

Abschlussbericht zum Projekt
**„Erzeugung mikrostrukturierter Vliese auf der Basis von Collagen für gerichtetes
zelluläres Wachstum in Tissue Engineering Applikationen“**
im Rahmen des Forschungsstipendiums der Max-Buchner-Forschungsstiftung
Projektnummer 2887

Dipl.-Ing. (FH) Steffen Berger, Prof. Dr. Katrin Salchert

Hochschule Lausitz (FH), Fakultät für Naturwissenschaften,
Großenhainer Straße 57, 01968 Senftenberg

1 Einleitung

Die *in vitro* Adhäsion, Proliferation und Migration von Zellen wird neben der Bereitstellung von Adhäsionsproteinen, der Wirkung von Wachstumsfaktoren und der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten entscheidend durch das Vorhandensein räumlicher Restriktionen gesteuert. Geometrische Limitationen in dreidimensionalen Zellkultivierungssubstraten führen zur spezifischen Organisation und Ausrichtung der Zellen, die im Vergleich zu planaren Trägermaterialien die Bildung einer nativen Zellmorphologie und dadurch eine Verbesserung der Zellfunktion ermöglichen. Darüber hinaus kann mittels spezifischer geometrischer Vorgaben eine Zellmigration und damit verbunden eine gerichtete Reorganisation von Geweben im Sinne des Tissue Engineering induziert werden. Neben der rein räumlichen Beeinflussung des zellulären Verhaltens ermöglicht die Verwendung von Extrazellulärmatrixbestandteilen in artifiziellen Matrices nicht nur eine gezielte Beeinflussung des zellulären Verhaltens, sondern auch eine Einstellung von *in vivo* Bedingungen zur Verbesserung der *in vitro* Zellfunktion und stellt damit einen weiteren Schritt zur Herstellung vollständig funktioneller Gewebeersatzmaterialien dar.

Dieses Projekt zielt auf die Entwicklung geometrisch wie auch kompositorisch spezifischer Membranen bestehend aus fibrillärem Collagen Typ I ab, mit denen die Proliferation und Organisation humaner Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) gesteuert werden soll. Dafür wurde ein Druckumformverfahren zur Erzeugung von oberflächlichen Mikrostrukturen in Form von Streifen mit Breiten von 10 µm – 40 µm und Tiefen von 10 µm und 20 µm entwickelt, bei dem nach einem dreistufigen Prozess die Mikrostreifen von einem mikrostrukturierten Polystyrol-Master in eine vorgequollene Collagenmembran übertragen werden. Mit diesen collagenbasierten mikrostrukturierten Trägern wurde die Fähigkeit der zellulären Ausrichtung von HUVEC parallel zur Mikrostrukturierung untersucht und die Verteilung der Zellausrichtungswinkel bewertet. Neben der geometrischen Gestaltung wurden unstrukturierte Collagenmembranen mit dem signal- und adhäsionsvermittelnden Glycosaminoglycan Hyaluronsäure ausgestattet und dessen Einfluss auf das initiale Adhäsions- und das Proliferationsverhalten der HUVEC ermittelt.

2 Ergebnisse

2.1 Mikrostrukturierung von Collagenmembranen

Pseudo-dreidimensionale Collagenmatrices werden in einem dreistufigen Verfahren erzeugt, bei dem von einem Siliziumwafer vorgegebene Streifenstrukturen mittels Soft-Lithographie auf Polydimethylsiloxan (Sylgard 184) und im Anschluss durch ein Thermoformverfahren auf Polystyrol übertragen werden. Während des nachfolgenden Druckumformprozesses werden Mikrogräben invers

in vorgequollene Collagenmembranen übertragen und zur Stabilisierung des dreidimensional strukturierten, fibrillären Collagens *in situ* mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid vernetzt.

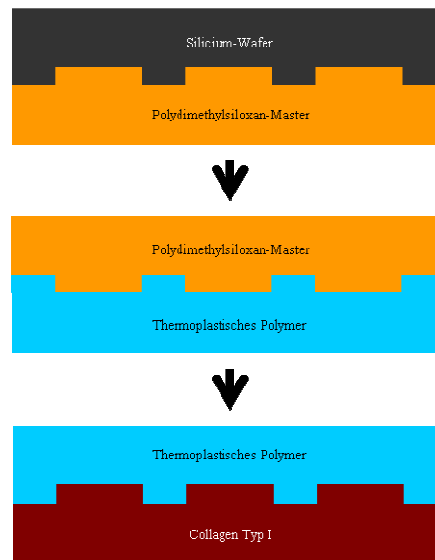


Abb. 1: Schematische Beschreibung der Herstellung mikrostrukturierter Collagenmatrices

Die Bewertung der erzeugten geometrischen Formen hinsichtlich der Genauigkeit der Grabenbreite und -tiefe sowie der Stabilität der Polystyrol-Stempel erfolgte durch Auswertung am Rasterelektronenmikroskop (Phillips XL 30) nach vorheriger Quellung der Collagenmatrices für 24 Stunden in 1 x PBS und anschließender Trocknung (Abb. 2).

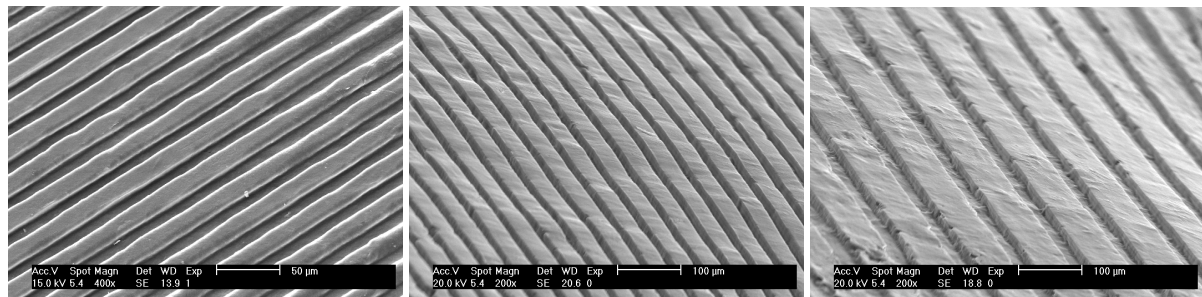


Abb. 2: REM-Aufnahmen von mikrostrukturierten Collagenmatrices: Links: Grabenbreite und -tiefe 10 µm; Mitte: Grabenbreite und -tiefe 20 µm; Rechts: Grabenbreite 40 µm, Grabentiefe 20 µm

Durch das Prägeverfahren konnten Mikrogräben mit (a) einer Breite und Tiefe von 10 µm, (b) mit einer Breite und Tiefe von 20 µm und (c) einer Breite von 40 µm und einer Tiefe von 20 µm erzeugt werden. Die Übertragung der Grabenstrukturen führte teilweise zu nicht vollständig rechteckigen Grabenkanten, während auftretende Abweichungen der Grabenbreite und -tiefe maximal 10 % der vorgegebenen Werte betragen.

2.2 Bewertung der Zellkernausrichtung von HUVEC auf mikrostrukturierten Collagenmembranen

Die Erzeugung von Mikrostrukturen in Form von Gräben mit Grabenbreiten von 10 µm – 40 µm und -tiefen von 10 µm und 20 µm und deren Einfluss auf die Zellmorphologie und damit auf das zelluläre Verhalten stellen ein Kernstück des Gesamtprojekts dar. Der Einfluss dieser Mikrogräben auf die

räumliche Ausrichtung von HUVEC entlang der Grabenlängsachse wurde in nachfolgenden Untersuchungen bewertet. Dafür wurden Collagenmembranen (20 mg, 10 x 10 mm²) unter Sterilbedingungen mit Mikrogräben unter *in situ*-Vernetzung mit EDC mit folgenden Dimensionen erzeugt (Grabenbreite/Grabentiefe): 10 µm/10 µm, 20 µm/20 µm, 40 µm/20µm. Anschließend wurden 5·10³ HUVEC auf der Oberfläche ausgesät, für 48 h in Endothelzellmedium kultiviert und zur fluoreszenzmikroskopischen Erfassung der Zellmorphologie mit Phalloidin-TRITC gefärbt. Für die Bewertung der Zellausrichtung wurde grafisch eine Gerade durch die zwei Punkte der maximalen Ausdehnung der Zellmembran gezeichnet und deren Winkel zur Längsachse der Mikrogräben ermittelt (Abb. 3).

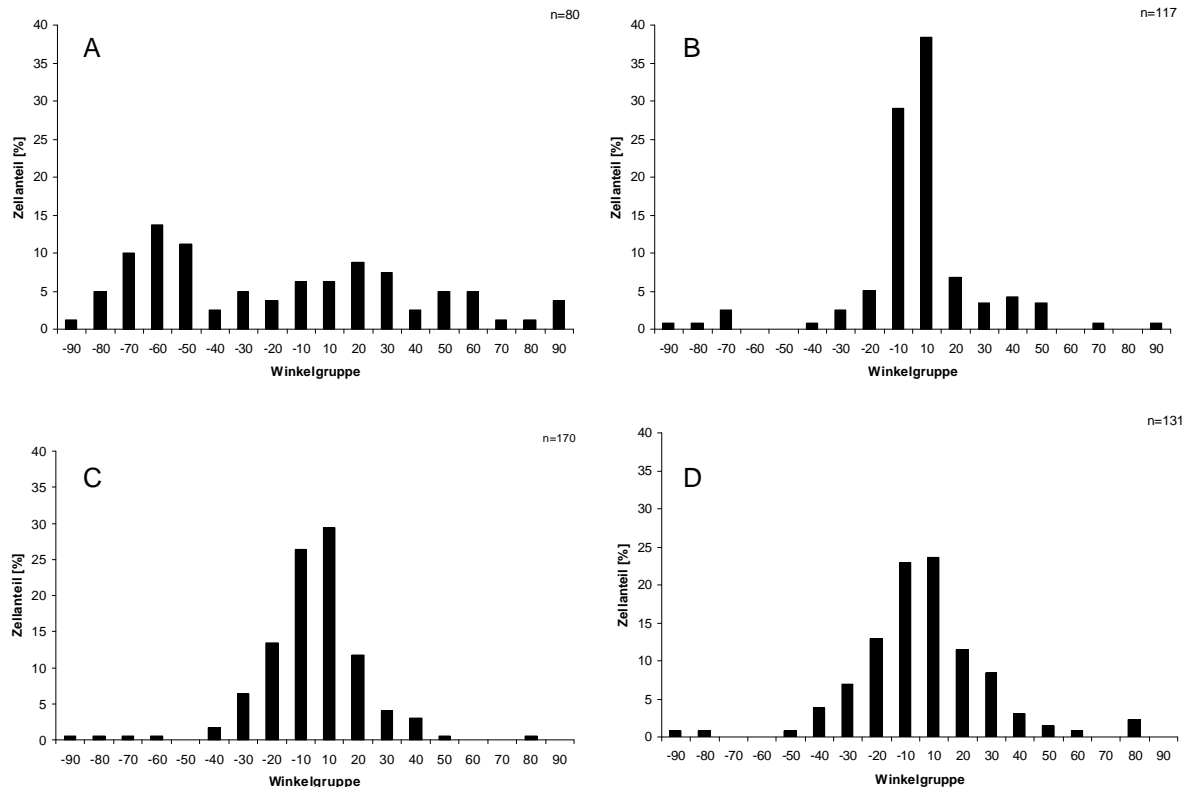


Abb. 3: Beeinflussung der Zellmorphologie von HUVEC durch Collagenmembranen mit Mikrogräben nach 48 h Kultivierung; (A) ohne Mikrogräben; (B) Grabenbreite 10 µm, Grabentiefe 10 µm; (C) Grabenbreite 20 µm, Grabentiefe 20 µm; (D) Grabenbreite 40 µm, Grabentiefe 20 µm

HUVEC zeigten in den Untersuchungen eine im Vergleich zu unstrukturierten Collagenmembranen deutliche Ausrichtung des Zellkörpers. Mit sinkender Grabenbreite konnte darüber hinaus ein Anstieg der Zellzahl mit Ausrichtungswinkeln im Bereich von -10° - +10° und eine Verschmälerung der Zellverteilung beobachtet werden.

2.3 Inkorporation von Hyaluronsäure und Bewertung des Einflusses auf die Zelladhäsion und -proliferation

Mit der biochemischen Komposition collagenbasierender Scaffolds durch Inkorporation von Hyaluronsäure (HA) sollte weiterführend die Möglichkeit zur Steuerung des zellulären Verhaltens ermittelt werden. Da die native Fixierung der HA an Collagen durch nicht-kovalente Wechselwirkungen geprägt ist, muss bei der Verwendung von Collagen-HA-Konstrukten für die Zellkultivierung mit einer HA-Freisetzung gerechnet werden. Zur Quantifizierung fixierter Hyaluronsäure in Collagenmembranen

wurde der Elson-Morgan-Assay verwendet, wobei initiale Experimente auf die Bewertung der Zugänglichkeit der Hyaluronsäure in der komplexen Probenmatrix abzielten. Dazu wurden mit Hyaluronsäure kofibrillierte Collagenmembranen mit HA-Konzentrationen im Bereich von 100 µg/mg – 1000 µg/mg sowohl nach Vernetzung mit EDC als auch unvernetzt einem proteolytischen Verdau mittels Papain zur Fragmentierung von Collagen unterzogen. Die Untersuchungen zeigten, dass die Zugänglichkeit der HA von der Vernetzung der Collagen-HA-Präparate mit EDC und der enzymatischen Spaltung mittels Papain abhängt und die Quantifizierung der HA in unvernetzten Collagen-HA-Membranen nach Papainbehandlung bzw. in EDC-vernetzten Präparaten ohne Papainverdau durchgeführt werden muss (Ergebnisse nicht gezeigt).

Weiterführende Untersuchungen zur Quantifizierung irreversibel fixierter HA in Collagensubstraten beinhalteten die Cofibrillogenese von Collagen (Masse = 1 mg) mit Hyaluronsäurekonzentration im Bereich von 0 µg HA/mg Collagen – 1000 µg/mg und deren anschließende Trocknung zu einer Membran. Mit dem Ziel der Steigerung irreversibel inkorporierter HA wurden Collagen-HA-Membranen nach der Trocknung mit EDC behandelt. Die Präparate wurden für einen Zeitraum von 0 – 7 Tagen in DMEM (10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 0,1 % NaN₃) bei 37 °C zur Freisetzung von nicht gebundener Hyaluronsäure inkubiert. Die Quantifizierung der Hyaluronsäure erfolgte nach enzymatischer Hydrolyse mit Papain und nachfolgender saurer Gasphasenhydrolyse, mittels Elson-Morgan-Assay (Abb. 4).

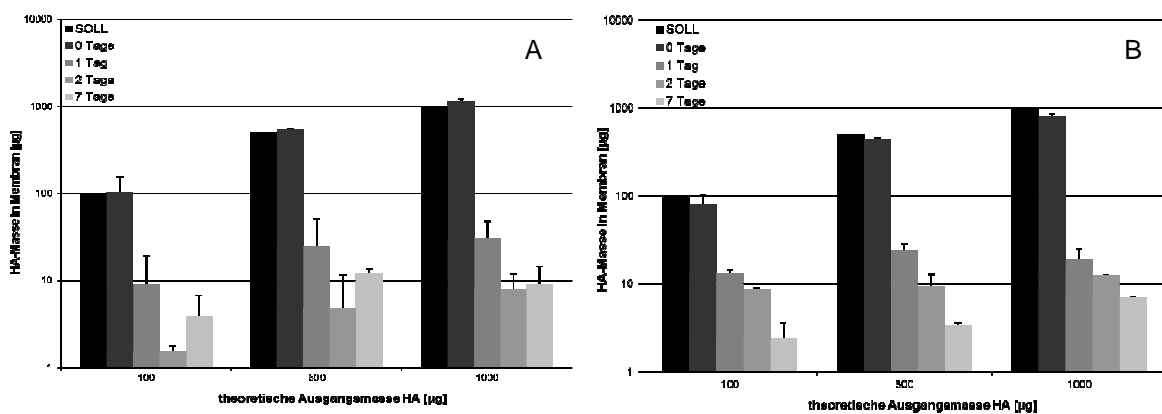


Abb. 4: Untersuchung der Freisetzungskinetik von HA: (A) unvernetzte Collagenmembranen nach Papainbehandlung, (B) EDC-vernetzten Collagenmembranen; Zeitraum 0 – 7 Tagen

Über den Inkubationszeitraum von 7 Tagen ist bei allen untersuchten Präparaten eine stetige Abnahme der HA-Konzentration in der Collagenmembran erkennbar. Die höchste irreversibel fixierte Hyaluronsäuremenge ohne EDC-Vernetzung von 9,1 µg/mg (0,8 % vom Anfangswert) konnte in Membranen mit einer HA-Ausgangskonzentration von 1000 µg/mg erreicht werden. Die Verringerung der eingesetzten HA-Konzentration auf 500 µg führte nach 7-tägiger Inkubation zu einem Rückgang der inkorporierten HA auf 11,8 µg/mg (2,2%). Eine weitere Senkung der Anfangskonzentration der HA auf 100 µg/mg führte unter den gegebenen Bedingungen zum Verbleib von 3,9 µg HA /mg Collagen (3,9 %) in den erzeugten Membranen. Es kann demnach festgestellt werden, dass ab einer Anfangskonzentration von 500 µg HA je 1 mg Collagen die Menge irreversibel fixierter HA in Collagenmembranen nach 7 Tagen Inkubation gleich bleibt. Durch die kovalente Vernetzung der Präparate mittels EDC konnte im Vergleich zur Verwendung unvernetzter Membranen keine Veränderungen in der Menge irreversibel fixierbarer Hyaluronsäure beobachtet werden.

In Untersuchungen zur Beeinflussung der Hyaluronsäure auf die initiale Adhäsion und das Proliferationsverhalten von primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) wurden Collagenmembranen (0,5 mg) mit HA-Konzentrationen im Bereich von 10 µg/mg – 500 µg/mg erzeugt. Zusätzlich wurde der Einfluss einer kovalenten Vernetzung der Membranen mit EDC

bewertet. Neben der initialen Adhäsion im Zeitraum von 5 min – 60 min, wurde das Proliferationsverhalten der HUVEC im Zeitraum von 1 Tag – 7 Tagen untersucht. (Abb. 5).

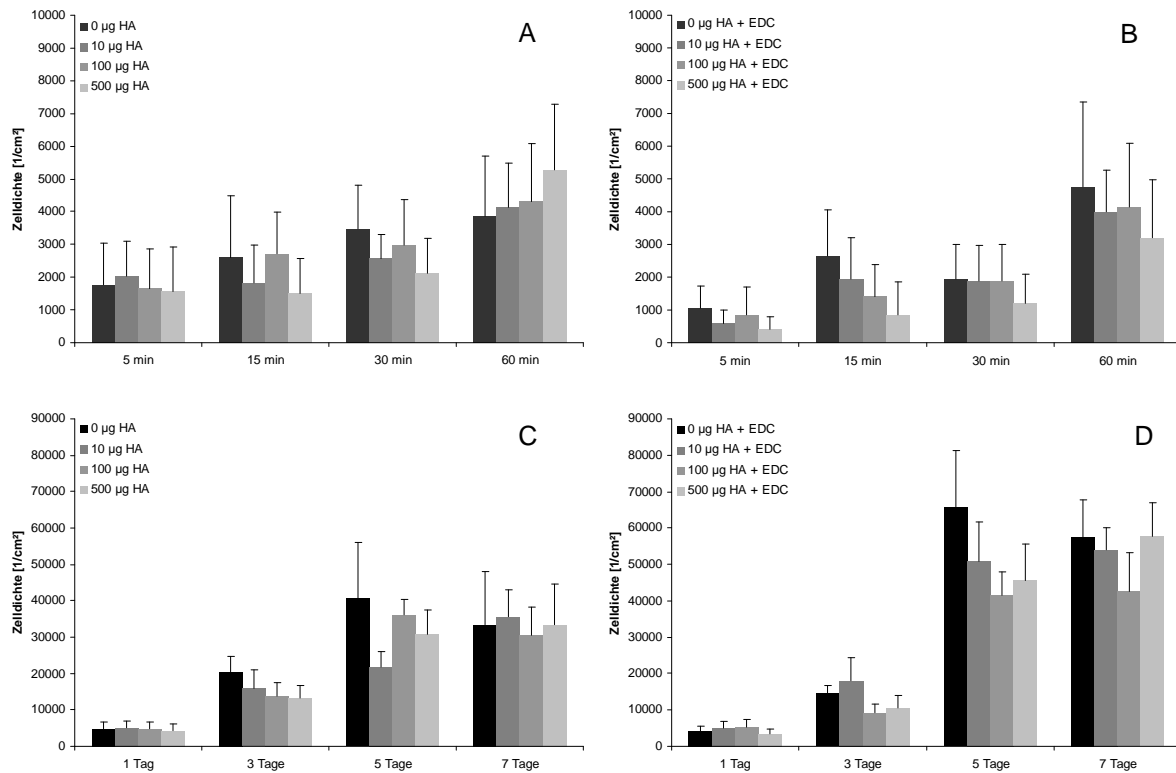


Abb. 5: Initiales Adhäsionsverhalten (A, B) und Proliferationsverhalten (C, D) von HUVEC auf Collagenmembranen mit Hyaluronsäuregehalten von 0 µg/mg – 500 µg/mg (A, C) ohne EDC-Vernetzung und (B, D) mit EDC-Vernetzung; Anfangszellzahl je Membran $2 \cdot 10^4$ HUVEC

Bei der Verwendung unvernetzter Collagen-HA-Membranen konnte zwar ein verzögerter Anstieg der Geschwindigkeit der initialen Adhäsion mit steigender HA-Konzentration über den Untersuchungszeitraum festgestellt werden, die Zelldichte nach 60 min Adhäsionszeit war jedoch bei Membranen mit der höchsten HA-Anfangskonzentration von 500 µg/mg am höchsten. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass sich die initiale Zelladhäsion von HUVEC im Zeitraum von 5 min – 30 min mit steigender Konzentration an HA in den Membranen verschlechtert, jedoch nach 60 min eine Adaption der Zellen an das Substrat eintritt und sogar die Adhäsion befördert. Werden Collagen-HA-Membranen mit EDC vernetzt, konnte neben einer allgemein verschlechterten initialen Adhäsion im Vergleich zu unvernetzten Substraten, dieses Verhalten nicht beobachtet werden. Mit steigender HA-Konzentration in den Membranen wurde eine Abnahme des Bestrebens zur Adhäsion beobachtet. Das Proliferationsverhalten von HUVEC wurde durch die Inkorporation von Hyaluronsäure in Collagenmembranen nicht entscheidend beeinflusst. Dagegen wurde durch die Verwendung EDC-vernetzter Collagen-HA-Präparate eine Erhöhung der Proliferationsrate von HUVEC im Vergleich zu EDC-freien Membranen beobachtet.