40/60 und 50/50 sind lineare Multiblock Copolymere, die ein kristallisierbares Hartsegment (T_{perm}) basierend auf Poly(p-dioxanon)diol **1** (Abb. 2.1) und ein Schaltsegment (T_{trans}) basierend auf kristallisierbarem Poly(ϵ -caprolacton)diol **2** besitzen. Die thermoplastischen Elastomere wurden durch eine Co-Kondensation der verschiedenen Makrodiolen durch Kupplung mit einem Isomerengemisch von 2,2(4),4-Trimethylhexandiisocyanat **3** synthetisiert. Die molekularen Parameter, die das Polymersystem bestimmen, sind das Molekulargewicht der Makromonomerblöcke, die Mikrostruktur (Sequenz) der Blöcke und das Comonomer-Verhältnis der Makrodiolen.

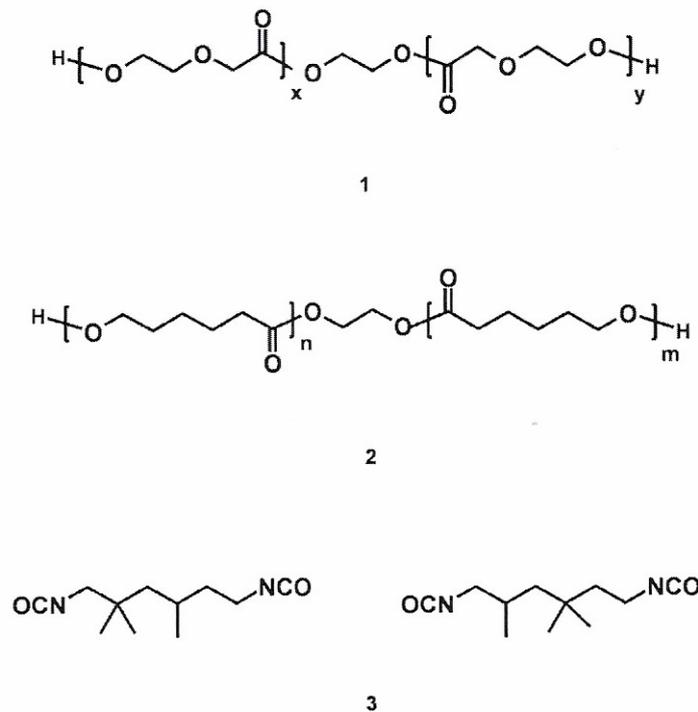


Abb. 2.1: Komponenten der Multiblock Copolymere: Poly(p-dioxanon)diol **1**, Poly(ϵ -caprolacton)diol **2**, 2,2(4),4-Trimethylhexandiisocyanat **3** (Lendlein und Kelch 2005).

Die Oberflächenrauigkeiten der verwendeten Multiblock Copolymere und des Referenzmaterials sind in Abb. 2.2 und Abb. 2.3 gezeigt. Polypropylen als Referenzmaterial weist dabei die geringste Oberflächenrauigkeit auf, PPDO/Diorez 50/50 die höchsten Werte.

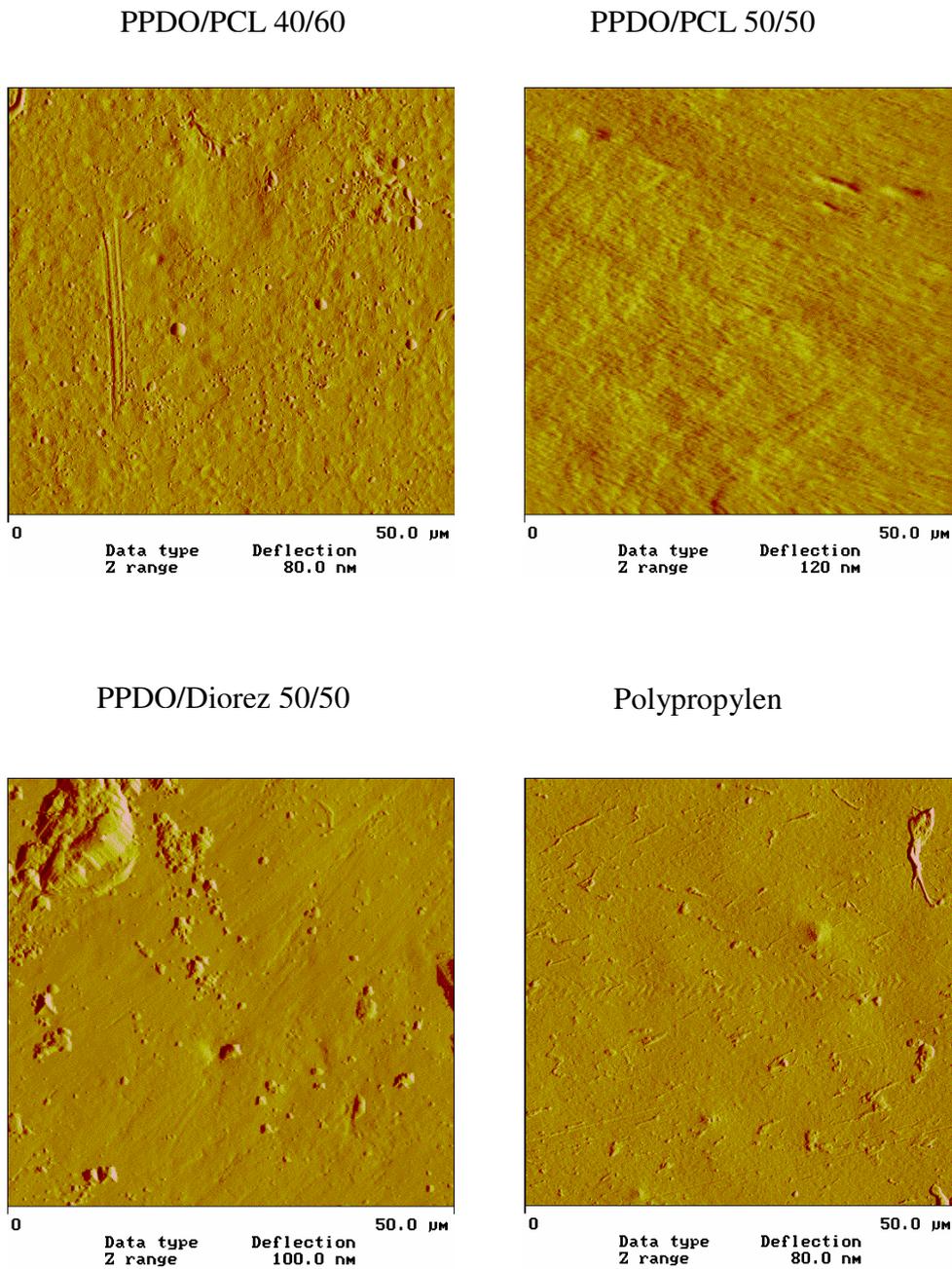


Abb. 2.2: Raster-Kraft-mikroskopische Aufnahmen der Oberflächen der verwendeten Polymere, Rastermaß 50 μm .

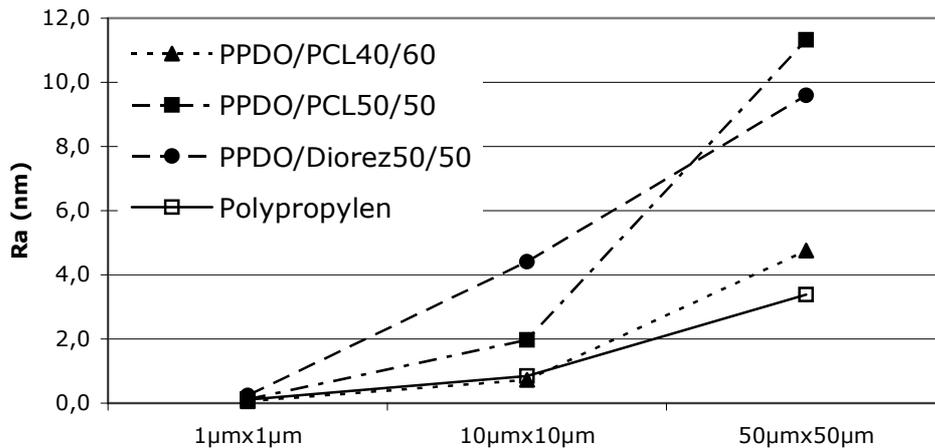


Abb. 2.3: Graphische Darstellung der Oberflächenrauigkeit Ra in nm der verwendeten Polymere.

Die Multiblock Copolymere weisen eine eher hydrophobe Oberflächencharakteristik auf mit benetzenden (advancing) Kontaktwinkeln um 72° für PPDO/PCL und 88° für PPDO/Diorez. PP liegt mit etwa 83° dazwischen (Tab. 2.3). Die hohe Differenz zwischen be- und entnetzendem (receding) Kontaktwinkel bei PPDO/Diorez 50/50 spricht für eine hohe Oberflächeninhomogenität bzw. -rauigkeit.

Tab. 2.3: Kontaktwinkel der verwendeten Polymere.

Polymer	Kontaktwinkel [°]	
	advancing	receding
PPDO/PCL 40/60	$72,2 \pm 3,5$	$37,5 \pm 3,2$
PPDO/PCL 50/50	$72,4 \pm 1,4$	$36,0 \pm 4,4$
PPDO/Diorez 50/50	$88,3 \pm 3,4$	$29,2 \pm 2,5$
Polypropylen	$82,6 \pm 2,7$	$47,5 \pm 2,5$

2.1.2 Referenzpolymere

Als Referenzpolymere kamen die nicht-resorbierbaren Materialien Polystyrol der Zellkulturplatte (TCP) und Polypropylen (PP) zum Einsatz. PP hat sich bereits seit langem in der Chirurgie als Nahtmaterial etabliert. Es wurden Scheiben aus Polypropylenfolie ausgestanzt und vor der Verwendung in 70% Ethanol sterilisiert.

2.2 Modelloberflächen

Als spezielle Modell-Oberflächen für den Einfluss von adsorbierten Proteinen auf EC wurden Deckgläser silanisiert (siehe 3.2), die anschließend mit Fibrinogen, Fibronectin und Collagen beschichtet wurden.

2.3 Zellen

2.3.1 HUVEC

Für die Biokompatibilitätsversuche wurden humane venöse Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) zwischen der dritten und achten Passage benutzt. Die Zellen wurden von der Firma oligene GmbH, Berlin, bezogen. Die Kultivierung erfolgte in einem spezifischen Endothelzellmedium (siehe 2.4).

2.3.2 Fibroblasten

Humane Fibroblasten wurden von der Firma oligene GmbH, Berlin, genutzt. Für die Versuche kamen Zellen der elften Passage zum Einsatz. Die Kultivierung erfolgte in Fibroblastenmedium (siehe 2.4). Für Zytotoxizitätsuntersuchungen entsprechend ISO-10993-5 wurden 3T3 Mausfibroblasten von der Firma Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, verwendet.

2.4 Medien

Endothelzellmedium

oligene GmbH, Berlin

Kat.-Nr.: 201 0101

Fibroblastenmedium

DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)

Biochrom AG, Berlin

1% AAS (Antibiotic-Antimycotic Solution)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

1% HEPES-Puffer

Biochrom AG, Berlin

(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure)

Einfriermedium

DMEM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
+ 10% FKS (Fötales Kälber Serum)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
+ 10% DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
+ 0,1% sterile Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
+ 1% AAS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.5 Stammlösungen

Trypsin/EDTA-Lösung

0,25% Trypsin/0,02% EDTA in PBS, Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , 37°C pH 7,4	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
--	--------------------------------------

Piranha-Lösung

H ₂ SO ₄	MERCK KgaA, Darmstadt
30% H ₂ O ₂	MERCK KgaA, Darmstadt
H ₂ SO ₄ : 30% H ₂ O ₂ = 3:1	

2.6 Puffer

1x PBS (Phosphate Buffered Saline)

150 mM NaCl (8,766 g/l)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
5,8 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (0,8003 g/l)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
5,8 mM Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (2,077 g/l)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
pH 7,4	

2.7 Eindeckmedium

Mowiol

Puffer für Mowiol

0,14 M NaCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
0,01 M KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Verhältnis KH ₂ : Na ₂ H (27,4:72,6) nach Sörensen auf pH 7,2 eingestellt	

20 g Mowiol 4.88 wurden in 80 ml hergestellten Puffer gelöst und für 16 Stunden gerührt. Nach der Zugabe von 40 ml Glycerol wurde diese Lösung nochmals für 16 Stunden gemischt und anschließend bei 12.000 U/min für 15 min zentrifugiert. Nach dem Dekantieren der Lösung soll der pH-Wert zwischen 6 und 7 liegen. Das Eindeckmedium lagerte luftdicht verschlossen bei 4°C.

2.8 Beschichtungsproteine

Zur Adhäsionsoptimierung von HUVEC wurden die Polymere (siehe 2.1) und die Modelloberflächen (siehe 2.2) mit verschiedenen Proteinen beschichtet.

Tab. 2.4: Proteine.

Protein	Hersteller	Katalognummer
Humanes Fibronectin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	F 2006
bovines Fibrinogen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	F 8630
Collagen Typ I calf skin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	C 9791

2.9 Wachstumsfaktoren

Tab. 2.5: Wachstumsfaktoren.

Faktor	Hersteller	Katalognummer
Humanes Interleukin 1 beta Humanes Interleukin 1 F2	R&D Systems, Minneapolis, USA	DY201
Humaner TNF alpha/TNFSF1A	R&D Systems, Minneapolis, USA	DY210
Humaner TNF alpha	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	T 6674

2.10 Antikörper

Tab. 2.6: Primärantikörper.

Antigen	Identität	Hersteller	Katalognummer
Vinculin	Maus-anti-Human Clone h Vin-1, monoklonal	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	V-9131
Von Willebrand Faktor	Kaninchen-anti-Human polyklonal	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark	A-0082

Tab. 2.7: Fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper.

Identität	Hersteller	Katalognummer
Ziege-anti-Maus-IgG-Cy3	Dianova, Hamburg	115-165-062
Ziege-anti-Maus-IgG-Cy2	Jackson Immuno Research, Baltimore, USA	115-225-062
Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Cy2	Dianova, Hamburg	111-225-045

2.11 Phallotoxine

Tab. 2.8: Direktnachweis von F-Aktin.

Spezifität	Konjugat	Hersteller	Katalognummer
F-Aktin	BODIPY 558/568 - Phalloidin	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	B-3475

2.12 Chemikalien und Reagenzien

APS (3-Aminopropyltriethoxy-Silan)	Fluka Chemie AG, Buchs
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
ODS (Dimethyloctadecylchlorsilan)	Fluka Chemie AG, Buchs
Essigsäure	MERCK KgaA, Darmstadt
Ethanol	MERCK KgaA, Darmstadt
Fluoreszeindiacetat (FDA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerol	MERCK KgaA, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hexan	MERCK KgaA, Darmstadt
Mowiol 4.88	Polysciences Inc., Warrington, PA, USA
MTT-Salz	SERVA Electrophoresis GmbH & Co. KG, Heidelberg
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Propanol	MERCK KgaA, Darmstadt
Prostacyclin-Elisa-Kit	Amersham, England
Schwefelsäure	MERCK KgaA, Darmstadt
Triton X-100	MERCK KgaA, Darmstadt
Tween 20	MERCK Schuchardt KgaA, Hohenbrunn
Wasserstoffperoxid	MERCK KgaA, Darmstadt
XTT Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.13 Verbrauchsmaterial

Deckgläser	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Objektträger	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago
Pipettenspitzen (Standardtips)	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße (Tubes)	Eppendorf AG, Hamburg
Zellkulturflaschen 75cm ²	TPP, Schweiz
Zellkulturplatten (12-, 24- und 96-Well-Platten)	TPP, Schweiz
Zentrifugenröhrchen	TPP, Schweiz

2.14 Geräte

Brutschrank Heraecell 240	Heraeus, Langenselbold
CASY Zellzählgerät	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Gefrierschrank	Heraeus, Langenselbold
Kontaktwinkelmessgerät G10/DSA10	KRUESS GmbH, Hamburg
Laser Scanning Mikroskop 510	Zeiss, Jena
Mikroskop, Axiovert 25	Zeiss, Jena
Neubauer-Zählkammer	Fein-Optik, Bad Blankenburg
Pipetten, μ l	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten, ml	TPP, Schweiz
Plattenspektralphotometer	TECAN SpectraFluor Plus, Crailsheim
Stickstofftank Espace 331	AIR LIQUID CRYOGENIE, Frankreich
Trockenschrank	Heraeus, Langenselbold
Waage	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	GFL®, Großburgwedel
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Langenselbold

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Die Kultivierung von HUVEC, Humanfibroblasten und 3T3 Mausfibroblasten erfolgte im Brutschrank bei konstanten Bedingungen (37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte). Für jeden Zelltyp wurde ein spezifisches Medium verwendet (siehe 2.4).

Konfluente Zellen wurden mit 0,25% Trypsin/0,02% EDTA abgelöst und passagiert. Anschließend wurde Trypsin mit fötalem Kälberserum neutralisiert.

Die Lagerung der Zellen erfolgte durch Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff. Die Zellen wurden vorher in ein spezielles Einfriermedium (siehe 2.4) überführt.

3.2 Herstellung von Modelloberflächen

Vor der Oberflächenbehandlung erfolgte die Reinigung der Deckgläschen. Dafür wurden die Deckgläser (Ø 12 mm) mit Piranha-Lösung (siehe 2.5) überschichtet und für 15 min inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Deckgläser bei 120°C für 120 min getrocknet.

Durch Randwinkelbestimmung mit dem Kontaktwinkelmessgerät G10/DSA10 wurde die Reinheit und Hydrophilität eingeschätzt. Nach Reinigung der Deckgläschen mit Piranha-Lösung sollte die Oberfläche stark hydrophil sein mit einem Kontaktwinkel annähernd 0° (Tab. 3.1, vgl. Tab. 2.3).

Tab. 3.1: Zusammenhang zwischen Kontaktwinkeln und Oberflächenenergien.

Kontaktwinkel	>100°	60-70°	0°
Oberflächenenergie	niedrig	mittel	hoch
Eigenschaft der Oberfläche	hydrophob		hydrophil

3.2.1 Herstellung hydrophober Oberflächen

Zur Herstellung hydrophober Oberflächen wurden die gereinigten Deckgläser mit Dimethyloctadecylchlorsilan (ODS) behandelt. Hierfür inkubierten die Deckgläser für eine Stunde in 2% (v/v) ODS in n-Hexan und wurden anschließend mit n-Hexan gewaschen. Die Deckgläser wurden für 30 min bei 120°C im Trockenschrank erhitzt und nach der Abkühlung dreimal mit vergälltem 100% Ethanol gespült. Die getrockneten Gläser wurden mit Stickstoff begast und luftdicht abgeschlossen. Der Kontaktwinkel sollte circa 80° betragen.

3.2.2 Herstellung hydrophiler Oberflächen

Die gereinigten Deckgläser (siehe 3.2) wurden mit 5% (v/v) 3-Aminopropyltriethoxy-Silan (APS) in 95% Ethanol für 20 min im Ultraschallbad behandelt. Nach anschließendem Spülen in 96% Ethanol wurden die Deckgläser für 30 min bei 120°C im Trockenschrank erhitzt. Nach der Abkühlung erfolgte ein zweimaliges Waschen mit 100% vergälltem Ethanol. Die Aufbewahrung erfolgte unter stickstoffhaltiger Schutzatmosphäre. Die moderat hydrophilen Oberflächen besaßen einen Randwinkel von circa 50°.

3.3 Zytotoxizitätstest

Entsprechend ISO 10993-5 wurden die eingesetzten Polymere vor den spezifischen Untersuchungen auf ihre Zytotoxizität hin an Extrakten mit 3T3 Mausfibroblasten getestet. Dazu wurden die Polymere für einen, drei und sieben Tage in dem Zellkulturmedium DMEM bei 37°C inkubiert und nach Ablauf der Zeit aus den „Extrakten“ entfernt. An subkonfluenten Schichten von 3T3 Mausfibroblasten (25.000 Zellen/Well, 48 h Inkubation) in 96-Well-Platten wurde der Einfluss dieser Extrakte auf die Vitalität der Zellen nach 24 Stunden mittels XTT- (siehe 3.5) und LDH-Test (siehe 3.6) untersucht.

Als negative Kontrolle diente gleich behandeltes DMEM ohne Materialkontakt, als positive Kontrollen Lösungen von 0,1mM und 0,2mM CuCl₂.

Dieser Zytotoxizitätstest wurde im Rahmen von Standarduntersuchungen von Angela Ritschel (GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH, Institut für Polymerforschung, Teltow) durchgeführt.

3.4 Adhäsion und Proliferation auf unterschiedlichen Polymeren

Die Bestimmung der Zelladhäsion und Zellproliferation wurde in 24-Well-Platten, jeweils als Doppelansatz, durchgeführt. Hierzu wurden HUVEC mit einer Dichte von 25.000 Zellen/ml in 500 µl Endothelzellmedium pro Well ausgesät.

Die Kultivierungszeiten betragen einen, drei und sieben Tage.

Die Zellzahl und die Vitalität wurden mit der Neubauer-Zählkammer und dem CASY-System bestimmt.

3.4.1 Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahl sowie die Vitalität wurden mittels einer Trypanblau-Färbung ermittelt. Nur geschädigte Zellmembranen erlaubten den Eintritt des Farbstoffes in die Zelle. Somit erschienen tote und membrangeschädigte Zellen im Mikroskop blau und waren damit von vitalen, ungefärbten Zellen zu unterscheiden.

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden 8 Großquadrate ausgezählt.

3.4.2 Zellzahlbestimmung mit CASY

Das CASY-System (Cell Counter and Analyser System) verband ein bewährtes Verfahren der Partikelmesstechnik nach dem Widerstandsmessprinzip mit einer modernen Methode der Signalauswertung, der Pulsflächenanalyse.

Für die Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in CASY[®]ton, einer speziellen isotonen Elektrolytlösung, suspendiert. Anschließend wurde die Probe durch die Messkapillare gesaugt. An diese wurde über zwei Platinelektroden eine elektrische Spannung angelegt. Sobald eine Zelle in die Messkapillare eindrang, entstand ein elektrischer Puls (Widerstandsänderung als Maß für das Volumen der Zellen). Die Anzahl der Pulse entsprach der Zellzahl in der Probe. Die Lebend/Tot-Differenzierung beruhte darauf, dass tote bzw. geschädigte Zellen mit defekter Zellmembran kleiner dargestellt wurden, als vitale Zellen mit intakter Zellmembran.

3.5 MTT- und XTT-Test

Durch die MTT- und XTT-Tests wurden vitale Zellen erfasst. Die Umwandlung der wasserlöslichen Tetrazoliumsalze MTT und XTT erfolgte dabei nur durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen. Das Produkt Formazan war im Falle von MTT wasserunlöslich und konnte nach Solubilisierung bei einer Wellenlänge $\lambda_{\text{MTT}} = 562 \text{ nm}$ quantifiziert werden. Mit XTT wurde ein wasserlösliches Produkt erzeugt, das im Zellüberstand bei $\lambda_{\text{XTT}} = 450 \text{ nm}$ bestimmt wurde. Somit konnte die Viabilität der Zellen auf verschiedenen Polymeren untersucht werden.

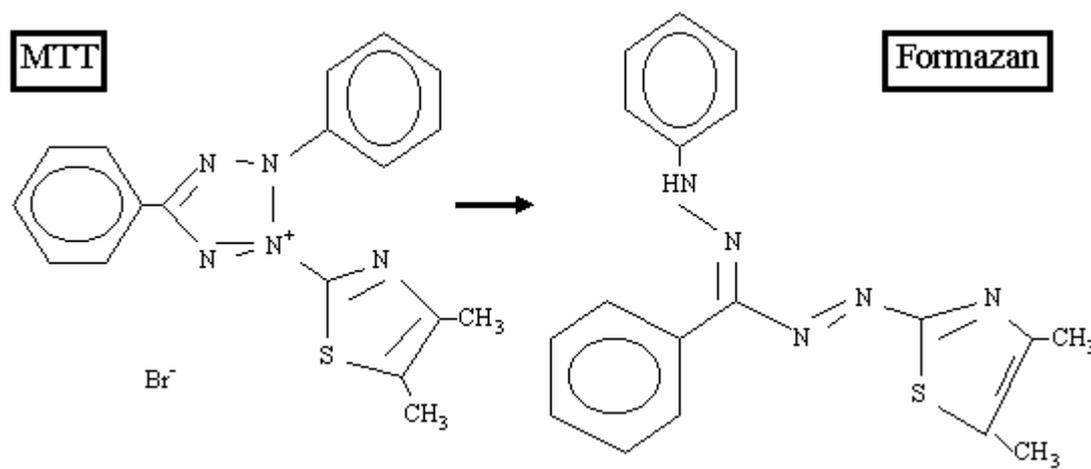


Abb. 3.1: Prinzip des MTT-Versuchs (Schulz 1998).

3.5.1 Durchführung des MTT-Tests

Für diesen Versuch wurden HUVEC mit einer Dichte von 25.000 Zellen/ml (in 24-Well-Platten) auf den verschiedenen Polymeren, als Dreifachansatz, in 500 μl Endothelzellmedium ausgesät. Die Kultivierungszeiten betragen einen, drei und sieben Tage.

Für einen weiteren Versuchsansatz wurden die verschiedenen Polymere mit Fibrinogen, Fibronectin und Collagen beschichtet und die Endothelzellen für drei Tage unter konstanten Kulturbedingungen (siehe 3.1) im Brutschrank inkubiert.

Nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten wurden zu jedem Well 110 μl der MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS, sterilfiltriert) gegeben und für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die Polymere mit den adhären Zellen in eine neue 24-Well-Platte übertragen. Nach der Zugabe von 500 μl Isopropanol erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (30 U/min) zur Lösung der gebildeten Formazan-Kristalle. Nachfolgend wurden jeweils 200 μl des Überstandes in eine 96-Well-Platte umpipettiert (Doppelbestimmung). Die Absorption wurde bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ gemessen.

3.5.2 Durchführung des XTT-Tests

Der XTT-Test fand nur für Zytotoxizitätstests in 96-Well-Platten Einsatz. Dazu wurde der Zellüberstand durch eine Mischung von DMEM und den beiden XTT-Lösungen ersetzt und die Zellen für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die spektralphotometrische Auswertung erfolgte direkt am Überstand bei $\lambda = 450 \text{ nm}$.

3.6 LDH – Test

Das Enzym Laktat-Dehydrogenase (LDH) ist im Zytoplasma von intakten Zellen lokalisiert. Sein Austritt aus den Zellen wird durch eine intakte Zellmembran unterbunden. *In vitro* ist die LDH-Menge im Zellkulturüberstand ein Maß für die Menge an toten Zellen in der Kultur. Bei Totallyse der Zellen kann die LDH-Aktivität aber auch als Maß für die Zellzahl genutzt werden (Tamada et al. 1995). Die LDH-Aktivität wurde direkt über die Konzentrationsabnahme von NADH und die Umsetzung eines Tetrazoliumsalses photometrisch bestimmt.

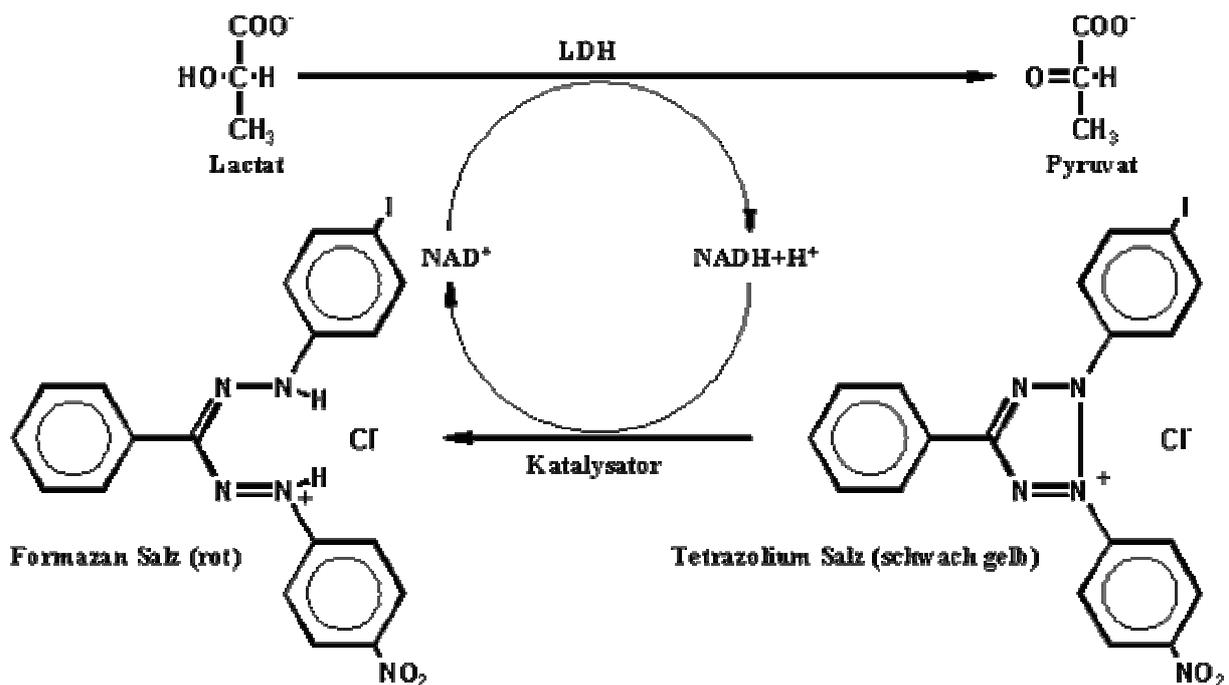


Abb. 3.2: Prinzip des LDH-Aktivitätsnachweises (Mühlenfeld 1999).

3.6.1 Durchführung des LDH-Tests

Die LDH-Aktivität wurde in 24-Well-Platten, jeweils als Dreifachansatz, gemessen. Hierzu wurden HUVEC (25.000 Zellen/ml) in 500 µl Endothelzellmedium pro Well ausgesät. Die Kultivierungszeiten betragen ein, drei und sieben Tage. Nach Absaugen des Mediums wurden die adhärennten Zellen in PBS gespült und in 1% Triton X-100/PBS lysiert. Während einer einstündigen Inkubation auf dem Schüttler (30 U/min) wurden die Zellmembranen aufgelöst. Danach wurde das Zelllysate in Eppendorf-Gefäße überführt und zentrifugiert (2800 U/min, 5 min). Jeweils 100 µl aus dem Überstand einer Probe wurden in eine 96-Well-Platte umpipettiert (Doppelbestimmung). Danach wurde in jedes Well 50 µl des LDH-Lösungsgemisches (siehe 2.12) hinzugegeben und 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Zum

Abstoppen der Reaktion wurde 50 μ l 1M HCl hinzugefügt. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte bei $\lambda = 492$ nm mit der Referenz $\lambda = 620$ nm.

3.7 Vitalfärbung der Zellen mittels FDA – Methode

Dieser Test diente zur Bestimmung von Adhäsion und Morphologie von Zellen. Fluoreszeindiacetat (FDA) wurde durch lebende Zellen aufgenommen und im Zytoplasma durch Esterasen gespalten. Bei diesem Prozess entstand Fluoreszein. Dieses ist polar und nicht zellmembrangängig. Somit konnten lebende Zellen fluoreszierend mit dem Laser Scanning Mikroskop 510 (LSM 510) dargestellt werden.

3.7.1 Durchführung

HUVEC und humane Fibroblasten wurden mit einer Zelldichte von 25.000 Zellen/ml (24-Well-Platte) in 1000 µl Endothelzellmedium bzw. Fibroblastenmedium auf den zu untersuchenden Proben ausgesät und für vier bzw. 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde pro Well 5 µl FDA hinzugegeben und die Proben für weitere zwei Minuten inkubiert. Das Medium wurde vollständig entfernt. Nach einem zweimaligen Waschschrift mit PBS erfolgte die Auswertung am LSM 510.

3.8 Immunfluoreszenz

Durch die Methode der Immunfluoreszenz wurde das Zytoskelett der untersuchten Zellen morphologisch beurteilt. Die Visualisierung des Aktin-Skeletts erfolgte durch das fluoreszierende Konjugat BODIPY 558/568-Phalloidin. Das Toxin Phalloidin besitzt die spezifische Eigenschaft, direkt an Aktin zu binden.

Die Ausbildung des Zytoskeletts wurde auf verschiedenen Proteinbeschichtungen (Fibrinogen, Fibronectin und Collagen) untersucht. Die Versuche erfolgten auf Glas, speziell behandelten Modelloberflächen (siehe 3.2) und Polymeren (siehe 2.1).

3.8.1 Durchführung der Proteinbeschichtung

Für die Beschichtung wurden Fibrinogen (10 mg/ml in 0,9% NaCl), Fibronectin (20 µg/ml in PBS) und Collagen I (20 µg/ml in 0,1% Essigsäure) als sterile Lösungen genutzt.

Pro Kavität der 24-Well-Platte wurden jeweils 500 µl der Proteinlösung einpipettiert und für 45 min inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit sterilem PBS über einen Zeitraum von zwei Stunden gespült.

3.8.2 Durchführung der Immunfluoreszenz-Markierung

HUVEC wurden mit einer Dichte von 25.000 Zellen/ml (24-Well-Platte) auf den Materialien (siehe 3.8) in 500 µl Endothelzellmedium ausgesät und für ein, drei und sieben Tage bei 37°C inkubiert.

Fixierung

Zum entsprechenden Zeitpunkt wurde das Medium vollständig entfernt und die Zellen in 3% Paraformaldehyd/PBS für 15 min fixiert. Anschließend erfolgte ein zweimaliger Waschschrift in PBS. Nach der Zugabe von 1 ml 0,5% Triton X-100/PBS zur Permeabilisierung der Zellmembran inkubierte der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur. Danach wurde erneut mit PBS gespült.

Zur Vermeidung einer unspezifischen Reaktion erfolgte ein 30-minütiger Blockierungsschritt mit 1% BSA/1% Glycin in PBS. Anschließend wurde zweimal mit PBS gespült.

Markierung von Aktin

Das Konjugat BODIPY 558/568-Phalloidin wurde 1:25 in PBS verdünnt. Je 100 µl dieser Lösung wurden auf Parafilm appliziert. Die Polymerscheiben wurden, mit den fixierten Zellen nach unten, auf die Lösung gelegt und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte

ein dreimaliger Waschschrift mit PBS und destilliertem Wasser. Nach der Eindeckung der Zellen mit Mowiol (siehe 2.7) erfolgte die Auswertung am LSM 510.

Markierung von Vinculin und von Willebrand Faktor

Die Primärantikörper (Vinculin 1:50, von Willebrand Faktor 1:400 verdünnt in 1% BSA/PBS) inkubierten mit den Zellen für 45 min bei 37°C. Folgend wurde ein dreimaliger Waschschrift mit PBS durchgeführt. Zur Detektion des gebundenen Primärantikörpers erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei 37°C mit einem Cy2-gekoppelten Ziege-Anti-Maus Antikörper (bzw. Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper). Der Sekundärantikörper wurde 1:200 in PBS verdünnt. Zur Entfernung des nicht gebundenen Sekundärantikörpers erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS. Nach einem Waschschrift mit destilliertem Wasser wurden die jeweiligen Proben mit Mowiol auf Objektträgern befestigt. Für die Auswertung und Anfertigung der Bilder wurde das LSM 510 genutzt.

Die Immunfluoreszenzfärbung von vWF wurde freundlicherweise von Angela Ritschel (GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH, Institut für Polymerforschung, Teltow) durchgeführt.

3.9 Antikoagulante Wirkung von HUVEC mittels Prostacyclin-Assay

Die Bestimmung der basalen und TNF- α -stimulierten Prostacyclin-Konzentration erfolgte mit einem kompetitiven Enzymimmunoassay (6-Keto-Prostaglandin F_{1 α} , Enzymimmunoassay Biotrak System, RPN221, Amersham, England). Es wurde 6-Keto-Prostaglandin F_{1 α} als stabiles Hydrolyseprodukt von PGI₂ gemessen.

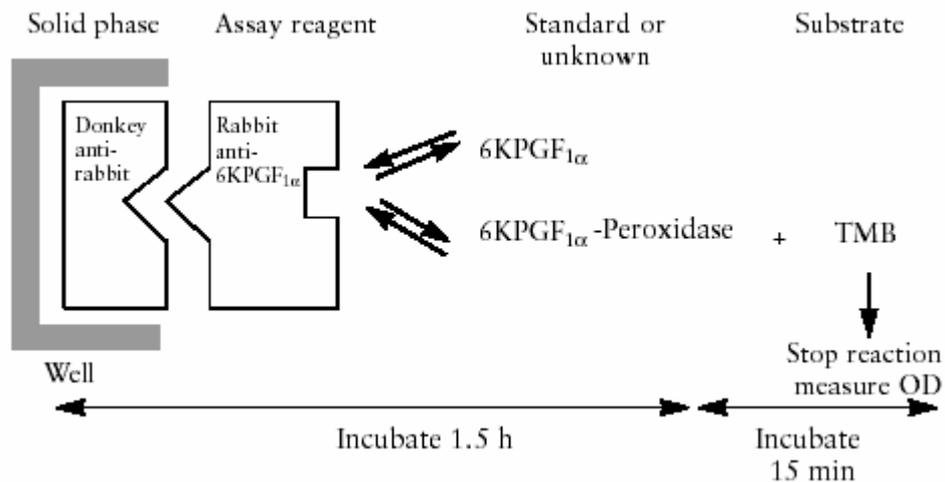


Abb. 3.3: Prinzip des Prostacyclin-Assays (RPN221, Amersham, England).

3.9.1 Bestimmung der basalen PGI₂-Produktion

Hierzu wurden HUVEC mit einer Zelldichte von 250.000 Zellen/ml (24-Well-Platte) in 1000 μ l Endothelzellmedium auf den Polymerscheiben ausgesät (Doppelbestimmung) und für sechs Tage bei 37°C inkubiert. Das überständige Medium wurde gesammelt und bei 2000 U/min für zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert. Bis zur Messung der PGI₂-Konzentration lagerten die Proben bei -20°C.

3.9.2 Bestimmung der TNF- α -stimulierten PGI₂-Produktion

Zur Beurteilung der TNF- α -stimulierten Sekretion von Prostacyclin erfolgte die Kultivierung von HUVEC mit einer Zelldichte von 250.000 Zellen/ml (24-Well-Platte) in 1000 μ l Endothelzellmedium für 24 Stunden. Folgend wurde 1 ml TNF- α (10 μ g/ml) in den Ansatz pipettiert. Das überständige Medium wurde nach fünf Stunden gesammelt und bis zur Verwendung eingefroren.

3.9.3 Enzymimmunassay-Prozedur

Hierfür wurden jeweils 50 µl der Proben in die 96-Well-Platte pipettiert. Nach Zugabe von 50 µl Antiserum erfolgte eine 30 minütige Inkubation auf dem Schüttler (30 U/min, RT). Anschließend wurde das bereitgestellte Peroxidase-Konjugat (Volumen: 50 µl) in jedes Well gegeben und unter Schütteln bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert.

Nach der vollständigen Entfernung der Flüssigkeit erfolgte ein viermaliger Waschschrift mit jeweils 400 µl Waschpuffer. Nach der Zugabe von 150 µl TMB-Substrat erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion wurden 100 µl einer 1 M H₂SO₄-Lösung hinzugefügt. Die Messung der Absorption erfolgte im TECAN-Reader bei 405 nm. Die Referenz wurde bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen.

Für die spätere Auswertung wurde die zum Kit gehörige Standardreihe mitgeführt.

3.10 Datenbearbeitung

Für die graphische und statistische Auswertung wurde das Programm Excel (Microsoft) und InStat Version 3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) benutzt.

Statistische Auswertung

Es erfolgte die Berechnung des arithmetischen Mittels und der mittleren Standardabweichung (SEM, engl. standard error of mean). Zur Signifikanzberechnung wurde das Programm ANOVA (NCSS, Kaysville, Utah, USA) benutzt.

4 Ergebnisse

4.1 Zytotoxizität

Die Unbedenklichkeit der Materialien hinsichtlich zytotoxischer Wirkungen wurde im Vorfeld der Untersuchungen an Materialextrakten entsprechend ISO-10993-5 überprüft.

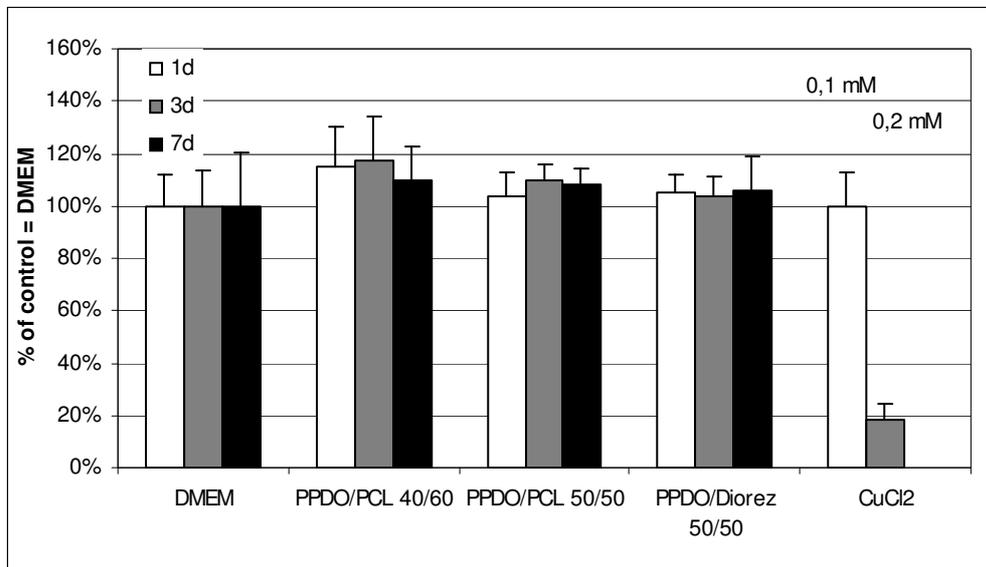


Abb. 4.1: Inkubation von 3T3 Fibroblasten mit Extrakten von PPDO/PCL 40/60, PPCO/PCL 50/50, PPDO/Diorez 50/50 in DMEM für 1, 3 und 7 Tage bei 37°C und der Referenz CuCl₂ (nach ISO 10993-5).

Die Vitalität der Zellen (3T3 Fibroblasten) wurde auf der negativen Kontrolle DMEM gleich 100% gesetzt. Auf dem Polymer PPDO/PCL 40/60 war dazu im Vergleich die Vitalität der Zellen am ersten Tag 115%, nach drei Tagen 117% und nach sieben Tagen 110%. Auf dem Polymer PPDO/PCL 50/50 betrug die Vitalität am ersten Tag 104%, nach drei Tagen 110% und nach sieben Tagen 108%, auf PPDO/Diorez 50/50 nach einem Tag 106%, nach drei Tagen 104% und nach sieben Tagen 106%. CuCl₂ diente als positive Kontrolle. Hier kam es zu einem Rückgang der Vitalität der Zellen, bei einer Konzentration von 0,1 mM auf 99%, bei 0,2 mM auf 18%. Die getesteten Materialien zeigten somit keine zytotoxischen Effekte.

Die detaillierten Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung befinden sich im Anhang (A.1 bis A.2).

4.2 Zelladhäsion und –proliferation

Dargestellt ist die Anzahl an HUVEC nach einem, drei und sieben Tagen. Die Graphik zeigt die Werte, die durch Zellzählung mittels CASY ermittelt wurden.

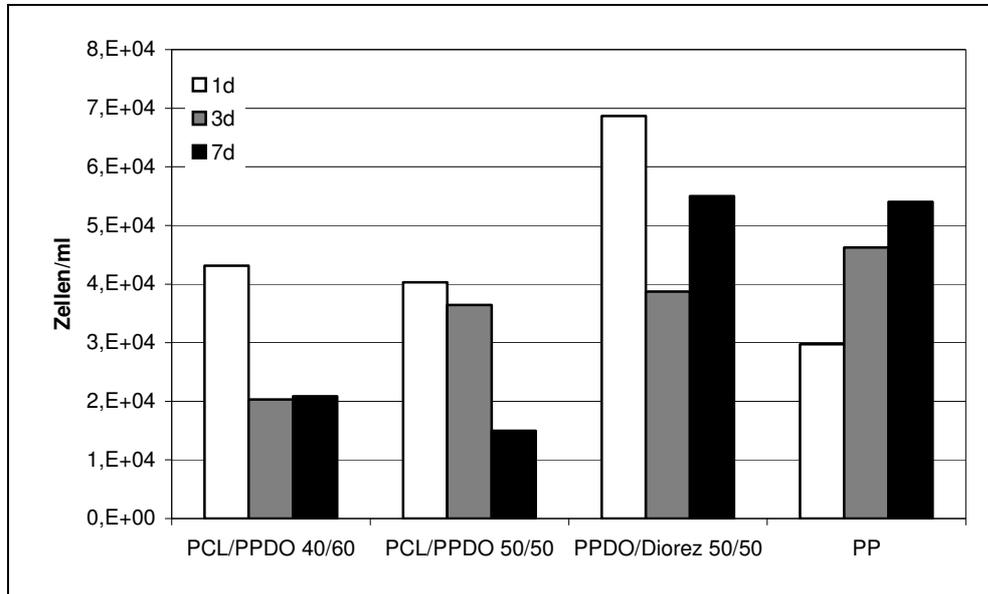


Abb. 4.2: Proliferation von HUVEC. Die Zellen wurden für 1, 3 und 7 Tage auf den Materialien PPDO/PCL 40/60, PPCO/PCL 50/50, PPDO/Diorez 50/50 und PP kultiviert. Die Messung der Zellzahl erfolgte mit dem CASY.

Nach dem ersten Tag waren im Mittel 61.743 Zellen/ml auf dem Polymer PPDO/PCL 40/60 zählbar. Nach drei Tagen waren es auf dem selbigen Material 15.248 Zellen/ml und nach sieben Tagen 21.410 Zellen/ml. Auf PPDO/PCL 50/50 konnte nach einem Tag eine Zellzahl von 31.303 Zellen/ml, nach drei Tagen von 27.308 Zellen/ml und nach sieben Tagen von 15.010 Zellen/ml registriert werden. Nach einer Inkubationszeit von einem Tag von HUVEC auf PPDO/Diorez 50/50 fand sich eine Zellzahl von 62.375 Zellen/ml, nach drei Tagen von 29.033 Zellen/ml und nach sieben Tagen von 52.975 Zellen/ml. Auf PP war nach einem Tag eine Zellzahl von 31.430 Zellen/ml zu verzeichnen, nach drei Tagen von 36.688 Zellen/ml und nach sieben Tagen von 51.085 Zellen/ml.

Während auf PP ein stetiger Zellanzug zu verzeichnen war, kam es bei den anderen Polymeren im Verlauf der gemessenen Zeit zu einem Zellverlust. Auf PPDO/Diorez 50/50 und PP war am siebten Tag die höchste Zelldichte nachweisbar. Die exakten Werte sind im Anhang vermerkt (B.1).

4.3 Viabilität von HUVEC

4.3.1 MTT ohne Beschichtungen über 1, 3 und 7 Tage

Zuerst wurden HUVEC auf den unbeschichteten Polymeren ausgesät, um das Zellwachstum bzw. die Zellviabilität auf den reinen Polymeren zu bestimmen.

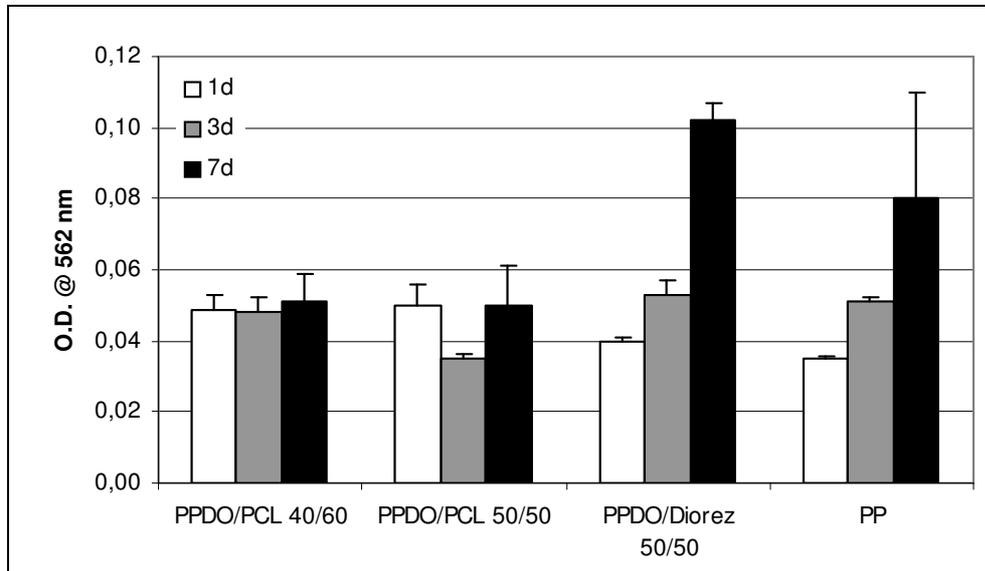


Abb. 4.3: Viabilität von HUVEC bestimmt mit dem MTT-Test. Die Zellen wurden für 1, 3 und 7 Tage auf PPDO/PCL 40/60, PPDO/PCL 50/50, PPDO/Diorez 50/50 und PP kultiviert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm.

Die optische Dichte der Probenlösungen des MTT-Tests bei 562 nm auf PPDO/PCL 40/60 betrug nach einem Tag im Durchschnitt 0,049, nach drei Tagen 0,048 und nach sieben Tagen 0,050. Auf PPDO/PCL 50/50 war nach einem Tag eine optische Dichte von 0,049, nach drei Tagen von 0,035 und nach sieben Tagen von 0,049 zu verzeichnen. Die optische Dichte auf PPDO/Diorez 50/50 betrug nach einem Tag 0,040, nach drei Tagen 0,051 und nach sieben Tagen 0,102. Auf PP war die optische Dichte nach einem Tag 0,035, nach drei Tagen 0,051 und nach sieben Tagen 0,080. Die ausführlichen Werte befinden sich im Anhang (C.1).

Während bei PPDO/Diorez 50/50 ($p < 0,001$) und PP ($p < 0,05$) ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen war, blieb die Zahl der vitalen Zellen, charakterisiert durch ihre Mitochondrienaktivität, auf PPDO/PCL 40/60 und PPDO/PCL 50/50 weitgehend konstant.

4.3.2 MTT mit verschiedenen Beschichtungen über 3 Tage

Anschließend wurde der Test zum Vergleich auf beschichteten Polymeren durchgeführt.

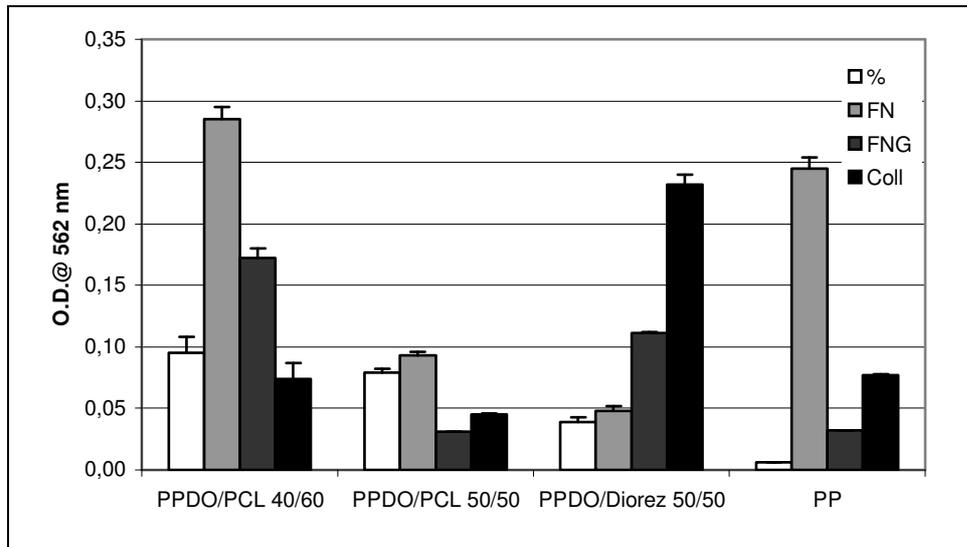


Abb. 4.4: Viabilität von HUVEC bestimmt mit dem MTT-Test. Die Zellen wurden für 3 Tage auf unbeschichtetem und auf mit FN-, FNG- und Coll-beschichtetem PPDO/PCL 40/60, PPDO/PCL 50/50, PPDO/Diorez 50/50 und PP kultiviert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm.

Nach drei Tagen betrug die optische Dichte der Probenlösungen des MTT-Tests auf unbeschichtetem PPDO/PCL 40/60 0,095, auf FN-beschichtetem PPDO/PCL 40/60 0,285, auf FNG-beschichtetem PPDO/PCL 40/60 0,172 und auf Coll-beschichtetem PPDO/PCL 40/60 0,074. Auf unbeschichtetem PPDO/PCL 50/50 war die optische Dichte 0,079, auf FN-beschichtetem PPDO/PCL 50/50 0,093, auf FNG-beschichtetem PPDO/PCL 50/50 0,031 und auf Coll-beschichtetem PPDO/PCL 50/50 0,045. Entsprechend war auf unbeschichtetem PPDO/Diorez 50/50 die optische Dichte 0,039, auf FN-beschichtetem PPDO/Diorez 50/50 0,048, auf FNG-beschichtetem PPDO/Diorez 50/50 0,111 und auf Coll-beschichtetem PPDO/Diorez 50/50 0,232. Die Werte für die optische Dichte lagen nach drei Tagen auf unbeschichtetem PP bei 0,006, auf FN-beschichtetem PP bei 0,245, auf FNG-beschichtetem PP bei 0,032 und auf Coll-beschichtetem PP bei 0,077. Die detaillierten Ergebnisse dieses Versuches befinden sich im Anhang (C.2). Insgesamt konnte auf allen Materialien eine Erhöhung der Zellzahl nach Beschichtung mit Fibronectin erfasst werden. Diese war bei PPDO/PCL 40/60 und PP signifikant, bei den anderen beiden Polymeren weniger ausgeprägt. Während bei der Beschichtung mit Fibrinogen ein deutlicher Zellanzug auf PPDO/PCL 40/60, PPDO/Diorez 50/50 und PP zu verzeichnen war, erhöhte eine Collagenbeschichtung nur bei PPDO/Diorez 50/50 und PP die Zahl der viablen Zellen.

4.4 Bestimmung der LDH-Aktivität

Ermittelt wurde die LDH-Aktivität von kultivierten HUVEC nach Totallyse zur Bestimmung der Zellzahl in Abhängigkeit vom Material.

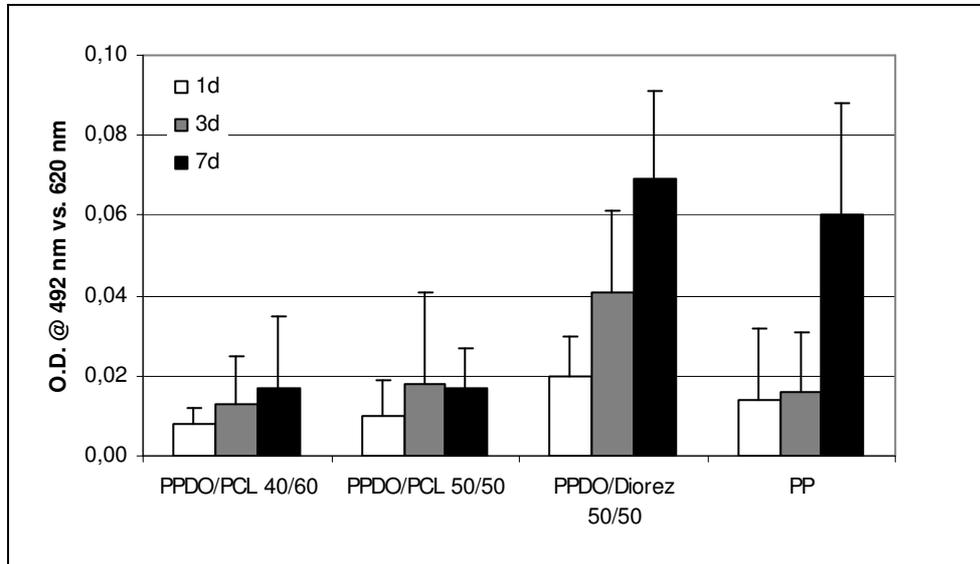


Abb. 4.5: Proliferation von HUVEC bestimmt durch den LDH-Test. Die Zellen wurden für 1, 3 und 7 Tage auf PPDO/PCL 40/60, PPCO/PCL 50/50, PPDO/Diorez 50/50 und PP inkubiert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 492 nm und einer Referenz von 620 nm.

Die optische Dichte der LDH-Probenlösung bei 620 nm betrug auf PPDO/PCL 40/60 nach einem Tag im Durchschnitt 0,009, nach drei Tagen 0,013 und nach sieben Tagen 0,005. Auf PPDO/PCL 50/50 war nach einem Tag eine optische Dichte von 0,011, nach drei Tagen von 0,018 und nach sieben Tagen von 0,017 zu verzeichnen. Die optische Dichte auf PPDO/Diorez 50/50 betrug nach einem Tag 0,020, nach drei Tagen 0,043 und nach sieben Tagen 0,089. Auf PP war die optische Dichte nach einem Tag 0,014, nach drei Tagen 0,016 und nach sieben Tagen 0,060. Die ausführlichen Werte befinden sich im Anhang (D.1).

Im Vergleich zu PP war die Zellzahl nach sieben Tagen auf PPDO/Diorez 50/50 höher, auf PPDO/PCL 50/50 und 40/60 niedriger. Während auf PPDO/Diorez 50/50 und PP die Anzahl der Zellen stetig zugenommen hat, blieb sie auf den PPDO/PCL-Polymeren weitgehend unverändert.

4.5 Adhäsionsverhalten und Morphologie von Zellen

4.5.1 FDA-Färbung von Humanfibroblasten

Gezeigt wird die Adhärenz und Morphologie von Humanfibroblasten auf ausgewählten Polymeren. Dadurch kann auch das Verhalten von HUVEC besser beurteilt und eingeordnet werden.

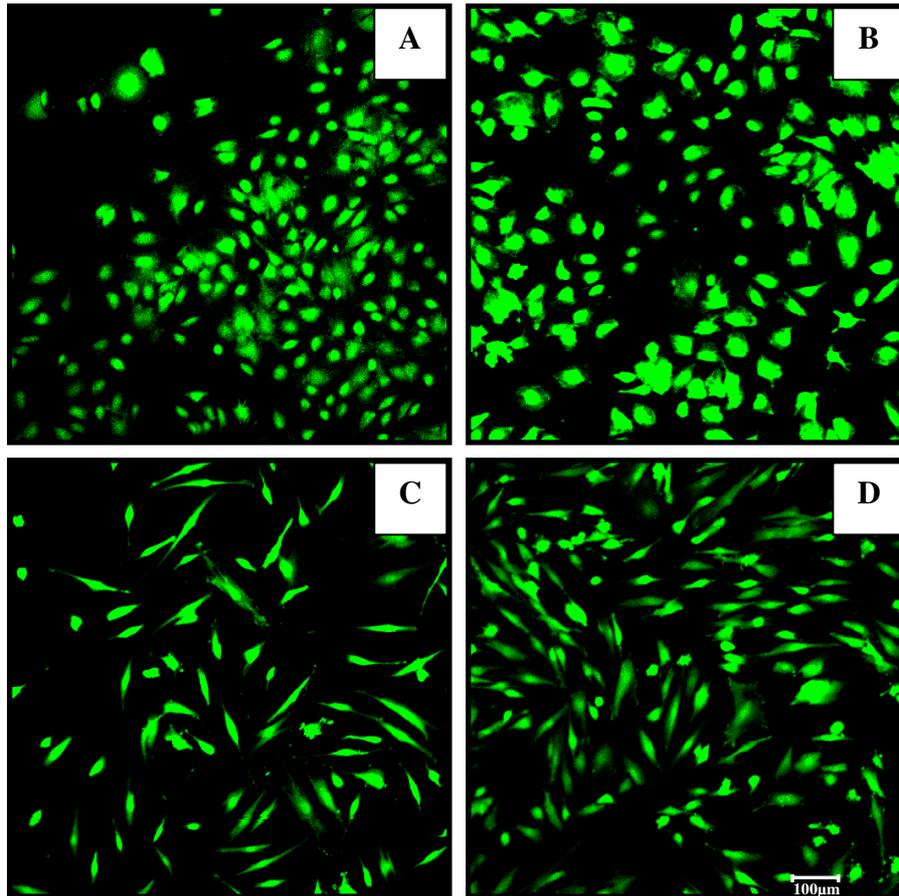


Abb. 4.6: Humane Fibroblasten (25.000 Zellen/ml) mit FDA-Färbung nach 4 h (A+B) und 24 h (C+D) Inkubation auf den Polymeren: PPDO/PCL 40/60 (A+C) und TCP (B+D), Balken: 100 µm.

Das Adhäsionsverhalten der Fibroblasten war auf den beiden untersuchten Materialien gleich. Nach 24 h hatten sich die Zellen ausgebreitet und gut an der Polymeroberfläche angeheftet.

4.5.2 FDA-Färbung von HUVEC

Dargestellt sind die Fähigkeit zur Anheftung auf den verschiedenen Materialien sowie der Phänotyp von HUVEC.

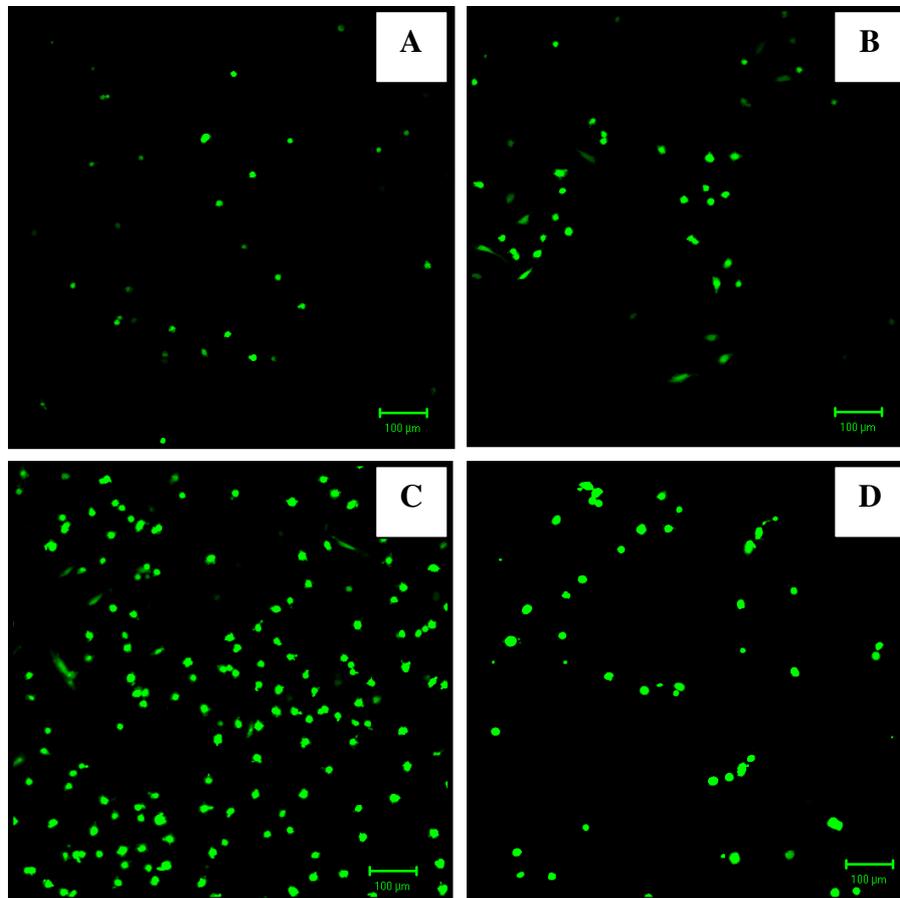


Abb. 4.7: HUVEC (25.000 Zellen/ml) mit FDA-Färbung nach 4 h Inkubation auf den Polymeren: PPDO/PCL 40/60 (A), PPDO/PCL 50/50 (B), PPDO/Diorez 50/50 (C) und PP (D), Balken: 100 µm.

Durch die Fluoreszenzmethode konnte gezeigt werden, dass sich HUVEC vor allem auf PPDO/Diorez 50/50 (**Abb. 4.7 C**) und auf PP (**Abb. 4.7 D**) gut anhefteten. Die geringste Zelladhäsion fand sich auf PPDO/PCL 40/60 (**Abb. 4.7 A**).

Während auf PPDO/PCL 50/50 (**Abb. 4.7 B**) und PPDO/Diorez 50/50 (**Abb. 4.7 C**) bereits nach 4 h eine Spreitung einiger Zellen mit einer fibroblastoiden Morphologie erkennbar war, besaßen die Zellen auf PPDO/PCL 40/60 (**Abb. 4.7 A**) und PP (**Abb. 4.7 D**) eine eher rundliche Form vom Epitheloidphänotyp.

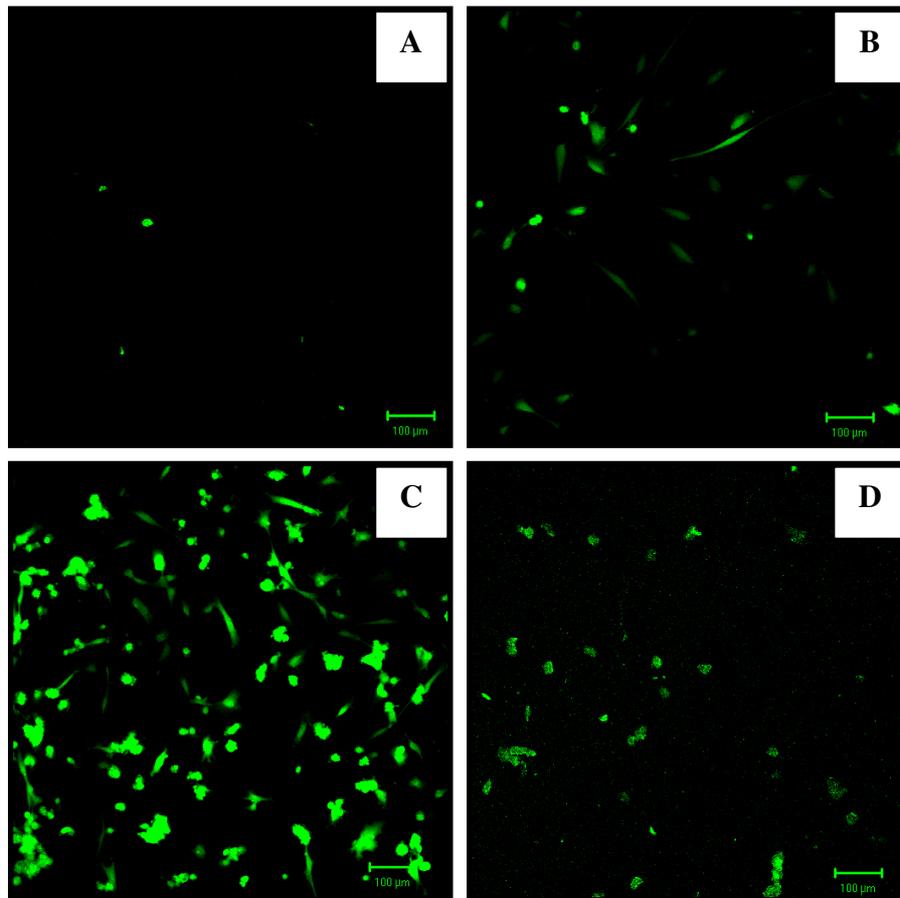


Abb. 4.8: HUVEC (25.000 Zellen/ml) mit FDA-Färbung nach 24 h Inkubation auf den Polymeren: PPDO/PCL 40/60 (A), PPDO/PCL 50/50 (B), PPDO/Diorez 50/50 (C) und PP (D), Balken: 100 µm.

Auch die Aufnahmen nach 24 h Inkubation zeigten, dass die Adhärenz von HUVEC auf PPDO/Diorez 50/50 (**Abb. 4.8 C**) am größten war. Auf PPDO/PCL 40/60 (**Abb. 4.8 A**) waren weiterhin nur wenige Zellen zu sehen.

Auf PPDO/PCL 50/50 (**Abb. 4.8 B**) und PPDO/Diorez 50/50 (**Abb. 4.8 C**) hatten die Zellen weiter seitliche Ausläufer gebildet und eine längliche Form angenommen. Auf PP (**Abb. 4.8 D**) zeigten HUVEC wie nach 4 h noch eine kugelige Form mit Größenzunahme.

Im Gegensatz zu Humanfibroblasten (siehe **Abb. 4.6 A und C**) adhärten HUVEC in geringerer Zahl auf PPDO/PCL 40/60 (**Abb. 4.7 und Abb. 4.8**).

4.6 Morphologische Beurteilung des Aktin-Zytoskeletts von HUVEC

4.6.1 Immunfluoreszenz auf Glas

Gezeigt wird die Beschaffenheit des Aktin-Zytoskeletts von HUVEC nach Kultivierung für 72 h auf unbehandeltem und auf Fibronektin-, Fibrinogen- und Collagen-beschichtetem Glas.

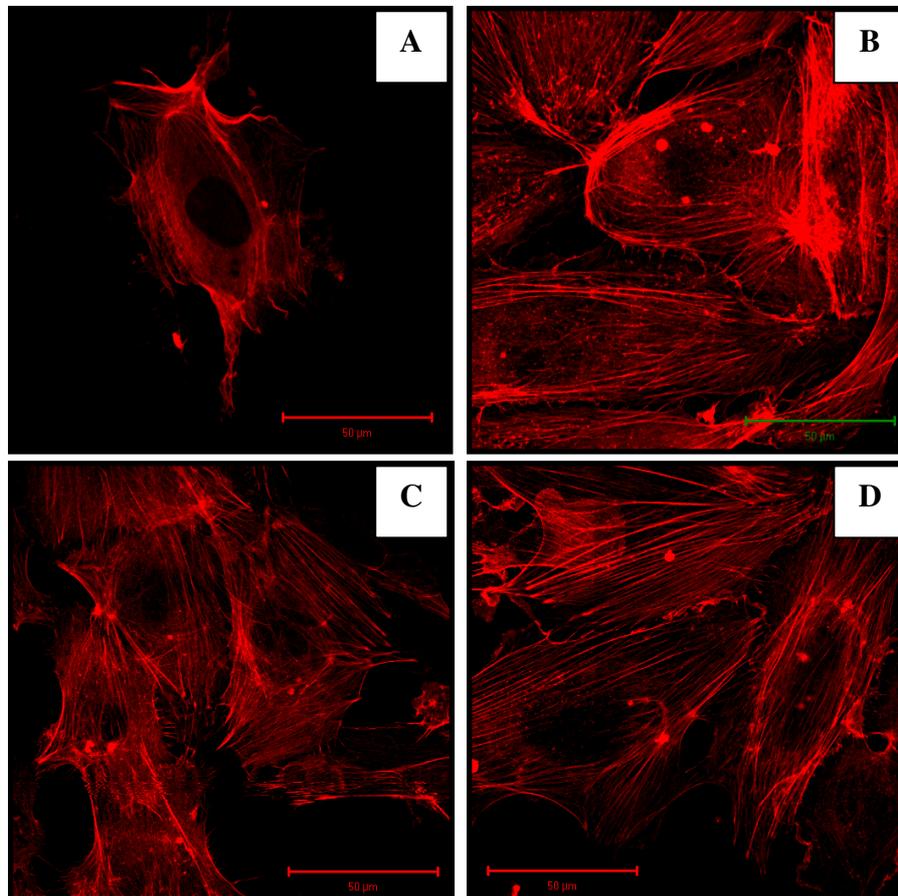


Abb. 4.9: HUVEC (25.000 Zellen/ml) mit Aktin-Färbung nach 72 h Inkubation auf unbehandeltem (A) und mit FN- (B), FNG- (C) und Coll- (D) beschichteten Deckgläsern, Balken: 50 µm.

Die Zellen auf den beschichteten Deckgläsern hatten sich gut ausgebreitet (**Abb. 4.9 B, C und D**) und erhielten eine prominente lineare Anordnung von Aktin-Bündeln. Fibronektin führte zu einer gleichmäßigen, netzartigen Anordnung von HUVEC, Fibrinogen und Collagen zu einer geschwungenen Zellform. Auf dem unbehandeltem Glas (**Abb. 4.9 A**) hatten sich HUVEC weniger zahlreich ausgebreitet und zeigten eine vorwiegende Färbung der umgebenden äußeren Aktinfilamente. Die Anzahl adhärerender Zellen war auf den beschichteten Deckgläsern (**Abb. 4.9 B, C und D**) sichtbar höher als auf reinem Glas (**Abb. 4.9 A**).

4.6.2 Immunfluoreszenz auf Modelloberflächen

Da sich im MTT-Versuch (siehe **Abb. 4.4**) gezeigt hatte, dass eine Beschichtung mit Fibronectin die höchste Zelladhäsion erbringt, wurden HUVEC für 24 h auf Modelloberflächen für hydrophiles und hydrophobes Verhalten, d.h. APS- (**Abb. 4.10 A**) und ODS- (**Abb. 4.10 B**) Deckgläsern mit Fibronectin-Beschichtung ausgesät.

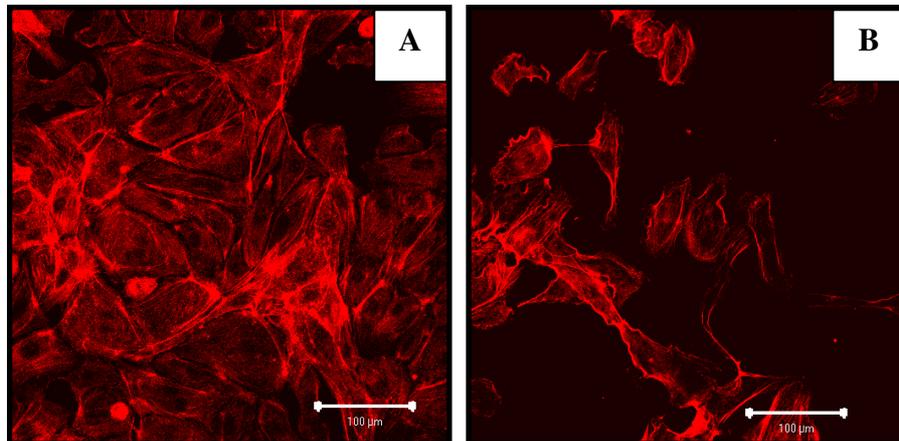


Abb. 4.10: HUVEC (25.000 Zellen/ml) mit Aktin-Färbung nach 24 h Inkubation auf APS- (A) und ODS- (B) behandelten mit FN-beschichteten Deckgläsern, Balken: 100 µm.

Die Zellen auf den APS-Gläsern (**Abb. 4.10 A**) hatten sich gut ausgebreitet. Ihr Aktin-Zytoskelett zeigte eine reguläre Anordnung der Fasern. Auf den ODS-Gläsern (**Abb. 4.10 B**) war eine geringere Ausbreitung erkennbar und HUVEC besaßen hinsichtlich der Morphologie einen veränderten Phänotyp. Die Form war uneinheitlich, die Ränder zum Teil gezackt und ausgefranst. Die Anzahl adhärennder Zellen war auf den APS-Gläsern (**Abb. 4.10 A**) sichtbar höher gegenüber den ODS-Gläsern (**Abb. 4.10 B**).

4.6.3 Immunfluoreszenz auf proteinbeschichteten APS-Oberflächen

Zur Optimierung des Wachstums von HUVEC auf den hydrophilen APS-Modelloberflächen, wurden diese mit Fibronectin (Abb. 4.11 A+B), Fibrinogen (Abb. 4.11 C+D) und Collagen (Abb. 4.11 E+F) beschichtet und die Zellen darauf für 1 d (Abb. 4.11 A,C,E) und 7 d (Abb. 4.11 B,D,F) kultiviert.

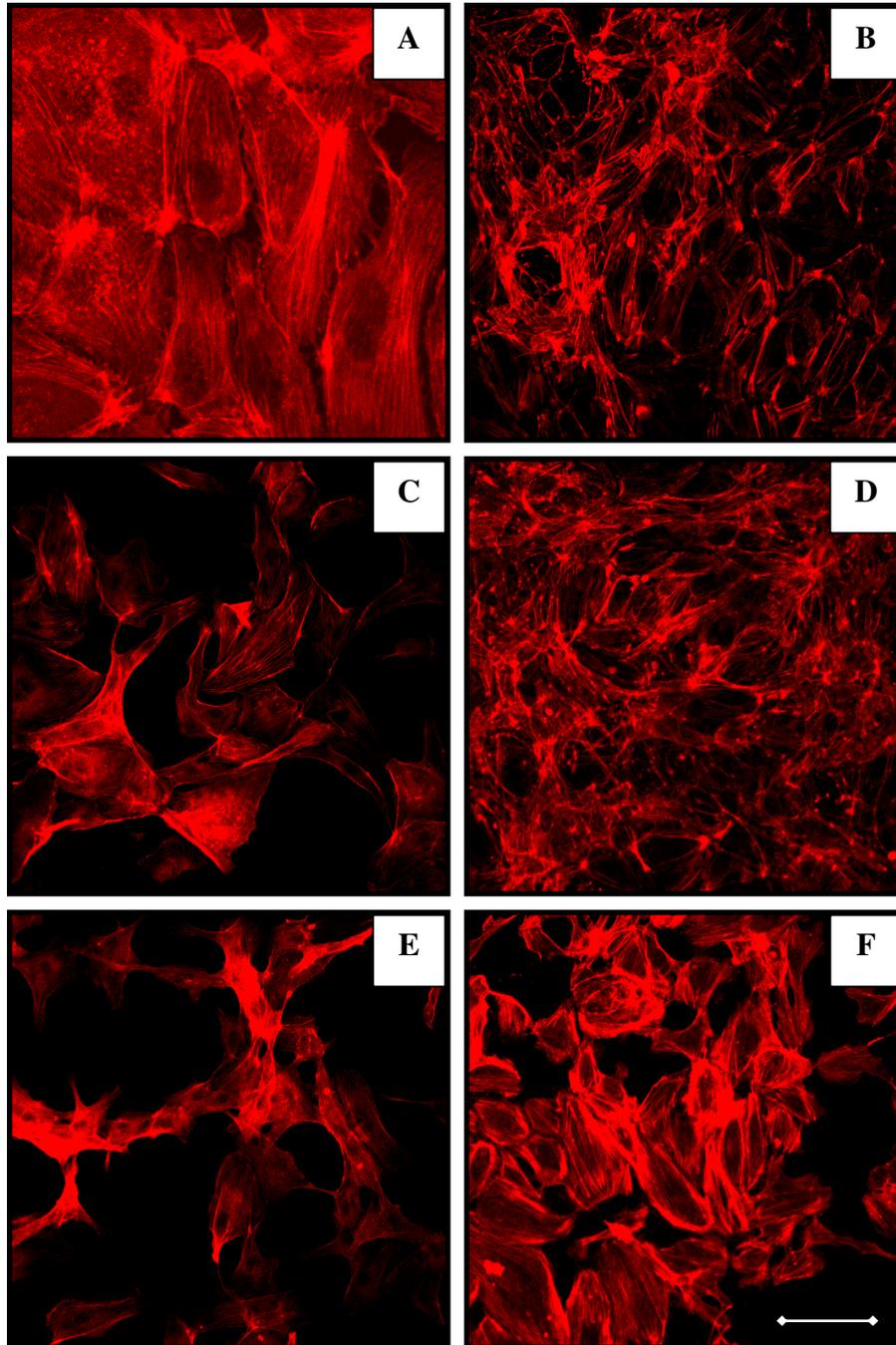


Abb. 4.11: HUVEC (25.000 Zellen/ml) mit Aktin-Färbung nach 1 d (A+C+E) und 7 d (B+D+F) Inkubation auf APS- behandelten mit FN- (A+B), FNG- (C+D) und Coll- (E+F) beschichteten Deckgläsern, Balken: 100 μ m.

Nach bereits einem Tag hatten sich HUVEC bei einem vorwiegend epitheloiden Phänotyp auf den FN-beschichteten Deckgläsern (**Abb. 4.11 A+B**) flächig auf dem Untergrund ausgebreitet und ein dichtes Netzwerk gebildet. Das Aktinzytoskelett war in Richtung der Verbindungswege zu benachbarten Zellen gut ausgebildet.

Auf den anderen beiden Beschichtungen FNG und Coll (**Abb. 4.11 C+D, E+F**) hatten sich weniger Zellen angeheftet. Die Verbindungen zwischen den einzelnen Zellen waren auch hier gut ausgeprägt. Die Zellen hatten eine längliche Form mit schräg verlaufenden Zellkanten.

Nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen (**Abb. 4.11 B,D,F**) hatten die Zellen auf der FN- (**Abb. 4.11 B**) und FNG- (**Abb. 4.11 D**) Beschichtung ein dichtes räumliches Netzwerk gebildet. Auch auf der Collagenbeschichtung (**Abb. 4.11 F**) war die Tendenz hierzu erkennbar, die Zellen lagen aber noch weitgehend flächig nebeneinander.

4.6.4 Immunfluoreszenz auf Multiblock Copolymeren und Polypropylen

HUVEC sind für 72 h auf unbeschichtetem und auf Fibronectin-, Fibrinogen- und Collagenbeschichtetem PPDO/PCL 40/60 (**Abb. 4.12**) gewachsen.

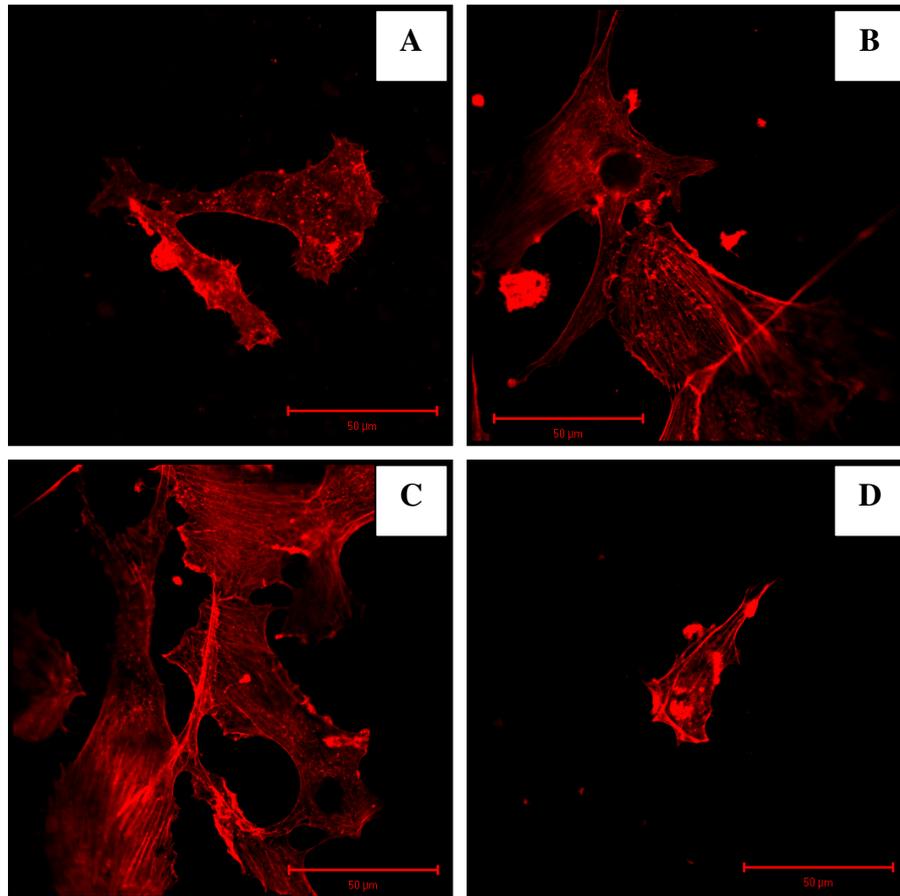


Abb. 4.12: HUVEC (25.000 Zellen/ml) mit Aktin-Färbung nach 72 h auf unbeschichtetem (A), FN- (B), FNG- (C) und Coll- (D) beschichtetem PPDO/PCL 40/60, Balken: 50 µm.

Ohne Beschichtung (**Abb. 4.12 A**) war die Zahl an adhärenen Zellen gering. Morphologisch zeigten HUVEC eine längliche Form mit zackenförmigen Ausläufern an den Enden. Die Aktinfilamente waren vor allem in der äußeren Begrenzung der Zellen ausgebildet.

Auf den FN- (**Abb. 4.12 B**) und FNG- (**Abb. 4.12 C**) beschichteten Polymeren hatten sich die Zellen in bedeutend größerer Zahl angeheftet. Die Zytoskelettstruktur und die Zellkerne waren gut abgrenzbar. Die Zellen besaßen eine geschwungene Form und verschiedene Betonungen der Ränder.

Die Beschichtung mit Coll (**Abb. 4.12 D**) zeigte hinsichtlich der Zelladhäsion und -proliferation ein unverändertes Bild zu dem unbeschichteten Material. Die Aktinbündel waren vor allem am Rand stark ausgeprägt.

Für PPDO/PCL 50/50 (**Abb. 4.13**) ergab sich unter identischen Bedingungen das folgende Bild.

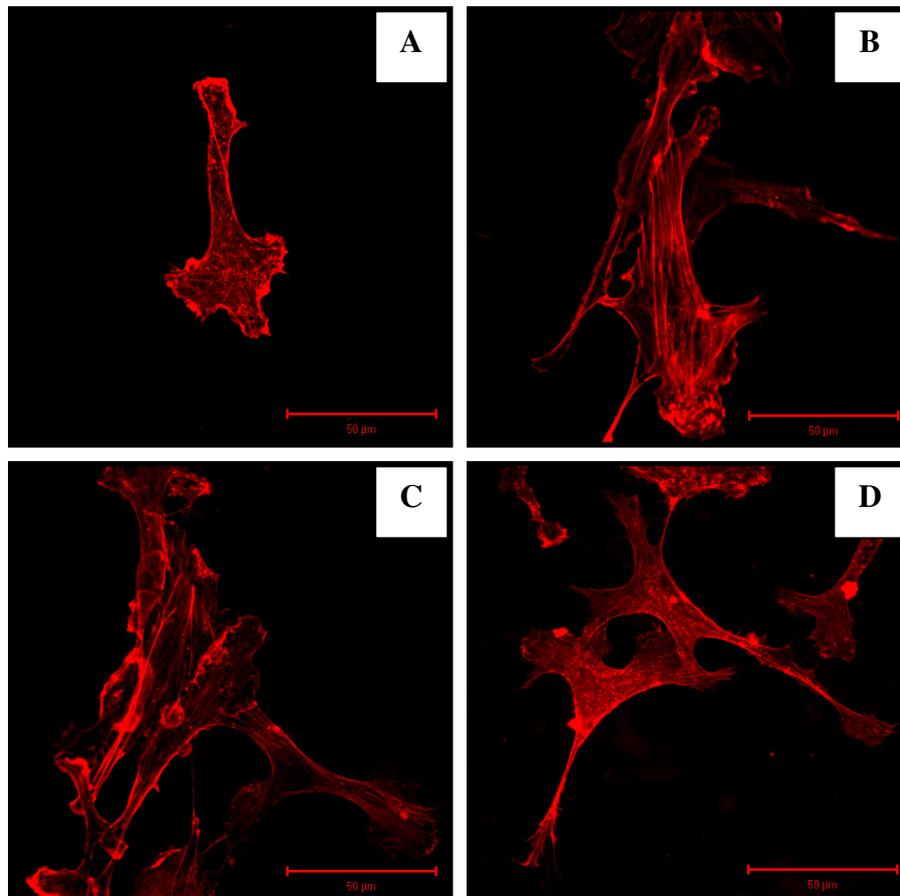


Abb. 4.13: HUVEC (25.000 Zellen/ml) mit Aktin-Färbung nach 72 h auf unbeschichtetem (A), FN- (B), FNG- (C) und Coll- (D) beschichtetem PPDO/PCL 50/50, Balken: 50 µm.

Auf dem unbeschichteten Material (**Abb. 4.13 A**) waren HUVEC in einer geringen Anzahl vorhanden. Sie besaßen eine längliche Form mit filigranen Ausläufern an beiden Enden. Die Aktinfilamente waren vor allem im äußeren Bereich ausgeprägt.

Auf dem FN- (**Abb. 4.13 B**) und FNG- (**Abb. 4.13 C**) beschichteten PPDO/PCL 50/50 hatte sich ein Netzwerk an Zellen ausgebildet. HUVEC hafteten auf den beschichteten Polymeren in größerer Anzahl als auf den unbeschichteten und waren zahlreiche Verbindungen zu anderen benachbarten Zellen eingegangen. Die Übergänge waren durch Aktinfilamente verstärkt. Zum Teil ließen sich gezackte Ränder erkennen.

Auch auf dem Coll-beschichteten Material (**Abb. 4.13 D**) hatten die Zellen feine Ausläufer ausgebildet. Die Gesamtanzahl an Zellen war hier geringer als auf FN und FNG (**Abb. 4.13 B+C**).

HUVEC wurden für 72 h auf unbeschichtetem und auf Fibronectin-, Fibrinogen- und Collagen-beschichtetem PPDO/Diorez 50/50 (**Abb. 4.14**) kultiviert.

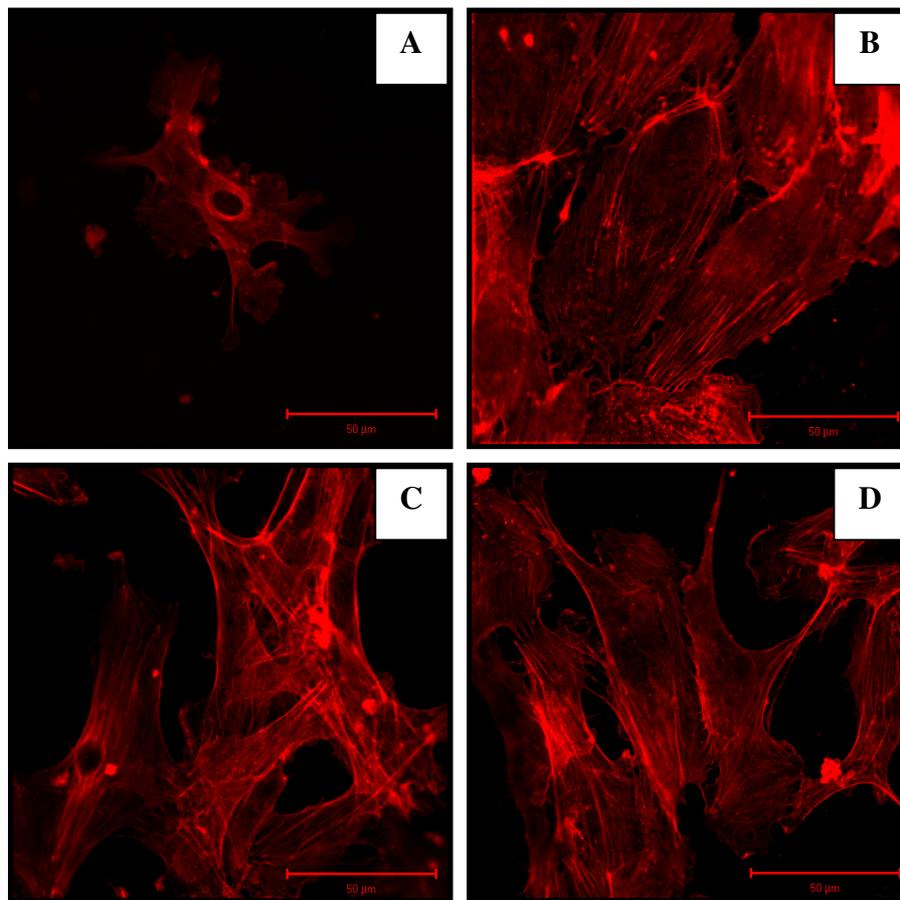


Abb. 4.14: HUVEC (25.000 Zellen/ml) mit Aktin-Färbung nach 72 h auf unbeschichtetem (A), FN- (B), FNG- (C) und Coll- (D) beschichtetem PPDO/Diorez 50/50, Balken: 50 µm.

Die geringste Zelladhärenz zeigte sich auf unbeschichtetem PPDO/Diorez 50/50 (**Abb. 4.14 A**). Die typische Morphologie der Endothelzelle war erkennbar und der Zellkern war gut abgrenzbar. Die Aktinfilamente waren deutlich im Zentrum, aber auch an den filigranen Zellausläufern ausgeprägt.

Auf allen Beschichtungen (**Abb. 4.14 B,C,D**) hatte sich ein dichtes Netzwerk ausgebildet. Dabei adhärten die Zellen auf dem FN-beschichtetem PPDO/Diorez 50/50 (**Abb. 4.14 B**) flächenhaft, eng beieinander liegend an dem Material. Das Zytoskelett war sowohl im Zellinneren als auch an den Rändern regelmäßig ausgebildet. Feine filigrane Ausläufer zu den Nachbarzellen ließen sich erkennen. Auch auf den Beschichtungen mit FNG (**Abb. 4.14 C**) und Coll (**Abb. 4.14 D**) hatte sich ein Netzwerk von HUVEC, aber weniger dicht, ausgebildet. Die Zellen hatten eine geschwungene Form, die Ränder erschienen unregelmäßig mit vielen Ausläufern.

Für PP (**Abb. 4.15**) ergab sich unter identischen Bedingungen das folgende Bild.

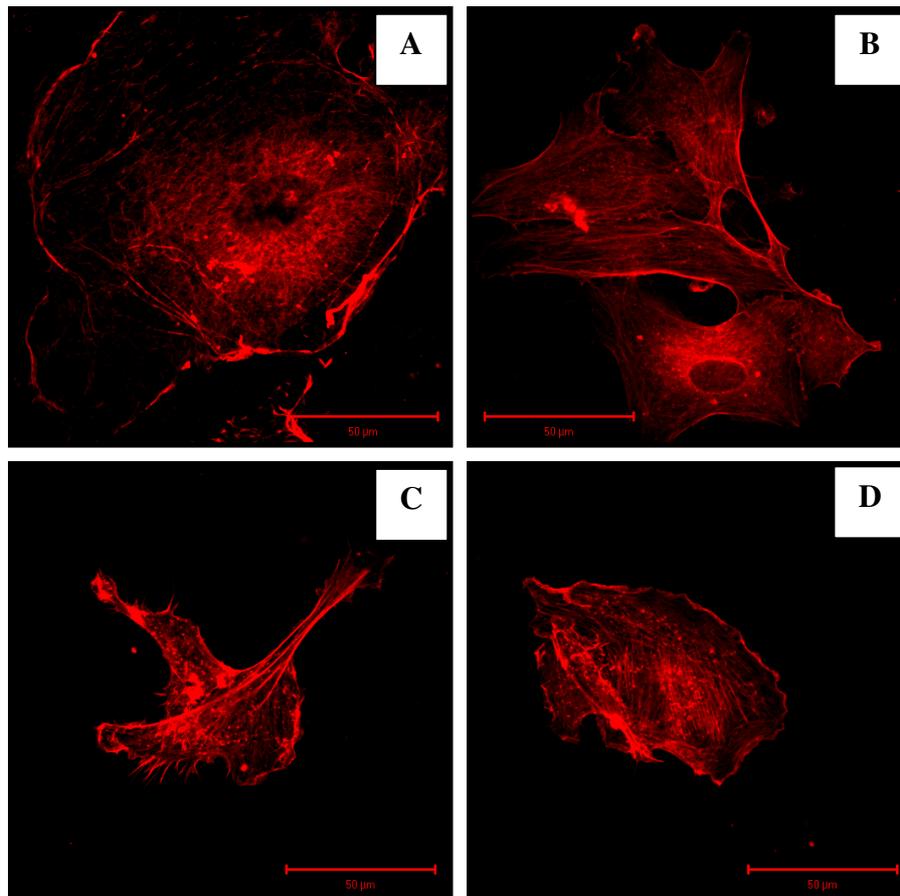


Abb. 4.15: HUVEC (25.000 Zellen/ml) mit Aktin-Färbung nach 72 h auf unbeschichtetem (A), FN- (B), FNG- (C) und Coll- (D) beschichtetem PP, Balken: 50 µm.

Auf dem reinen Polypropylen (**Abb. 4.15 A**) wiesen die Zellen eine eher kreisförmig ausgebreitete Gestalt auf. Der Zellkern war mittig erkennbar. Die Zytoskelett-Fasern waren v. a. am äußeren Rand betont.

Die FN-Beschichtung (**Abb. 4.15 B**) ließ einen epitheloidzellförmigen Phänotyp und in Verbindung stehende Zellen mit einem gut abgrenzbaren Zellkern erkennen. Auf der FNG-beschichteten Oberfläche (**Abb. 4.15 C**) hatten die Zellen feine filigrane Füßchen ausgebildet, auf der Coll-beschichteten (**Abb. 4.15 D**) zeigte sich ein vorwiegend gezackter, unregelmäßiger Zellrand.

Weiterhin wurde zur Untersuchung von fokalen Adhäsionen eine Vinculin-Färbung durchgeführt. Diese ergab keine auswertbaren Unterschiede für die betrachteten Polymere.

4.7 Antikoagulante Wirkung von HUVEC

Nach Ermittlung einer Standardkurve (Abb. 4.16) konnten die basalen und TNF- α -stimulierten Prostacyclin-Konzentrationen auf den verschiedenen Polymeren dargestellt werden (Abb. 4.17).

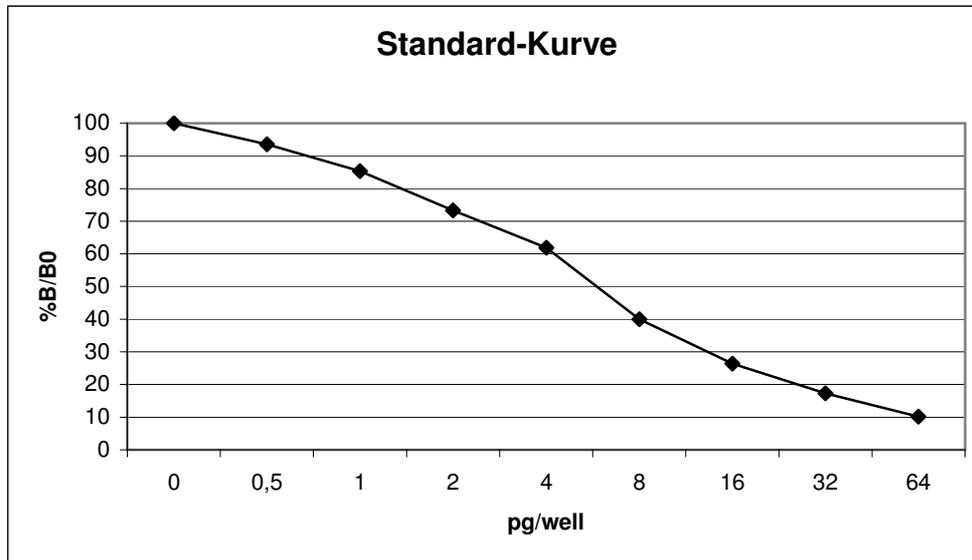


Abb. 4.16: Standard-Kurve zur Bestimmung der PGI₂-Produktion von HUVEC.

$\%B/B_0 = ((\text{Standard oder Proben OD} - \text{NSB OD}) \times 100) / (B_0 \text{ OD} - \text{NSB OD})$, B = Leerwert (Enzymsubstrat+H₂SO₄), B₀ = Nullstandard (enthält Versuchspuffer), OD = Optische Dichte, NSB = nichtspezifische Bindung.

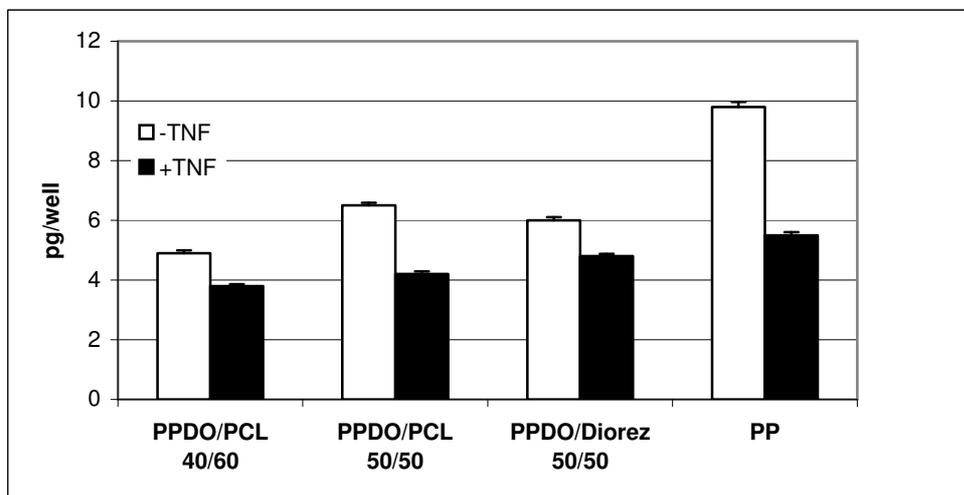


Abb. 4.17: PGI₂-Produktion von HUVEC unter basalen und stimulierten Bedingungen. **Weißer Balken:** Basale PGI₂-Produktion: HUVEC wurden für 6 Tage auf PPDO/PCL 40/60, PPDO/PCL 50/50, PPDO/Diorez 50/50 und PP kultiviert. **Schwarzer Balken:** TNF- α -Stimulation: Die Zellen wurden 24 h inkubiert, anschließend TNF- α (10 μ g/ml) für 5 h zugegeben.

Die basale Prostacyclin-Konzentration auf PPDO/PCL 40/60 betrug im Mittel 4,90 pg/well und die TNF- α -stimulierte Prostacyclin-Konzentration 3,8 pg/well. Auf PPDO/PCL 50/50 wurde

eine basale Prostacyclin-Konzentration von 6,50 pg/well und eine TNF- α -stimulierte Prostacyclin-Konzentration von 4,20 pg/well ermittelt. Auf PPDO/Diorez 50/50 betrug die basale Prostacyclin-Konzentration 6,00 pg/well und die TNF- α -stimulierte Prostacyclin-Konzentration 4,80 pg/well. Auf PP ergab sich für die basale Prostacyclin-Konzentration ein Mittelwert von 9,80 pg/well und für die TNF- α -stimulierte Prostacyclin-Konzentration ein Wert von 5,50 pg/well.

Insgesamt wurde deutlich, dass die basale Produktion bei PP, gefolgt von PPDO/PCL 50/50, PPDO/Diorez 50/50 und PPDO/PCL 40/60, am höchsten war. Nach Stimulation mit TNF- α zeigte sich auf jedem Material eine geringere PGI₂-Produktion. Diese war bei PP wiederum am höchsten und bei PPDO/PCL 40/60 erneut am geringsten. Die genauen Angaben finden sich im Anhang (E.1-E.4).

4.8 Dedifferenzierung von HUVEC (von Willebrand Faktor)

Dargestellt ist die Dedifferenzierung von HUVEC auf den verschiedenen Polymeren mit einer Immunfluoreszenzfärbung gegen den von Willebrand Faktor (vWF). Hierfür wurden HUVEC für 72 h auf PPDO/PCL 40/60, PPDO/PCL 50/50, PPDO/Diorez 50/50 und PP kultiviert.

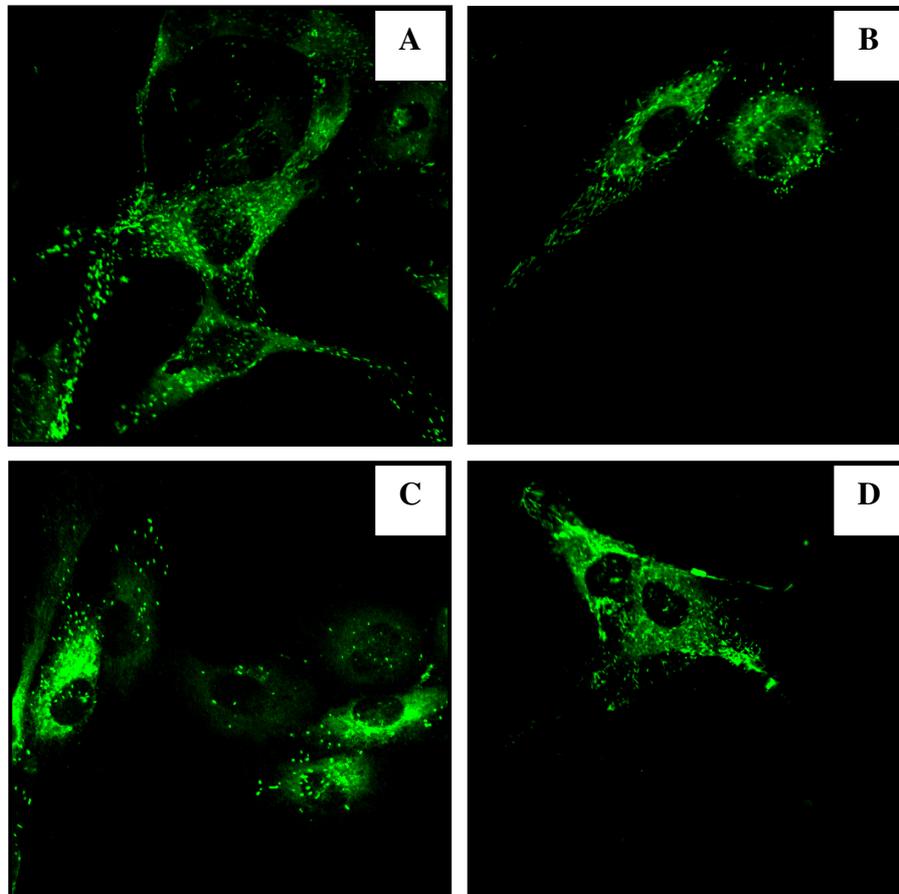


Abb. 4.18: HUVEC (25.000 Zellen/ml) mit Immunfluoreszenz-Färbung gegen vWF nach 72 h Inkubation auf PPDO/PCL 40/60 (A), PPDO/PCL 50/50 (B), PPDO/Diorez 50/50 (C) und PP (D), Vergrößerung 63x.

HUVEC zeigten auf allen Polymeren eine positive Färbung von vWF, die sich v.a. unmittelbar um den Zellkern und in den Zellausläufern befanden.

Hinsichtlich der Stärke und Ausbreitung der vWF-Expression waren zwischen den einzelnen Polymeren keine Unterschiede feststellbar.

5 Diskussion

In der chirurgischen Praxis werden häufig Fäden eingesetzt um z.B. Darm zu anastomosieren. Ein Problem der bisher vorliegenden Fadenmaterialien besteht dabei im Risiko von Nahtinsuffizienzen. Anastomoseninsuffizienzen am unteren Gastrointestinaltrakt treten z. B. mit einer Häufigkeit von 1%-12% auf (Willis und Stumpf 2004). Deren Auftreten stellt dabei eine der schwerwiegendsten Komplikationen in der Chirurgie mit unverändert hoher Morbidität und Letalität dar (Stumpf et al. 2004). Diese Insuffizienzen sind durch viele Faktoren bestimmt (Willis und Stumpf 2004), werden aber u. a. auch durch die Festigkeit des Knotens und die daraus resultierende Adaption des Gewebes beeinflusst. Da es nach anfänglicher Ödembildung des Gewebes wieder zu einer Gewebeabschwellung kommt, werden herkömmliche Fäden häufig lose und können das anastomosierte Gewebe nicht mehr ausreichend zusammen halten. Daher wäre es wünschenswert, wenn es einen Faden gäbe, mit dem diese Knotenfestigkeit adaptiert werden kann. So genannte Formgedächtnis (FG)-Materialien bieten hier die Möglichkeit, diesem Wunsch nahe zu kommen. FG-Polymere sind „stimuli-sensitive“ Materialien. Da es sich um Multiblock Copolymere mit einer phasensegregierten Struktur handelt, besitzen sie die Fähigkeit, nach Anwendung eines externen Stimulus, ihre Form zu ändern (Lendlein und Kelch 2005). Neben der Form können zusätzliche Faktoren, wie mechanische Eigenschaften, Abbaurate und Abbauverhalten sowie Biokompatibilität und Funktionalität, spezifisch und individuell kombiniert werden. Das heißt, dass diese Fäden entsprechend der jeweiligen Bedürfnisse programmiert werden können. Für die Praxis bedeutet dies ein einfacheres Handling der Nahtmaterialien. Die raumgreifende Manipulation durch den Chirurgen würde vereinfacht werden und durch eine genau einstellbare Straffung des Fadens wäre eine optimale Festigkeit des Knotens realisierbar. Diese Vorteile würden sich auch in der minimal invasiven Chirurgie zu Nutze machen lassen, da hier die Operationsverhältnisse durch eine eingeschränkte Sicht bei einem minimalen Aktionsraum noch anspruchsvoller als bei einer konventionellen Operation sind.

In Zusammenarbeit mit dem GKSS-Forschungszentrum in Teltow wurden solche Materialien auf der Basis von Monomeren (Bausteinen) bereits etablierter Nahtmaterialien entwickelt, die für den klinischen Einsatz am Darm gedacht sind. Diese Multiblock Copolymere bestanden aus Poly(p-dioxanon) (PPDO) und Poly(ϵ -caprolacton) (PCL) mit einem Blockverhältnis von 40/60 und 50/50 Masse-% und PPDO und Poly-(alkylenglycoladipinat) (Diorez) mit Blöcken im Verhältnis von 50/50 Masse-%. PPDO fungierte als Hartsegment und PCL als Schaltsegment. Während es sich bei PPDO/Diorez um ein Polymer ohne Formgedächtniseffekt handelte, verfügte das PPDO/PCL-Material bei entsprechender Programmierung über einen thermischen

FG-Effekt im Bereich der Körpertemperatur (siehe 2.1.1). Für PPDO/PCL wurden zwei unterschiedliche Zusammensetzungen an Hart- und Schaltsegment gewählt. Diese 3 verschiedenen Multiblock Copolymere sollten in ihrer Relevanz bzgl. ihres Einsatzes als neue verbesserte Nahtmaterialien überprüft werden.

Vor dem klinischen Einsatz eines solchen Fremdmaterials musste eine Testung der Biokompatibilität erfolgen. Ziel dieser Arbeit war es, diese Untersuchungen im Vergleich zu einem konventionellen Material, in diesem Fall mit Polypropylen, durchzuführen. Im speziellen sollten dabei folgende Fragen mit Hilfe eines *in vitro* Modells geklärt werden:

1. Führen die Materialien zu einem Zellschaden? Sind sie toxisch?
2. Unterscheiden sich die Polymere hinsichtlich der Adhäsion und Proliferation von HUVEC?
3. Wie muss der Zellumsatz von HUVEC auf den untersuchten Polymeren beurteilt werden?
4. Werden Unterschiede in der Adhärenz und Morphologie der Zellen beobachtet?
5. Wird die Funktionalität der Zellen auf den FG-Polymeren verändert?
6. Welche Faktoren beeinflussen die Aktin-Zytoskelett-Organisation und fokale Adhäsionskontakte?

HUVEC

Da Endothelzellen die Blutgefäße auskleiden und so in engem Kontakt mit dem Blut stehen (Jaffe et al. 1973) und bei der Wundheilung und anderen metabolischen Vorgängen eine herausragende Rolle einnehmen (siehe 1.2.1), erschienen sie als geeignete Zellkultursysteme für die Lösung der Problemstellung.

Für die Untersuchungen wurden Humane umbilikale venöse Endothelzellen (HUVEC) verwendet, da sie leicht verfügbar, frei von pathologischen Prozessen und physiologisch relevanter als viele etablierte Zelllinien sind. Sie stellen daher auch den meist genutzten Endothelzell-Typ dar (Marin et al. 2001).

Zum Einsatz kamen speziell HUVEC zwischen der dritten und achten Passage. Dabei konnten in dieser Arbeit keine auswertbaren Unterschiede in Hinblick auf Morphologie, Proliferationsverhalten oder Funktion der Zellen in Abhängigkeit von der Passage beobachtet werden. Innerhalb eines Versuchsabschnittes wurde immer eine einheitliche Passage genutzt, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen. In der Literatur wird empfohlen, die Kultivierung der Zellen auf vier Passagen zu begrenzen (Ziats und Anderson 1993).

1. Führen die Materialien zu einem Zellschaden? Sind sie toxisch?

Die Beantwortung der ersten Frage diente als Voraussetzung für die Durchführung weiterer Versuche. Denn zuerst musste getestet werden, ob die Materialien zu einem Schaden an den verwendeten Zellkulturen führen.

Hierfür kamen Untersuchungen an Materialextrakten entsprechend ISO-10993-5 zum Einsatz. Die Tests erfolgten mit 3T3 Fibroblasten (siehe 4.1). Es handelte sich hierbei um ein bewährtes Verfahren zur Zytotoxizitätsuntersuchung, da durch mitochondriale Dehydrogenasen, die nur in lebenden Zellen vorkommen, die Umwandlung von XTT in ein wasserlösliches Produkt erfolgen konnte. Dieses konnte im Zellüberstand bestimmt werden und war somit ein Hinweis für die Viabilität der Zellen.

Alle getesteten Materialien zeigten dabei keine zytotoxischen Effekte. Bei den PPDO/PCL-Polymeren war ein ähnliches Verhalten zu beobachten. Während die Vitalität der Zellen nach Kontakt zu Extrakten, die drei Tage mit dem Material inkubiert wurden, leicht anstieg, fiel sie bei den Extrakten mit sieben Tagen Materialkontakt leicht ab. Bei PPDO/Diorez 50/50 kam es beim drei-Tage-Extrakt zu einem minimalen Abfall der Zellvitalität und beim sieben-Tage-Extrakt zu einer Zunahme. Die stimulierenden bzw. inhibierenden Einflüsse der Extrakte der untersuchten Polymere auf 3T3 Fibroblasten waren jedoch nicht signifikant, so dass darauf geschlossen werden konnte, dass die Materialien keinen zytotoxischen Einfluss auf die Zellen ausübten.

Das Ergebnis bestätigte Vorversuche mit dem sog. CAM (chorioallantois membrane)-Test von Rickert et al. 2006, Rickert et al. 2003 sowie von Lendlein und Langer 2002. Dabei wurden jeweils sterilisierte Polymerproben auf die Membran des Eigelbs gelegt und dort für zwei Tage inkubiert. Anschließend wurden die Blutgefäße, die durch die Membran gut sichtbar sein sollten, betrachtet. Die Polymere waren nicht toxisch, wenn die Ausbildung von Blutgefäßen nicht beeinträchtigt worden war. In den Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es zu keiner wesentlichen Veränderung der Anzahl und der Morphologie der Blutgefäße während des Polymer-Kontaktes gekommen war. Ebenso war keine Schädigung der Gefäße aufgetreten. Dass es sich bei der Kontrolle PP um ein biokompatibles Material handelt, konnte schon in vielen Arbeiten gezeigt werden. In einer Veröffentlichung von Bellón et al. 2005 war ein Vergleich zwischen PP und Polydioxanon erfolgt mit dem Ergebnis, dass beiden Materialien ein gutes biologisches Verhalten ausgesprochen worden war.

Bezüglich des klinischen Einsatzes konnte ausgehend von den o. g. Ergebnissen vorerst angenommen werden, dass die Materialien prinzipiell keine gewebschädigende Wirkung haben.

2. Unterscheiden sich die Polymere hinsichtlich der Adhäsion und Proliferation von HUVEC?

Nachdem mit Hilfe des Vorversuches gezeigt worden ist, dass die Materialien den Zellen keinen Schaden zufügen, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, wie sich HUVEC an den Materialien anheften und wie schnell bzw. in welcher Zahl sie darauf proliferieren.

Als Methoden dienten die Neubauer-Zählkammer und das Cell Counter and Analyser System (CASY). Durch eine Trypanblau-Färbung konnten in der Zählkammer vitale von geschädigten Zellen unterschieden werden. Zum Vergleich erfolgten Messungen mit dem CASY, einer Verbindung aus dem bewährten Verfahren der Partikelmesstechnik nach dem Widerstandsprinzip und einer modernen Methode der Signalauswertung, der Pulsflächenanalyse. Während es auf dem Vergleichsmaterial PP, nach anfänglich geringster Zellzahl, innerhalb des Versuchszeitraumes zu einem kontinuierlichen Zellanstieg von HUVEC kam, war dies auf den anderen Materialien nicht der Fall (siehe 4.2). Auf PPDO/Diorez 50/50 fand sich zwar zunächst nach einem Tag die höchste Zellzahl. Allerdings kam es nach drei Tagen zu einem Zellrückgang mit einem anschließenden Wiederanstieg. Im Gegensatz dazu nahm die Zahl an HUVEC auf den PPDO/PCL-Materialien ab (PPDO/PCL 50/50) bzw. nur gering zum siebten Tag zu (PPDO/PCL 40/60). Die Zellen adhärten hier folgend in geringerer Zahl als auf PP und PPDO/Diorez 50/50.

Der Versuch zeigte, dass die Zellen auf den neuen Formgedächtnismaterialien in geringerer Zahl als auf Polypropylen adhärten. Prinzipiell war die Adhärenz von HUVEC aber auf allen Materialien ausreichend vorhanden. In einer Arbeit von Rickert et al. 2007 wurden primäre Zellkulturen des oberen Gastrointestinaltrakts von Ratten auf verschiedenen Multiblock Copolymeren und der Kontrolle Polystyrol ausgesät. Es erwies sich, dass die Zellzahl zwischen dem ersten und neunten Inkubationstag auf einer raueren Oberfläche höher war als auf einer eher glatten Oberfläche. Auf dem Kontrollmaterial Polystyrol war die Zellzahl am höchsten. Auch in der vorliegenden Arbeit war die Zellzahl auf dem Vergleichsmaterial Polypropylen im Verlauf am höchsten. Auf PPDO/Diorez, das eine höhere Oberflächenrauigkeit als die PPDO/PCL-Materialien aufweist (siehe 2.1.1), war die Zellzahl im Vergleich zu diesen höher, im Vergleich zu Polypropylen allerdings niedriger. Im Jahre 2006 berichteten Rickert et al. bereits darüber, dass die Zellzahl, nach Inkubation von primären Zellkulturen für 12 Tage auf dem PPDO/PCL-Material mit poröser Oberfläche höher war als auf dem mit eher glatter Oberfläche. In einer Arbeit von Rickert et al. 2005 wurde anhand der Versuchsergebnisse die Hypothese aufgestellt, dass zum einen eine höhere Rauigkeit der Polymeroberfläche die Adhäsion und Proliferation der Zellen nach dem adhären werden der Zellen zu unterstützen scheint. Zum anderen scheint mit

Erreichen eines konfluenten Zellschichtes die glatte Polystyroloberfläche die weitere Proliferation der Zellen zu begünstigen. Auch in dieser Arbeit kann über eine ähnliche Beobachtung berichtet werden. Anfänglich war die Zellzahl auf den Multiblock Copolymeren höher als auf PP. Da in den Versuchen eine initial höher gewählte Zellaussaatmenge gewählt worden ist, wurde der Zustand der Konfluenz bereits früher erreicht mit anschließend besserer Proliferation der Zellen auf dem glatten Material PP. Warum es allerdings auf PPDO/Diorez am siebten Tag ähnlich wie auf PP zu einem Zellanstieg gekommen ist, kann nicht allein durch die o. g. angenommene Hypothese erklärt werden. Es scheinen also noch andere Parameter das Zellwachstum und die Adhärenz zu beeinflussen. Möglicherweise spielt neben dem Einfluss der Materialien auf das Proliferationsverhalten der Zellen auch die Apoptoserate eine Rolle. In einer Arbeit von Duchrow et al. 2002 wurde beobachtet, dass Kunststoffnetze aus PP keinen wesentlichen Einfluss auf die Proliferation der untersuchten Zelllinien ausübten, hingegen die Apoptoserate der Zellen scheinbar beeinflusst wurde.

Auf die Praxis bezogen, kann darauf geschlossen werden, dass die Bildung neuer Gefäße und die Durchblutung des Wundgebietes gewährleistet ist. Auf der anderen Seite wäre eine übermäßige Proliferation auch nicht erwünscht, da sonst die Gefahr einer erhöhten Blutungsneigung bestehen würde.

3. Wie muss der Zellumsatz von HUVEC auf den untersuchten Polymeren beurteilt werden?

Im Folgenden sollte der Zellumsatz auf den Materialien bestimmt werden, um die Anzahl an vitalen Zellen nach jeweils einem, drei und sieben Tagen beurteilen zu können.

Dazu wurde zum einen die MTT- und zum anderen die LDH-Aktivität nach Zelltotalyse bestimmt. Beim MTT-Test wurde die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen erfasst, im LDH-Test konnte nach Totalyse der Zellen die LDH-Aktivität als Maß für die Integrität der Zellmembran bzw. Zellzahl genutzt werden.

Bei PPDO/Diorez 50/50 und PP stieg die MTT- und LDH-Aktivität (siehe 4.3 und 4.4) mit zunehmender Kultivierungsdauer stetig an. Dies sprach für eine hohe Proliferation mit kontinuierlicher Zellteilung. Die hohe Zellzahl gab einen Hinweis für eine gute Verträglichkeit der beiden Polymere mit HUVEC. Die Zellzahl auf den beiden PPDO/PCL-Materialien blieb mit fortschreitender Kultivierungsdauer weitgehend konstant. Das heißt, die Zellen adhärten weniger gut, behinderten sich in ihrem Wachstum aber nicht. Sie führten zu keinem Zellsterben und scheinen daher ebenfalls für den Einsatz als Biomaterialien geeignet.

Die Versuchsergebnisse ließen die Einschätzung einer hinreichenden Wundversorgung durch Gefäßneubildung zu. Für eine übermäßige Proliferation und damit eine zu hohe Blutungsgefahr in der praktischen Anwendung ergab sich kein Hinweis. In einer Arbeit von Feng et al. (2004) wurden jeweils vier Proben eines Multiblock Copolymers mit gleichen Gewichtsanteilen an Hart- und Schaltsegment im Agarose-Overlay-Test, im MTT-Test und im LDH-Test Werte bestimmt, die eine sehr gute Biokompatibilität anzeigten. Da es sich allerdings nicht um die gleichen Mischungsverhältnisse der einzelnen Segmente handelte, konnten die einzelnen Ergebniswerte nicht direkt miteinander verglichen werden.

4. Werden Unterschiede in der Adhärenz und Morphologie der Zellen beobachtet?

Weiterhin erfolgten Untersuchungen zur Adhärenz und Morphologie von HUVEC. Dabei stand die Beurteilung des Aktin-Zytoskeletts im Vordergrund, da dieses für die Stabilisierung der Zellen, das Schließen und Öffnen von Junctions, Zellform und -polarität (Stevens et al. 2000, Dudek und Garcia 2001, Sheldon et al. 1993, Lampugnani et al. 2002) sowie für den Wechsel der Zytoskelett-Organisation (Dejana 2004) eine bedeutende Rolle spielt.

Mittels FDA konnten lebende Zellen fluoreszierend mit dem Laser Scanning Mikroskop 510 dargestellt werden. Durch die Methode der Phalloidin-Färbung gelang speziell die morphologische Beurteilung des Aktins im Zytoskelett von HUVEC.

Verglich man zuerst die Anheftung zwischen HUVEC und Humanfibroblasten im FDA-Versuch (siehe 4.5.1), wurde ersichtlich, dass sich HUVEC weniger gut als Humanfibroblasten an den Oberflächen anhefteten. Dies konnte mit der physiologischen Funktion der Zellen erklärt werden. Während Fibroblasten der Faserbildung und der Synthese amorpher Interzellulärsubstanzen dienen (Lendlein 1999), haben EC die Aufgabe der Gefäßbildung und des Bluttransports, ohne dass Blutkörperchen daran adhären.

Auf PPDO/Diorez 50/50 und PPDO/PCL 50/50 (siehe 4.5.2 und 4.6.4) erschienen HUVEC in einer länglichen, spießenden Form. Dies entsprach einer fibroblastoiden, mesenchymalen Morphologie (Dejana 2004). Auf PPDO/Diorez 50/50 war der Zellkern der Endothelzelle gut abgrenzbar. Die Aktinfilamente waren sowohl im Zentrum als auch an den filigranen Zellausläufern gut ausgeprägt. Auch bei PPDO/PCL 50/50 fand sich eine ähnliche Morphologie, wobei hier die Aktinfilamente v. a. im äußeren Bereich, als Zeichen der Adhärenzbereitschaft, ausgeprägt waren. Die Morphologie auf den beiden o. g. Polymeren war typisch für proliferierende Zellen (Fagotto und Gumbiner 1996, Vinals und Pouyssegur 1999).

Auf den anderen beiden Polymeren PPDO/PCL 40/60 und PP war die Anzahl adhärenter Zellen tendenziell geringer und die Form von HUVEC eher untypisch mit einer rundlichen Gestalt. Die Zytoskelett-Fasern waren v. a. am äußeren Rand der Zellen betont. Dieser Phänotyp entsprach dem Epitheloidtyp (Dejana 2004) und ließ auf eine weniger gute Anheftungstendenz der Zellen schließen. In Übereinstimmung mit anderen Literaturquellen werden die Zellen unter diesen Bedingungen in ihrem Wachstum gehemmt und vor Apoptose geschützt (Fagotto und Gumbiner 1996, Vinals und Pouyssegur 1999).

In der Literatur wurde außerdem häufig davon berichtet, dass bei einer Vielzahl von Zelltypen, einschließlich Endothelzellen, eine Zellspreitung die Proliferation fördert, während eine runde Zellform mit einem differenzierten Phänotyp assoziiert ist (Boudreau und Jones 1999).

Zum Teil könnten sich die Ergebnisse mit der Oberflächeninhomogenität bzw. -rauigkeit der Materialien erklären lassen. Diese war zum Beispiel bei PPDO/Diorez 50/50 sehr hoch, da hier eine hohe Differenz zwischen be- und entnetztem Kontaktwinkel (siehe 2.1.1) bestand. Dadurch schienen die Zellen eher zur Adhärenz, Zellspreitung und Proliferation befähigt zu sein. Die beiden PPDO/PCL-Materialien wiesen eine weniger hohe Kontaktwinkeldifferenz und damit Oberflächenrauigkeit auf, die eine Zellanheftung weniger zu begünstigen schien. Dies wurde v. a. bei PPDO/PCL 40/60 deutlich. PP lag mit seinen Kontaktwinkeln zwischen den beiden Material-Gruppen. In Anbetracht der Proliferationsvorversuche und weiteren Literaturquellen (vgl. Rickert et al. 2007, 2005, 2003) war die Anzahl an adhärennten Zellen auf PP bedeutend höher vermutet worden. Dies hätte wiederum auch die Morphologie von HUVEC erklärt. Denn bei einem konfluenten Zelllayer weisen die Zellen einen typischen Epitheloidphänotyp auf, werden in ihrem Wachstum gehemmt und vor Apoptose geschützt. Eine Erklärung könnte in der Anfertigung der Proben liegen. Möglicherweise wurde beim letzten Waschschrift der Zellen mit PBS oder bei der Eindeckung der Zellen mit Mowiol ein Teil von HUVEC von dem Material PP versehentlich entfernt.

In der Arbeit von Rickert et al. 2005 konnten keine morphologischen Unterschiede in den Primärzellkulturen nach Besiedlung der Polymer- (PPDO/PCL) und der Kontrolloberfläche Polystyrol beobachtet werden. Auch in der Veröffentlichung von Saad et al. 1997 wurde darüber berichtet, dass nach Aussaat von humanen Fibroblasten auf verschiedenen Polymeren (z.B. PCL, Diorez) keine Unterschiede in der Morphologie der Zellen beobachtet worden waren. Möglicherweise scheinen HUVEC sich optimal den „speziellen Gegebenheiten“ hinsichtlich der Oberflächenbeschaffenheit und der Zellanzahl anzupassen und demnach auch ihre Form zu verändern.

5. Wird die Funktionalität der Zellen auf den FG-Polymeren verändert?

Prostacyclin (PGI₂)-Produktion

Eine wesentliche Aufgabe der EC besteht darin, ein Gleichgewicht zwischen pro- und antikoagulatorischen Faktoren aufrecht zu erhalten, wobei unter physiologischen Bedingungen die antithrombotische Aktivität der EC vorherrscht. Aussäen von EC auf künstlichen Substraten beeinflusst den EC-Metabolismus (Wissink et al. 2001), welcher Auswirkungen auf die Funktionalität von Endothelium haben kann. Da die PGI₂-Produktion eine wichtige Voraussetzung für deren antithrombotische Eigenschaften darstellt (Crutchley et al. 1994), wurde im Folgenden die PGI₂-Produktion untersucht.

Dies wurde durch Anwendung eines PGI₂-Assays erreicht. Hierbei handelte es sich um einen kompetitiven Enzymimmunoassay, bei dem 6-Keto-Prostaglandin F_{1α}, als stabiles Hydrolyseprodukt von PGI₂, gemessen wurde. Dadurch erfolgte die Bestimmung der basalen und der TNF- α -stimulierten Prostacyclin-Konzentration.

In der vorliegenden Arbeit (siehe 4.7) konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von PGI₂ durch HUVEC auf keinem Material aufgehoben wurde. Nach Stimulation mit TNF- α kam es überall zu einem Rückgang der Produktion von PGI₂. Insgesamt war sie bei dem Referenzmaterial PP sowohl vor als auch nach Stimulation am höchsten. Die höheren Werte gingen jedoch mit einem vermehrten Zellwachstum einher. Das einheitliche Verhalten sprach dafür, dass die Zellen auf allen Materialien ihre Funktion ungehindert ausführen konnten.

In einer Arbeit von Rickert et al. 2005 wurde die Zellproliferation und die zelluläre Aktivität von Primärzellkulturen in Kontakt mit PPDO/PCL getestet. Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede der MMP-1-, MMP-2-, MMP-9- und TIMP-Level zwischen den Primärzellkulturen, die auf der Polymeroberfläche und der Kontrolloberfläche gewachsen waren. Es wurde daher geschlossen, dass die Expression von Enzymen, die direkt in das Remodeling der Extrazellulärmatrix involviert waren, während des untersuchten Zeitraums durch PPDO/PCL nicht nachteilig beeinflusst wurden. D.h. auch hier konnte gezeigt werden, dass die Expression von Enzymen, d.h. die Zellfunktionalität, nicht negativ beeinflusst worden war.

Für die Klinik heißt das, dass die Funktionalität der Zellen, bezogen auf thrombotische und antithrombotische Funktionen, nicht beeinträchtigt wird und das Ergebnis somit für eine gute Biokompatibilität der Materialien spricht.

Dedifferenzierung

Da die Expression und Speicherung von vWF auf EC und Megakaryozyten begrenzt ist, eignet er sich als guter Marker, um Blutgefäße zu detektieren. Er beeinflusst die Adhäsion von Thrombozyten am Subendothelium und ist somit an der Hämostase beteiligt. Ebenso ist er auch ein Carrier Protein für den Faktor VIII (Ruggeri 1997). Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, ob Unterschiede bzgl. der Detektion von vWF und damit der Dedifferenzierung bestehen.

Als Methode diente die Markierung von vWF mittels Immunfluoreszenz, einem bewährten Verfahren.

Hinsichtlich der Expression von vWF konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Materialien gefunden werden. Auf allen Polymeren zeigten die HUVEC eine gleichmäßige Färbung von vWF entsprechend ihrer physiologischen Funktion.

In der Arbeit von Unger et al. (2002) zeigten sich immuncytochemisch große Unterschiede zwischen verschiedenen humanen EC in der Expression von vWF. Bei HUVEC jedoch führten generell alle Zellen zu einer vWF-Expression mit einem homogen gefärbten Bild und positiven Zellen. Dies ist als Zeichen einer guten Differenzierung der EC zu werten und steht in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit.

Die gute Dedifferenzierung spricht klinisch für eine unbehinderte Funktion der Zellen und damit dem Wundheilungsvorgang.

6. Welche Faktoren beeinflussen die Aktin-Zytoskelett-Organisation und fokale

Adhäsionskontakte?

Zusätzlich sollte untersucht werden, inwiefern neben dem Zell-Material-Kontakt selbst auch weitere Einflüsse auf die Zytoskelettstruktur und auf Adhäsionskontakte wirken.

Dafür wurden zunächst die Materialien genauer untersucht und die jeweiligen Randwinkel (siehe Tab 2.3 und Tab. 3.1) und die Oberflächenrauigkeit (siehe Abb. 2.3) bestimmt. Außerdem wurden ausgewählte Methoden wie der MTT-Test und die Immunfluoreszenz-Färbung sowohl ohne als auch mit Proteinbeschichtungen durchgeführt, um deren Einfluss auf die Adhäsion und Proliferation von HUVEC beurteilen zu können.

Die demonstrierten Daten zeigten Unterschiede in der Zellmorphologie. Die Fähigkeit von HUVEC, fokale Adhäsionskontakte zu formen, wurde nicht beeinflusst. Die Oberflächenbenetzbarkeit und -rauigkeit des Substrats und die Art der Proteinbeschichtung konnten als Faktoren, die das unterschiedliche Zellverhalten bestimmen, identifiziert werden.

Oberflächenbenetzbarkeit/-rauigkeit

Aus früheren Untersuchungen ging hervor, dass optimale Bedingungen für die Wechselwirkung mit Zellen an Materialien moderater Benetzbarkeit mit Wasser-Randwinkeln zwischen 50° bis maximal 80° gegeben sind (Tamada und Ikada 1994, Vogler 1998, Groth und Altankov 1998).

Andere Forschungsgruppen berichteten darüber, dass auf hydrophoben Polymeren die Adhäsion, Ausbreitung und Vermehrung von Zellen gehemmt wird (Grinnell et al. 1973, Tamada und Ikada 1994).

Beide Aussagen können durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zum Teil belegt werden. Bei den Untersuchungen mit silanisierten Oberflächen (siehe 4.6.2) adhärten EC bevorzugt auf hydrophilen (APS-Deckgläschen, 50°) im Gegensatz zu hydrophoben Flächen (ODS-Deckgläschen, 80°). Bei den zu untersuchenden Polymeren (siehe 4.6.4) zeigte sich auf PPDO/Diorez 50/50, das einen Kontaktwinkel von 88° besitzt, jedoch bei gleichzeitiger hoher Oberflächenrauigkeit, die höchste Proliferationsrate. Dagegen ergaben sich auf den PPDO/PCL-Polymeren mit Kontaktwinkeln um 72° weniger optimale Bedingungen für die Adhäsion und Ausbreitung von HUVEC. Dies deutet darauf hin, dass die Benetzbarkeit nur ein relevanter Parameter ist und andere Faktoren, z. B. auch die Rauigkeit der Oberflächen eine ebenso entscheidende Rolle spielen.

In annähernder Übereinstimmung mit der Arbeit von Rickert et al. 2005 kann auch mit der vorliegenden Arbeit die Hypothese, dass zum einen eine höhere Rauigkeit der Polymeroberfläche die Adhäsion und Proliferation der Zellen nach dem adhären werden der

Zellen zu unterstützen scheint und zum anderen mit Erreichen eines konfluenten Zelllayers die glatte Polystyroloberfläche die weitere Proliferation der Zellen zu begünstigen scheint, unterstützt werden.

Proteinbeschichtungen

Sowohl im MTT-Versuch (siehe 4.3) als auch bei der Immunfluoreszenzfärbung (siehe 4.6) hat sich gezeigt, dass zum einen die Viabilität, Adhärenz und Proliferation von HUVEC auf beschichteten Materialien höher als auf unbeschichteten war. Zum anderen gab es zwischen den einzelnen Beschichtungsproteinen Fibronectin, Fibrinogen und Collagen Unterschiede.

HUVEC schienen sich auf Fibronectinbeschichtungen am besten anzuheften. Vor allem auf Glas-Oberflächen (siehe 4.6.1) ließ sich eine Zunahme der Zellzahl mit einer gleichmäßigen und netzförmigen Anordnung von HUVEC erkennen, wenn eine FN-Beschichtung aufgebracht war. Dieses Ergebnis stimmte mit vorherigen Veröffentlichungen überein, in denen festgestellt wurde, dass Adhäsion, Ausbreitung und weitere Reaktionen, wie die Proliferation der Zellen, von der Menge und Konformation des Fibronectins abhängig sind (Grinnel und Feld 1981, Horbett und Schway 1988, Underwood und Bennet 1993).

Weiterhin konnten Unterschiede zwischen der FN- und FNG-Beschichtung aufgezeigt werden. Die Versuche haben veranschaulicht, dass die FN-Beschichtung die Zelladhäsion und das Ausbreiten der Zellen beeinflusst hat und zu einem eher ortsständigen Zelltyp mit einer flächenhaften Ausdehnung von HUVEC mit gleichmäßig betonten Rändern geführt hat. Das Gesamtbild sprach für ruhende Zellen. Im Gegensatz dazu rief die FNG-Beschichtung eine beweglichere Morphologie von HUVEC hervor. Die zum Teil gezackten Zellränder wiesen auf eine eher geschwungene Form der Zellen hin. Dies sprach für einen Bewegungsprozess. Die Daten stimmten mit den Beobachtungen von Dejana (1992) und Cheresch (1987), dass adsorbiertes FNG Bewegung und Wachstum von EC induziert, überein. Offensichtlich behielten die Zellen auf den FN-beschichteten Materialien ihren adhäsiven Phänotyp. Auf FNG-beschichteten Substraten zeigten sie eine veränderte Morphologie entsprechend eines motilen Phänotyps.

Die beiden o. g. Punkte galten ohne Einwand für die Versuche mit unbehandeltem Glas. Auf den mit FN-beschichteten Polymeren fand sich ein ähnliches Ergebnis. Bei den Multiblock Copolymeren und bei PP handelt es sich allerdings um eher hydrophobe Materialien. So zeigte

sich in anderen Versuchen, dass mit Zunahme der Hydrophobie von Materialien zwar eine Erhöhung der Quantität der Fibronectin-Adsorption einhergehen kann, das Protein jedoch Konformationsänderungen erlitt, welche seine Wechselwirkungen mit den Zellen behinderten (Grinnel 1987, Juliano et al. 1993). Dies bestätigte sich in dieser Arbeit. Denn zum Teil erschienen HUVEC auch auf den FN-beschichteten Polymeren mit einem veränderten morphologischen motilen Phänotyp. Allerdings konnte keine konkrete Aussage hinsichtlich Stärke der Hydrophobizität und der Beeinflussung auf FN gemacht werden. Denn PPDO/Diorez 50/50 und PP mit höheren Kontaktwinkeln (siehe 2.1.1) als die PPDO/PCL-Materialien zeigten ein flächenhafteres und ortsständigeres Zellbild als PPDO/PCL 40/60 und PPDO/PCL 50/50. Dies sprach dafür, dass auch noch andere Faktoren von Bedeutung sein müssen. Neben Fibronectin kommt es bei Kontakt der Oberflächen mit Blut, Plasma oder Gewebezellen auch zur Adsorption weiterer Proteine, wie dem Laminin und dem Vitronectin (Fabricius-Homan und Cooper 1991).

Auf den Coll-beschichteten Materialien fand sich im Gegensatz zu FN und FNG die geringste Adhärenz von HUVEC. Die Zellmorphologie glich der auf FNG mit einem veränderten motilen Phänotyp. Auf den eher hydrophoben Polymeren kam es auch hier zu einer Veränderung der Morphologie im Vergleich zu den unbeschichteten Proben.

Um die Formgedächtnispolymere in ihrem Verhalten besser einordnen zu können, wurden Vorversuche mit FN-beschichteten hydrophilen APS- und hydrophoben ODS-Modelloberflächen durchgeführt (siehe 4.6.2 und 4.6.3). Diese Versuche bestätigten, dass sich HUVEC besser an hydrophilen als an hydrophoben Materialien anhefteten und dass eine Fibronectin-Beschichtung dieses Verhalten nicht prinzipiell änderte. Man muss davon ausgehen, dass während der Proteinadsorption speziell auf ODS eine deutliche Konformationsänderung des FN erfolgte, die die relevanten Sequenzen (RGD) nicht ausreichend für die Zellrezeptoren zugänglich machte. Während sich die Zellen auf den FN-beschichteten Materialien flächig und in hoher Zahl ausgebreitet haben, besaßen HUVEC auf den anderen Beschichtungen FNG und Coll eine längliche Form mit schräg verlaufenden Zellkanten, die mit einer größeren Bewegungs- und einer geringeren Anheftungstendenz einhergegangen sind.

Abschließend wurde aus der vorliegenden Arbeit ersichtlich, dass es sich bei allen untersuchten Polymeren um biokompatible Materialien handelt. Es waren keine toxischen Wirkungen zu beobachten. Die Zellzahl und der Zellumsatz blieben etwa stabil bzw. fielen leicht ab

(PPDO/PCL-Materialien) oder stiegen wie bei dem Vergleichsmaterial PP an (PPDO/Diorez 50/50). Es wurden keine Einschränkungen in der Funktion von HUVEC gemessen. Hinsichtlich der Morphologie von HUVEC konnten Unterschiede festgestellt werden. Außerdem konnte ein Einfluss der Oberflächenbenetzbarkeit/-rauigkeit und von verschiedenen Proteinbeschichtungen herausgearbeitet werden.

Insgesamt stellen die getesteten Polymere damit viel versprechende Materialien für eine Anwendung als Implantatmaterial dar. Dabei muss beachtet werden, dass es sich bei den durchgeführten Versuchen um *in vitro* Untersuchungen handelt. Im Organismus hängt die Gewebebiokompatibilität von komplexen Wechselwirkungen ab.

6 Zusammenfassung

In der Chirurgie kommen verschiedene Nahtmaterialien zum Einsatz, um Wunden zu verschließen oder Gewebe zu adaptieren. Dabei werden in der Viszeralchirurgie spezielle Fäden für Anastomosen benötigt, an die spezifische Anforderungen gestellt werden. Neben einer ausreichenden Biokompatibilität müssen die Materialien eine gute Festigkeit aufweisen und nach einer bestimmten Zeit resorbiert sein. Trotz fortgeschrittener Entwicklung von Nahtmaterialien treten Anastomoseninsuffizienzen am unteren Gastrointestinaltrakt z. B. mit einer Häufigkeit von 1%-12% auf (Willis und Stumpf 2004). Diese sind durch viele Faktoren bestimmt, werden aber u. a. auch durch die Festigkeit des Knotens und der daraus resultierenden Gewebeadaptation beeinflusst. Nach Anschwellen des anfänglich ödematösen Gewebes wird das Nahtmaterial häufig lose und kann das zuvor adaptierte Gewebe nicht mehr in ausreichendem Maße zusammen halten. Dies führt unter Umständen zu schwerwiegenden Komplikationen mit einem hohen Risiko für den Patienten.

Daher wurden in Zusammenarbeit mit dem GKSS-Forschungszentrum in Teltow Materialien für den klinischen Einsatz am Darm auf der Basis von Monomeren (Bausteinen) bereits etablierter Nahtmaterialien entwickelt. Hierbei handelt es sich um Multiblock Copolymere mit einer phasensegregierten Struktur, die die Fähigkeit besitzen, nach Anwendung eines externen Stimulus, ihre Form zu ändern. Dieser externe thermisch induzierte Stimulus führt zum Verknoten des Materials ohne Manipulation durch den Chirurgen. Außerdem können durch spezielle Programmierungsprozesse die genaue Zugstärke, die Resorptionszeit und andere Eigenschaften exakt eingestellt werden.

Im Speziellen bestanden diese für den operativen Eingriff hergestellten Multiblock Copolymere aus Poly(p-dioxanon) (PPDO) und Poly(ϵ -caprolacton) (PCL) mit einem Blockverhältnis von 40/60 und 50/50 Masse-% und PPDO und Poly-(alkylenglycoladipinat) (Diorez) mit Blöcken im Verhältnis von 50/50 Masse-%. Das PPDO/PCL-Material verfügte bei entsprechender Programmierung über einen thermischen FG-Effekt im Bereich der Körpertemperatur.

Vor der klinischen Anwendung dieser neuen Materialien war es wichtig, Untersuchungen in Hinblick auf deren Biokompatibilität durchzuführen. Die Gewebibiokompatibilität eines Materials ist dabei das Resultat komplexer Wechselwirkungen im Organismus. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente ermöglichten es in einem *in vitro* Modell, einzelne Zell-Material-Wechselwirkungen losgelöst vom übrigen Geschehen zu untersuchen. Als Referenzmaterial für die Biokompatibilitätsuntersuchungen wurde Polypropylen, ein gebräuchliches Polymer für Nahtmaterialien, in Form von Folien eingesetzt.

Für die Biokompatibilitätstests (Zelladhäsion, -proliferation, -morphologie und funktionelle Aktivität) wurden Humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) und humane Fibroblasten, für Zytotoxizitätsuntersuchungen 3T3 Mausfibroblasten eingesetzt. Dabei kamen Verfahren wie Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer und dem CASY-System (Cell Counter and Analyser System), MTT-, XTT-, LDH-Test, FDA-Färbung, Immunfluoreszenzverfahren und ein Prostacyclin-Assay zur Anwendung.

Die Materialien zeigten im Test nach ISO 10993-5 mit 3T3 Mausfibroblasten keine zytotoxische Wirkung. Die Untersuchungen mit HUVECs und Humanfibroblasten hinsichtlich der Zell-Material-Wechselwirkung (Adhäsion, Proliferation, Funktion) belegten eine gute Biokompatibilität für PPDO/Diorez. Während die Zellzahl auf PPDO/Diorez 50/50 gegenüber PP insgesamt höher war und im Laufe der Kultivierung anstieg, blieb diese bei PPDO/PCL 50/50 und PPDO/PCL 40/60 weitgehend konstant. Auf den PPDO/PCL-Materialien kam es demzufolge zu einer geringen Adhäsion von HUVEC. Mit Hilfe von Oberflächenbeschichtungen durch Zelladhäsionsproteine wie Fibronectin, Fibrinogen oder Collagen konnte die Zelladhäsion und -proliferation auch auf den PPDO/PCL-Polymeren gesteigert werden. Morphologisch zeigten sich, bei Anfärbung von Aktin und vWF, in Abhängigkeit vom Material Unterschiede. Die Funktionalität der Zellen in Bezug auf ihre antikoagulante Wirkung war auf jedem Material vorhanden.

Die betrachteten bioabbaubaren Polymere haben sich in den durchgeführten *in vitro* Versuchen als biokompatibel und damit als vielversprechende Materialien für eine Anwendung als Implantatmaterial erwiesen. Für spezielle Applikationen ist eine Oberflächenmodifikation mit adhäsionsfördernden Substanzen notwendig. Bei einem möglichen *in vivo* Einsatz könnten sie durch eine optimale Festigkeit des Knotens und einer einstellbaren Resorptionszeit zu einer guten Wundheilung und damit einer verbesserten postoperativen Kreislaufstabilisierung und damit einer kürzeren Genesungszeit beitragen.

Abkürzungsverzeichnis

AAS	(engl.) Antibiotic-Antimycotic Solution
APS	3-Aminopropyltriethoxy-Silan
ARG	Arginin
ASP	Asparagin
BSA	bovines Serumalbumin
CASY	Cell Counter and Analyser System
CD	(engl.) cluster of differentiation
Coll	Collagen
Diorez750	Poly(alkylenglycoladipinat)
DMEM	(engl.) Dulbecco´s modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	(engl.) Endothelial Cell, Endothelzelle
ECGF	(engl.) Endothelial Cell Growth Factor
ECM	(engl.) Extracellular matrix, extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetra–Essigsäure
FDA	Fluoreszeindiacetat
FG	Formgedächtnis
(a) (b)FGF	(engl.) (acidic) (basic) Fibroblast growth factor, Fibroblastenwachstumsfaktor
FKS	Fötale Kälber Serum
FNG	Fibrinogen
FN	Fibronektin
GLY	Glycin
GMCSF	(engl.) Growth mediated Colony Stimulating Factor
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HUVEC	(engl.) Human umbilical vein endothelial cells, menschliche, venöse Nabelschnurendothelzellen
Ig	Immunglobulin
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LSM	(engl.) laser scanning microscope
MTT	3,(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid
NO	Nitritoxid

NSB	Nicht-spezifische Bindung
OD	Optische Dichte
ODS	Dimethyloctadecylchlorsilan
t-PA	(engl.) Tissue Plasminogen Activator, Gewebe-Plasminogen-Aktivator
u-PA	(engl.) Urokinase Type Plasminogen Aktivator
PAF	(engl.) platelet activating factor, Plättchen aktivierender Faktor
PAI-1	(engl.) Plasminogen Activator Inhibitor-1
PBS	(engl.) Phosphate Buffered Saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCL	Poly(ϵ -caprolacton)
PDCn	Multiblock Copolymere aus Poly(p-dioxanon)diol und Poly(ϵ -caprolacton)diol mit einem Anteil von n% Poly(p-dioxanon)diol
PDGF	(engl.) Platelet-derived growth factor, Plättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor
PECAM	(engl.) platelet endothelial cell adhesion molecule, Plättchen-Endothelzell-Adhäsionsmolekül
PGI ₂	Prostacyclin I ₂
PP	Polypropylen
PPDO	Poly(p-dioxanon)
T _{perm}	Übergangstemperatur der permanenten Form
T _{trans}	Übergangstemperatur
TCP	tissue culture polystyrene
TF	(engl.) Tissue Factor, Gewebefaktor
TGF- β	transforming growth factor β
TNF	(engl.) Tumor nekrosis factor, Tumor Nekrose Faktor
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
TxA ₂	Thromboxan A ₂
VEGF	(engl.) Vascular endothelial growth factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
vWF	von Willebrand Faktor
XTT	2,3-Bis(2-Methoxy-4-Nitro-5- Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxid

Literaturverzeichnis

Albelda SM, Oliver PD, Romer LH, Buck CA (1990) EndoCAM: A novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J. Cell. Biol.*, **110**, 1227 – 1237.

Anggard EE (1990) - The endothelium - the body's largest endocrine gland. - *J. Endocrinol.*, **127**, 371 – 375.

Bazzoni G, Dejana E, Lampugnani MG (1999) Endothelial adhesion molecules in the development of the vascular tree: the garden of forking paths. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **11**, 573 – 581.

Bellón JM, Rodríguez M, Serrano N, García-Honduvilla N, Gómez V, Buján J (2005) Polypropylene and polydioxanone show similar biomechanical efficacy in midline closure. *Cir. Esp.*, **78** (6), 377 – 81.

Black J (1992) *Biological Performance of Materials: Fundamentals of Biocompatibility*. 2nd Edition, New York, M. Dekker.

Boudreau NJ, Jones PL (1999) Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem. J.*, **339**, 481 – 488.

Braga VM (2002) Cell-cell adhesion and signalling. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **14**, 546 – 556.

Bruck SD (1980) *Properties of Biomaterials in the Physiological Environment*. Boca Raton, CRC Press.

Cheresh D (1987) Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6471 – 6475.

Clark RAF (1997) Wound repair: lessons for tissue engineering. In: principles of tissue engineering (Lanza RP, Langer R, Chick WL Hrsg.), Landes Bioscience, Georgetown, Texas, S. 737 – 782.

Crutchley D, Conanan L, Que B (1994) Effects of prostacyclin analogs on the synthesis of tissue factor, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in human monocytic THP-1 cells. *J. Pharmakol. Exp. Ther.*, **271**, 446 – 451.

Dejana E (2004) Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **5**, 261 – 270.

Dejana E (1992) Human endothelial cells express integrin receptors on the luminal aspect of their membrane. *Blood*, **80**, 437 – 446.

Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G (1995) Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am. J. Pathol.*, **146**, 56 – 66.

Dimmeler S, Zeiher AM (2000) Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *AM. Circ. Res.*, **87**, 434 – 439.

Duchrow M, Windhövel U, Bethge T, Schwandner O, Markert U, Bruch HP, Broll R (2002) Polypropylene synthetic mesh modifies growth of human cells in vitro. An experimental study. *Chirurg*, **73** (2), 154 – 160.

Dudek SM, Garcia JG (2001) Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J. Appl. Physiol.*, **91**, 1487 – 1500.

Fabricius-Homan DJ, Cooper SL (1991) A comparison of the adsorption of three adhesive proteins to biomaterial surfaces. *Journal of Biomaterials Science – Polymer Edition*, **3**, 27 – 47.

Fagotto F, Gumbiner BM (1996) Cell contact-dependent signalling. *Dev. Biol.*, **180**, 445 – 454.

Fajardo LP (1989) The complexity of endothelial cells. *Am. J. Clin. Pathol.*, **92**, 241 – 250.

Falck P (1994) Activation of human neutrophils by organic polymer surfaces. *Journal of Materials Science – Materials in Medicine*, **29**, 4007 – 4012.

Feng Y, Kelch S, Rickert D, Fuhrmann R, Franke RP, Lendlein A (2004) Biokompatible Abbaubare Formgedächtnispolymersysteme als Intelligente Implantatmaterialien. *Biomaterialien*, **5**, 159.

Gimbrone MA (1986) Vascular endothelium: nature`s blood container.- In: *Vascular Endothelium in Haemostasis and Thrombosis. Contemporary Issues in Haemostasis and Thrombosis*, Vol. 2, M.A. Gimbrone Ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 1 – 13.

Gimbrone MA, Cotran RS, Folkman J (1974) Human vascular endothelial cells in culture: growth and DNA synthesis. *J. Cell Biol.*, **60**, 673 – 684.

Grinnel F (1987) Fibronectin adsorption on material surfaces. *Annals of New York Academy of Sciences*, **516**, 280 – 290.

Grinnel F, Feld MK (1981) Adsorption characteristics of plasma fibronectin in relationship to biological activity. *Journal of Biomedical Materials Research*, **15**, 363 – 381.

Grinnel F, Milam M, Spree P (1973) Attachment of normal and transformed hamster kidney cells to substrata varying in chemical composition. *Biochemical Medicine*, **7**, 87 – 90.

Groth T (2003) Habilitationsschrift, Universität Potsdam. Die Bedeutung der Volumen- und Oberflächeneigenschaften von Biomaterialien für die Adsorption von Proteinen und nachfolgende zelluläre Reaktionen. 12 – 14.

Groth T, Altankov G (1998) Cell-surface interactions and the tissue compatibility of biomaterials. In: *New Biomedical Materials* (Harris PI and Chapman D, eds.), IOS Press, Amsterdam, 12 – 23.

Hewett PW, Murray JC (1996) Coexpression of flt-1, flt-4 and KDR in freshly isolated and cultured human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **221**, 697 – 702.

Horbett TA, Schway MB (1988) Correlations between mouse 3T3 cells spreading and serum fibronectin adsorption on glass and hydroxymethylmethacrylate-ethylmethacrylate copolymers. *Journal of Biomedical Materials Research*, **22**, 763 – 793.

Hynes RO (1992) Integrins: versatility, modulation and signalling in cell adhesion. *Cell*, **69**, 11 – 25.

Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL (1974) Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1906 – 1909.

Jaffe EA, Nachman R, Becker C, Minick C (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.*, **52**, 2745 – 2756.

Juliano DJ, Saavedra SS, Truskey GA (1993) Effect of the conformation and orientation of adsorbed fibronectin on endothelial cell spreading and the strength of adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research*, **27**, 1103 – 1113.

Kao WJ, Hubbell JA, Anderson JM (1999) Protein-mediated macrophage adhesion and activation on biomaterials: A model for modulating cell behavior. *Journal of Materials Science – Materials in Medicine*, **10**, 601 – 605.

Kirkpatrick CJ, Krump-Konvalinkova V, Unger RE, Bittinger F, Otto M, Peters K (2002) Tissue response and biomaterial integration: the efficacy of in vitro methods. *Biomolecular Engineering*, **19**, 211 – 217.

Kirkpatrick C, Mittermayer C (1990) Theoretical and practical aspects of testing potential biomaterials in vitro. *Journal of Materials Science – Materials in Medicine*, **1**, 9 – 13.

Klinkmann H (1995) Clinical relevance of biocompatibility – the necessity of a system approach. *Proceedings of 5th Dresden Polymer Discussion, Königstein*, 38 – 52.

Klinkmann H, Wolf H, Schmitt E (1984) Definition of biocompatibility. *Contributions in Nephrology*, **37**, 70 – 77.

Koslowski, Bushe, Junginger, Schwemmler (1999) *Die Chirurgie*, 4. Auflage, Schattauer, Stuttgart- New York, Seite 24 – 26.

Kumar S, West DC and Ager A (1987) Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels. *Differentiation*, **36**, 57 – 70.

Lampugnani MG, Zanetti A, Breviario F, Balconi G, Orsenigo F, Corada M, Spagnuolo R, Betson M, Braga V, Dejana E (2002) VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 1175 – 1189.

Lelkes PI (1991) New aspects of endothelial cell biology. *J. Cell. Biochem.*, **45**, 242 – 245.

Lendlein A (1999) Polymere als Implantatwerkstoffe. *Chemie in unserer Zeit*, **33** (5), 279 – 295.

Lendlein A, Kelch S (2005) Shape memory polymers as stimuli-sensitive implant materials. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, **32**, 105 – 116.

Lendlein A, Kelch S (2002) Shape memory polymers. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41** (12), 2034 – 2057.

Lendlein A, Langer R (2002) Biodegradable, elastic shape-memory polymers for potential biomedical applications. *Science*, **296** (5573), 1673 – 1676.

Lendlein A, Schmidt A, Langer R (2001) AB-polymer networks based on oligo(epsilon-caprolactone) segments showing shape-memory properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98** (3), 842 – 847.

Lewis WH (1922) Endothelium in tissue cultures. *Am. J. Anat.*, **30**, 39 – 59.

Marin V, Kalpanski G, Gres S, Farnarier C, Bongrand P (2001) Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *Journal of Immunological Methods*, **253**, 183 – 190.

Matsuda T (1989) Biological responses at non-physiological interfaces and molecular design of biocompatible surfaces. *Neprol. Dial. Transplan.*, **4**, 60 – 66.

Matter K, Balda MS (2003) Signalling to and from tight junctions. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, **4**, 225 – 236.

McNally AK, Anderson JM (1994) Complement C3 participation in monocyte adhesion to different surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **91**, 10119 – 10123.

Mühlenfeld KI (1999) Untersuchungen zur Biotransformation und Toxizität mit der Hepatomzelllinie Hep G2 im Vergleich zu Primärkulturen der Wistar ratte. Dissertation, Humboldt-Universität, Berlin, Seite 65.

Nawroth P, Handley D, Esmon C, Stern D (1986) Interleukin 1 induces endothelial cell procoagulant while suppressing cell-surface anticoagulant activity. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **83**, 3460 – 3464.

Nockemann PF (2001) Nahttechniken und Nahtmaterialien in der Viszeralchirurgie. Einhorn-Press Verlag, Reinbek.

Park JB (1995) Biomaterials – Introduction. In: *The Biomedical Engineering Handbook* (Bronzino JD, Hrsg.), CRC Press, Boca Raton, 530 – 536.

Pearson JD (1991) Endothelial cell biology. *Radiology*, **179**, 9 – 14.

Petit V, Thiery JP (2000) Focal adhesions: structure and dynamics. *Biology of the Cell*, **92**, 477 – 494.

Raghow R (1994) The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *FASEB J.*, **8**, 823 – 831.

Rickert D, Franke RP, Lendlein A, Kelch S, Moses MA (2007) Influence of the surface structure of a multiblock copolymer on the cellular behavior of primary cell cultures of the upper aerodigestive tract *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **83** (2), 558 – 569.

Rickert D, Lendlein A, Peters I, Moses MA, Franke RP (2006) Biocompatibility testing of novel multifunctional polymeric biomaterials for tissue engineering applications in head and neck surgery: an overview. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, **263**, 215 – 222.

Rickert D, Lendlein A, Kelch S, Franke RP, Moses MA (2005) Zellproliferation und zelluläre Aktivität von Primärzellkulturen der Mundhöhle nach Oberflächenbesiedlung eines abbaubaren, thermoplastischen Blockcopolymers. *Biomed. Technik*, **52**, 92 – 99.

Rickert D, Moses MA, Lendlein A, Kelch S, Franke RP (2003) The importance of angiogenesis in the interaction between polymeric biomaterials and surrounding tissue. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **28**, 175 – 181.

Ruggeri ZM (1997) von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.*, **99** (4), 559 – 564.

Ruoslahti E, Hayman EG and Pierschbacher MD (1985) Extracellular matrices and cell adhesion. *Arteriosclerosis*, **5**, 581 – 594.

Saad B, Hirt TD, Welti M, Uhlschmid GK, Neuenschwander P, Suter UW (1997) Development of degradable polyesterurethanes for medical applications: in vitro and in vivo evaluations. *J. Biomed. Mater. Res.* **36** (1) 65 – 74.

Schäffer M, Becker HD (2000) Immunregulation der Wundheilung, *HARTMANN WundForum* 1/2000.

Schulz JG (1998) Identifikation des Glykosylphosphatidylinositol-verankerten Heparan Sulfat Proteoglykans Glypikan als Toxizitäts-vermittelndem Rezeptor für β -Amyloid der Alzheimer'schen Krankheit in der neuronalen PC12 Zelllinie. Dissertation, Humboldt-Universität, Berlin, Seite 24.

Sheldon R, Moy A, Lindsley K, Shasby S (1993) Role of myosin light-chain phosphorylation in endothelial cell retraction. *Am. J. Physiol.*, **265**, L606 – L612.

Slavin J (1996) The role of cytokines in wound healing. *J. Pathol.*, **178**, 5 – 10.

Stevens T, Garcia JG, Shasby DM, Bhattacharya J, Malik AB (2000) Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **279**, L419 – L422.

Stumpf M, Klinge U, Mertens PR (2004) Anastomotic leakage in the gastrointestinal tract – repair and prognosis, *Chirurg*, **75**, 1056 – 1062.

Tamada Y, Kulik EA, Ikada Y (1995) Simple method for platelet counting. *Biomaterials*, **16** (3), 259 – 261.

Tamada Y, Ikada Y (1994) Fibroblast growth on polymer surfaces and the biosynthesis of collagen. *Journal of Biomedical Materials Research*, **28**, 783 – 789.

Thomas KA (1996) Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J. Biol. Chem.*, **271**, 603 – 606.

Underwood PA, Bennet FA (1993) The effect of extracellular matrix molecules on the in vitro behaviour of bovine endothelial cells. *Experimental Cell Research*, **205**, 311 – 319.

Unger RE, Krump-Konvalinkova V, Peters K, Kirkpatrick CJ (2002) *In Vitro* Expression of the Endothelial Phenotype: Comparative Study of Primary Isolated Cells and Cell Lines, Including the Novel Cell Line HPMEC-ST1.6R. *Microvascular Research*, **64**, 384 – 397.

Vernon RB, Sage EH (1995) Between molecules and morphology. Extracellular matrix and creation of vascular form. *Am. J. Pathol.*, **147**, 873 – 883.

Vinals F, Pouyssegur J (1999) Confluence of vascular endothelial cells induces cell cycle exit by inhibiting p42/p44 mitogen-activated protein kinase activity. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 2763 – 2772.

Vogler EA (1998) Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Advances in Colloid and interface science*, **74**, 69 – 117.

Wagner WH, Henderson RM, Hicks HE, Banes AJ and Johnson G (1988) Differences in morphology, growth rate and protein synthesis between cultured arterial and venous endothelial cells. *J. Vasc. Surg.*, **8**, 509 – 519.

Wheelock MJ, Johnson KR (2003) Cadherin-mediated cellular signalling. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **15**, 509 – 514.

Williams DF (1986) Definitions in Biomaterials. In: Proceedings of a Consensus Conference of the European Society of Biomaterials, Elsevier, Amsterdam, 3 – 5.

Willis S, Stumpf M (2004) Leakages after surgery of the lower gastrointestinal tract. *Chirurg*, **75** (11), 1071 – 1078.

Wissink M, van Luyn M, Beernink R, Dijk F, Poot A, Engbers G, Beugeling T, van Aken W, Feijen J (2001) Endothelial cell seeding on crosslinked collagen: effects of crosslinking on endothelial cell proliferation and functional parameters. *Thromb. Haemost.*, **84**, 325 – 331.

Wolf H, Karwath R, Groth Th (1988) Interaction of blood with biomedical polymers – some basic aspects. In: *Advances in Biomedical Measurements* (Carson ER, Kneppo P und Krekule I, Hrsg.), Plenum Press, New York und London, 133 – 142.

Ziats NP, Anderson JM (1993) Endothelial cell culture - Evaluation of biomaterials. *S.T.P. PHARMA SCIENCES*, **3** (1) 23 – 30.

Anhang

A Zytotoxizität

Tab. A.1.1: Anzahl von 3T3 Fibroblasten nach Inkubation mit den Extrakten der Polymerproben, bestimmt durch einen XTT-Test (August 2003).

Material	MW±SEM		
	1d	3d	7d
DMEM	1,194±0,143	1,289±0,178	1,177±0,240
PPDO/PCL 40/60	1,448±0,257	1,512±0,245	1,426±0,257
PPDO/PCL 50/50	1,146±0,149	1,340±0,099	1,227±0,152
PPDO/Diorez 50/50	1,223±0,086	1,066±0,230	1,052±0,137
CuCl ₂	1,188±0,158 0,1 mM	0,234±0,082 0,2 mM	

Tab. A.1.2: Anzahl von 3T3 Fibroblasten nach Inkubation mit den Extrakten der Polymerproben August 2003, prozentual zur Kontrolle DMEM (DMEM=100%).

Material	MW±SEM		
	1d	3d	7d
DMEM	100%±12%	100%±14%	100%±20%
PPDO/PCL 40/60	115%±15%	117%±17%	110%±13%
PPDO/PCL 50/50	104%±9%	110%±6%	108%±6%
PPDO/Diorez 50/50	106%±7%	104%±7%	106%±13%
CuCl ₂	99%±13% 0,1 mM	18%±6% 0,2 mM	

Tab. A.2.1: Anzahl von 3T3 Fibroblasten nach Inkubation mit Extrakten weiterer Polymerproben, bestimmt durch einen XTT-Test (Juli 2004).

Material	MW±SEM		
	1d	3d	7d
DMEM	0,983±0,053	1,052±0,119	1,025±0,092
PPDO/PCL 50/50	1,038±0,103	1,151±0,158	1,162±0,156
PPDO/Diorez 50/50	1,016±0,066	1,003±0,088	0,913±0,132
CuCl ₂	0,697±0,026 0,25 mM	0,535±0,011 0,5 mM	

Tab. A.2.2: Anzahl von 3T3 Fibroblasten nach Inkubation mit Extrakten weiterer Polymerproben, bestimmt durch einen XTT-Test (August 2004).

Material	MW±SEM		
	1d	3d	7d
DMEM	1,408±0,266	1,353±0,257	1,410±0,211
PPDO/PCL 50/50	1,228±0,106	1,498±0,216	1,342±0,242
PPDO/Diorez 50/50	1,430±0,275	1,065±0,119	1,265±0,090
CuCl ₂	0,869±0,022 0,25 mM	0,592±0,013 0,5 mM	

Tab. A.2.3: Anzahl von 3T3 Fibroblasten nach Inkubation mit den Extrakten der Polymerproben Juli/August 2004, prozentual zur Kontrolle DMEM (DMEM=100%).

Material	MW±SEM		
	1d	3d	7d
DMEM	100%	100%	100%
PPDO/PCL 50/50	96%±12,5%	110%±0,9%	104%±12,9%
PPDO/Diorez 50/50	103%±1,3%	87%±12%	89%±0,6%
CuCl ₂	66% 0,25 mM	6,6% 0,5 mM	

B Zelladhäsion und –proliferation von HUVEC

Tab. B.1: Zellzahl von HUVEC.

Polymer	MW±SEM		
	1d	3d	7d
Zellen/ml (1)			
PPDO/PCL 40/60	43.135	20.330	20.850
PPDO/PCL 50/50	40.300	36.410	15.000
PPDO/Diorez 50/50	68.650	38.710	55.000
PP	29.710	46.250	54.000
Zellen/ml (2)			
PPDO/PCL 40/60	80.350	10.165	21.970
PPDO/PCL 50/50	22.305	18.205	15.020
PPDO/Diorez 50/50	56.100	19.355	50.950
PP	33.150	27.125	48.170
Zellen/ml (1-2)			
PPDO/PCL 40/60	61.743±26.315	15.248±7.188	21.410±792
PPDO/PCL 50/50	31.303±12.724	27.308±12.873	15.010±14
PPDO/Diorez 50/50	62.375±8.874	29.033±13.686	52.975±2.864
PP	31.430±2.433	36.688±13.523	51.085±4.122

C Viabilität von HUVEC

Tab. C.1: Optische Dichte der Probenlösungen bei 562 nm (MTT-Test an Zellen auf Oberflächen ohne Beschichtungen).

Polymer	MW±SEM		
	1d	3d	7d
MTT (1)			
PPDO/PCL 40/60	0,046	0,046	0,056
PPDO/PCL 50/50	0,043	0,034	0,058
PPDO/Diorez 50/50	0,039	0,048	0,105
PP	0,034	0,050	0,057
MTT (2)			
PPDO/PCL 40/60	0,052	0,051	0,044
PPDO/PCL 50/50	0,054	0,035	0,039
PPDO/Diorez 50/50	0,041	0,054	0,098
PP	0,035	0,051	0,102
MTT (1-2)			
PPDO/PCL 40/60	0,049±0,004	0,048±0,004	0,050±0,008
PPDO/PCL 50/50	0,049±0,008	0,035±0,001	0,049±0,013
PPDO/Diorez 50/50	0,040±0,001	0,051±0,004	0,102±0,005
PP	0,035±0,001	0,051±0,001	0,080±0,032

Tab. C.2: Optische Dichte der Probenlösungen bei 562 nm (MTT-Test an Zellen auf Oberflächen mit verschiedenen Beschichtungen).

Polymer	MW±SEM			
	ohne Beschichtung	FN	FNG	Coll
MTT (1)				
PPDO/PCL 40/60	0,104	0,278	0,166	0,065
PPDO/PCL 50/50	0,078	0,092	0,032	0,046
PPDO/Diorez 50/50	0,042	0,045	0,110	0,226
PP	0,005	0,237	0,031	0,075
MTT (2)				
PPDO/PCL 40/60	0,085	0,292	0,177	0,083
PPDO/PCL 50/50	0,082	0,096	0,032	0,045
PPDO/Diorez 50/50	0,036	0,051	0,112	0,237
PP	0,005	0,250	0,031	0,077
MTT (1-2)				
PPDO/PCL 40/60	0,095±0,013	0,285±0,010	0,172±0,008	0,074±0,013
PPDO/PCL 50/50	0,079±0,003	0,093±0,003	0,031±0,000	0,045±0,001
PPDO/Diorez 50/50	0,039±0,004	0,048±0,004	0,111±0,001	0,232±0,008
PP	0,006±0,000	0,245±0,009	0,032±0,000	0,077±0,001

D LDH-Aktivität**Tab. D.1:** Optische Dichte der Probenlösungen von Zellen auf den verschiedenen Polymeren.

Polymer	MW±SEM		
	1d	3d	7d
LDH (1)			
PPDO/PCL 40/60	0,009	0,031	0,004
PPDO/PCL 50/50	0,008	0,045	0,033
PPDO/Diorez 50/50	0,032	0,067	0,058
PP	0,037	0,033	0,032
LDH (2)			
PPDO/PCL 40/60	0,010	0,005	0,008
PPDO/PCL 50/50	0,019	0,006	0,011
PPDO/Diorez 50/50	0,016	0,026	0,099
PP	0,004	0,015	0,144
LDH (3)			
PPDO/PCL 40/60	0,007	0,003	0,002
PPDO/PCL 50/50	0,007	0,003	0,006
PPDO/Diorez 50/50	0,011	0,035	0,068
PP	0,001	0,001	0,003
LDH (1-3)			
PPDO/PCL 40/60	0,009±0,009	0,013±0,011	0,005±0,005
PPDO/PCL 50/50	0,011±0,005	0,018±0,020	0,017±0,017
PPDO/Diorez 50/50	0,020±0,012	0,043±0,015	0,089±0,029
PP	0,014±0,010	0,016±0,009	0,060±0,019

E Antikoagulante Wirkung von HUVEC

Tab. E.1: Prostacyclin (PGI₂)-ELISA-OD bei 450 nm.

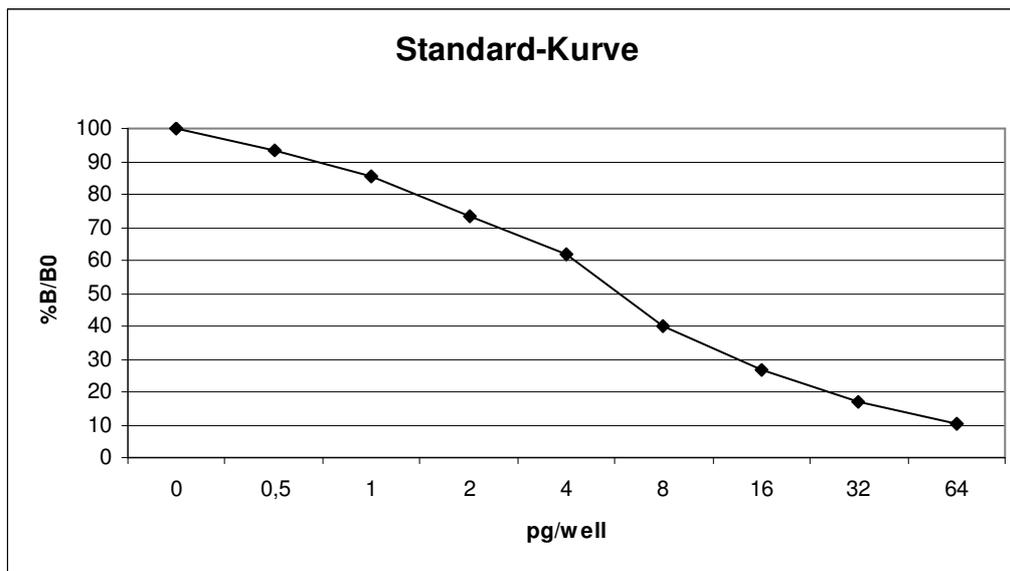
Polymer -TNF	OD/450 nm								
	PPDO/PCL 40/60	0,504	0,472	0,600	0,491	0,639	0,580	0,720	0,619
PPDO/PCL 50/50	0,407	0,489	0,552	0,580	0,501	0,627	0,547	0,341	0,634
PPDO/Diorez 50/50	0,381	0,510	0,512	0,443	0,534	0,515	0,657	0,611	0,737
PP	0,200	0,273	0,356	0,178	0,348	0,586	0,590	0,563	0,544
+TNF									
PPDO/PCL 40/60	0,604	0,590	0,578	0,632	0,643	0,632	0,750	0,675	0,707
PPDO/PCL 50/50	0,470	0,481	0,564	0,620	0,668	0,700	0,678	0,700	0,706
PPDO/Diorez 50/50	0,535	0,429	0,543	0,592	0,592	0,638	0,640	0,680	0,716
PP	0,400	0,461	0,487	0,499	0,607	0,664	0,679	0,617	0,658

Tab. E.2: %B/B₀ ($\%B/B_0 = ((\text{Standard- oder Proben OD} - \text{NSB OD}) \times 100) / (\text{B}_0 \text{ OD} - \text{NSB OD})$), OD = Optische Dichte, NSB = nicht-spezifische Bindung, NSB=0,014, B₀ OD=1,051).

Polymer -TNF	%B/B ₀								
	PPDO/PCL 40/60	47,25	44,17	56,51	46,00	60,27	54,58	68,08	58,34
PPDO/PCL 50/50	37,90	45,81	51,88	54,58	46,96	59,11	51,40	31,53	59,79
PPDO/Diorez 50/50	35,39	47,83	48,02	41,37	50,15	48,31	62,01	57,57	69,72
PP	17,94	24,98	32,98	15,82	32,21	55,16	55,55	52,94	51,11
+TNF									
PPDO/PCL 40/60	56,90	55,55	54,39	59,60	60,66	59,60	70,97	63,74	66,83
PPDO/PCL 50/50	43,97	45,03	53,04	58,44	63,07	66,15	64,03	66,15	66,73
PPDO/Diorez 50/50	50,24	40,02	51,01	55,74	55,74	60,17	60,37	64,22	67,70
PP	37,22	43,11	45,61	46,77	57,18	62,68	64,13	58,15	62,10

Tab. E.3: MW±SEM %B/B₀.

Polymer	MW±SEM %B/B ₀	
	-TNF	+TNF
PPDO/PCL 40/60	55,80±0,091	60,92±0,056
PPDO/PCL 50/50	48,77±0,097	58,51±0,094
PPDO/Diorez 50/50	51,15±0,109	56,13±0,086
PP	37,63±0,169	52,99±0,103

**Abb. E.1:** Standard-Kurve zur Ablese der PGI₂-Produktion von HUVEC.

$\%B/B_0 = ((\text{Standard oder Proben OD} - \text{NSB OD}) \times 100) / (B_0 \text{ OD} - \text{NSB OD})$, B = Leerwert (Enzymsubstrat+H₂SO₄), B₀ = Nullstandard (enthält Versuchspuffer), OD = Optische Dichte, NSB = nichtspezifische Bindung.

Tab. E.4: pg/well (abgelesene Werte aus Standardkurve).

Polymer	Pg/well (abgelesene Werte aus Standardkurve)	
	-TNF	+TNF
PPDO/PCL 40/60	4,90	3,80
PPDO/PCL 50/50	6,50	4,20
PPDO/Diorez 50/50	6,00	4,80
PP	9,80	5,50

Erklärung

„Ich, Claudia Weckwerth, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*In vitro* Untersuchungen zur Wechselwirkung von Endothelzellen mit Multiblock Copolymeren für Anwendungen als Implantatmaterial“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich danke Frau Dr. rer. nat. Barbara Seifert für die hervorragende Betreuung während der Bearbeitungszeit. Vor allem möchte ich mich für die entgegengebrachte fachliche und seelische Unterstützung, Geduld und Hilfestellung bei Problemen bedanken.

Herrn PD Dr. med. Jörg-Peter Ritz gilt mein Dank für seine kompetente und unkomplizierte Unterstützung bei der Fertigstellung der Dissertation an der Charité Berlin – Campus Benjamin Franklin sowie bei der Anfertigung weiterer wissenschaftlicher Beiträge. Herrn Prof. Dr. H. J. Buhr danke ich für die Betreuung während der Anfänge der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. A. Lendlein möchte ich für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten im Institut für Polymerforschung durchzuführen, danken.

Herrn Dr. Steffen Kelch danke ich für die Bereitstellung der Polymere und für sein Talent, komplizierte Sachverhalte verständlich zu erläutern.

Weiterhin möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Angela Ritschel für die durchgeführten Untersuchungen bedanken.

Frau Ruth Hesse danke ich für ihre ausgezeichnete Organisation im Labor und ihre Unterstützung bei auftretenden Problemen. Außerdem trug sie, Dank ihrer herzlichen und entgegenkommenden Art, sehr zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre bei.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Schwester Isabelle, die mit zahlreichen Vorschlägen und Lösungsmöglichkeiten zum Gelingen des praktischen und schriftlichen Teils beitrug.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich in jeder Lebensphase unterstützt und ermutigt haben.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen / wissenschaftliche Beiträge

In Vorbereitung:

C. Weckwerth, B. Seifert, M. Zierke, S. Kelch, C. Reißfelder, A. Lendlein, H.-J. Buhr, J.-P. Ritz

In vitro Untersuchungen zur Wechselwirkung von Endothelzellen mit Multiblock Copolymeren für Anwendungen als Implantatmaterial

B. Seifert, C. Weckwerth, M. Zierke, S. Kelch, A. Lendlein, Ch. Isbert, H.-J. Buhr

Biodegradable shape-memory polymers as implant materials

Cytotherapy 6 (2004) 3: 257

C. Weckwerth, B. Seifert, M. Zierke, S. Kelch, C. Reißfelder, A. Lendlein, H.-J. Buhr, J.-P. Ritz

In vitro Untersuchungen der Wechselwirkung von Endothelzellen mit Multiblock Copolymeren zur Anwendung als Implantatmaterial

126. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie 28.04.-01.05.2009, München

B. Seifert, C. Weckwerth, M. Zierke, S. Kelch, Ch. Reißfelder, A. Lendlein, H.-J. Buhr

Biodegradable multi-block polymers in contact with blood and tissue cells

23. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Mikrozirkulation und Hämorheologie 04.-06.11.2004, Dresden

B. Seifert, C. Weckwerth, M. Zierke, S. Kelch, Ch. Reißfelder, A. Lendlein, H.-J. Buhr

Bioabbaubare polymere Nahtmaterialien im Kontakt zu Gewebezellen und Blut

Tagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien 08.-10.10.2004, Berlin

B. Seifert, C. Weckwerth, M. Zierke, S. Kelch, Ch. Reißfelder, A. Lendlein, H.-J. Buhr

Evaluation of biodegradable shape-memory polymers as implant materials

Polydays 04.-06.10.2004, Potsdam

B. Seifert, C. Weckwerth, M. Zierke, S. Kelch, A. Lendlein, C. Isbert, H.-J. Buhr

Biodegradable shape-memory polymers as implant materials

Strategies in Tissue Engineering, Internationale Konferenz, Würzburg, 16.-19.06.2004