

Bioabbaubare dreidimensionale Gerüststrukturen für die Zellkultur

A. Welle, E. Pindel, IBG; M. Kröger, Freudenberg Forschungsdienste, Weinheim;
K. Niederer, Johannes Gutenberg Universität Mainz;
I. S. Chronakis, Swedish Institute for Fiber and Polymer Research Mölndal, Schweden

Einleitung

Komplexe dreidimensionale Strukturen sind einer der auffälligsten Unterschiede zwischen der einfachen Zellkultur in Petrischalen, wie sie seit über hundert Jahren eingesetzt werden [1], und dem modernen „Tissue engineering“ [2, 3], das heißt der Züchtung größerer Zellverbände bis hin zu ganzen Organen in vitro oder in vivo nach Implantation eines mit Zellen vorbesiedelten Gerüsts. Wie schwierig diese Aufgabe immer noch ist, zeigt die geringe Zahl und die Art der bereits klinisch einsetzbaren Gewebe: Haut, Knochen, Knorpel, sowie Kiefer/Zahnfleisch.

Solche Gewebestrukturen können nur erhalten und stabilisiert werden, wenn neben den Zellen das oft vollsynthetische, bioabbaubare Gerüst sowie das Zusammenspiel zahlreicher Signaltransduktionswege im Organoid ex vivo beherrschbar werden. In den vergangenen zwanzig Jahren hat das Tissue engineering in allen diesen drei Bereichen eine rasante Entwicklung erfahren, zu der auch zahlreiche Arbeiten aus der Polymerchemie und den Materialwissenschaften beigetragen haben.

Ein noch nicht befriedigend gelöstes Problem im Falle vieler Gewebe, insbesondere stoffwechselaktiver Zellen in größeren Implantaten, stellt die Ausbildung neuer Blutgefäße (Neovaskularisierung) dar, die für den Anschluss des Implantats an das Blutgefäßsystem und somit für die Versorgung der Zellen im Gerüst mit Sauerstoff und Nährstoffen nötig ist [4].

Gegenwärtig sind zur Erzeugung dreidimensionaler Kunststoff-Gerüststrukturen verschiedene Methoden von größerer Bedeutung: Das 3D-Drucken [5], das Aufschäumen mit Treibgasen, die thermisch induzierte Phasenseparation (TIPS) [6], das „Solvent casting and particulate leaching“ (SCPL) oder kurz „Salt leaching“ [6], sowie das „Electrospinning“ [7, 8] (Tab.1). Teilweise sind auch Kombinationen dieser Verfahren möglich.

Das höchst aufwändige 3D-Drucken (Rapid prototyping) erlaubt zwar die Herstellung sehr definierter Gerüste, ist jedoch nicht für alle Polymere geeignet und liefert gegenwärtig nur verhältnismäßig grobe Strukturen im Bereich von größer 10 µm. Somit ist diese Technik für den Einsatz im Bereich Knochen

gut, für kleinskalige und weiche Gewebe dagegen weniger gut geeignet. Grundlegend für eine erfolgreiche Besiedelung des Netzwerks (Scaffold) mit Zellen ist dessen Offenporigkeit. Diese Interkonnektivität aller Hohlräume des Gerüsts ist bei einem schwammartigen Polymer, das durch Aufschäumen während der Polymerisation oder nach Aufschmelzen des fertigen Polymers beziehungsweise durch TIPS gewonnen wird, relativ schwierig zu erreichen. Demgegenüber liefert das Electrospinning ohne Weiteres ein filzartiges Gewebe welches keinerlei abgeschlossene Hohlräume aufweisen kann. Dennoch wurde kürzlich bezweifelt, dass die Porengröße in dickeren Geweben (< 1 mm), die per Electrospinning erzeugt wurden, für die Zellmigration ausreichend ist [4]. Unsere nachfolgend beschriebenen Experimente zeigen hier einen Lösungsweg auf.

Experimente und Ergebnisse

Um einige genannte Nachteile von Gerüststrukturen für das Tissue engineering zu umgehen, wurden im Rahmen einer Kooperation zwischen

	3D-Drucken	Treibgas-schäumen	TIPS	SCPL	Electro-spinning
Kontrolle d. Struktur	++	+	-	+	-
Offenporigkeit	++	--	-	++	++
Oberfläche/Volumen Verhältnis des Gerüsts	--	+	-	-	++
Geschwindigkeit, Skalierbarkeit	--	+	-	--	++
Vielseitigkeit	-	++	--	+	+

Tab. 1: Stärken und Schwächen der meistverwendeten Methoden zur Herstellung dreidimensionaler Polymergerüste für das Tissue engineering.

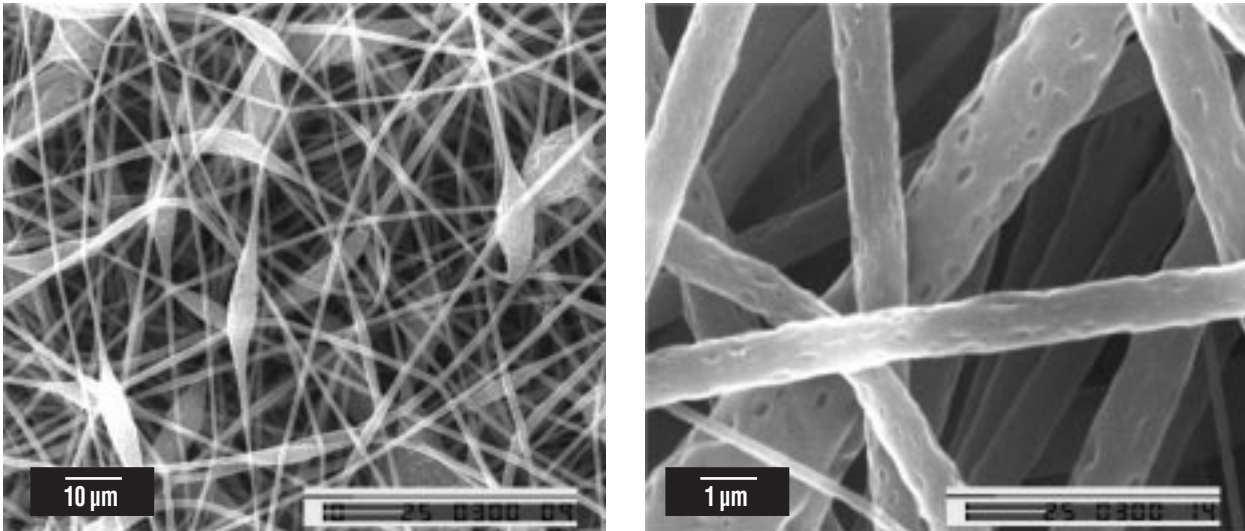


Abb. 1: PPC-Fasern die per Electrospinning erzeugt wurden.

dem Forschungszentrum (IBG und ITC-CPV) und dem Swedish Institute for Fiber and Polymer Research neuartige Gerüste aus aliphatischen Polycarbonaten per electrospinning erzeugt und auf ihre biologische Anwendbarkeit getestet [9].

Polymersynthese und -verarbeitung

Zwei Polycarbonate wurden in einer umweltfreundlichen Synthese ohne Lösungsmittel direkt aus CO₂ und Epoxiden hergestellt:

1. Poly(cyclohexyl carbonat), PCHC, wurde aus CO₂ und Cyclohexenoxid synthetisiert. Als homogener Katalysator diente hierbei ein im ITC-CPV neu entwickelter Zinkkomplex mit einem 3-Amino-2-cyanoimidazoacrylat-Liganden. Dieser Ligand wurde in einer dreistufigen Synthese aus Cyanoessigsäure gewonnen. Der katalytisch aktive Acetat-Komplex wur-

de durch die Reaktion dieses Liganden mit Diethylzink und nachfolgender Reaktion mit Essigsäure generiert. Die molekulare Struktur des Katalysators erlaubt eine homogen katalysierte lebende Polymerisation¹⁾, die zu einem Polymer mit enger Molekulargewichtsverteilung führt [10].

2. Poly(propyl carbonat), PPC, wurde durch heterogene Katalyse mit Zinkglutarat aus CO₂ und Propylenoxid erhalten. Der Katalysator wurde aus Zinkoxid hergestellt. Versuche andere Zinkkomponenten wie Diethylzink als Startmaterial zu verwenden, führten zu einem starken Verlust der katalytischen Aktivität. Durch die Verwendung eines heterogenen Katalysators zeigte das entstandene PPC eine breite Streuung des Molekulargewichtes. Dagegen war das mittlere Molekulargewicht des Polymers im Vergleich zum PCHC größer.

Beide Polymere wurden anschließend dem Electrospinning unterworfen. Bei diesem Prozess wird ein elektrisches Potenzial zwischen einer Polymerlösung, die am Ende einer Kapillare austritt, und einer geerdeten Metallplatte angelegt. Wenn das elektrische Feld eine bestimmte kritische Größe, die von der Oberflächenspannung der Polymerlösung abhängig ist, übersteigt, wird ein geladener Polymerstrahl kontinuierlich ausgestoßen der durch eine radiale Ladungsabstoßung in viele Teilstrahlen zerfällt, die dann durch die rasche Verdunstung des Lösungsmittels in erstarrtem Zustand als Nanofasern auf dem Kollektor auftreffen (siehe Abb. 1).

Chemisch/biologische Charakterisierung

Arbeiten verschiedener anderer Gruppen [11, 12] haben gezeigt,

¹⁾ Eine lebende Polymerisation (eng. polymerization) ist eine Kettenreaktion ohne Übertragungsreaktionen oder Abbruchreaktionen. Bei der lebenden Polymerisation bleiben nach Verbrauch des Monomers die Kettenenden aktiv, d. h. nach Zusatz von frischem Monomer wachsen die Ketten weiter. Bei den meisten lebenden Polymerisationen handelt es sich um anionische Polymerisationen, es gibt aber auch kationische und radikalische lebende Polymerisationen. Besondere Bedeutung hat die lebende Polymerisation bei der Herstellung von Blockcopolymeren.

dass aliphatische Polycarbonate unter milden Bedingungen zu einem gewissen Maß enzymatisch abgebaut werden. Ein Gewichtsverlust und die Änderung der Oberflächenstruktur und der Benetzbarkeit von PPC in biologischem Milieu sowie ein Gewichtsverlust von Polyethylencarbonat durch die Einwirkung von Lipasen zweier Rhizopus-Spezies wurden bereits gezeigt, so dass eine Bioabbaubarkeit des PPC erwartet werden kann. An PCHC wurde ein Hydrolyseexperiment durchgeführt, welches jedoch mittels Gelpermeationschromatographie keine signifikante Verringerung der mittleren molaren Masse zeigte. Daraus folgern wir eine im Vergleich zum PPC wesentlich höhere Beständigkeit des PCHC gegenüber Hydrolyse.

Beide Polymere wurden einem Biokompatibilitätstest gemäß EN ISO 10993-5 in ihrer ursprünglichen Form (aufgesponnen auf Glas) unterworfen. Der Agar Overlay Test mit L929-Zellen unter Standardbedingungen zeigte keine zytotoxischen Effekte des PPC und PCHC. Auch bei direkter Besiedelung verhielten sich beide Polymere zellfreundlich (Abb. 2). Sogar empfindliche primäre Rattenhepatozyten besiedelten spontan ein Kissen aus PPC-Nanofasern und zeigten gute Vitalitätsraten.

Polymermodifikation

Im Rahmen dieser Studie wurde die Modifikation der gesponnenen Fasern durch hartes UV-Licht untersucht. Die UV-Bestrahlung von Polymeroberflächen in Luft induziert bei Dosen von 1 bis 5 mJ/cm^2 üblicherweise Photooxidationen die zu Peroxiden und Carbonsäure-

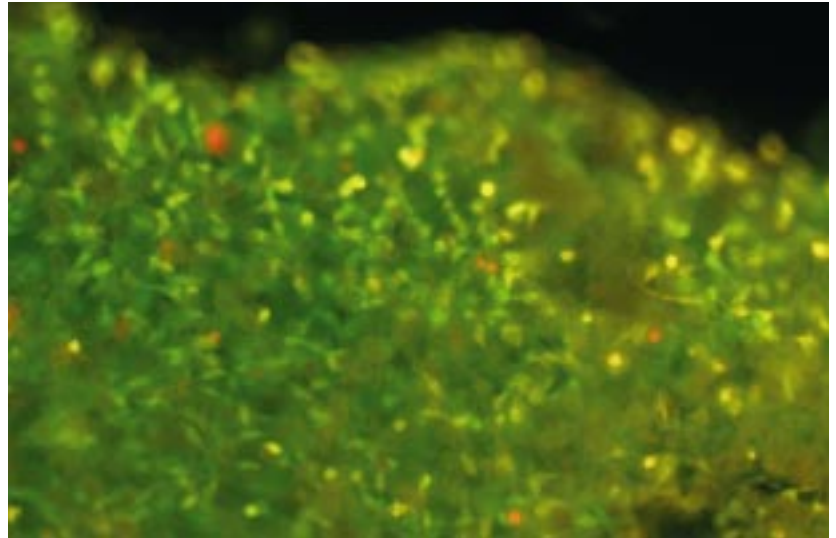


Abb. 2: Fluoreszenzaufnahme von L929-Fibroblasten in einem PPC-Gewebe, Kulturdauer: zwei Tage, Fluoresceindiaceetat/Propidiumiodid Doppelfärbung. Lebende Zellen erscheinen grün, abgestorbene rot.

gruppen führen, aber noch nicht zur Ablation, d. h. Massenverlust. Dosen $> 10 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ bewirken einen Oberflächenabtrag bei Polystyrol und Poly(methylmethacrylat), haben jedoch offenbar keine erkennbaren Effekte auf tiefere Schichten der Materialien. Neben dieser bereits an den biostabilen Polymeren

beobachteten Photooxidation [13] konnte im Falle von PPC zusätzlich eine Veränderung im Inneren der Fasern nachgewiesen werden: Das mittlere Molekulargewicht des Polymers sank auf etwa die Hälfte, siehe Abb. 3. Bei PCHC sank das mittlere Molekulargewicht lediglich um ein Fünftel.

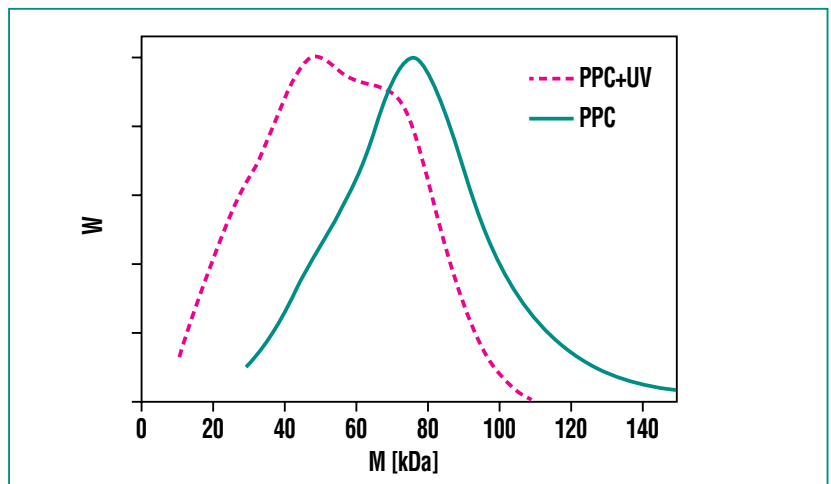


Abb. 3: Molekulargewichtsverteilung aus Gelpermeationschromatographien von nativem PPC und PPC-Nanofasern nach Bestrahlung mit hartem UV-Licht. (W: Häufigkeit; M: Molmasse, 1 kDa entspr. 1 kg/Mol).

Die Veränderung am Polymergerüst der PPC-Nanofasern hat deutliche Auswirkungen auf das Verhalten des besiedelten Substrats in vitro. Während unbestrahlte PPC-Fasern in der Zellkultur auch nach mehreren Tagen keine strukturellen Veränderungen zeigten, deutet ein Quellen und Erweichen der UV-bestrahlten Fasern innerhalb eines Tages nach Fibroblastenaussaat auf einen gesteigerten hydrolytischen und enzymatischen Abbau des modifizierten Polymers hin. Abb. 4 zeigt eine Schicht aus PPC-Nanofasern die mittels einer Maske, die UV-Licht in mäanderförmigen Bereichen durchlässt, mikrostrukturiert wurde.

Unter den mäanderförmigen, offenen Bezirken der Lithographiemaske ist das Fasergespinnst tiefem UV-Licht ($\lambda = 185 \text{ nm}$) ausgesetzt worden. Nach Einbringen in eine Fibroblastensuspension setzt innerhalb von 20 h die Änderung der Fasermorphologie ein. Die bestrahlten Fasern quellen auf und haften am Deckgläschen. In den unbelichteten Zonen bleibt die Morphologie der Fasern unverändert, jedoch lösen sich hier die Fasern von der Unterlage und das Gespinnst kontrahiert so dass offene Bereiche entstehen. Zellen adhären sowohl auf bestrahlten als auch auf unbestrahlten Fasern.

Zusammenfassung

Die hergestellten Fasern haben eine nanoskalige Morphologie und eine leicht poröse Oberflächenstruktur. Die erhaltenen Gerüste können sowohl ohne eine Nachbehandlung für die Zellkultur verwendet werden als auch mit zelladhäsionsunterstützenden Prote-



Abb. 4: Fotomontage. Oben: Durch UV-Bestrahlung modifizierte Schicht aus PPC-Nanofasern auf einem Deckgläschen. Mitte und unten: Die verwendete Lithographiemaske im gleichen Maßstab.

inen beschichtet werden. Bei PPC-Nanofasern führt eine photochemische Oberflächenmodifikation zur Steigerung der spontanen Adsorption adhäsionsstimulierender Plasmaproteine sowie zusätzlich zu Veränderungen der Volumeneigenschaften des Polymers (Molekularmassenverteilung). Es ist davon auszugehen, dass die Geschwindigkeit des hydrolytischen Abbaus in vivo, die von der Kettenlänge des Polymers abhängt, durch diese Technologie kontrollierbar ist. Dabei sollten maßgeschneiderte Gerüststrukturen und Abbauprofile mit einer lateralen Auflösung von

ca. $50 \mu\text{m}$ durch die UV-Nachbehandlung der PPC-Fliesstoffe erreichbar sein. Dadurch können zwei Fortschritte erreicht werden: 1. Verbesserte Zugangswege für das kontinuierliche Einwachsen der (Spender-) Zellen des Zielgewebes im In-vitro-Schritt und patienteneigener Zellen im In-vivo-Schritt des Tissue engineering. 2. Anlage von Blutgefäßen im implantierten Gewebe durch die gezielte Vorbereitung von Kanälen bei der Scaffold-Herstellung. Somit kann eine kritische Hürde für den Einsatz größerer konventioneller Implantate überwunden werden.

Danksagung

Besonderer Dank gilt Simone Weigel für ihre exzellenten Beiträge zu dieser Arbeit, sowie Brigitte Lahni, Cordula Nies, Tim Scharnweber

und Michael Bruns für ihre wertvolle Unterstützung. I. S. Chronakis wurde von der Swedish Agency for Innovation Systems finanziell unterstützt.

Literatur

- [1] R.J. Petri, *Eine kleine Modification des Koch'schen Plattenverfahrens, Centralblatt für Bacteriologie und Parasitenkunde, 1887, 1: 279–80*
- [2] R. Langer, J.P. Vacanti, *Tissue Engineering, Science, 1993, 260: 920–6*
- [3] C.A. Vacanti, *History of Tissue Engineering and A. Glimpse Into Its Future, Tissue Eng., 2006, 12: 1137–42*
- [4] Y. Ikada, *Challenges in tissue engineering, J. R. Soc. Interface, 2006, 3: 589–601*
- [5] C.X.F. Lam, X.M. Mo, S.H. Teoh, D.W. Hutmacher, *Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer, Mater. Sci. Eng. C, 2002, 20: 49–56.*
- [6] Y. Cao, G. Mitchell, A. Messina, L. Price, E. Thompson, A. Penington, W. Morrison, A. O'Connor, Geoffrey Stevens, J. Cooper-White, *The influence of architecture on degradation and tissue ingrowth into three-dimensional poly(lactico-glycolic acid) scaffolds in vitro and in vivo, Biomaterials, 2006, 27: 2854–64*
- [7] X.M. Mo, C.Y. Xu, M. Kotaki, S. Ramakrishna, *Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation, Biomaterials, 2004, 25: 1883–90*
- [8] K. Tuzlakoglu, N. Bolgen, A.J. Salgado, M.E. Gomes, E. Piskin, R.L. Reis, *Nano- and micro-fiber combined scaffolds: A new architecture for bone tissue engineering, J. Mat. Sci.: Mater. Med., 2005, 16: 1099–104*
- [9] A. Welle, M. Kröger, M. Döring, K. Niederer, E. Pindel, I.S. Chronakis, *Electrospun aliphatic polycarbonates as tailored tissue scaffold materials, Biomaterials, 2007, 28: 2211–9*
- [10] M. Kröger, C. Folli, O. Walter, M. Döring, *Alternating Copolymerization of Carbon Dioxide and Cyclohexene Oxide and Their Terpolymerization with Lactide Catalyzed by Zinc Complexes of N,N Ligands, Adv. Synth. Catal., 2006, 348: 1908–18*
- [11] L.C. Du, Y.Z. Meng, S.J. Wang, S.C. Tjong, *Synthesis and Degradation Behavior of Poly(Propylene Carbonate) Derived from Carbon Dioxide and Propylene Oxide, J. Appl. Polym. Sci., 2004, 92: 1840–6*
- [12] M. Zhou, M. Takayanagi, Y. Yoshida, S. Ishii, H. Noguchi, *Enzyme-catalyzed degradation of aliphatic polycarbonates prepared from epoxides and carbon dioxide, Polym. Bulletin, 1999, 42: 419–24*
- [13] A. Welle, E. Gottwald, *UV-Based Patterning of Polymeric Substrates for Cell Culture Applications, Biomed. Microdev., 2002, 4: 33–41*