

BIONANO-MATERIALS

JOURNAL OF FUNCTIONAL MATERIALS,
BIOMECHANICS, AND TISSUE ENGINEERING

OFFICIAL JOURNAL OF THE GERMAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS

ANNUAL CONFERENCE OF THE GERMAN SOCIETY
FOR BIOMATERIALS 2016 - ABSTRACTS

EDITORS-IN-CHIEF

*Stephan Barcikowski
Stefan Jockenhövel
Katrín Sternberg
Meike Stiesch*

BIONANO- MATERIALS

JOURNAL OF FUNCTIONAL MATERIALS,
BIOMECHANICS, AND TISSUE ENGINEERING

OFFICIAL JOURNAL OF THE GERMAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS

EDITORS-IN-CHIEF

Stephan Barcikowski
Stefan Jockenhövel
Katrín Sternberg
Meike Stiesch

EDITORIAL BOARD

Aldo R. Boccaccini, *Erlangen*
Klaus Liefelth, *Heiligenstadt*
Klaus Müllen, *Mainz*
Minna Kellomäki, *Tampere*
Fergal O'Brien, *Dublin*
Werner Weitscheis, *Greifswald*
Koudy Williams, *Salem*

DE GRUYTER

The publisher, together with the authors and editors, has taken great pains to ensure that all information presented in this work (programs, applications, amounts, dosages, etc.) reflects the standard of knowledge at the time of publication. Despite careful manuscript preparation and proof correction, errors can nevertheless occur. Authors, editors and publisher disclaim all responsibility for any errors or omissions of liability for the results obtained from use of the information, or parts thereof, contained in this work.

The citation of registered names, trade names, trademarks, etc. in this work does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from laws and regulations protecting trademarks etc. and therefore free for general use.

ISSN 2193-0651 · e-ISSN 2193-066X

All information regarding notes for contributors, subscriptions, Open access, back volumes and orders is available online at
www.degruyter.com/biomat

RESPONSIBLE EDITORS

Prof. Dr.-Ing. Stephan Barcikowski , Chair of Technical Chemistry I, University of Duisburg-Essen and
Center for Nanointegration Duisburg-Essen (CeNiDE), Universitaetsstr. 7, 45141 Essen, Email: stephan.barcikowski@uni-due.de.
Univ.-Prof. Dr. med. Stefan Jockenhoevel, Dept. of Tissue Engineering & Textile Implants, AME - Institute of Applied Medical Engineering
Helmholtz Institute Aachen, Pauwelsstr. 20; 52074 Aachen; Germany, Email: jockenhoevel@hia.rwth-aachen.de
Prof. Dr. Katrin Sternberg, Universität Rostock, Institut für Biomedizinische Technik, Friedrich-Barnewitz-Str. 4, 18119 Rostock
Deutschland, Email: katrin.sternberg@uni-rostock.de
Prof. Dr. Meike Stiesch, Direktorin der Klinik für Zahnärztliche Prothetik und Biomedizinische Werkstoffkunde,
Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover, Germany, Tel.: +49 (0)511 532 – 47 74,
Email: Stiesch.Meike@mh-hannover.de

JOURNAL MANAGER Ingrid Grünberg, De Gruyter, Gentiner Straße 13, 10785 Berlin, Germany,
Tel.: +49 (0)30 260 05 – 245, Fax: +49 (0)30 260 05 – 298, Email: bnm.editorial@degruyter.com

RESPONSIBLE FOR ADVERTISEMENTS Claudia Neumann, De Gruyter, Gentiner Straße 13, 10785 Berlin, Germany.
Tel.: +49 (0)30.260 05-226, Fax: +49 (0) 30.260 05-322 Email: heiko.schulze@degruyter.com

© 2016 Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston

TYPESETTING Compuscript Ltd., Shannon, Ireland

PRINTING Franz X. Stückle Druck und Verlag e.K., Ettenheim
Printed in Germany



Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien 2016



29.09. – 01.10.2016

Tagungsleitung

Prof. Dr. Wilhelm Jähnen-Dechent

Helmholtz-Institute for Biomedical Engineering

Biointerface Laboratory, RWTH Aachen University Pauwelsstraße 30
52074 Aachen

Tagungsort

Hörsaalgebäude PPS

Professor-Pirlet-Straße 12

52074 Aachen

Veranstalter

Deutsche Gesellschaft für Biomaterialien e. V.

INHALT

VORTRÄGE

Plenary Talks	PL01 – PL04	S.	S1
Nanoscience I	S01-01 – S01-06	S.	S3
Zell-Material Interaktion I	S02-01 – S02-06	S.	S10
Nanoscience II	S03-01 – S03-06	S.	S16
Zell-Material Interaktion II	S04-01 – S04-06	S.	S24
Biomaterialien I	S05-02 – S05-04	S.	S35
Stem Cells, Tissue Engineering I	S06-01 – S06-04	S.	S39
Biomaterialien II	S07-01 – S07-06	S.	S43
Stem Cells, Tissue Engineering II	S08-01 – S08-06	S.	S50
Biomaterialien III	S09-01 – S09-06	S.	S57
Stem Cells, Tissue Engineering III	S10-01 – S10-06	S.	S65
NBTE Session I	S11-02 – S11-03	S.	S70
Klinische Anwendungen I	S12-01 – S12-04	S.	S74
NBTE Session II	S13-01 – S13-05	S.	S79
Klinische Anwendungen II	S14-01 – S14-06	S.	S85

POSTER

Nanoscience (Electrospinning, Drug Delivery, Imaging)	P01 – P17	S.	S91
Zell-Material Interaktion (Biokompatibilität, Biointerface)	P18 – P32	S.	S109
Advanced Medical Product Production	P34 – P37	S.	S126
Young Scientists Forum	P38 – P41	S.	S131
Biomaterialien (Hydrogele, Programmierbare Materialien)	P43 – P67	S.	S136
Klinische Anwendungen	P68 – P69	S.	S161
Stem Cells & Tissue Engineering	P71 – P79	S.	S163
Additive Produktion, Biofabrication	P80 – P88	S.	S173

PL01

Current Opinion in Nano-biomaterials

* S. Ramakrishna¹

¹National University of Singapore, Center for Nanofibers & Nanotechnology

Nano-biomaterials are being researched worldwide as they are perceived to enhance the safety and efficacy of drug delivery systems, tissue engineering, regenerative medicine, making of ex-vivo tissues for biocompatibility evaluation and drug screening, stem cells therapy, diagnostic devices, medical imaging, implants, transplants, prosthetics, and healthcare equipment. Nano-biomaterials enable engineering of scaffolds at sub-micron length scales with suitable 3D geometry, compliant physical and mechanical properties, and bulk and surface chemistries to mimic the natural micro-environment of cells for improved tissue engineering, regenerative medicine, stem cells therapy, and ex-vivo tissues. More over expansion, differentiation, and reprogramming of cells are engineered by the nano-biomaterials. They are helpful in remotely controlled, longer duration and targeted delivery of drugs, biomolecules, and electrical, magnetic and optical signals. They enable higher resolution medical imaging. They enable anti-microbial surfaces, super-hydrophilic or super-hydrophobic surfaces, and tailored host tissue response and integration of implants where necessary. They are also useful in engineering faster, miniature and more effective diagnostic devices. 3D Printing or Additive Manufacturing is providing additional flexibility to make use of nano-biomaterials. Stimuli responsive nano-biomaterials are enabling innovations such as 4D printing and remote control of in situ responses possible. This lecture illustrates progress made thus far via examples of nerve guides for peripheral nerve regeneration, stem cells for spinal cord injury, neuro-prosthetics for aging brain, and natural polysaccharides delivery for neuroprotection and well-being. Neuronal injury and degeneration due to traumas, diseases and aging are among the challenging problems of healthcare due to their limited self-recovery and serious consequences on the human health and well-being.

PL04

BioArtificial Hydrogels for Regenerative Medicine

* A. J. García¹

¹Petit Institute for Bioengineering and Bioscience, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA

Hydrogels, highly hydrated cross-linked polymer networks, have emerged as powerful synthetic analogs of extracellular matrices for basic cell studies as well as promising biomaterials for regenerative medicine applications. A critical advantage of these synthetic matrices over natural networks is that bioactive functionalities, such as cell adhesive sequences and growth factors, can be incorporated in precise densities while the substrate mechanical properties are independently controlled. We have engineered poly(ethylene glycol) [PEG]-maleimide hydrogels to control stem cell engraftment and bone repair. In another application, we have developed synthetic hydrogels that support improved pancreatic islet engraftment, vascularization and function in diabetic models. These studies establish these biofunctional hydrogels as promising platforms for basic science studies and biomaterial carriers for cell delivery, engraftment and enhanced tissue repair.

S01-01

Nanoparticulate drug delivery systems in multilayers and their application for graded implants

*S. Sydow¹, N. Poth¹, J. Sundermann², H. Bunjes², H. Menzel¹

¹Institut für Technische Chemie, TU Braunschweig, Braunschweig, Deutschland

²Institut für Pharmazeutische Technologie, TU Braunschweig, Braunschweig, Deutschland

Introduction

Functional implants between complex tissues are still an unsolved medical problem. For example, commercially available implants are responsible for up to 90 % of the rotator cuff revision operations carried out. Creation of gradients along implant surfaces could improve the situation at the tissue transition region. Beside gradients in the mechanical properties also gradients in the release of signaling proteins might be a progress to more functional implants. To generate such a gradient we combine a drug release system based on immobilized nanoparticles [1] with the Layer-by-Layer-technology (LbL). Recent studies have shown that biopolymers like chitosan or alginate can be used to prepare such nanoparticles for drug delivery applications [1,2]. Our approach focusses on the incorporation of proteins, such as bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), into the nanoparticles and their immobilization in a graded way on a surface of an implant.

Materials and Methods

Nanoparticles were prepared by ionotropic gelation from aqueous solution and characterized by determining particle diameter and zetapotential via dynamic light scattering (DLS). Nanoparticle coatings on silicon wafers as reference material were prepared by LbL using a dip-robot. The resulting films were investigated by ellipsometry, atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM). Furthermore ellipsometry was used to observe the degradation of the coating. BMP-2 encapsulation was evaluated with an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

Results and Discussion

The nanoparticle system were prepared by ionotropic gelation of chitosan and a sodium tripolyphosphate crosslinker. Nanoparticles with a well-defined particle size and zetapotential have been obtained. The cationic nanoparticles were coated on silicon as a model surface by the LbL-method with alginate or chondroitin sulfate as a polyanionic layer. A linear increase in layer thickness with the number of dipping cycles is observed. Varying the dipping depth resulted in a concentration gradient of nanoparticles on the substrate. The degradation of the nanoparticle layer was proven by the decrease of the film thickness upon incubation. BMP-2 was incorporated into the degradable particles with high efficiency. The release was investigated by ELISA analysis.

Conclusion

Combination of signal protein release from nanoparticles with the Layer-by-Layer-technology is a promising method to create a release profile with spatial gradients.

References

- [1] N. Poth et al., *Biomolecules*, 2015, 5, 3-19.
- [2] J. J. Wang et al., *Int. J. Nanomedicine*, 2011, 6, 765-774.

S01-02

The Miracle of PEGylation: Specific Proteins Determine the Stealth Effect of Polyethylene Glycol

*V. Mailänder^{1,2}

¹University Medicine Mainz, Dermatology, Mainz, Deutschland

²MPI for Polymer Research, Mainz, Deutschland

PEGylation is today's gold standard for drug delivery vehicles to reduce unspecific cell uptake, i.e. to establish a "stealth" effect. Nanocarriers with diameters of 100 nm were modified with PEG as the gold standard and for comparison with a hitherto less known polymer poly(ethylene ethyl phosphate)-modified (PEEP). PEEP is interesting as it is biodegradable, has additional chemical functionality, while for PEG recent studies have also pointed out medical problems with PEG, namely hypersensitivity or antibody formation.

As it is thought that the reduction of protein absorption is the critical parameter for the stealth effect while still a detectable amount is present we chose to combine the critical techniques. We determined the exact number of polymer chains attached to the nanocarriers, which were then investigated with respect to amount of protein adsorption, cell uptake, and protein corona composition. Three intriguing findings are reported: First, both PEG- and - and also interestingly PEEP-modified nanocarriers - are not internalized by cells and exhibit a reduced protein adsorption after incubation with human plasma. Secondly and more intriguingly, all particles are strongly internalized by cells if not previously incubated with human plasma. Third and most importantly, we have shown by quantitative proteomic mass spectrometry of the protein corona on both stealth nanoparticles that clusterin - also known as apolipoprotein J (ApoJ) is the major component in both protein mixtures and that plasma as well as clusterin alone act as "cell-repellents". This established the necessity of distinct plasma proteins at the nanocarriers' surface to mediate the stealth effect.

Literature

Schöttler, S.; Becker, G.; Winzen, S.; Steinbach, T.; Mohr, K.; Landfester, K.; Mailänder, V.; Wurm, F. R., Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers. *Nature nanotechnology* 2016, 11 (4), 372-7.

S01-03

Nanoporous Platinum Coatings for the Improvement of Neural Interface Electrode Surfaces

*K. D. Kreisköther¹, J. Schulze², N. Ehlert¹, H.-C. Schwarz¹, A. Warnecke², P. Behrens¹

¹Leibniz Universität Hannover, Institut für Anorganische Chemie, Hannover, Deutschland

²Hannover Medical School, Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Hannover, Deutschland

The aim of this work is the improvement of neural interface electrodes, especially the cochlear electrode, by enhancing the long-term biointegration and the contact between electrode and nerve fibers. This can be realized by chemical modification of the electrode surface or by integrating a drug delivery system [1] in e.g. nanoporous platinum coatings on the electrode surface. The pore diameter can be adjusted by the use of different templates like Pluronic® F127 and polystyrene latex beads to load the pores with active agents of various sizes. Furthermore, the porous platinum surface can be modified with several functionalized thiols to adjust the release behaviour of the active agents. Since the nanoporous platinum coating leads to an increased specific surface area, the impedance can be reduced in the low-frequency range [2].

For the deposition of nanoporous platinum on metal surfaces, we established two principle methods by using different templates. Within the first method, the surfactant Pluronic® F127 is dissolved in aqueous Pt(IV) solution. During the pulsed potential electrochemical deposition of platinum, Pluronic® F127 is incorporated into the forming platinum coating and removed subsequently during calcination. To adjust the release behaviour of active agents, these nanoporous platinum surfaces are modified with self-assembled monolayers (SAMs) of different functionalized thiols, e.g. 1-propanethiol, sodium 3-mercaptopropanesulfonate, as well as 11-mercaptopoundecanoic acid by storing the samples in an ethanolic thiol solution for 48 hours. Within the second method, metal surfaces are coated with polystyrene latex beads (PLBs) dispersion by storing in a climate chamber with a humidity of 80% for 3 days, followed by drying at a humidity of 50%. After template formation, the platinum is deposited electrochemically into the voids of the PLB layer by using an aqueous Pt(IV) solution. Subsequently, the PLBs are dissolved by storing the samples in toluene for 3 days leading to nanoporous platinum coating with pore diameter corresponding to the PLB size.

The coatings were characterized by scanning electron microscopy, confocal microscopy, contact angle measurements, sorption measurements, impedance spectroscopy. Furthermore, cell culture investigations were carried out with NIH3T3 fibroblasts, spiral ganglion cells (SGNs), which are the nerve cells of the inner ear, as well as bone-derived mesenchymal stem cells (BDMSCs).

Both processes lead to coatings containing nanopores. By using Pluronic® F127, pores with a size of about 10 nm are obtained (figure 1), which are applicable for loading with small active agents like rolipram. Previous studies showed that the neuronal survival of SGNs can be increased by this neurotrophic factor [3]. By using PLBs the average pore diameter is increased to 50 nm, corresponding to the size of the PLBs (figure 1). These pores can be loaded with larger active agents like the growth factor BDNF (brain-derived neurotrophic factor), which also can enhance the neuronal survival of nerve cells [3]. Depending on the coating thickness, the specific surface area can be increased to $430 \text{ cm}^2 \cdot \text{cm}^{-2}$. Impedance measurements of the nanoporous platinum coatings show improved impedance behaviour in the low-frequency range. The successful surface modification with different thiols can be validated by contact angle measurements. Cell culture investigations with NIH3T3 fibroblasts, SGNs and BDMSCs indicate a good cell compatibility because of a positive cell proliferation and cell spreading. The SGNs show a successful neurite growth on the nanoporous platinum coatings (figure 2).

Release experiments with rolipram in phosphate buffered saline under dynamic conditions at 37 °C show an adjustable rolipram amount depending on the coatings of different functionalized SAMs.

This work was supported by the DFG within the Cluster of Excellence Hearing4all.

[1] Ehlert, N. et al., *Chem. Soc. Rev.* 42:3847-3861, 2013

[2] Schlie-Wolter, S. et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5:1070-1077, 2013

[3] Warnecke, A. et al., *PLOS One* 9: 1-10, 2014

Abb. 1

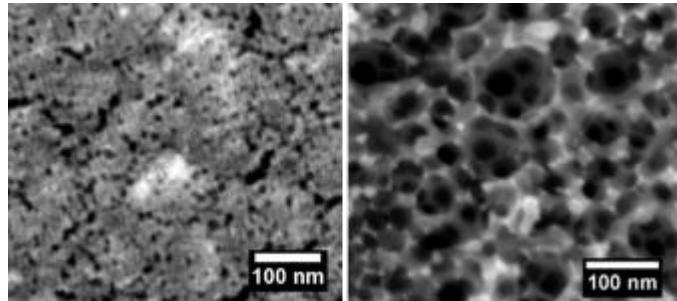
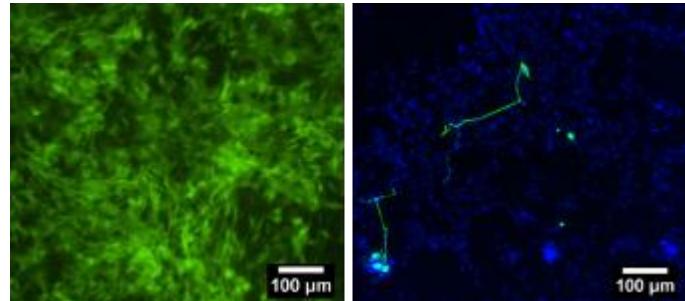


Abb. 2



S01-04

Freisetzung von Therapeutika für Knochenerkrankungen aus oberflächengebundenen Polyelektrolytkomplexen

*D. Vehlow¹, R. Schmidt², M. Siebert³, K. S. Lips³, A. Gebert², M. Müller¹

¹Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V., Polyelektrolyte und Dispersionen, Dresden, Deutschland

²Leibniz-Institut für Festkörper- und Werkstoffsorschung, Dresden, Deutschland

³Justus-Liebig-Universität Giessen , Giessen, Deutschland

Einführung

Die lokale Funktionalisierung von Knochenersatzmaterialien (KEM) mit Drug-Delivery-Systemen ist relevant für Frakturheilung und Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen (Osteoporose (OP), Multiples Myelom (MM)). Es wird gezeigt, wie KEM und Modellsubstrate mit etablierten Polyelektrolytkomplex-Nanopartikeln (PEK-NP) [1] beschichtet und daraus Arzneistoffe (AS) verzögert freigesetzt werden können, um deren Effizienz zu steigern und Nebenwirkungen zu unterdrücken.

Materialien & Methoden

Aufbauend auf bisherigen Arbeiten [2,3] wurde eine verbesserte Präparationsmethode für AS/PEK-NP ausgearbeitet. Kationisches Poly(L-Lysin) (PLL) wurde mit einem Gemisch aus anionischen Cellulosesulfaten (CS) mit niedrigem und hohem Sulfatgehalt komplexiert, damit CS- und PLL-Lösung eine möglichst gleiche molare Ladungskonzentration haben [4]. Das Bisphosphonat Risedronat (RIS) und das Antibiotikum Rifampicin (RIF) wurden ladungsgemäß integriert. Durch Zentrifugation, Überstand-Dekantieren und Pellet-Isolierung wurden überschüssiges PK oder PA und ungebundener AS abgetrennt.

Die Charakterisierung der AS/PEK-NP-Dispersionen und -Schichten an Substraten aus Germanium (Ge) und einer Titan/Niob-Legierung (Ti/Nb) erfolgte über Kolloidtitration, dynamische Lichtstreuung, mikroskopische und spektroskopische Techniken (FTIR, UV-VIS) hinsichtlich Nettoladung, Partikelgröße, Morphologie, Zusammensetzung und AS-Gehalt. Die Wechselwirkung von PEK-NP-Schichten mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC aus Knochenbohrmehl) wurde über Metabolitätstests (MTT), Osteocalcin- und Calcium-Spiegel (ELISA) im Zellmedium und digitale Lichtmikroskopie charakterisiert.

Ergebnisse

Die neue Präparationsmethode bringt drei wichtige Vorteile: Zugang zur AS-Beladung der dispersierten PEK-NP (AS-Konzentration im Überstand) (i), adhäsive Stabilität (kein PLL- oder CS-Überschuss) am KEM (ii), geringerer Initial-Burst und höherer Restgehalt (kein ungebundener AS) (iii). pH-Wert und Ionenstärke üben deutliche Effekte auf Beladung und Freisetzung von RIS und RIF aus. Das Freisetzungsverhalten am Substrat eines KEM (Ti/Nb) und am Modellsubstrat ist ähnlich. Unbeladene PEC-NP-Schichten zeigen nach 24 und 48 h ähnliche Viabilität der hMSC gegenüber der Kontrolle, Risedronat hat zelltoxischen Einfluss. In aktuellen Untersuchungen werden als weitere AS das Bortezomib für MM und Wachstumsfaktoren wie BDNF (brain-derived neurotrophic factor) für OP in PEK-NP integriert.

Referenzen

- [1] Adv. Pol. Sci. 2014, 255, 256
- [2] Biointerphases 2013, 8:25
- [3] Biointerphases 2015, 10, 011001
- [4] Nanomaterials 2016, 6, 53

S01-05

Molecular imaging of ECM deposition in progressive kidney fibrosis

*M. Baues¹, J. Ehling¹, Q. Sun², B. Klinkhammer², P. Boor², F. Kiessling¹, T. Lammers¹

¹Institut für Experimentelle Molekulare Bildgebung, Aachen, Deutschland

²Institut für Pathologie, Aachen, Deutschland

Introduction

Millions of patients worldwide suffer from chronic kidney disease (CKD). Biopsies are still the golden standard for diagnosis and staging of progressive kidney fibrosis, but they are highly invasive and moderately informative. Renal fibrosis refers to the excessive deposition of extracellular matrix (ECM) components, such as collagen and elastin, and results in pathological obliteration of organ architecture and function [1]. The continuous synthesis and turnover of the ECM during fibrogenesis is characterized by disease state-specific changes in the qualitative and quantitative composition of the ECM. Based on these notions, we employed two recently developed molecular imaging agents, i.e. ESMA [2] and CNA35 [3], which specifically target elastin and collagen, for the diagnosis and staging of renal fibrosis.

Methods

The elastin- and collagen-specific agents were evaluated using magnetic resonance imaging (MRI) [4] and hybrid computer tomography - fluorescence molecular tomography (CT-FMT) [5]. This was done in three different animal models for renal fibrosis: unilateral ureteral obstruction (UUO), unilateral ischemia/reperfusion injury (IR) and adenine-containing diet (ADE) (Fig. 1 A [6]). In vivo findings were verified by laser ablation inductively coupled mass spectrometry (LA-ICP-MS) [7] and two-photon laser scanning microscopy (TPLSM).

Results

Both in human and in mouse tissue specimens, western blotting and immunohistochemistry confirmed the gradual deposition of elastin during disease progression (Fig. 1 B). For the elastin-specific contrast agent ESMA, T1-weighted MRI revealed a significant difference in the medulla of fibrotic vs. healthy kidneys 24 hours after i.v. injection, which was clearly stronger than the difference observed for unspecific Gd-DTPA (Fig. 1 C). These findings were confirmed by LA-ICP-MS. For the collagen-specific agent CNA35, which was labeled with the NIR fluorophore Cy-7 and with the standard fluorophore Alexa-488, in vivo CT-FMT imaging revealed a 3-fold higher accumulation in fibrotic kidneys than in contralateral control kidneys (Fig. 1 D, E). TPLSM confirmed these findings, showing highly specific binding of FITC-CNA35 to perivascular collagen fibers (Fig. 1 F).

Conclusions

We established probes and protocols for molecular imaging of CKD using MRI and CT-FMT. Our findings lay the basis for the establishment of elastin- and collagen-based imaging biomarkers for the diagnosis and staging of kidney fibrosis.

References

- [1] Boor P et al. Nat Rev Nephrol 2010, 6:643-656
- [2] Makowski M et al. Nat Med 2011, 17:383-388
- [3] Sanders H et al. Chem Commun 2011, 47:1503-1505
- [4] Ehling J et al. Hepatology 2013, 4:1517-1518
- [5] Kunjachan S et al. ACS Nano 2013, 7:252-262
- [6] Ehling J et al. J Am Soc Nephrol 2016, 27:520-532
- [7] Boaru S et al. J Cell Mol Med 2015, 19:806-814

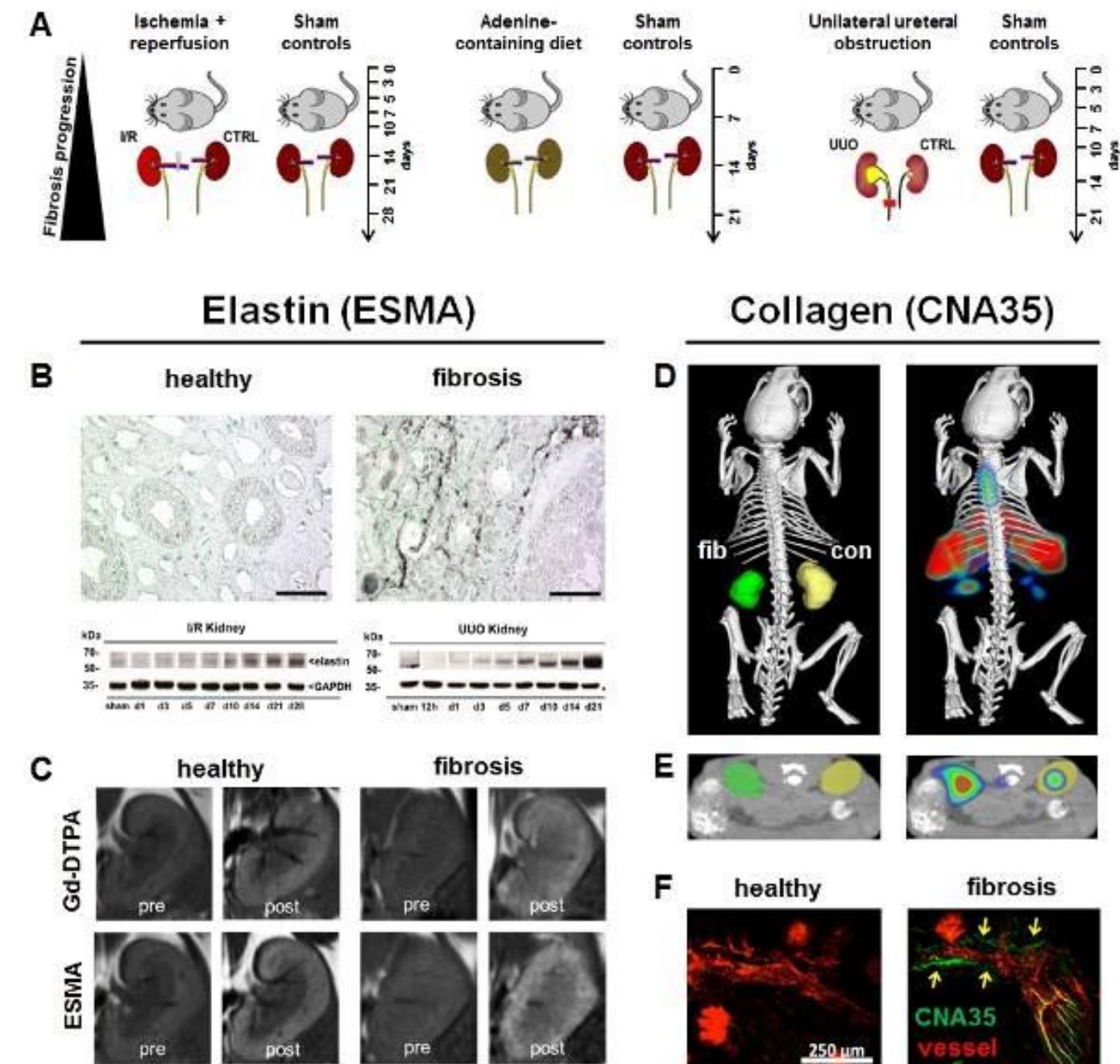
Acknowledgment

This work is supported by the ERC (StG309495-NeoNaNo), DFG (SFB/TRR57) and START (124/14 and 152/12).

Figure 1: Imaging biomarkers for diagnosis and staging of kidney fibrosis

Three different murine models for kidney fibrosis were employed (A). Interstitial elastin deposition was confirmed by immunohistochemical stainings of human samples and western blotting of murine I/R and UUO samples (B). Elastin based molecular MRI of kidney fibrosis, showing strong and specific contrast agent localization in diseased kidneys for ESMA (C). In vivo (D, E) and ex vivo (F) optical imaging of collagen deposition in a fibrotic kidney using fluorophore labeled CNA35.

Abb. 1



S01-06

Einsatz von rekombinanten Spinnenseidenpartikeln als mobile Wirkstofftransporter

*H. M. Herold¹, M. B. Schierling¹, S. Müller-Herrmann¹, T. Scheibel¹

¹Universität Bayreuth, Lehrstuhl Biomaterialien, Bayreuth, Deutschland

Moderne (Nano-)Wirkstofftransporter können bei der Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten einen wichtigen Beitrag leisten und bieten gegenüber der konventionellen Gabe von Medikamenten entscheidende Vorteile. So kann die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen durch die Bindung an bzw. in partikuläre Wirkstofftransporter verbessert werden und insbesondere degradationsanfällige Wirkstoffe können vor vorzeitigem Abbau im Körper geschützt werden. Geschicktes Design der Transporter ermöglicht zudem eine kontrollierte Wirkstoffabgabe im Zielgewebe, wodurch die insgesamt benötigte Wirkstoffmenge reduziert wird und unerwünschte Nebenwirkungen zurückgehen.

Submikrometerpartikel, hergestellt aus (gentechisch modifiziertem) Spinnenseidenprotein, eignen sich gut für den Einsatz als Wirkstofftransporter. Spinnenseide ist ein vielseitiges Material; neben den besonderen mechanischen Eigenschaften - der Kombination aus hoher Elastizität gepaart mit großer Reißfestigkeit - zeigt Spinnenseide eine besonders gute Biokompatibilität, was sie vor allem für medizinische Anwendungen zu einem vielversprechenden Material macht. Spinnenseide löst keine Allergien im Körper aus, ruft (nahezu) keine Immunreaktion hervor und ist nicht zytotoxisch [1]. Rekombinante Spinnenseidenproteine können unter moderaten Bedingungen (wässrige Puffersysteme, neutraler pH) in Partikel prozessiert und mit Wirkstoffen beladen werden, was für deren medizinische Anwendung von Vorteil ist [2].

Die Möglichkeit der rekombinanten Herstellung des Proteins ermöglicht gleichzeitig die Produktion des Proteins in industriellem Maßstab, wie auch die genetische Modifikation des Proteins entsprechend den Anforderungen an eine bestimmte Anwendung. So kann die Aufnahme der Seidenpartikel in Zellen, wie beispielsweise HeLa-Zellen, durch die Modifikation des zugrunde liegenden Proteins gezielt beeinflusst werden. Während die bei physiologischem pH negativ geladenen Partikel aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) nur mit moderater Effizienz in HeLa-Zellen aufgenommen werden, führen Modifikationen mit zellpenetrierenden Peptiden sowie Ladungsänderung hin zu einer positiven Nettoladung des Proteins zu einer verstärkten zellulären Partikelaufnahme [3]. In Abhängigkeit von der Nettoladung des verwendeten Spinnenseidenproteins können Seidenpartikel als Transporter für entgegengesetzt geladene Wirkstoffe fungieren [4]. Spinnenseidenpartikel sind zudem bioabbaubar, indem sie im Körper in die zu Grund liegenden Bausteine, die Aminosäuren, abgebaut werden. Dies ermöglicht eine wiederholte Gabe dieser Wirkstofftransporter, was besonders für Langzeitbehandlungen von Vorteil ist.

[1] Leal-Egana, A. and T. Scheibel, *Silk-based materials for biomedical applications*. Biotechnol Appl Biochem, 2010. 55(3): p. 155-67.

[2] Lammel, A., et al., *Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles*. Biomaterials, 2011. 32(8): p. 2233-2240.

[3] Elsner, M.B., et al., *Enhanced cellular uptake of engineered spider silk particles*. Biomaterials Science, 2015. 3(3): p. 543-551.

[4] Doblhofer, E. and T. Scheibel, *Engineering of recombinant spider silk proteins allows defined uptake and release of substances*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. 104(3): p. 988-94.

S02-01

Expression and Activity of Tissue Transglutaminase in the Response to Gelatin-based Hydrogels *in vivo*

*S. Hauser¹, R. Wodtke^{1,2}, C. Tonner^{1,2}, A. T. Neffe^{3,4}, A. Lendlein^{3,4}, R. Löser^{1,2}, J. Pietzsch^{1,2}

¹Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Institute of Radiopharmaceutical Cancer Research, Department of Radiopharmaceutical and Chemical Biology, Dresden, Deutschland

²Technische Universität Dresden, Department of Chemistry and Food Chemistry, Dresden, Deutschland

³Institute of Biomaterial Science and Berlin-Brandenburg Centre for Regenerative Therapies, Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Teltow, Deutschland

⁴Helmholtz Virtual Institute “Multifunctional Biomaterials for Medicine”, Teltow and Berlin, Deutschland

Introduction

Tissue transglutaminase (TGase 2) is proposed to be important for biomaterial-cell or -tissue interactions due to its presence and versatile functions in the extracellular environment. For example, TGase 2 catalyzes the crosslinking of proteins of the extracellular matrix through its Ca^{2+} -dependent transamidase activity or enhances the interactions between fibronectin, integrins, and syndecan-4 via its role as scaffold protein. Through these functions, TGase 2 mediates the adhesion, migration and motility of cells. Additionally, TGase 2 is a key player during the development of fibrosis. Consequently, TGase 2 might be a potential target for the improvement and visualization of tissue regeneration following biomaterial implantation. Here, we studied the expression pattern and activity of TGase 2 *in vivo* in the response to gelatin-based hydrogels with tailororable elastic properties and degradation behavior due to different degrees of crosslinking.

Methods

Solutions of 10 wt.-% gelatin were crosslinked with 3- (G10_LNCO3) or 8-fold (G10_LNCO8) excess of isocyanate groups of lysine diisocyanate ethyl ester compared to amino groups of gelatin [1]. Hydrogels were implanted subcutaneously in immunocompetent, hairless SKH-1 mice. TGase 2 expression at the implantation site was detected *ex vivo* by immunohistochemistry at several time points up to 112 days after implantation. The presence of activatable TGase 2 in tissue sections was confirmed *in vitro* by incorporation of fluorescently labelled cadaverine derivatives [2] at sites of TGase 2 expression. To prove that the incorporation is caused by TGase 2, the staining was performed in the presence and absence of a recently described irreversible inhibitor for TGase 2 [3].

Results and Discussion

Ex vivo analysis of tissue sections by immunohistochemistry revealed enhanced expression levels of TGase 2 around the hydrogels especially 14 and 21 days after implantation. Incorporation of fluorescently labelled cadaverine derivatives at sites of TGase 2 expression confirmed TGase 2 to be activatable. The presence of an irreversible inhibitor of TGase 2 led to attenuated incorporation of the cadaverines, which verifies that TGase 2 catalyzes the detected cadaverine incorporation.

The results indicate that TGase 2 might play a role in hydrogel integration and tissue remodeling, which underlines TGase 2 to be a promising theranostic target during biomaterial integration processes. In addition, principal applicability of the cadaverine derivatives for a fluorescence-based detection of activatable TGase 2 could be verified.

References

- [1] Ullm et al. Biomaterials 2014, 35, 9755-9766
- [2] Hauser et al. Amino Acids 2016, DOI 10.1007/s00726-00016-02192-00725
- [3] Wityak et al. ACS Med. Chem. Lett. 2012, 3, 1024-1028

S02-02

Functional Carbon-based Coatings for Cochlear Electrodes: Carbon Nanotube and Nanoporous Carbon Films on Platinum

*N. Burbries¹, J. Schulze², A. Warnecke², P. Behrens¹

¹Leibniz Universität Hannover, Institut für Anorganische Chemie, Hannover, Deutschland

²Hannover Medical School, Department of Otorhinolaryngology, Hannover, Deutschland

Long-term biointegration and the improvement of the function are main requirements for neural interface electrodes, e.g. cochlear electrodes or other stimulating implants [1]. Especially carbon nanotubes (CNTs) are in focus for neural interface applications [2], but also porous carbon materials are of great interest for biomedicine due to their remarkable properties [3]. Our approach is the chemical modification of the electrode surface to improve the contact of the cochlear electrodes to the nerve fibers and to minimize the impedance of the electrical contact. Additionally, a porous system provides the opportunity to establish a drug delivery system. For this purpose, the platinum surfaces of these electrodes shall be equipped with two different types of coatings based on different carbon materials: carbon nanotubes and porous carbon.

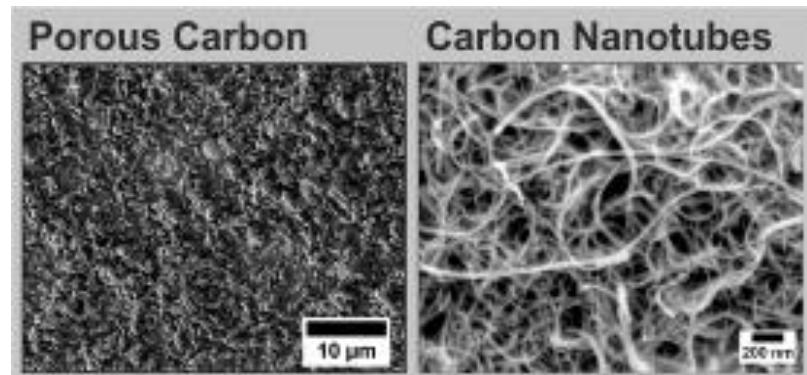
Reflux acid-treatment of different as-received carbon nanotubes (Fraunhofer IWS Dresden, Bayer Material Science and SouthWest Nanotechnologies) led to a purification due to the removal of catalyst residue and a modification of the nanotubes with carboxyl-groups. Thereby, after a following sonication process, long-term stable aqueous dispersions of carbon nanotubes were obtained. These dispersions were used to coat platinum-coated silicon substrates via automated spray-coating [4]. Nanoporous carbon CMK-3 was synthesized as reported in reference [5] via nanocasting approach using mesoporous silica SBA-15 as template and sucrose as carbon source. Carbonisation was carried out under argon atmosphere and subsequently, the silica template was removed with hydrofluoric acid. Electrode slurries of the porous carbon were prepared by mixing the carbon material with different binder polymers (e.g. chitosan) in different non-toxic solvents (water or acetic acid). Further dilution of these slurries led to stable sprayable dispersions. Porous carbon films on platinum-coated silicon substrates were produced via bar-coating or by automated spray-coating.

The successful purification and modification of the acid-treated carbon nanotubes were investigated via SEM, Raman spectroscopy, thermogravimetric analysis and ICP-OES. The properties of the nanoporous carbon material were analyzed using XRD, SEM, Raman spectroscopy and sorption measurements. SEM and confocal microscopic images of the films on platinum reveal homogeneous coated substrate surfaces for both coatings (Fig. 1) and gave information about topography and thicknesses of the coatings. Spray-coated carbon nanotube films show film thicknesses of approx. 100 nm, porous carbon film of 10 µm (spray-coated) and 50 µm (bar-coated). EDX and XPS analysis provide information on the elemental composition of the surfaces. Electrochemical investigation was carried out by using impedance spectroscopy and cyclic voltammetry. Both types of carbon-based coatings show enhanced electrical properties compared to non-coated platinum electrodes. Cell culture experiments with NIH3T3 fibroblasts reveal a general cytocompatibility and non-toxicity for both coatings. Investigations with spiral ganglion neurons - the neurons of the inner ear - of neonatal rats provide information on the suitability of the coatings for an application in the cochlear implant. Morphology and GFP or anti-neurofilament antibody expression, respectively, were investigated by fluorescence microscopy and the number of cells was determined after cultivation.

This work was supported by the DFG within the Cluster of Excellence Hearing4all.

- [1] Stöver, T., Lenarz, T.; *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg* (2009) 8; 1-22
- [2] Bareket-Keren, L., Hanein, Y.; *Front Neural Circuits* (2012) 6; 1-16
- [3] Liang, C., et al.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (2008) 47; 3696-3717
- [4] Burbries, N., et al.; *PLoS One* (2016) submitted for publication
- [5] Jun, S., et al.; *J. Am. Chem. Soc.* (2000) 122; 10712-10713

Abb. 1



S02-03

Improving the *in vitro* and *in vivo* properties of neural electrodes by coating with platinum nanoparticles

S. Koenen¹, *C. Rehbock¹, C. Streich¹, J. Jakobi¹, S. Angelov², H. E. Heissler², K. Schwabe², J. K. Krauss², S. Barcikowski¹¹Universität Duisburg-Essen and Center for Nanointegration Duisburg-Essen, Essen, Deutschland²Hannover Medical School, Department of Neurosurgery, Hannover, Deutschland

Biomedical implants are of significant importance in today's medicine, where they replace, support, or enhance existing biological structures. However, the interaction of the implant with the surrounding tissue can cause severe problems like infection, rejection as well as scar formation. This is particularly critical when implants are placed in sensitive areas such as the patient's brain. In case of neural electrodes, which are routinely used in deep brain stimulation (DBS) for the treatment of Parkinson's disease, scar formation usually leads to increased impedance. This significantly reduces the efficiency of DBS treatment and should be avoided. Nanostructuring was previously shown to enhance cellular adhesion and biocompatibility of implants and was thus employed to examine if it can also improve biocompatibility and counteract impedance increase in neural electrodes.

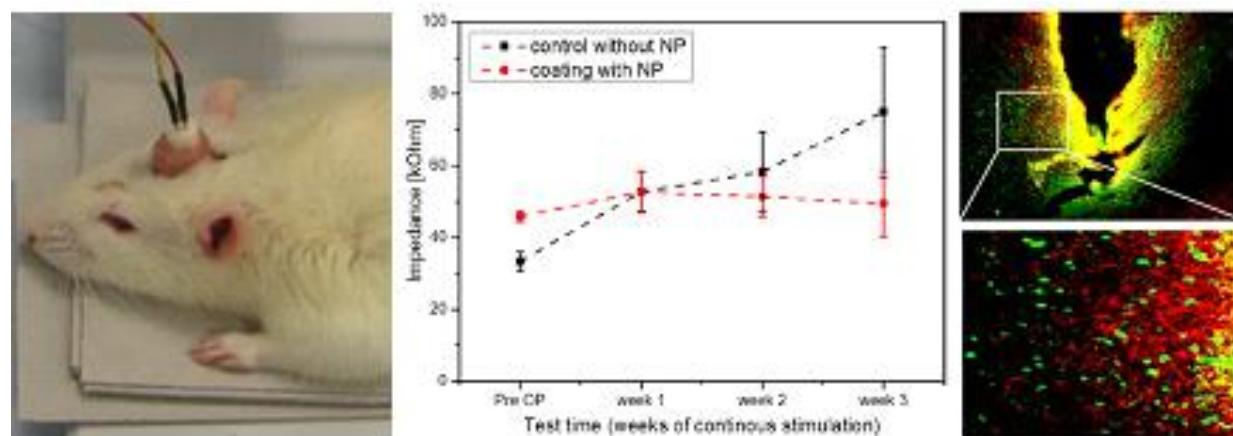
In this work neuronal PtIr electrodes were structured with laser-generated Pt nanoparticles (NP) using electrophoretic deposition (EPD) with a two electrode system where the neural electrode served as a working electrode [1]. Particles obtained by pulsed laser ablation in liquid (PLAL) are particularly beneficial as they can be made of the same material as the electrode, carry a high surface charge and are completely ligand-free [2], which makes them ideal candidates for efficient deposition on the electrode surface [3]. The EPD process was optimized with regard to particle concentration, voltage and deposition time. In these experiments we could conclusively verify that an increased surface coverage of the electrode went along with increased hydrophilicity (reduced contact angle), a higher level of surface oxidation as well as a reduced impedance [4]. In consecutive experiments, surface-structured electrodes were implanted in rats. Electrostimulation was conducted for three weeks and the effect of surface modification on cell growth and electrode impedance was examined *in vivo*. In comparison to uncoated control electrodes, the lowest impedance was recorded for electrodes coated with small nanoparticles (<10 nm). These electrodes also featured the most stable impedance dynamics and the lowest total power of local field potential during neuronal activity recording. Moreover, immunohistological analysis of the tissue around the electrode tip did not reveal differences between coated and uncoated electrodes [5]. In conclusion, the structure-function relationship of neural electrodes coated with laser-generated Pt nanoparticles in terms of affecting electrode's impedance was comprehensively investigated in a rat model. Our results show that NP-coating improves impedance stability without sacrificing the electrode's biocompatibility *in vivo*.

Figure 1: Implanted neural electrode for DBS experiments in a rat model (left). *In vivo* impedance behavior of uncoated neural electrodes and electrodes coated with Pt nanoparticles over three weeks of continuous stimulation (middle). Immunohistological analysis near the electrode's contact site five weeks after implantation (green: neurons, red: astrogliosis, right).

References

- [1] S. Koenen, R. Streubel, J. Jakobi, K. Schwabe, J. K. Krauss and S. Barcikowski, *J. Electrochem. Soc.*, 162, D174-D179 (2015).
- [2] V. Amendola, and M. Meneghetti, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15, 3027-3046 (2013).
- [3] C. Streich, S. Koenen, M. Lelle, K. Peneva and S. Barcikowski, *Applied Surface Science*, 348, 92-99 (2015).
- [4] A. Heinemann, S. Koenen, K. Schwabe, C. Rehbock, and S. Barcikowski, 654, 218-223 (2015).
- [5] S. D. Angelov, S. Koenen, J. Jakobi, H. E. Heissler, M. Alam, K. Schwabe, S. Barcikowski, and J. K. Krauss, *Journal of Nanobiotechnology*, 14:3, 1-11 (2016).

Abb. 1



S02-04

Cell-selective Surfaces promoting Adhesion and Growth of Valvular Interstitial Cells

*M. Gabriel¹, C. Raynaud¹, C. Bollensdorff¹

¹Sidra Cardiovascular Research, Doha, Qatar

Introduction

Surface modification of a plethora of substrates has gained great interest in biomaterial research. The general aim of this approach is to endow material surfaces with cell-adhesive properties. Apart from simple coating with ECM-proteins more advanced techniques make use of covalent conjugation of ECM-derived recognition motifs, e.g. the well-known RGD sequence. Additional peptides have been described addressing specific cell types. The valvular interstitial cell (VC) is the predominant cell type of the heart valve whereas endothelial cells (ECs) form the blood-contacting luminal layer. Aiming at tissue engineering of valves, surfaces that spatially favor either the adhesion and growth of VCs or ECs would be very beneficial. Here we report on the bioconjugation of a peptide and a polysaccharide (hyaluronic acid, HA), ligands specific for $\alpha\beta_1$ [1] and CD 44 [2] respectively, both receptors highly expressed on VCs. Modifications were performed on a non-degradable as well as on a bioerodible polymer.

Methods

Polytetrafluoroethylene (PTFE) and polycaprolactone (PCL) were used as substrates and amino-functionalized as previously reported [3,4]. HA was immobilized using hexamethylene diisocyanate (HMDI) as the crosslinker under non-aqueous conditions. Coupling of the peptide CPLAEIDGIELTY (VCsP) via a thiol and amine reactive heterobifunctional crosslinker was carried out in aqueous buffer. Pristine and modified samples were subjected to cell culture with primary sheep VCs and human umbilical vein ECs up to 1 week. Surfaces were additionally tested for platelet adhesion. Cells were fluorescently stained and micrographs were analyzed with ImageJ software. Data were expressed as percentage coverage of total area.

Results & Discussion

Both untreated materials are poor substrates for cell adhesion and colonization (PTFE blank % coverage, PCL blank %). On PTFE modified with VCsP or HA confluence was reached after one week of VC culture. Compared to this, VC growth on untreated material was negligible. All three surfaces prevented EC colonization to a large extent suggesting that the modifications may be considered as specific. Platelet attachment was considerable for the pristine PTFE surface (ca. 14 % coverage), whereas both treatments were found to be thrombo-resistant, possibly due to the hydrophilic nature of the coating. For PCL, similar but less pronounced results were obtained: modified surfaces stimulated VC adhesion (confluent after 1 week), prevented colonization by ECs almost completely after 1 week and simultaneously reduced platelet adhesion considerably. Given that VCs show a much higher growth rate compared to ECs it maybe assumed that endothelialization is expected to be suppressed on modified surfaces. In addition, the non-thrombogenic properties created in this way might facilitate colonization and avoid the need for initial anticoagulation.

Conclusion

Covalent bioconjugation of appropriate ligands onto biomaterials affords surfaces which exhibit a pronounced preference for a specific cell type. This approach might provide a novel route for the tissue engineering of heart valves.

References

- [1] Schneider et al. FEBS Lett. 1998 Jun 16;429(3):269-73
- [2] Peach et al. J Cell Biol. 1993 Jul;122(1):257-64
- [3] Gabriel et al. Biomed Mater. 2011 Jun;6(3):035007
- [4] Gabriel et al. J Biomater Sci Polym Ed. 2012;23:941-53

Figure 1: PTFE modification with immobilized VC-specific peptide or hyaluronic acid respectively renders the material an excellent substrate for colonization by VCs. In addition these surfaces prevent platelet attachment.

Figure 2: Conjugation of both biomolecules on PCL results in a similar biological performance as demonstrated for PTFE (magnification: ECs/VCs: x40, platelets: x100).

Abb. 1

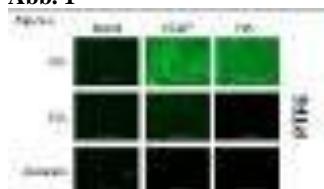
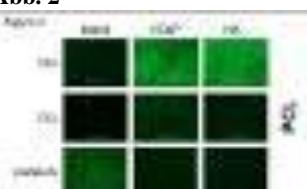


Abb. 2



S02-05

Influence of surface roughness of dental zirconia implants on their mechanical stability, cell behavior and osseointegration

*G. Hildebrand¹, M. Strickstrock², H. Rothe¹, S. Grohmann¹, I. M. Zylla², K. Liefelth¹

¹iba Heiligenstadt e.V., Biowerkstoffe, Heilbad Heiligenstadt, Deutschland

²FH Osnabrück, Labor für Metallkunde und Werkstoffanalytik, Osnabrück, Deutschland

It is generally accepted that a micrometer scale roughness supports the osseointegration of titanium implants. While abrasive technologies can easily be employed to create a microtopography on titanium surfaces, the preparation of rough ceramic surfaces is more challenging. Typically, abrasive treatments of yttria-stabilized tetragonal zirconia polycrystal (Y-TZP) surfaces result in rather smooth topographies ($R_a < 0.6 \mu\text{m}$). Furthermore, when this sandblasting process is performed after firing, a transformation of the tetragonal into the monoclinic phase is observed. Exceeding phase transformation may lead to a decreased flexural strength and an increased brittleness - two highly undesirable processes for a ceramic for load bearing applications. In the present study Y-TZP surfaces were sandblasted between the pre-sintering and the final sintering step. Instead of corundum particles, sintered Y-TZP grit was employed for blasting. By varying the particle size and the sandblasting pressure, moderately rough ($R_a \sim 1.7 \mu\text{m}$) and rough ($R_a \sim 3 \mu\text{m}$) Y-TZP surfaces could be prepared. The resulting rough Y-TZP materials were analysed with respect to their microstructure, flexural strength and 3D surface topography. The results of the subsequent *in vitro* and *in vivo* experiments reveal a cyocompatibility and a bone-implant contact that is well comparable to the reference material titanium SLA (sandblasted, large grit, acid etched).

S02-06

Stabile Kopplungen von HGF-Proteinen und RGD-Peptiden für die gerichtete Zellrekrutierung und -adhäsion auf bioinerten Hochleistungskeramiken

*F. Böke¹, N. Labude², I. Lauria¹, S. Neuss², H. Fischer¹

¹Universitätsklinikum RWTH Aachen, Zahnärztliche Werkstoffkunde und Biomaterialforschung, Aachen, Deutschland

² Universitätsklinikum RWTH Aachen, Institut für Pathologie und Helmholtz Institut für Biomedizinische Technologien – Zell- und Molekularbiologie an Grenzflächen, Aachen, Deutschland

Einleitung

Trotz ihres seit vielen Jahren kontinuierlichen Einsatzes im Bereich des Gelenkersatzes und der Knochenrekonstruktion sind Implantate aus Hochleistungskeramiken aufgrund ihrer unzureichenden Gewebeintegration nicht beliebig auf andere Anwendungsbereiche übertragbar. Durch maßgeschneiderte, stabile chemische Aktivierung und anschließende Kopplung von spezifischen Biomolekülen könnten jedoch weitere, vielfältige Anwendungsfelder geschaffen werden. Um dies zu ermöglichen, muss die ursprünglich inerte Keramikoberfläche jedoch zuerst umfassend modifiziert werden, um im Anschluss die Gewebeintegration zu begünstigen.

Material und Methoden

Auf polierten Al₂O₃, ZrO₂, ZTA und ATZ-Keramiken wurden haftfeste 100 nm starke SiO_x-Schichten durch Gasphasenabscheidung erzeugt. Anschließend wurden Silane zur Ausbildung von Amino- und Sulfhydrylgruppen einzeln und als Doppelbeschichtung appliziert. Die resultierenden Monoschichten wurden durch XPS, ATR-FTIR, und AFM charakterisiert. Mittels chemischer Quervernetzung wurden RGD-Peptide, RAD-Negativkontrollen und HGF-Proteine auf einfach und doppelt funktionalisierten Oberflächen angekoppelt. Der Kopplungserfolg wurde über ¹²⁵-Radioaktivmarkierung des RGD Peptids, HGF-Antikörper und ELISAs bestätigt. RGD- und RAD-beladene, sowie unmodifizierte Keramiken wurden mit murinen Fibroblasten (L929) und humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC) besiedelt, inkubiert, bei 30, 40, und 50 g zentrifugiert, und die auf der Oberfläche verbleibenden Zellen analysiert. Die HGF-Proteinfunktion wurde in Boyden-Kammer Migrationsversuchen an MSC und HuH7 nachgewiesen.

Resultate

Nach Silanisierung der Silikatschicht betrug die Amino- und Sulfhydryldichte auf den einzeln funktionalisierten Oberflächen ca. 90 %, auf den bi-funktionalisierten Oberflächen kombiniert ca. 80 %. AFM und XPS Analysen bestätigen die Applikation als Monolayer von ca. 0,7 nm Höhe. Durch Quervernetzung konnten RGD- und RAD-Peptide auf Amino-funktionalisierten, HGF-Proteine auf Sulfhydryl-Oberflächen, sowie beide Biomoleküle ebenfalls auf bi-funktionalisierten Oberflächen angekoppelt werden. Peptid-Radioaktivmarkierungen zeigten signifikant größere Mengen an RGD auf Quervernetzer-Bindungen gegenüber unspezifischer Adhäsion. Durch Zentrifugationsversuche konnten signifikante Verbesserungen der Adhäsion von L929 und hMSC auf RGD-beladenen Oberflächen nachgewiesen werden, im Vergleich zur RAD-beladenen Kontrolle, mit max. 65 % (RGD) zu 15 % (RAD) haftenden Zellen bei Zentrifugationskräften von 60-70 nN pro Zelle. Fluoreszenz-Aufnahmen zeigten erhöhte Mengen von FAK und pFAK Komplexen auf RGD-beladenen Oberflächen verglichen mit RAD-Kontrollen. HGF-Proteine konnten in Konzentrationen von ca. 5 ng/cm² gekoppelt werden. Durch Gold-Antikörperdetektion wurde die biologische Zugänglichkeit nach Kopplung bestätigt, sowie durch Migrationsversuche die aufrecht erhaltene Funktion des gebundenen Proteins nachgewiesen, insbesondere bei mehrstufiger Kopplung. Erfolgreiche Bindungen mit simultaner Aufrechterhaltung der Funktion von Protein und Peptid konnten dabei sowohl auf einfach- als auch bi-funktionalisierten Oberflächen nachgewiesen werden.

Diskussion

Auf Basis der Resultate konnte gezeigt werden, dass durch eine Silikat/Silan-basierte chemische Vorbehandlung inerter Hochleistungskeramiken effiziente Proteinankopplungen zur Biologisierung von Implantat-Oberflächen realisiert werden können. Durch Auswahl geeigneter Proteine konnte sowohl die Rekrutierung von Stammzellen zur modifizierten Oberfläche, als auch die Adhäsion dieser Zellen am Substrat signifikant verbessert werden. Von entscheidender Bedeutung ist hierbei eine präzise Abstimmung der chemischen Aktivierung mit der biologischen Beladung. Dadurch konnten in der vorliegenden Studie sowohl die biologische Zugänglichkeit, als auch die spezifische Peptid-/Proteinfunktionalität nach Kopplung erhalten werden. Die entwickelte, neuartige Beschichtungsstrategie ermöglicht es, im unbehandelten Zustand inerte Hochleistungskeramiken zu bioaktivieren. Im nächsten Schritt werden die funktionalisierten und biologisierten Oberflächen nun in einem Tierversuch auf ihre *In-Vivo* Aktivität hin überprüft. Bei erfolgreicher Evaluierung der vorgestellten Funktionalisierungs- und Biologisierungstechnik könnte eine Vielzahl neuer Applikationen für keramische Implantate mit direktem Gewebekontakt ermöglicht werden.

S03-01

Delivery Systems based on Nanoporous Silica Nanoparticles for Neuronal Applications

*N. Schmidt¹, T. Heemeier¹, J. Schulze², A. Warnecke², P. Behrens¹

¹Leibniz Universität Hannover, Institut für Anorganische Chemie, Hannover, Deutschland

²Hannover Medical School, Department of Otorhinolaryngology, Hannover, Deutschland

Nanoporous silica nanoparticles (NPSNPs) have already offered their great potential as delivery platforms due to their advantageous properties in previous studies [1-3]. They are suitable as delivery platforms for simple drugs and for complex bioactive molecules. The properties include a high surface area, a high porosity (up to 50%) and the amenability for surface modification, because the silanol groups at the external and internal surface can be used to modify the surface properties. Moreover, NPSNPs have shown a good biocompatibility and are biodegradable [3,4].

Our approach is the application of such delivery systems on the surface of cochlear implants to optimize the biocompatibility and to improve the electrode-nerve contact of the implant. Cochlear implants are required to treat sensorineural deafness, which is caused by damage of hair cells followed by ongoing degeneration of spiral ganglion neurons (SGNs), the nerve cells in the inner ear. The establishment of delivery systems on the implant surface for neuroprotective factors can promote different cell processes like differentiation or proliferation. Previous studies have demonstrated that rolipram and the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) are promising agents due to their ability to improve the survival and growth of SGNs [5,6].

NPSNPs were prepared via sol-gel process from alkaline aqueous solutions. Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) acted as structure directing agent to build up the porous system. The particle surface was modified with different trialkoxysilanes by post-grafting reactions to equip the surface with various functional groups and to control the release of rolipram and BDNF [7,8]. We investigated the immobilization of BDNF on the surface of NPSNPs and the incorporation of rolipram into the pores of NPSNPs. The immobilized and released amounts of BDNF were determined by using an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The release of rolipram was investigated via UV-vis spectroscopy. The cytocompatibility of the NPSNPs was investigated for fibroblasts (NIH3T3) and the neuroprotective effect of NPSNPs with immobilized BDNF and rolipram loaded NPSNPs was studied for spiral ganglion neurons. Morphology and proliferation of the SGNs and fibroblasts were investigated by light microscopy and the number of cells for fibroblasts and SGNs was determined after cultivation.

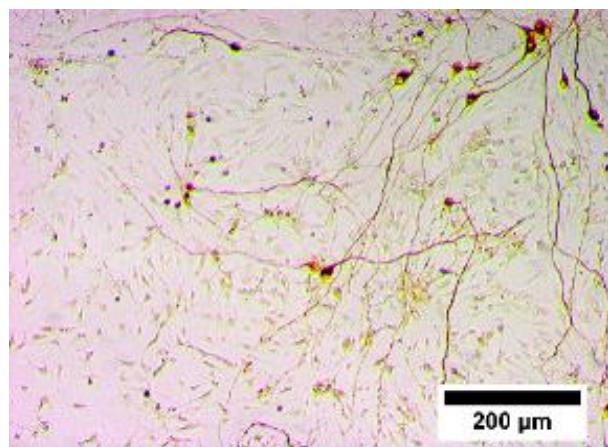
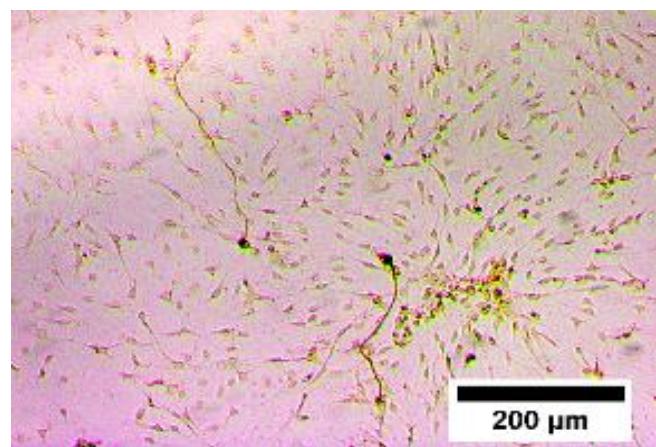
The synthesized NPSNPs were approximately 40 nm in size and had a high specific surface area ($1000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) und large pore volume ($1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$). The modified silica nanoparticles showed a decrease of the specific surface area and the pore volume, but still offered a high porosity and they could be successfully used as drug delivery systems for enclosed rolipram or immobilized BDNF. These NPSNPs also exhibit good cytocompatibility with NIH3T3 fibroblasts and increased the survival rate of spiral ganglion neurons in cell culture investigations (Figure 1 and 2).

This work was supported by the Cluster of Excellence Hearing4all.

- [1] V. Mamaeva, C. Sahlgren, M. Linden, *Adv. Drug Delivery Rev.* 2013, 65, 689-702.
- [2] A. Neumann, A. Christel, C. Kasper, P. Behrens, *RSC Adv.* 2013, 3, 24222-24230.
- [3] F. Tang, L. Li, D. Chen, *Adv. Mater.* 2012, 24, 1504-1534.
- [4] H. Yamada, C. Urata, Y. Aoyama, S. Osada, Y. Yamauchi, K. Kuroda, *Chem. Mater.* 2012, 24, 1462-1471.
- [5] K. Kranz, A. Warnecke, T. Lenarz, M. Durisin, V. Scheper, *PLOS One* 2014, 9, 1-10.
- [6] T. Stöver, T. Lenarz, *GMS Curr Top Otorhinolaryngol - Head Neck Surg* 2009, 8, 1-22.
- [7] Z.-A. Qiao, L. Zhang, M. Guo, Y. Liu, Q. Huo, *Chem. Mater.* 2009, 21, 3823-3829.
- [8] F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, *Angew. Chem.* 2006, 118, 3290-3328.

Figure 1: Light microscopic images of SGNs in presence of NPSNPs with immobilized BDNF.

Figure 2: Light microscopic images of SGNs in presence of NPSNPs loaded with rolipram.

Abb. 1**Abb. 2**

S03-02

Avidin-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel als modulares System zur Anbindung beliebiger Biotin-funktionalisierter (Bio-)moleküle

*S. van der Meer¹, M. Epple¹

¹Universität Duisburg-Essen, Anorganische Chemie und Center for Nanointegration Duisburg-Essen (CeNIDE), Essen, Deutschland

Einleitung

Calciumphosphat-Nanopartikel stellen ein ideales System für biomedizinische Anwendungen dar. Aufgrund des Vorkommens von nanokristallinem Hydroxylapatit im Hartgewebe des menschlichen Organismus weisen Calciumphosphat-Nanopartikel eine hohe Biokompatibilität, Biodegradierbarkeit und Bioaktivität auf [1]. Bei Avidin handelt es sich um ein Protein, das eine der stärksten bekannten nichtkovalenten Bindungen mit dem Biomolekül Biotin bildet. Avidin besitzt eine homotetramere Struktur. An jede Untereinheit kann ein Biotin-Molekül binden [2].

Durch eine Oberflächenmodifikation der Calciumphosphat-Nanopartikel mit Avidin konnte ein Nanotransportssystem entworfen werden, das durch die Bindung beliebiger biotinylierter Liganden ein modulares System für biologische und medizinische Anwendungen darstellt. Fluoreszierende Avidin- und Biotin-Derivate wurden verwendet, um die Partikel bei *in vitro*-Studien in HeLa-Zellen sichtbar zu machen und eine Zellaufnahme der Partikel zu zeigen.

Materialien und Methoden

Die nasschemische Synthese der Calciumphosphat-Nanopartikel wurde in Anlehnung an Kozlova et al. Durchgeführt [3]. Die Stabilisierung der Nanopartikel erfolgte mit dem verzweigten Polymer Polyethylenimin. Im Anschluss daran wurde die Oberfläche der Nanopartikel mit Silica beschichtet. Um Thiolgruppen für die Konjugationsreaktion zu erhalten, wurden die Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan umgesetzt. Die Konjugation von Avidin an die thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurde mit dem heterobifunktionellen Crosslinker Sulfo-SMCC erreicht. An solche Avidin-funktionalisierte Nanopartikel können beliebige Biotin-funktionalisierte Moleküle durch Ausnutzung der nichtkovalenten Bindung angebracht werden.

Nach jedem Reaktionsschritt wurde die Dispersion mittels Zentrifugation und Redispersierung in Reinstwasser aufgereinigt. Die *in vitro*-Studien wurden mit HeLa-Zellen mit Inkubationszeiten von 1 h und 3 h durchgeführt. Die Untersuchung der fixierten Zellen erfolgte mit konfokaler Laserscanningmikroskopie (CLSM).

Ergebnisse und Diskussion

Der hydrodynamische Durchmesser der Avidin-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel betrug ca. 200 nm (Dynamische Lichtstreuung). Das Zetapotential lag bei +21 mV.

Mit dem *Fluorescence Quenching*-Assay ließ sich die Zugänglichkeit des Avidins nach der Funktionalisierung an die Calciumphosphat-Nanopartikel untersuchen [4]. Es wurde gezeigt, dass an jedes Avidin-Tetramer der Avidin-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel ca. 2,6 Biotin-Moleküle gekoppelt wurden.

In Zellaufnahmestudien konnte die Lokalisierung der Partikel in HeLa-Zellen untersucht werden. Dafür wurden Calciumphosphat-Nanopartikel verwendet, an die fluoreszenzmarkierte Avidin- und Biotin-Derivate konjugiert wurden, und mittels CLSM intrazellulär nachgewiesen. Durch eine Überlagerung der Fluoreszenzintensitäten des Avidin- und Biotin-Derivats wurde eine Kolokalisierung der beiden Biomoleküle beobachtet. Dies zeigt die Stabilität Avidin-Biotin-Komplexes während der *in vitro*-Untersuchungen.

Als Kontrolle wurde ein fluoreszierender Avidin-Biotin-Komplex (ohne Anbindung an ein Nanopartikel) mit HeLa-Zellen inkubiert. In dieser Kontrolle fand sich der Komplex nicht in den Zellen wieder. Somit wird erst durch die Funktionalisierung des Komplexes an die Calciumphosphat-Nanopartikel eine Zellaufnahme ermöglicht.

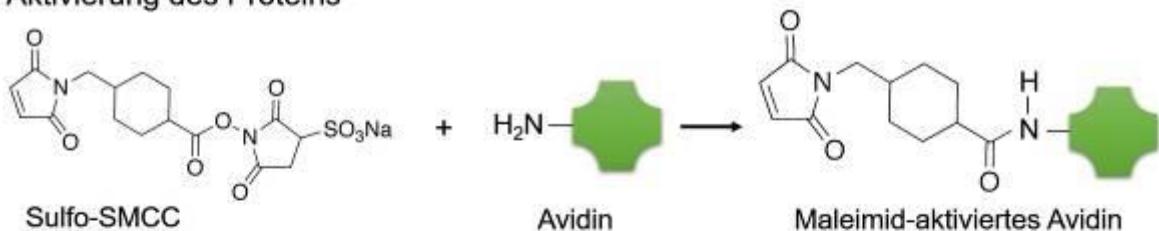
Durch die Kopplung verschiedenster biotinylierter Liganden an die Avidin-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel (Abbildung 1: Schematische Darstellung der Synthese der Avidin-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel und anschließender Kopplung mit biotinierten Molekülen) lässt sich somit ein maßgeschneidertes Wirkstoffträgersystem für biologische und medizinische Anwendungen erzeugen.

Literatur

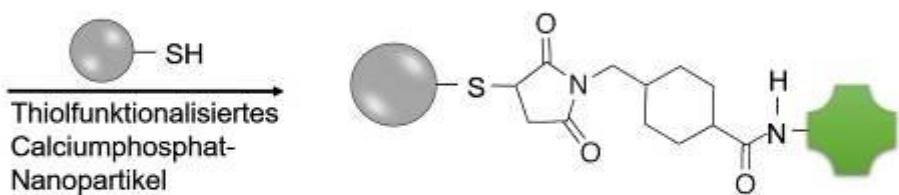
- [1] M. Epple, K. Ganesan, R. Heumann, J. Klesing, A. Kovtun, S. Neumann, V. Sokolova, *J. Mater. Chem.* 2010, 20, 18-23.
- [2] N. M. Green, *Adv. Prot. Chem.* 1975, 29, 85-133.
- [3] D. Kozlova, S. Chernousova, T. Knuschke, J. Buer, A. M. Westendorf, M. Epple, *J. Mater. Chem.* 2012, 22, 396-404.
- [4] G. Kada, H. Falk, H. J. Gruber, *BBA* 1999, 1427, 33-43.

Abb. 1

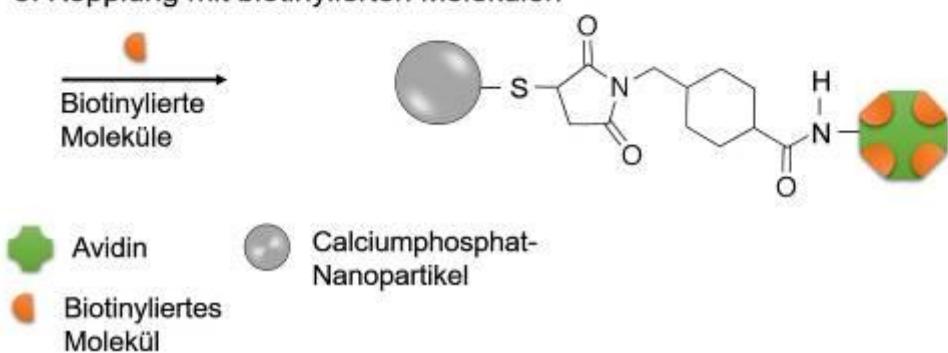
1. Aktivierung des Proteins



2. Konjugation mit einem Calciumphosphat-Nanopartikel



3. Kopplung mit biotinylierten Molekülen



Avidin

Biotinyliertes Molekül

Calciumphosphat-Nanopartikel

S03-03

Stabilizer-free gold nanoparticle bioconjugates as efficient transfection agents in regulatory T cells

*S. Barcikowski¹, L. Gamrad¹, W. Rehbock¹, W. Hansen²¹University of Duisburg-Essen, Technical Chemistry I, Essen, Deutschland²University Hospital Essen, Institute of Medical Microbiology, Essen, Deutschland

Immune responses have to be tightly controlled to guarantee maintenance of immunological tolerance and efficient clearance of pathogens without induction of unspecific side effects. CD4+CD25+ regulatory T cells (Tregs) play an important role in these processes due to their immunosuppressive function. Genetic modification of Tregs would be helpful to understand which molecules and pathways are involved in their function, but currently available methods are limited by time, costs or efficacy. The current gold standard in this application is electroporation, which yields 40% of gene expression but also suffers from a cell viability of only 55%. Bioconjugated gold nanoparticles (AuNPs) may be a suitable alternative as they can act as carriers to transport genetic information into murine Tregs. [1]

This work focuses on the gold nanoparticle-mediated transfection of nucleic acids in different relevant biomedical applications. In previous experiments we examined to what extend the addition of ligand-free laser-generated gold nanoparticles in a size range from 14–89 nm can be used to improve transfection protocols with plasmid DNA in canine mammalian cells. These experiments showed that bare AuNPs significantly increases the transfection efficiency of DNA-expression by the plasmid depending on nanoparticle size. In the end, 59 nm nanoparticles lead to a 6-fold higher efficiency than the usage of only transfection reagents. [2, 3]

In more recent experiments we examined to what extend bivalently functionalized gold nanoparticle conjugates can be used to improve the transfection of murine Tregs. These conjugates were composed of an unspecific oligonucleotide for improving colloidal stability and a cell penetrating peptide designed to ease cellular uptake. These conjugates were co-incubated with a specific siRNA and consecutively added to GFP+ regulatory T cells. TEM as well as confocal microscopy studies could show that the conjugates were transported into the cytoplasm of GFP+ regulatory T cells (Figure 1A and B). Cellular uptake went along with the translocation of dissolved siRNA across the cell membrane into the cytoplasm, which could be verified by the downregulation of GFP expression in the corresponding cells by up to 50% without the utilization of any additional transfection reagent or method. (Figure 1C) Cell viability in this case was comparable to common methods. Hence, gold nanoparticle-conjugates were shown to be superior to commonly used transfection methods especially for murine regulatory T cells.

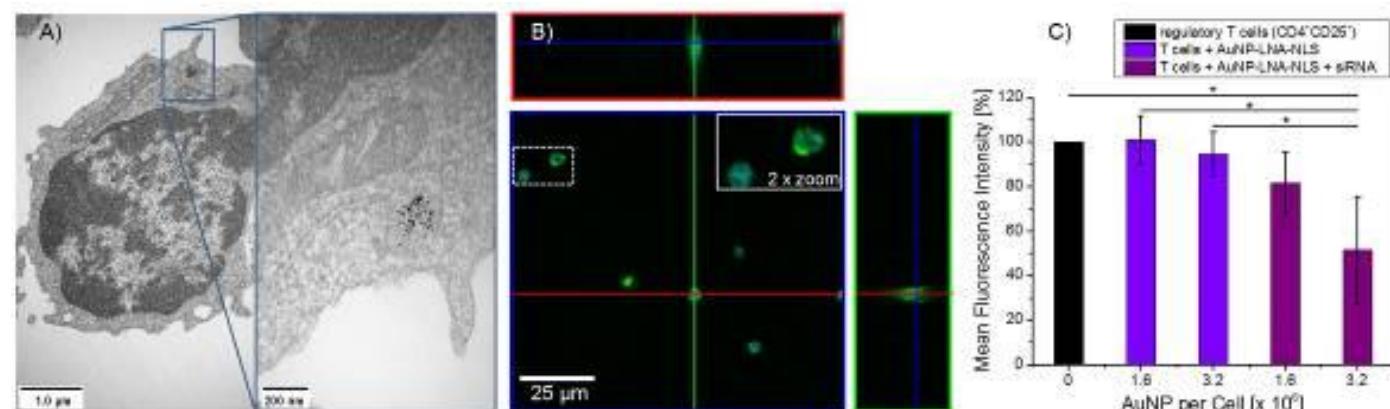
Abb. 1

Translocation of bivalent nanoconjugates into the cytoplasm of GFP+ regulatory T cells verified by TEM (A) as well as confocal microscopy. The confocal images of clusters shown in green (middle) can be colocalised with the cell nuclei shown in blue (B). Downregulation of GFP expression shown by the reduction of mean fluorescence intensity for two different AuNP doses. (C)

References

- [1] Gamrad, L.; Rehbock, C.; M., W. A.; Buer, J.; Barcikowski, S. & Hansen, W.; Sci. Rep., 2016, 6: 28709.
- [2] Petersen, S.; Soller, J. T.; Wagner, S.; Richter, A.; Bullerdiek, J.; Nolte, I.; Barcikowski, S. & Escobar, H. M.; J. Nanobiotechnol., 2009, 7, 1–6.
- [3] Durán, M. C.; Willenbrock, S.; Barchanski, A.; Müller, J.-M. V.; Maiolini, A.; Soller, J. T.; Barcikowski, S.; Nolte, I.; Feige, K. & Murua Escobar, H.; J. Nanobiotechnol., 2011, 9, 1–11.

Abb. 1



S03-04

Magnetoliposomes for temperature-triggered drug delivery

*S. M. Dadfar¹, D. Camozzi², J. Metselaar¹, S. Banala¹, F. Kiessling¹, T. Lammers¹

¹RWTH Aachen, Aachen, Deutschland

²University of Urbino ‘Carlo Bo’, Department of Biomolecular Sciences, Urbino, Italien

Introduction

Liposomes are nanosized phospholipid vesicles with a bilayered membrane structure. They have been widely applied in drug targeting, especially in cancer treatment. Liposome encapsulation can alter the spatial and temporal distribution of encapsulated drug molecules, reducing side effects and increasing treatment efficacy. Liposomes can be made thermosensitive by tuning the phase transition temperature (T_m) of the lipid bilayer between 42–46 °C. Such temperature-sensitive liposomes release encapsulated drugs when exposed to hyperthermia. Heat can be generated locally within the liposomes by using magnetic fluid hyperthermia. We have developed thermosensitive magnetoliposomes (TSML) by co-encapsulating superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) together with drug (prednisolone sodium phosphate) and model drug (calcein) in the core of liposomes.

Methods

Citric acid-coated SPION were synthesized using Fe(II) and Fe(III) salt chemical co-precipitation with aqueous ammonia solution. Different parameters affecting SPION size, dispersity and stability including temperature, pH, time, sonication, centrifuge and stirring speed were investigated. SPION prepared at 25 °C and with stirring time 30 min had the smallest size with narrow size distribution (TEM showed a core size 10.1 ± 1.8 nm). Thermosensitive magnetoliposomes were prepared using the thin film hydration method. DPPC/CHOL/DSPE-PEG2000 (90/5/5) was dissolved in chloroform and dried in a rotary evaporator under vacuum at 50 °C until a thin lipid film layer was obtained. The magnetoliposomes were prepared by adding different concentrations of SPION into the flask under mechanical stirring at 60 °C for 2 h. The magnetoliposome dispersion was passed thrice through a 200 and 100 nm polycarbonate membrane with an extruder at 60 °C. The iron concentration and phospholipid content of the magnetoliposome were measured by using of phenanthroline and Stewart assays, respectively. The SPION generate heat upon exposure to low frequency alternating magnetic fields (AMF), due to magnetic hysteresis loss. Specific absorption rates (SAR) were measured at 187 kHz frequency and 20 kA.m⁻¹ AC magnetic field.

Results

Table 1 shows the initial and final concentration of iron, the ratio of final iron to phospholipid content after purification and the percentage of the iron encapsulated in the liposomes. The results show that the percentage of the iron encapsulated in the liposomes decreased with increasing iron concentration. Figure 1A shows TEM micrographs of ML3 magnetoliposome loaded with hydrophilic SPION in the core. Figure 1B shows time-dependent heating profiles of magnetoliposomes loaded with different concentration of the SPION. The measured SAR values of magnetoliposomes are presented in Table 1 which is provided based on Figure 1B. The SAR is calculated using the following equation:

$$\text{SAR} = C \cdot \Delta T / \Delta t \cdot 1/m_{\text{Fe}}$$

where C is the specific heat capacity of the sample ($C_{\text{water}} = 4.18 \text{ J.g}^{-1} \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$), $\Delta T / \Delta t$ is the initial slope of the time-dependent temperature curve and m_{Fe} is the weight fraction of Fe in the sample. From Table 2, it can be concluded that ML3 has the best and optimum SAR value. Although, the ML1 has the highest value of SAR, but we cannot reach the desired temperature which is between 37–43 °C.

Abb. 1

Table 1: characterization of magnetoliposomes prepared

Sample name	Initial concentration of iron (mg/ml)	Final concentration of iron (mg/ml)	Final iron/phospholipid content after purification (g/mmol)	Percentage of iron encapsulated (mg/mg)	$(\Delta T / \Delta t) \cdot 10^3$	$m_{\text{Fe}} \cdot 10^3$	SAR (W.g ⁻¹)	$\tau(\text{sec})^*$
ML0	0.00	0.000	0.0000	0.000	-	-	-	-
ML1	0.05	0.041±0.008	0.0021	82.0	13.5	0.041	1377.66	-
ML2	0.20	0.159±0.009	0.0080	79.5	14	0.159	368.4	-
ML3	0.50	0.370±0.008	0.0185	74.0	37.5	0.37	424.05	352
ML4	0.80	0.562±0.009	0.0281	70.3	43	0.562	320.13	270
ML5	1.20	0.775±0.011	0.0388	64.6	56	0.775	302.33	148
ML6	1.50	0.951±0.010	0.0476	63.4	65.5	0.951	288.17	117

* Time for increasing temperature from 37 to 43 °C

Abb. 2

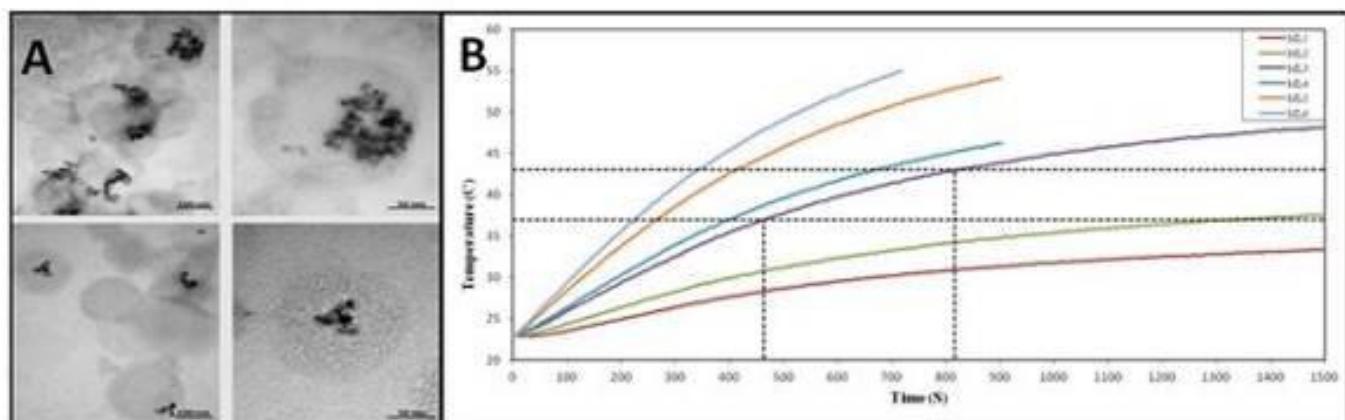


Fig 2. TEM micrograph of ML3 sample (A), Time dependent heating profiles of magnetoliposomes (B)

S03-06

Carbon nano fibers for 3D-electrode scaffolds

*T. Weigel¹, T. Pfister¹, T. Schmitz¹, M. Jannasch¹, S. Gaetzner¹, J. Hansmann¹

¹Uniklinik Würzburg, Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Würzburg, Deutschland

Introduction

A central challenge of current electrodes is the integration into the target tissue, to minimize the energy loss and inflammatory response at the interface. The combination of suitable materials and nanostructures is promising for an effective energy transfer from electrode to the surrounding medium. To improve the tissue compatibility, a 3D electrode design with cell infiltration characteristics could be appropriate.

In our study, 3D carbon nano fiber structures were generated. This material combines applicable electrical properties and the possibility to create nano fibers based on electrospinning. By varying the fiber dimensions and carbonaceous modifications, we tried to identify structural configurations that provide direct cell/tissue contact and the possibility to reduce the foreign body reaction.

Materials & Methods

The conductive nano fibers of different diameters were generated by electrospinning of a polyacrylonitrile (PAN) solution. The PAN fibers were converted to carbon fibers by means of an oxidation step and subsequent carbonization. Carbonaceous modifications were conducted by ionothermal carbonization of the fibers in NaCl. The properties of the fibers were characterized by SEM, measurements of conductivity, and electrical impedance. Biocompatibility was investigated with human fibroblasts. The electrical stimulation characteristics were tested with muscle tissue in an organ bath.

Results

For the experiments, carbon nano fibers with 140 and 500 nm were generated with a characteristic conductivity of 200 S/cm. The modified fabrication process produced fibers with slightly higher diameters and showed graphene-like structures or fiber-linking carbon layers. In addition, the ionothermal carbonization showed a more distorted fiber network, resulting in an increase in mesh size and fiber orientation. Tensile tests showed a decrease in young's modulus, but an increase in flexibility.

During impedance spectroscopy, the carbon fibers exhibited a capacitive charge transfer, a behavior similar to titanium nitride. Additionally, the high surface area resulted in an increased charge injection capacity.

Short term (< one week) and long term (six weeks) incubation with fibroblasts showed the reaction of human fibroblasts like proliferation, viability and collagen expression on the different fiber morphologies. For testing the functionality, the generated electrodes were compared with commercial electrodes in pacing experiments with contracting tissue in an organ bath.

S04-01

Komposite aus Strontium-substituierten Pastenzementen und Kollagen-Silikat Xerogel als injizierbarer Knochenersatz

*M. Schumacher¹, A. Sühnel¹, S. Rößler², T. Hanke², A. Lode¹, M. Gelinsky¹

¹TU Dresden, Zentrum für translokale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung, Dresden, Deutschland

²TU Dresden, Werkstoffwissenschaften/Max Bergmann Zentrum für Biomaterialien, Dresden, Deutschland

Fragestellung

Calciumphosphat-Knochenzemente kommen wegen ihrer hervorragenden Biokompatibilität und Osteokonduktivität in der klinischen Versorgung knöcherner Defekte zum Einsatz. Mit dem Ziel einer erleichterten Verarbeitbarkeit und der Möglichkeit einer minimalinvasiven Applikation des Zements wurden sog. Pastenzemente entwickelt, die durch Verwendung eines nicht wässrigen Trägerliquids ein Aushärten des Zementprecursors erst bei Kontakt mit wässrigen Medien und damit nach Applikation in den Knochendefekt erlauben [1]. Nachteil solcher Zementsysteme ist ihre fehlende Makroporosität, welche für eine schnelle Integration in das umliegende Knochengewebe erforderlich wäre. Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines *in-situ* Poren-bildenden Zements durch Integration bioaktiver Kollagen-Silikat Xerogel-Partikel [2], welche eine gegenüber CaP erhöhte Degradationsrate aufweisen.

Methoden

Die Synthese des Kollagen-Silikat Xerogels (B30) erfolgte in Suspension aus fibrilliertem, bovinem Kollagen und Tetraethoxysilan (TEOS) [2]. Durch anschließendes Trocknen und Mahlen wurden B30-Partikel mit einem Durchmesser von 250-425 µm hergestellt. Diese wurden einem Apatit bildenden Pastenzement auf Basis von α -Tricalciumphosphat (pCPC, Fa. InnoTERE) sowie einem Strontium-substituiertem Pastenzement (pS100) beigemischt (5 und 10 Gew.-%). Das Komposit wurde zunächst bei 100% RH und 37°C ausgehärtet und anschließend über 21 Tage in simulierter Körperflüssigkeit (SBF) ausgelagert. Es wurden Injizierbarkeit, Gefüge und mechanische Eigenschaften sowie die *in vitro* Zytotoxizität der Komposite untersucht.

Ergebnisse

Durch Beimischung von 5 bis 10 Gew.-% B30 zu den verwendeten Zementpasten nahm die Injizierbarkeit der Komposite ab, jedoch konnte dieser Effekt durch Anpassung des Gehalts an Trägerliquid ausgeglichen werden. Aufgrund der Einbettung der B30-Partikel in die Zementmatrix (Abb. 1A) kam es zu einer Reduzierung der mechanischen Eigenschaften der frisch abgebundenen Komposite, jedoch führte die durch Degradation des B30 induzierte Zunahme der Porosität mit der Zeit nicht zu einer weiteren Abnahme der Festigkeit (Abb. 1B), was auf eine fortschreitende Verfestigung der Matrix durch Rekristallisierung der Zement- und insbesondere B30-Degradationsprodukte schließen lässt. Weiterhin konnte die Zytokompatibilität der hergestellten Komposite *in vitro* bestätigt werden.

Schlussfolgerungen

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse stellt die Kombination aus Calciumphosphat-Knochenzementen mit Kollagen-Silikat Xerogel Partikeln eine vielversprechende Materialkombination für die Versorgung knöcherner Defekte dar.

Literatur

[1] S. Heinemann *et al.*: Properties of injectable ready-to-use calcium phosphate cement based on water-immiscible liquid. *Acta Biomater* 9

(2013) 6199-6207

[2] S. Heinemann *et al.*: Bioactive silica-collagen composite xerogels modified by calcium phosphate phases with adjustable mechanical properties for bone replacement. *Acta Biomater* 5 (2009) 1979-1990

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert (SFB/Transregio 79).

Abb. 1

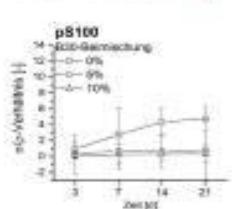
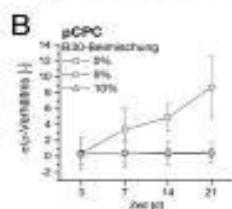
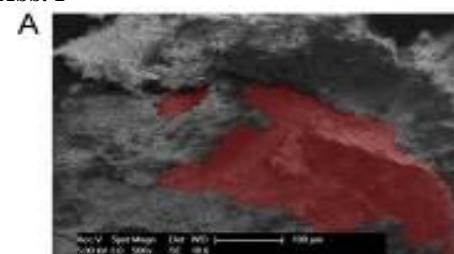


Abb.1: A: REM-Aufnahme eines in pCPC eingebetteten B30-Partikels (coloriert).
B: Verhältnis von Druckfestigkeit und Porosität von pCPC und pS100 mit 0, 5 und 10 Gew.-% B30.

S04-02

Methodische Probleme und alternative Entwicklungen bei der materialspezifischen Interpretation der initialen bakteriellen Adhäsion auf Biomaterialien

*H. Rothe¹, S. Schkölziger¹, N. Förster¹, K. Liefelth¹

¹Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V., Biowerkstoffe, Heilbad Heiligenstadt, Deutschland

Fragestellung

Die Adhäsion von Mikroorganismen an Oberflächen ist ubiquitär und stellt bei zahlreichen Applikationen die entscheidende Herausforderung bei der Entwicklung von Biomaterialien dar. In der Methodik der Charakterisierung dieser Adhäsionsvorgänge liegt eine enorme Gefahr der Fehlinterpretation der erhaltenen Daten. So werden *in vitro*-Testungen zur bakteriellen Adhäsion selten nach standardisierten Testroutinen durchgeführt, je nach Testung variieren essentielle Parameter wie Bakterienkonzentration und Zeitpunkt der Beobachtung oder Dauer der Inkubation. Dies führt einerseits zu einer schlechten Vergleichbarkeit von Untersuchungen. Andererseits lassen sich die aus derartigen Testungen erhaltenen Adhäsionsparameter nur als Systemparameter interpretieren, in die neben dem eigentlichen Materialeinfluss auch periphere Komponenten, wie z.B. Zeit- und Konzentrationskomponenten, eingehen. Eine exakte Bestimmung von Materialparametern zur Beschreibung der mikrobiellen Adhäsion ist somit nicht möglich.

Die hier vorgestellte Methode basiert auf einer kinetischen Betrachtung der bakteriellen Adhäsion an Biomaterialien. Dabei wird der Adhäsionsvorgang unter Variation der Bakterienkonzentration zeitaufgelöst beurteilt. In Anlehnung an kinetische Adsorptionsmodelle wird mit dem so erhaltenen Datensatz die Kalkulation zeit- und konzentrationsunabhängiger Parameter möglich. In der vorgestellten Studie wurde anhand der beschriebenen Methode die bakterielle Adhäsion einer Mischkultur in Abhängigkeit physikochemischer Parameter der Biomaterialoberfläche quantifiziert.

Material & Methoden

Als bakterielles Modell wurde eine Mischkultur von *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* in vier aufsteigenden Konzentrationen ($10^6/\text{ml}$ - $5 \times 10^7/\text{ml}$) eingesetzt. Die Adhäsionsversuche wurden in Fließkammern unter einem permanenten Medienflow durchgeführt und zeitaufgelöst mittels Lichtmikroskopie quantifiziert.

Die zu charakterisierenden Materialien wiesen ein aus physikochemischer Sicht abgestuftes Spektrum von unpolaren, hydrophoben bis zu sehr polaren bzw. hydrophilen Oberflächen auf. Im Einzelnen handelte es sich dabei um unpolare Polysiloxanschichten, in welche mittels Plasmafunktionalisierung im Niederdruck-Sauerstoffplasma schrittweise polare Funktionalitäten eingebracht wurden. Die so für die Testungen hergestellten physikochemischen Zustände wiesen ein Benetzbarkeitsspektrum von $\sim 20^\circ$ bis $\sim 105^\circ$ Wasserkontaktwinkel auf.

Die bakteriellen Adhäsionskinetiken wurden unter Anwendung adsorptionskinetischer Modelle gefittet und ausgewertet. Folgende Parameter der Biomaterialien wurden für die fünf Monokulturen und die Mischkultur ermittelt:

- a) Initialgeschwindigkeit
- b) Gleichgewichtssättigung
- c) Halbsättigungskonstante

Ergebnisse/Schlussfolgerung

Die Ergebnisse bestätigten die These, dass Punktmessungen die Gefahr der Fehlinterpretation bieten. Während bei geringen Bakterienkonzentrationen statistisch signifikante Unterschiede zwischen hydrophoben und hydrophilen Oberflächen erkennbar sind, werden diese bei höheren Konzentrationen durch die zunehmend dominierenden Wechselwirkungen unter den Mikroorganismen schwächer und sind ab einer bestimmten Konzentration kaum nachzuweisen (Abb. 1).

Die Kalkulation konzentrations- und zeitunabhängiger, kinetischer Parameter lieferte einen deutlich quantifizierbaren Einfluss der physikochemischen Eigenschaften der Biomaterialoberfläche unabhängig von der eingesetzten Bakterienkonzentration bzw. des Zeitpunktes der Beobachtung. Demnach zeichnen sich hydrophile Oberflächen durch eine signifikant geringere Affinität zur eingesetzten Mischkultur aus als Oberflächen mit einem Wasserkontaktwinkel zwischen 60° - 90° (Abb. 2).

Es konnte in der vorgestellten Studie eine Methode validiert werden, mit der es möglich ist, materialspezifische Parameter der mikrobiellen Adhäsion an Biomaterialien ohne den Einfluss von Systemparametern wie Konzentration und Zeit zu generieren. Durch die Anwendung der Methode können Studien zur mikrobiellen Adhäsion in Zukunft wesentlich vergleichbarer gestaltet und sicherer interpretiert werden.

Abbildung 1: Vergleich der hydropophoben Oberfläche (Referenz) zur hydrophilsten Oberfläche anhand der aus Adhäsionskinetiken extrapolierten, maximalen Flächenbelegung (q_{\max}) für die vier eingesetzten Bakterienkonzentrationen

Abbildung 2: Halbsättigungskonzentration in Abhängigkeit der Adhäsionsspannung [$g_{lv} \cdot \cos(Q)$] als konzentrations- und zeitunabhängiger Parameter der mikrobiellen Adhäsion

Abb. 1

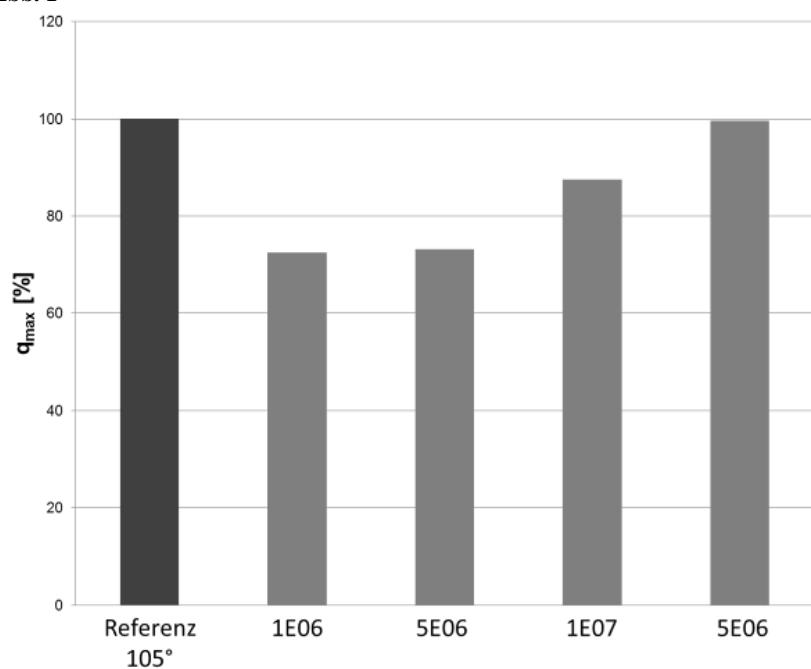
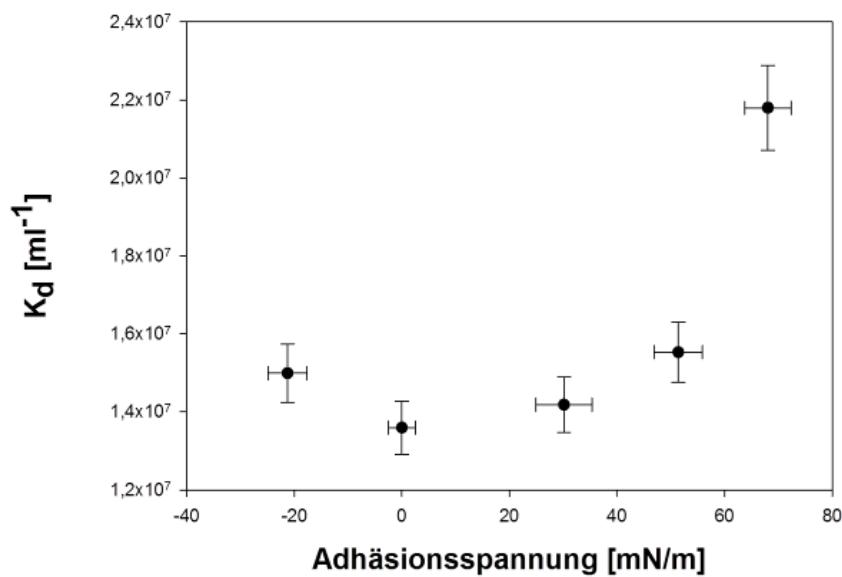


Abb. 2



S04-03

Biofunktionalisierung von Titanimplantaten mit einem Multilayersystem aus BMP-2 und Fibronectin

*V. Ettelt^{1,2}, P. W. Kämmerer³, M. Epple², M. Veith¹

¹Westfälische Hochschule, Labor für Biophysik, Recklinghausen, Deutschland

²Universität Duisburg-Essen, Anorganische Chemie und Center for Nanointegration Duisburg-Essen (CeNiDE), Essen, Deutschland

³Universitätsmedizin Rostock, Mund-, Kiefer-, plastische Gesichtschirurgie, Rostock, Deutschland

Hintergrund

Biofunktionalisierte Titanoberflächen mit dem Wachstumsfaktor BMP-2 sind in der Implantatforschung von großem Interesse. BMPs besitzen wichtige Funktionen in der Regulation des Knochenaufbaus. Trotz der hohen Biokompatibilität von Titan ist *in vivo* die spezifische Zelladhäsion aufgrund der Ausbildung einer unspezifischen Proteinmischschicht auf der Implantatoberfläche eingeschränkt [1,2]. Bei BMPs verhindert das eine selektive Adsorption an der Implantatoberfläche. Die Umgehung dieses Problems geschieht häufig durch den Einsatz unphysiologisch hoher Dosierungen an BMP-2. Die Folge sind unerwünschte Nebenwirkungen wie ektopische Knochenbildung und Entzündungsreaktionen [3,4]. Daher ist eine multifunktionale Biofunktionalisierung notwendig, die einerseits nicht-spezifische Proteinadsorption verhindert und gleichzeitig die spezifische Immobilisation von definierten Mengen gewünschter Proteine ermöglicht [5].

Methodik

In dem hier vorgestellten Ansatz wurde eine biotinylierte TiO₂-Modelloberfläche mittels Self-Assembly von Streptavidin biofunktionalisiert [6]. Diese bindet biotinyliertes Fibronectin (bFN) über spezifische nichtkovalente Wechselwirkungen. Eine zweite Streptavidinlage ermöglicht die spezifische Anbindung einer weiteren Proteinalage [7] wie des biotinylierten Wachstumsfaktors BMP-2 (bBMP-2).

Ergebnisse

Mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie und Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie konnte der Aufbau der supramolekularen Architektur nachgewiesen werden. Die Anbindung der biotinylierten Proteine ist hochgradig spezifisch. Wie bereits für bFN *in vitro* und *in vivo* gezeigt [8,9], liegt auch die Kombination von bFN mit bBMP-2 in einer biologisch aktiven Konformation vor.

Schlussfolgerung

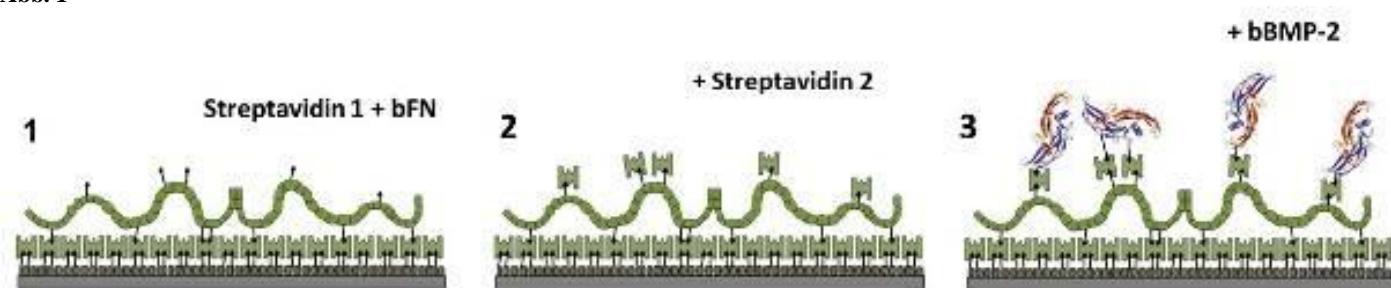
Der vorgestellte Ansatz bietet eine vielversprechende Alternative zu Biofunktionalisierungsansätzen, die auf reiner Physisorption von Wachstumsfaktoren beruhen. Nebenwirkungen, die durch BMP-2-Überdosierung hervorgerufen werden, entfallen. Neben der Suppression der unspezifischen Proteinadsorption besitzt der multifunktionale Biofunktionalisierungsansatz eine zelladhäsionsfördernde sowie eine osteoinduktive Komponente durch die Immobilisation von bFN und bBMP-2.

Referenzen

- [1] B. Kasemo, J. Gold, "Implant surfaces and interface processes", *Adv. Dent. Res.*, vol. 13, pp. 8-20, 1999.
- [2] S. Raghavendra, M. C. Wood, T. D. Taylor, "Early wound healing around endosseous implants: a review of the literature", *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, vol. 20, pp. 425-431, 2005.
- [3] C. Carreira, F. H. Lojudice, E. Halesik, R. D. Navarro, M. C. Sogayar, J. M. Granjeiro, "Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives", *J. Dent. Res.*, vol. 93, pp. 335-345, 2014.
- [4] J. Even, M. Eskander, J. Kang, "Bone morphogenetic protein in spine surgery: current and future uses", *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, vol. 20, pp. 547-552, 2012.
- [5] M. Hajimiri, S. Shahverdi, G. Kamalinia, R. Dinarvand, "Growth factor conjugation: strategies and applications", *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 103, pp. 819-838, 2014.
- [6] M. Lehnert, M. Gorbahn, C. Rosin, M. Klein, I. Köper, B. Al-Nawas, W. Knoll, M. Veith, "Adsorption and conformation behavior of biotinylated fibronectin on streptavidin-modified TiO_x surfaces studied by SPR and AFM", *Langmuir*, vol. 27, pp. 7743-7751, 2011.
- [7] M. Lehnert, C. Rosin, W. Knoll, M. Veith, "Layer-by-layer assembly of a streptavidin-fibronectin multilayer on biotinylated TiO_x", *Langmuir*, vol. 27, pp. 1732-1737, 2013.
- [8] M. Lehnert, M. Gorbahn, M. Klein, B. Al-Nawas, I. Köper, W. Knoll, M. Veith, "Streptavidin-coated TiO₂ surfaces are biologically inert: Protein adsorption and osteoblast adhesion studies", *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 100, pp. 388-395, 2012.
- [9] P. Kämmerer, M. Lehnert, B. Al-Nawas, V. Kumar, S. Hagmann, A. Alshiri, B. Frerich, M. Veith, "Osseointegrity of a specific streptavidin-biotin-fibronectin surface coating of biotinylated titanium implants - a rabbit animal study", *Clin. Impl. Dent. Rel. Res.*, vol. 17, pp. 601-612, 2015.

Abbildung 1: Biofunktionalisierung einer biotinylierten TiO₂-Oberfläche mit biotinyliertem Fibronectin (bFN) und biotinyliertem BMP-2 (bBMP-2). Nach Silanisierung und Biotinylierung einer TiO₂-Oberfläche wird mittels Self-Assembly eine antiadhäsive Streptavidin-Monolage aufgebracht.^[8] Anschließend wird die Oberfläche mit bFN abgesättigt (1). Nach Aufbringen einer weiteren Streptavidinlage stehen weitere Bindungsplätze für biotinylierte Proteine zur Verfügung (2). Diese werden mit bBMP-2 abgesättigt (3).

Abb. 1



S04-04

Surface engineering by means of a toolbox of biodegradable 3-armed macromers

*B. M. Müller¹, R. Loth¹, P.-G. Hoffmeister¹, L. Kalbitzer², M. C. Hacker¹, M. Schulz-Siegmund¹

¹Universität Leipzig, Pharmazeutische Technologie, Leipzig, Deutschland

²Universität Leipzig, Biophysikalische Chemie, Leipzig, Deutschland

Introduction

Controlling material-tissue interaction with respect to tissue mechanics, physiological environment and biochemical signaling is beneficial to achieve guided tissue regeneration.

We recently developed a toolbox of macromers that can be cross-copolymerized into constructs with tunable hydrophilicity, swelling, biodegradability and mechanics¹. These molecules can additionally be processed into covalently modifiable substrates by copolymerization with monomethacrylated PEG (PEGMA).

Surface parameters of a biomaterial are of highest relevance for cell-material-interactions. We processed scaffold components into polymer films which function as analytical tool for surface modifiable scaffolds for bone tissue engineering to rationalize development of 3D constructs

Presentation of functional groups was assessed by the immobilization of a low molecular weight fluorescent dye and alkaline phosphatase (ALP). Additionally, surface structures were visualized by atomic force microscopy. Proof of concept for functional film modification was given by cell adhesion studies including RGD-peptide modified films.

Experimental Methods

Films were cross-polymerized onto MA-silane layer bearing glass-disks using thermally controlled radical polymerization reactions with benzoyl peroxide and 2-(4-dimethyl-aminophenyl)-ethanol as initiator/accelerator system. The films consisted of core molecules (T134, T170, T450) which are trivalent alcohols with different degrees of ethoxylation and thus molecular weights. Cores are flanked by lactic acid (LA) side chains of variable length (LA2, LA4, LA6). The macromers can further be modified using PEGMAs (1000 Da) and methoxyPEGMAs (mPEGMA with 475 Da). PEGMAs anchoring in the film surface, provided a free hydroxyl group for carboxylation with succinic anhydride and activation by dicyclohexyl-carbodiimide and N-hydroxysuccinimide. Density of functional groups present at the surface was determined by the immobilization of 5-((aminopentyl)thiouredyl)-fluorescein (Fcad). Biotinylated ALP was immobilized similarly and by specific binding employing biotin-streptavidin-biotin sandwich structures. Visualization of surface structures was conducted by AFM where 1 μm² images of films in dry and equilibrated state were generated. Adhesion of human adipogenic stem cells (hASCs) was determined for the most relevant compositions including materials functionalized with cyclic RGDFK.

Results and Discussion

Fcad immobilization capacity strongly depended on macromer hydrophilicity. While we detected up to 1 nmol/cm² Fcad on hydrophilic T450LA2 films, we determined 30 fold less Fcad on hydrophobic macromers, such as T134LA6, inspite of high PEG chain density. These differences strongly diminished when ALP was immobilized instead of small Fcad. Divergent Fcad immobilization results were addressed to stronger swelling of hydrophilic macromers reasoning a three-dimensional immobilization of the freely diffusing small molecule Fcad.

Surface reactivity was improved by the addition of shorter mPEGMAs with more pronounced effects on hydrophobic macromers. Studies with T134LA6 and T450LA2 revealed that compositions with 20% of the PEGMA and 10% of the filler mPEGMA were sufficient to increase the immobilizing capacity by factor two to five depending on the macromer. AFM images displayed that PEGMA was associated in domains on surfaces of the polymer films. Addition of mPEGMA decreased domain size but strongly increased number of these domains creating a broadened distribution and thus higher accessibility of PEGMA for functionalization.

Numbers of adherent hASCs were almost independent of the macromer type but strongly decreased when 20% PEGMA were incorporated into the films. By functionalizing those films with RGDFK peptide, cell numbers exceeded those of controls without PEGMA by more than factor two. Association of RGD peptide on top of PEGMA nanodomains mediated adhesiveness as the addition of mPEGMA caused no further increase in cell number.

Conclusion

We engineered surfaces from a toolbox of biodegradable macromers that can be cross-copolymerized with PEGMA to functional films. The surface properties, namely immobilization capacity towards different analytes and cell adhesion were controlled by molecular weight of macromers and cross-copolymerization rates with PEGMAs. Relevant effects on cellular response were shown by immobilization of RGD peptides.

References

R. Loth *et al.*, Acta Biomaterialia 26:82-96, 2015

Acknowledgments

The authors thank the German Research Council (DFG SFB/Transregio 67) for financial support.

S04-05

Regulated adhesion of HUVEC cells on polyelectrolyte multilayer coated surfaces

*A. Rudt¹, X. Xiong², R. Krastev^{1,2}

¹Hochschule Reutlingen University, Intelligente Oberflächen, Reutlingen, Deutschland

²Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut an der Universität Tübingen, Biomaterialien, Reutlingen, Deutschland

Surface coatings are widely used to control the interaction between implants and the surrounding tissues. This contact should be precisely tuned according to the therapeutic purposes and the desired outcome. One main task is to reduce the foreign body reaction by immune response.

The Layer-by-Layer (LbL) coating technology allows formation of Polyelectrolyte (PE) Multilayers (PEM) onto surfaces of the implants. It is based on the alternating deposition of polycations and polyanions. The layers have a thickness of few hundred nano meters, and can change the interfacial properties of the coated materials significantly.

In this presentation we will demonstrate the physical properties of different coatings with regard to the cellular behavior when in contact with such coatings. The coatings were prepared using different polyelectrolyte to vary the charge, charge density, stiffness and the topography/roughness of the surfaces after the coating.

Two representative coatings were selected for further characterizations. One coating showed excellent compatibility to HUVEC cells where the cells could well adhere and proliferate. Another coating showed strongly reduced adhesion of HUVEC and cellular activity.

The physical properties of both coatings were studied utilizing Atomic Force Microscopy (AFM). Tapping mode configuration in liquid environment was used to characterize the interface topography. Force spectroscopy measurements were applied. These enable the measurement of elastic properties such as the Young's Modulus and the relaxation time.

The results can be correlated to the biological measurements using HUVEC Cell cultures and the understanding of such interactions can be applied to modify surfaces more specifically to achieve different goals.

Acknowledgement

The project is financially supported by the Program "Innovative Projekte / Kooperationsprojekte" an den Hochschulen Baden-Württemberg".

S04-06

Quantitative Bewertung der Osseointegration von Implantaten: „Jahresring-Algorithmus“ für die Analyse dreidimensionaler Bilddaten

*S. Kottke¹, D. Linde¹, P. Saupe², G. Schneider¹

¹Universitätsklinikum Jena, Klinik für HNO-Heilkunde, Biomateriallabor, Jena, Deutschland

²Ernst-Abbe-Hochschule, Jena, Deutschland

Fragestellung

Die Osseointegration von Knochenersatzmaterialien bzw. Implantaten im Knochen ist für die Evaluierung ihrer Biokompatibilität ein entscheidendes Kriterium. Für ihre quantitative Bewertung ist der Anteil der Implantatoberfläche mit direktem Knochenkontakt (Bone-Implantat-Contact, BIC) bis heute ein Goldstandard. Diese Analyse sollte allerdings durch die Ermittlung weiterer Parameter ergänzt werden, die zusätzliche Aussagen über Biokompatibilität, Heilungsverhalten und mechanische Eigenschaften des umgebenden Knochens liefern. Die Definition von "jahresringartig" konzentrisch um das Implantat angeordneten Regions-of-Interest (ROI) in 3D-Datensätzen kann als Grundlage für eine quantitative Bewertung der Knochenmatrix in der Umgebung von Implantaten dienen.

Methoden

An New Zealand White Kaninchen wurden *in vivo* Tests nach dem "Jenaer Schädelmodell" durchgeführt [1]. Von den jeweils 4 Implantaten in der Schädelkalotte (Titan, Calciumphosphat-Polymer-Composit, Polymer, Biokeramik) wurden nach der Explantation µCT-Scans (pro Implantat ein Scan, Auflösung ca. 1800x1800x1000, isotrope Voxelgröße 7µm) und Hartgewebe-Histologien erstellt.

Die Bilddaten wurden mit Avizo® (FEI-Visualization Sciences Group) visualisiert und bearbeitet. Die µCT-Datensätze wurden ausgerichtet, segmentiert und danach mit einem Script-gesteuerten „Jahresring-Algorithmus“ bearbeitet. Als Orientierung diente ein in [2] für die Software CtAn® (Bruker microCT) demonstriertes Verfahren.

Ablauf: Zur Minimierung der Größe des 3D-Datensatzes wurde das zu bearbeitende Subvolumen festgelegt und nachfolgend anhand des Implantates ausgerichtet. Implantat und umgebende Knochenmatrix wurden segmentiert. Durch Erweiterung des Implantat-Volumensegments um 1 Voxel wurde eine das Implantat direkt umgebende ROI mit minimaler Schichtdicke definiert. Der Volumanteil an Knochen in dieser ROI ist äquivalent zum BIC. Jeweils ausgehend vom erweiterten Volumen wurden sukzessive weitere Dilatationen durchgeführt, wobei die Schichtdicke dieser ROIs anhand der Informationen aus den vorliegenden Histologien optimiert wurde. Die damit definierte Serie „Jahresring“-artig konzentrisch um das Implantat angeordneter ROIs wurde nachfolgend auf den segmentierten Original-Datensatz angewendet. Der jeweilige Volumanteil der Knochenmatrix in den ROIs wurde ausgewertet.

Ergebnisse

Die Hartgewebe-Histologien bildeten prinzipiell Oberfläche und Umgebung der untersuchten Implantate nur stichprobenartig ab. Aus diesen Bilddaten konnten qualitative Aussagen bzw. semiquantitative Befunde zur Osseointegration abgeleitet werden. Die dreidimensionale Analyse der µCT-Scans ermöglichte im Unterschied dazu eine detaillierte quantitative Bewertung der Osseointegration in Bezug auf die gesamte Implantat-Oberfläche.

Die für die Analyse des periimplantären Volumens gewählte Struktur in Form mehrerer konzentrisch angeordneter ROIs war für die vorliegenden Daten und Fragestellungen geeignet. Der iterative Ablauf der Erstellung dieser „Jahresring“-ROIs wurde durch die Erstellung eines Scripts in Avizo vereinfacht und - je nach Größe der Datensätze bzw. Hardware-Konfiguration des Computers - auf wenige Minuten verkürzt. Tests zeigten die Notwendigkeit eines ergonomischen und flexiblen User-Interface für den effizienten Input relevanter Parameter des Algorithmus.

Schlussfolgerungen

Die erreichbare Präzision der quantitativen Auswertung wurde prinzipiell durch die Qualität der zugrundeliegenden 3D-Bilddaten und der anschließenden Segmentierung limitiert. Im vorliegenden Fall erschwerten Bildartefakte in den µCT-Scans der Titan-Implantate die Analyse des Knochen-Anteils in ihrer direkten Umgebung.

Das Verfahren wurde bisher für die Evaluierung von Implantaten in der Schädelkalotte von Kaninchen erfolgreich getestet, sollte jedoch auf ähnliche Fragestellungen ohne Probleme übertragbar sein. Unter Beachtung der jeweils vorliegenden anatomischen Verhältnisse, z.B. anhand eingeschlossener Bereiche kortikalen bzw. spongiösen Knochens, kann die Auswertung weiter differenziert werden.

[1] Linde D, Diebowski S, Greiner-Petter C, Schneider G (2012) Biomed Tech (Berlin) 57(S1)557-560;

DOI: 10.1515/bmt-2012-4307

[2] Bruker microCT (Skyscan) (2015) BrukerMicro-CTAcademy 2(3) MN074

Abbildung 1: µCT Datensatz ($7\mu\text{m}$ Voxel) mit in Knochen integriertem Implantat (Durchmesser 5mm): virtueller Schnitt und eine konzentrisch um das Implantat angeordnete ROI

Abbildung 2: µCT Datensatz ($7\mu\text{m}$ Voxel) mit in Knochen integriertem Implantat (Durchmesser 5mm): Knochen-Matrix in einer konzentrisch um das Implantat angeordneten ROI

Abb. 1

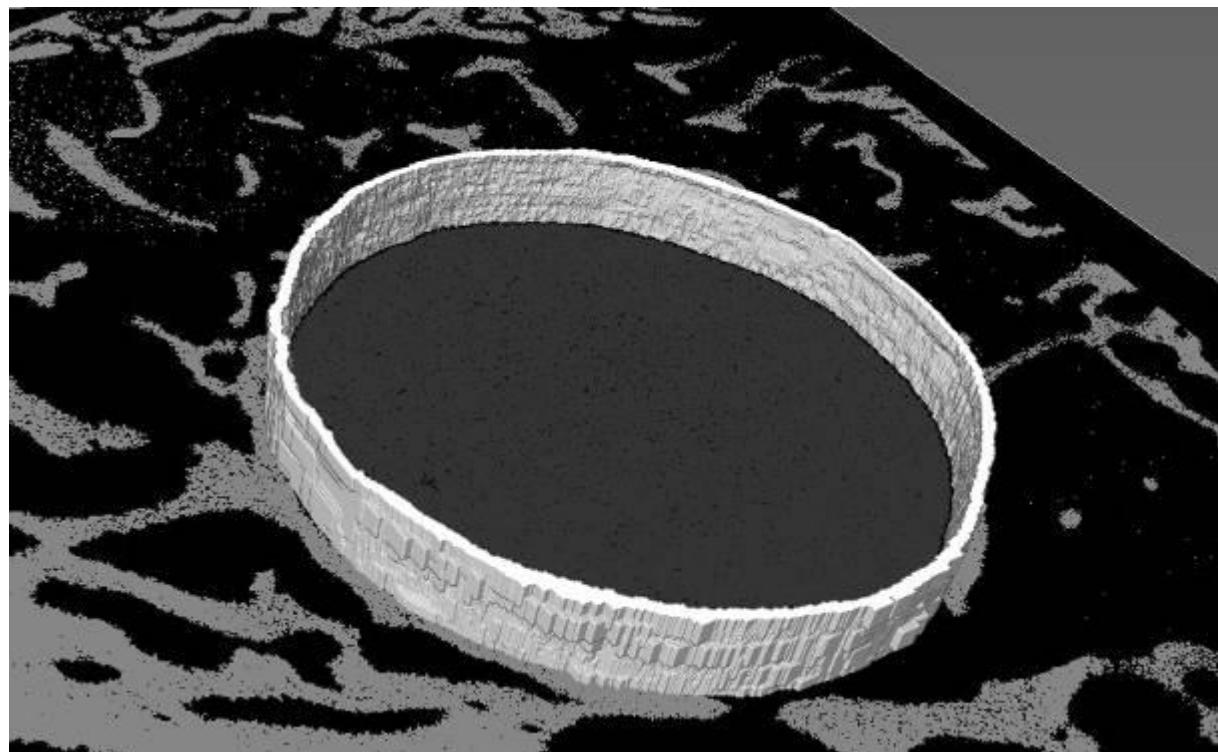
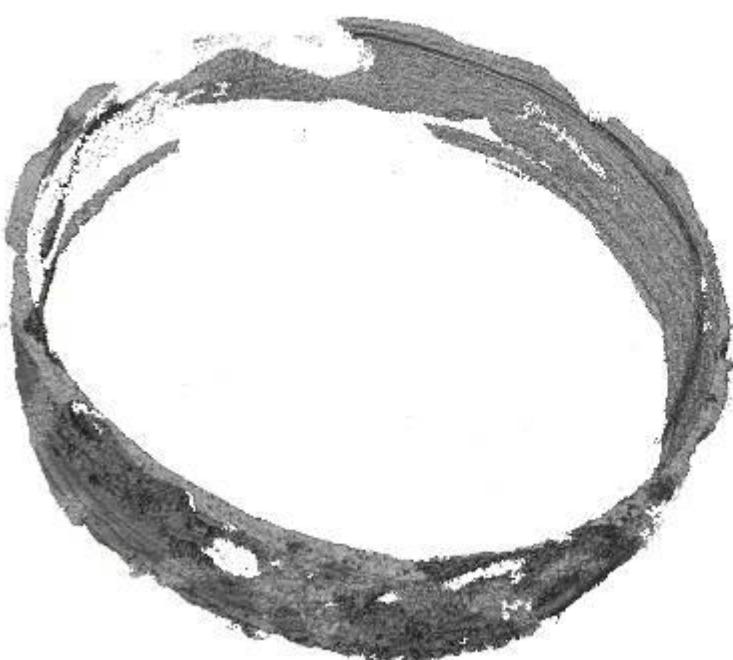


Abb. 2



S05-02

Bio-based heparin-functionalized hydrogels for controlled VEGF release I: EDC-based crosslinking

L. Sewald¹, M.-E. Kotzampasi¹, C. Claaßen², G. Tovar², B. Stanzel³, *K. Borchers¹

¹Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB, Stuttgart, Deutschland

²Universität Stuttgart, Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP, Stuttgart, Deutschland

³Universitätsklinikum Bonn, Augenklinik, Bonn, Deutschland

Purpose

Presently formation of fibrotic encapsulation around implants [1] as well as insufficient oxygen and nutrient supply in tissue engineered grafts due to poor vascularization are fundamental limitations [2]. Controlled release of pro-angiogenic growth factors is reported to be a promising approach to stimulate vascularization and thereby biointegration. In this study we investigate heparin-functionalized biopolymer based hydrogels as vascular endothelial growth factor (VEGF) storage and release systems which can also be applied as coatings. In this study we compare carbodiimid crosslinked hydrogels based on gelatine type A, gelatine type B or albumin in terms of loading and release behavior.

Methods

Heparin (1 % w/w) containing hydrogel precursor solutions based on gelatin (10 % w/w) or albumin (10 % w/w) were formulated. Chemical crosslinking was mediated by EDC (N-(3-Dimethylamino-propyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride). Hydrogels were characterized concerning gel yield and degree of swelling by gravimetric analysis. VEGF₁₆₅ was loaded onto the dry gels at 0,1 µg VEGF per mg dry weight of gels. VEGF₁₆₅ release was quantified via ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Thin film coatings of hydrogels were applied onto polyethylenetherphthalat (PET) membrane surfaces by doctor blading and inkjet printing of solutions with low biopolymer concentration (1 % w/w protein, 0,1 % heparin). Immobilization of the hydrogel coating onto the polymer membrane is investigated applying e.g. NaOH with subsequent EDC activation of the PET surface. Alcian blue staining was applied to visualize the coatings and to analyze the stability at the polymer surface.

Results

We present results on physico-chemical gel characterization. We reveal impacts of the preparation method and the gel composition on gel yield and swelling behavior. We present the distinct characteristics of the biobased hydrogels systems based on gelatin types A and B, and albumin in terms of loading capacities, loading kinetics and release kinetics of VEGF as well as the influence of heparin. We consider the characteristic netto charges of the proteins as a reason for the observed effects. Finally we show results on preparation of thin hydrogel coatings and immobilization of such coatings on track-etched PET membranes.

Conclusion

Crosslinked gelatin and albumin with and without heparin provide biobased hydrogel systems with distinct release behaviours. Therefore they might be candidates for controlled drug delivery.

Acknowledgements

The authors thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG for funding (BO 4252/1-1).

S05-03

In vivo degradation and drug release of different non-covalent, injectable starPEG dextran sulphate hydrogels

*C. Tondera^{1,2}, R. Wieduwild³, Y. Zhang³, J. Pietzsch^{1,2}

¹Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Radiopharmazeutische und Chemische Biologie, Dresden, Deutschland

²TU Dresden - Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften, Fachrichtung Chemie und Lebensmittelchemie, Dresden, Deutschland

³B Cube - Center for Molecular Bioengineering, Zhang Group, Dresden, Deutschland

Introduction

There is a high interest in controlled release of therapeutics from biocompatible biomaterials. The optimal biopolymer has to be easily modifiable, loadable with different therapeutics and applicable to the patient in an easy manner. (CWGG(KA)₅)₄-starPEG (KA5-starPEG) conjugates with dextran sulfate as injectable and *in situ* polymerizing hydrogels combine all the features mentioned above [1] but have not yet been investigated *in vivo* for biocompatibility and drug release kinetics. Therefore, the aim of this study was to investigate these promising hydrogels *in vivo* using a preclinical mouse model.

Methods

To investigate degradation and potential drug release *in vivo* in a preclinical model, four different non-covalent KA5-starPEG dextran sulfate hydrogels (final concentration of each component in hydrogel was 4 mM) were injected subcutaneously (100 µl each) in immunocompetent SKH-1 mice. The hydrogels differed in the drug loading and functionalization, which were obtained by adding 0.4 mM (KA)₇-bound Cy7 (KA7-Cy7) as drug mimic, and/or using peptide-starPEG with additional cell adhesive sequences RGDSP (KA5-RGDSP-starPEG) or GDPSR (KA5-GDPSR-starPEG, scrambled RGDSP). The observation period covered 231 days post injection (p.i.). Hydrogel degradation was observed by magnetic resonance imaging (MRI). Furthermore, as potential drug, Cy-7 release was measured and quantified using optical imaging. To investigate any inflammatory response of the organism to the hydrogels, inguinal lymph node size was measured and compared to untreated and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) injected mice using MRI.

Results

Figure 1 shows degradation profiles of the different hydrogels. Except for KA5-starPEG all hydrogels showed accumulation of body liquid on the day of injection as well as 1 day p.i. From day 3 onwards the material could be monitored. All hydrogels showed similar degradation profiles until day 147. From day 147 onwards non-functionalized and KA7-Cy7 loaded hydrogels showed relatively slow degradation as compared with other injected hydrogels. KA7-Cy7 release revealed an exponential behaviour (Fig. 1). Even after 273 days minor amounts of KA7-Cy7 could still be detected at the injection site. The ratio of fluorescence intensity compared to the hydrogel volume was constant between day 14 and 63 p.i. Before and after this time frame the ratio revealed that KA7-Cy7 was released faster than the hydrogel was degraded resulting in a decreasing ratio. Inguinal lymph node size of all animals showed no significant difference to untreated but significantly lower lymph node size than TPA treated animals.

Discussion & Conclusions

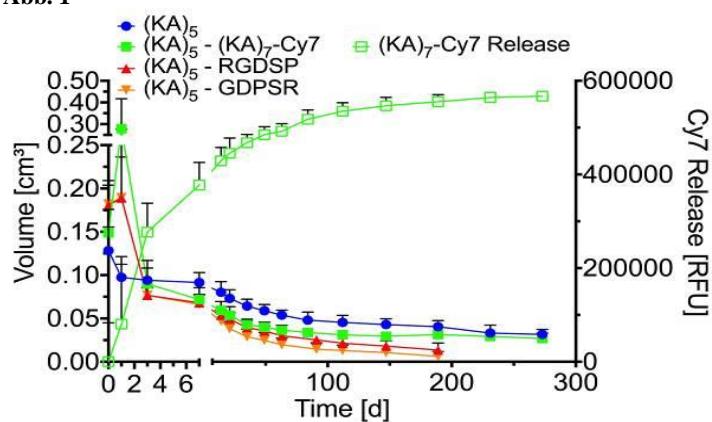
All hydrogels showed similar degradation behaviour in the early phase. In the later stage functionalized hydrogels show continuous degradation, which is sequence independent. KA7-Cy7 loaded hydrogels show a very long-lasting drug release, which is both passive and degradation dependent. No inflammatory reaction or adverse tissue reaction to any hydrogel could be observed by measurement of inguinal lymph node sizes. Taken together, KA5-starPEG dextran sulfate hydrogels are biocompatible, can be modified in their degradation time by functionalization and possess ideal release kinetics for long-term drug application.

References

- [1] Wieduwild et al. (2014), Biomacromolecules, 15, 2058-2066.

Figure 1: Hydrogel volume and degradation rates were determined using small animal MRI (n=8-10). Quantification of KA7-Cy7 release was quantified using optical imaging (hollow squares and green line; n=8).

Abb. 1



S05-04

Characterization of degradable PEG-PLA-hydrogel/brushite composites for biomedical applications

*M. Rödel¹, J. Teßmar¹, U. Gbureck¹, J. Groll¹

¹Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, Würzburg, Deutschland

More than 25 years ago, Mirtchi and Lemaître firstly described brushite forming calcium phosphate cements which have in comparison to hydroxyapatite the advantage of a higher resorption rate under physiological conditions [1]. Based on the fact, that bone is a composite material made of inorganic calcium phosphate mineral reinforced with an elastic collagen matrix, we established a dual-setting system of a degradable poly(ethylene glycol) (PEG)/poly(lactic acid) (PLA)-hydrogel phase combined with the brushite cement phase.

In this study, we investigated both the mechanical properties especially under bending load and the overall degradability of the composites in physiologically buffered solution. Furthermore, hydrogel formation was characterized by rheological analysis and HPLC measurements.

The linear triblock copolymer composed of PEG and PLA was synthesized via ring opening polymerization adapted to Sawhney et al. [2]. PEG ($M_w = 6$ kDa) was reacted with L-lactide in a molar ratio of 1:5 and was functionalized in a second step with methacryloyl chloride at both terminal hydroxyl groups.

Composite cements were produced by dissolving the hydrogel precursors with a concentration of 20 wt%, 40 wt% and 50 wt% in 0.5 M citric acid. An amount of 5 wt% H_2O_2 -solution (30 %) was added to the cement liquid, which was mixed with the cement raw powder consisting of β -tricalcium phosphate (β -TCP) and anhydrous monocalcium phosphate (MCPA) (molar ratio: 1:1 + 5 wt% ascorbic acid) at a powder-to-liquid ratio of 2.5 g/ml. After homogenous mixture, both the cement setting reaction and the gelation started simultaneously. The resulting paste was transferred into silicon molds (4x6x30 mm) and put into a water bath (37 °C and 100 % humidity) for 15 min. For the degradation study, the samples were stored in phosphate buffered saline with a pH of 7.4.

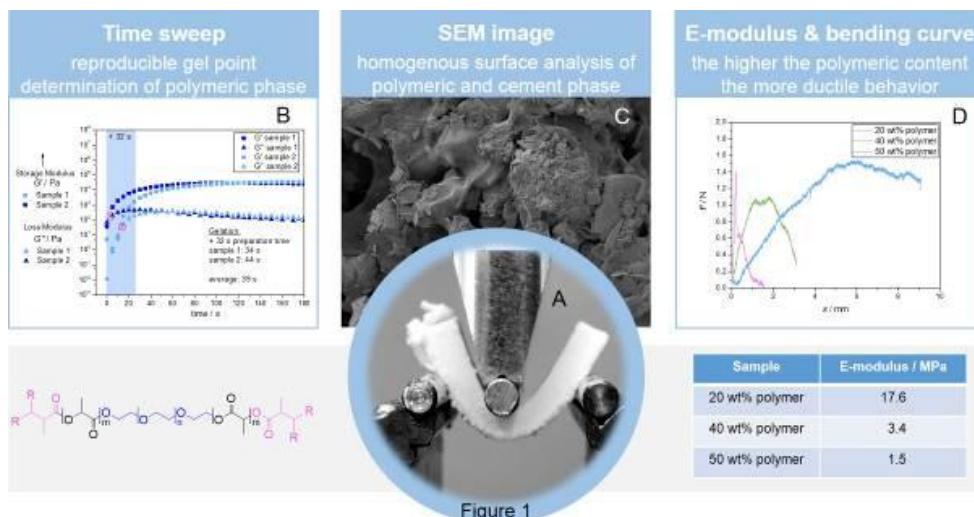
Composite cements demonstrated an extremely flexible and ductile behaviour (Figure 1A) with a quite homogenous distribution of the hydrogel in the cement matrix (Figure 1A and C). With the highest polymeric amount of 50 wt%, the produced samples did not even break while mechanical testing (Figure 1A). Investigations concerning the gelation point showed a very fast hydrogel formation in less than one minute, which closely matches the fast initial setting reaction of brushite cements (Figure 1B). Additional XRD-measurements proved a significant influence of the polymeric matrix on the conversion from β -TCP and MCPA to brushite. Rietveld refinement analysis indicated a quantitative phase composition of the set samples with 54.1 wt% brushite, 25.2 wt% Monetite and 20.8 wt% β -TCP for the mineral phase.

Investigations concerning the mechanical performance of the composites showed a more ductile behavior with higher polymer content in the dual setting cement system in comparison to the brittle brushite cement reference. However, further studies are still necessary to determine the long-term mechanical performance of this polymer-cement-composite under dynamic loading to prove its suitability for load-bearing defects.

References

- [1] Tamimi, F., Z. Sheikh, and J. Barralet, *Dicalcium phosphate cements: Brushite and monetite*. Acta biomaterialia, 2012. 8(2): p. 474-487.
 [2] Sawhney, A.S., C.P. Pathak, and J.A. Hubbell, *Bioerodible hydrogels based on photopolymerized poly (ethylene glycol)-co-poly (α -hydroxy acid) diacrylate macromers*. Macromolecules, 1993. 26(4): p. 581-587.

Abb. 1



S06-01

Biochip-based organoid models for studies of inflammation-related organ dysfunction and the development of targeted treatment strategies of organ failure.

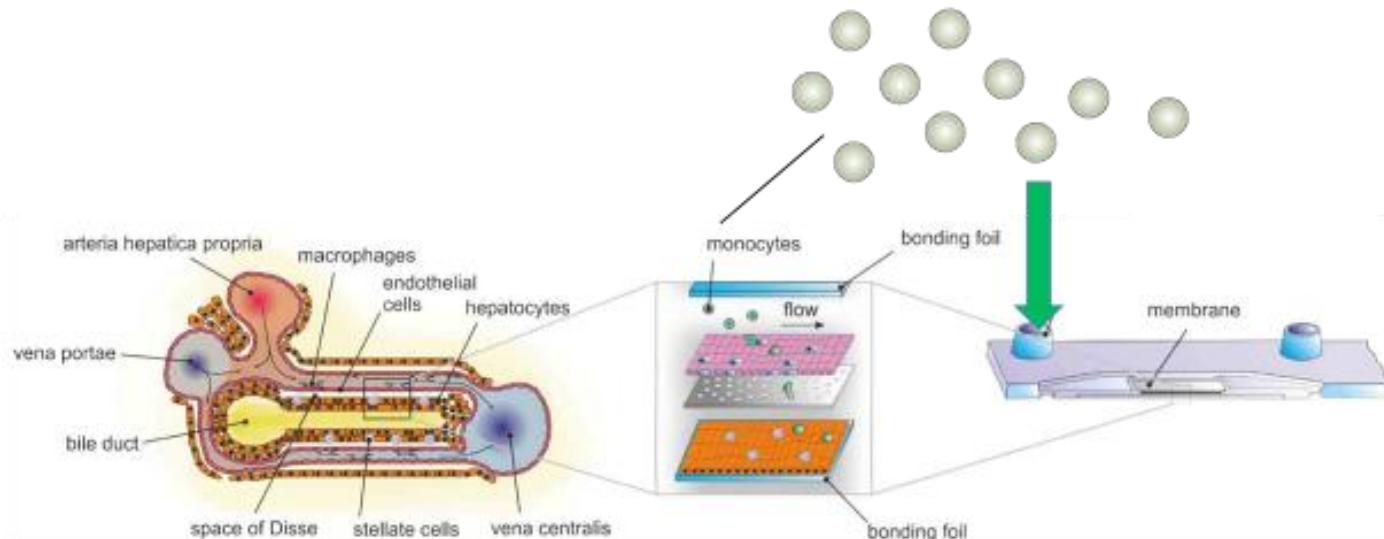
*A. Mosig¹

¹Universitätsklinikum Jena, Center for Sepsis Control & Care, Jena, Deutschland

Animal models are frequently used in biomedical research. However, recently a controversial debate about the transferability of data obtained in animal models to human conditions emerged. Although cell-based *in vitro* approaches can be an alternative, conventional cell culture methods hardly reflect cellular cross-communication and neglect essential physiological parameters of the living organism. We therefore develop biochip-embedded organoid models of the liver, gut and brain for application in biomedical research. The organoids are composed of essential human cell types of the respective organs and were tested in the context of sepsis-related organ dysfunction. Dynamic perfusion of biochip-embedded tissues allows an optimal supply with nutrients and oxygen, an efficient removal of catabolic metabolites, and enables a physiological cell polarization and communication within tissues. The modular approach of the biochip design allows a variable microfluidically interconnection of different organoid models in a freely selectable arrangement. The cellular processes observed under pathophysiological conditions *in vitro* closely resemble pathophysiological responses of established mouse models and most important reflect essential clinical observations of human sepsis. The biochip-based organoids have been proven as reliable models that reflect inflammation-related organ-dysfunction as well as processes of immune cell related tissue repair. Application of these models in biomedical research will help to speed up drug screening studies and to improve the predictability and transferability of the obtained results to human conditions. Thus, biochip-based organoids are suitable tools that extend current study options on pathophysiological mechanisms of organ failure and the development of novel targeted treatment strategies.

Abb. 1

liver model



S06-02

Hydrogel-Blends aus Agarose und Kollagen I unterstützen dreidimensional verdrückt die Ausbildung von kapillaren Zellstrukturen

*M. Köpf¹, F. Kreimendahl², D. F. Duarte Campos¹, A. Blaeser¹, S. Jockenhövel², H. Fischer¹

¹Universitätsklinikum Aachen, Lehr- und Forschungsgebiet Zahnärztliche Werkstoffkunde und Biomaterialforschung (ZWBF), Aachen, Deutschland

²Helmholtz-Institut Aachen, Institut für Angewandte Medizintechnik, Aachen, Deutschland

Die Anwendung der Additiven Fertigungstechnik im Bereich des *Tissue Engineering* erfordert Materialien, die sowohl biologischen als auch technischen Anforderungen genügen. In vorausgegangenen Studien wurden von unserer Arbeitsgruppe Hydrogel-Blends aus Agarose und Kollagen I untersucht, die eine intrinsische dreidimensionale Druckbarkeit aufweisen und gleichzeitig für die 3D-Zellkultur geeignet sind. Darauf aufbauend wurde nun die Hypothese aufgestellt, dass der 3D-Druckprozess mit den darin auftretenden Scherbelastungen für Zellen derart kompatibel eingestellt werden kann, dass die Ausbildung von kapillaren Strukturen durch humane Endothelzellen auch in 3D-gedruckten Agarose-Kollagen-Blends erzielt werden kann.

Für die Ausbildung von kapillaren Strukturen aus humanen Endothelzellen (HUVEC) erwies sich auf Grundlage einer separaten Studie ein Hydrogel-Blend aus 0,5 % Agarose und 0,5 % Kollagen I als vielversprechend. Daher wurde das Degradations- und Schwellverhalten dieses Hydrogel-Blends bei gleichzeitiger Erfassung des pH-Wertes über einen Zeitraum von zwei Wochen untersucht. In rheologischen Untersuchungen wurde die Viskosität in Abhängigkeit der Scherrate ermittelt sowie das Gelierverhalten analysiert. Der 3D-Druck der Hydrogel-Zell-Suspensionen erfolgte im *Drop-On-Demand*-3D-Druckverfahren durch Mikroventile mit Durchmessern zwischen 150 und 600 µm bei angelegten Drücken zwischen 0,5 und 2,0 bar. Die verdrückten zellbeladenen Hydrogele wurden 14 Tage lang inkubiert. Anschließend wurden die kapillaren Zellstrukturen mittels immunhistochemischer Färbung (CD31) und Zwei-Photonen-Mikroskopie analysiert.

Degradations- und Schwellverhalten bestätigen die grundsätzliche Eignung des Agarose-Kollagen-Blends für die Anwendung im *Tissue Engineering*, da alle Proben im Beobachtungszeitraum formstabil blieben. Der pH-Wert war über 14 Tage konstant bei einem physiologischen Wert von 7,4. Die Resultate der rheologischen Messungen bestätigen die Eignung des Blends für das 3D-Druckverfahren. Die Gelierung des Kollagens in bereits erstarrter Agarose konnte nachgewiesen werden. Die Agarose-Kollagen-Blends konnten durch entsprechende Parameterwahl im 3D-Druckprozess zytokompatibel dispensiert und in anschließender Zellkultur prävaskularisiert werden.

Die erfolgreiche Prävaskularisierung von dreidimensional verdrückten Hydrogelen wurde mit dieser Studie zum ersten Mal gezeigt. In Vorbereitung auf eine *In-Vivo*-Studie soll in weiteren Versuchen überprüft werden, inwieweit im Hydrogel-Blend befindliche Zellen extrazelluläre Matrix entwickeln können. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Verbesserung der mechanischen Eigenschaften während der Kultivierung.

S06-03

Nanotopography guides morphology and spatial patterning of induced pluripotent stem cell colonies

*G. Abagnale¹, A. Sechi², M. Steger³, G. Aydin², G. Müller-Newen⁴, A. Gillner³, W. Wagner¹

¹Helmholtz Institute for Biomedical Engineering, RWTH Aachen, Stem Cell Biology and Cellular Engineering, Aachen, Deutschland

²Helmholtz Institute for Biomedical Engineering, RWTH Aachen, Cell Biology, Aachen, Deutschland

³Fraunhofer Institute for Laser Technology, Aachen, Deutschland

⁴Interdisciplinary Center for Clinical Research, RWTH Aachen, Immunohistochemistry and Confocal Microscopy Unit, Aachen, Deutschland

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) raise high hopes in regenerative medicine, but little is known about how they are affected by surface topography. iPSCs usually grow on tissue culture plastic as round colonies and it has been demonstrated that morphogen induced lineage-specification, e.g. in response to factors as BMP-4, is heterogeneous but spatially ordered within colonies. In this study, we analyzed how nanotopography impacts on the morphology of iPSC colonies and whether it modulates lineage-specific differentiation. To this end, we have structured polyimide (PI) by laser interference in a groove-ridge pattern with a periodicity of 650 nm (see also Abagnale et al., *Biomaterials* 2015). Individual iPSCs displayed an elongated morphology, parallel to these structures as well as modifications in the number and size of focal adhesions. Colonies of iPSCs acquired too an elongated shape along the nanopatterns, apparently through a modulation of cell division planes and the rearrangement of apical actin fibers. Treatment of iPSCs with BMP-4 led to a different spatial distribution of the pluripotency markers NANOG and E-cadherin in round *versus* elongated colonies. Notably, a similar pattern was observed in the intracellular localization of the transcriptional co-activators YAP and TAZ, which play a key role in the mechanotransduction, particularly with regards to proliferation and cell fate decisions. Interestingly, TAZ (but not YAP) was localized in filamentous structures similar to actin fibers, suggesting a direct link between the cytoskeleton and the mechanotransducer machinery in iPSCs. Taken together, our findings demonstrate that growth of iPSCs colonies is controlled by surface topography at nano-scale. This is also reflected by distinct cellular differences in mechanotransduction upon stimulation with morphogens.

S06-04

Mechanotransduction-induced expression of neuronal markers in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells

F. Rohn¹, J. Boltze², S. Stein-Neuss³, S. Lindlohr¹, *A. Gutermuth¹

¹IPT Fraunhofer, Aachen, Deutschland

²EMB Fraunhofer, Lübeck, Deutschland

³RWTH Aachen University, Institute for Pathology, Aachen, Deutschland

Introduction

Mechanotransduction describes conversion of extracellular mechanical inputs to intracellular biochemical and biophysical signals. It is partly mediated by intracellular tension caused by cytoskeletal reorganization. Cultivation of pluripotent stem or neuronal precursor cells on nano-scaled structural patterns provides topographical cues directing cellular alignment and extension, and being able to induce mechanotransduction and, potentially, differentiation. Physical and chemical properties of biomaterials resembling the natural cellular microenvironment are also believed to induce lineage-specific stem cell differentiation and support organized tissue regeneration.

Mechanotransductive induction of stem cell differentiation by appropriate artificial surfaces is an emerging field and a promising tool in tissue engineering and regenerative medicine. Mesenchymal stem cells (MSC) are adult multipotent stem cells providing key advantages like easy obtainability in sufficiently large numbers, large scale expandability, and biological safety. MSC show a higher plasticity than initially anticipated and do not only differentiate along mesodermal lineages, but also express markers for endo- and ectodermal lineages including those usually expressed on neurons.

The aim of this study was to investigate the applicability of micro- combined with nano-structured polydimethylsiloxane (PDMS) surfaces to induce neuronal differentiation in MSC.

Methods and Results

Adipose tissue derived (AD-)MSC were obtained from middle-aged donors (20 to 30 years) and characterized by flow cytometry (CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD14⁻, CD20⁻, CD34⁻, and CD45⁻). Additionally, AD-MSC were differentiated into adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages confirming the cells' mesodermal differentiation potential. PDMS-micro- and nano-patterned surfaces were treated with oxygen plasma to support cell attachment before seeding the cells and incubation for 14 days. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and immunofluorescence staining for specific neuron-specific markers were performed. In contrast to flat PDMS surfaces,

AD-MSC incubation on micro- and nano-grooved PDMS surfaces induced characteristic phenotypical changes. Particularly, cells aligned in parallel to the grooves and presented neurite-like cellular extensions. Nestin, which is expressed in neural stem and precursor cells, but decreased during neural maturation, was downregulated. This might indicate a transition to a more mature state and indeed, cells significantly (< 0.05) increased expression of neuronal markers such as β -tubulin III (young neurons) up 13-fold and neurofilament (mature neurons) up to 6-fold on gene and respectively on protein level. These substantial changes were achieved without addition of media or factors for neuronal induction.

Conclusion

We conclude that AD-MSC cultivation on micro- and nano-grooved surfaces fosters differentiation into neuron-like cells *in vitro*. PDMS withstands degradation during differentiation and exhibits visco-elastic properties resembling the native extracellular matrix properties.

These results are of relevance for regenerative medicine since such cellularized structures could be used for pre-differentiation towards neuronal differentiation lineages, could provide a novel tool for damaged neuronal tissue reconstitution, or for production of patient-specific neural cells. However, future research still needs to confirm the full functionality (e.g. signal transduction) of mechanotransduction-induced neuron-like cells from AD-MSC, as well as the expression of neuronal markers being necessary for neuronal activity including neurotransmitters.

Outlook

Due to the fact that stem cell fate and lineage decision can be also modulated by extracellular matrix stiffness, we will next try to combine specific topographical cues with matrix elasticity modules. We will also assess the applicability of a method for moulding collagen derivates from micro-structured patterns.

S07-01

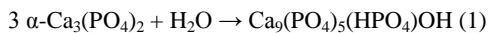
Untersuchung der Hydratation von partiell amorphisiertem β -TCP mittels Wärmeflusskalorimetrie und in-situ XRD

*K. Hurle¹, J. Neubauer¹, F. Götz-Neunhoeffer¹

¹FAU Erlangen-Nürnberg, Lehrstuhl für Mineralogie, Erlangen, Deutschland

Fragestellung

Calciumphosphatzemente (CPCs) werden aufgrund ihrer ausgezeichneten Biokompatibilität in der Medizin als Knochenersatzstoffe eingesetzt. Ein häufiger Bestandteil von CPCs ist Tricalciumphosphat (TCP), das in zwei Modifikationen vorkommt. Die Hochtemperaturmodifikation α -TCP ist hydraulisch aktiv und reagiert mit Wasser unter Bildung von calcium-defizitärem Hydroxylapatit (CDHA) nach (1) [1]:



Die Niedrigtemperaturmodifikation β -TCP ist in kristalliner Form in Wasser hingegen nur sehr schwach löslich. Durch partielle Amorphisierung, welche in zweiphasigen Proben mit einem kristallinen β -TCP- sowie einem amorphen Anteil ($\text{ATCP}_{\beta\text{eta}}$) resultiert, können jedoch reaktive Zementformulierungen entwickelt werden, welche analog zum α -TCP in CDHA-Bildung resultieren [2]. Daraus ergibt sich Potential zur Entwicklung neuartiger CPCs für die medizinische Anwendung. Dies setzt ein detailliertes Verständnis der Hydrationsmechanismen voraus, welches folglich Gegenstand der vorliegenden Studie war.

Methoden

Sechs durch Nassaufmahlung teilamorphisierte β -TCP - Proben mit amorphen Anteilen von 16 bis 60 Ma.% wurden mit 0.1 M wässriger Na_2HPO_4 -Lösung zur Hydratation gebracht. Der amorphe Anteil der Proben wurde mittels Pulverdiffraktometrie kombiniert mit der G-Faktormethode bestimmt, einer externen Standardmethode, welche die Bestimmung absoluter Gehalte kristalliner Phasen und so indirekt die Quantifizierung amorpher Anteile ermöglicht [3]. Alle Versuche wurden bei 23 °C durchgeführt.

Mittels Wärmeflusskalorimetrie wurde die bei der Hydratation freigesetzte Wärme gemessen. Es wurde ein spezielles InMixEr-Tool für internes Anrühren verwendet, womit bereits der initiale Wärmefluss zuverlässig erfassbar ist. Die Entwicklung des quantitativen Phasenbestands wurde mittels in-situ XRD und G-Faktor-Methode ermittelt. Die anisotrope Kristallinität des CDHA wurde durch ein geeignetes Modell verfeinert [4].

Ergebnisse

Es zeigte sich, dass in allen Proben bereits unmittelbar zu Beginn eine deutliche Auflösung des amorphen Anteils einsetzte, was erwartungsgemäß mit einer starken CDHA-Bildung einherging. Es war zudem eine geringfügige Auflösung des kristallinen β -TCP zu beobachten. Diese setzte erst nach ca. 2 bis 5 h ein, wobei höhere amorphe Anteile zu einem späteren Beginn der β -TCP - Auflösung führten. Nach 24 h waren jeweils 3-5 Ma.% kristallines β -TCP bezogen auf die Pastenzusammensetzung aufgelöst, die Hydratation hatte sich bereits merklich verlangsamt. Es lagen somit zweiphasige Proben aus CDHA und β -TCP vor, wobei das Verhältnis CDHA/ β -TCP durch den amorphen Anteil der Ausgangspulver bestimmt wurde. Die Kristallinität der resultierenden CDHA-Kristallite unterschied sich von Probe zu Probe nur geringfügig.

Anhand von Literaturdaten wurde die Hydrationsenthalpie von kristallinem β -TCP kalkuliert. Über die quantitativen XRD-Daten konnte daraus der aus der Hydratation des β -TCP resultierende Wärmefluss berechnet und im Vergleich mit den gemessenen Wärmeflusskurven ein Hydrationsmodell für teilamorphisiertes β -TCP erstellt werden (Abb. 1): Die mit relativ hoher Wärmefreisetzung verbundene Hydratation des $\text{ATCP}_{\beta\text{eta}}$ setzt schon sehr früh ein und wird nach einiger Zeit von geringfügiger Auflösung des β -TCP, verbunden mit geringer Wärmefreisetzung, gefolgt. Es liegt somit grundsätzliche Ähnlichkeit zum zuvor ermittelten Hydrationsmodell für teilamorphisiertes α -TCP vor [5], mit dem Unterschied, dass dort das kristalline α -TCP vollständig abreagiert.

Abbildung 1: Hydrationsmodell für teilamorphisiertes β -TCP.

Schlussfolgerungen

Der Vorteil von teilamorphisiertem β -TCP ist somit, dass bei der Hydratation zweiphasige Produkte entstehen, welche bezüglich des Resorptionsverhaltens im Körper andere Eigenschaften im Vergleich zu reinem CDHA erwarten lassen. Somit ergibt sich eine Möglichkeit zur Steuerung des Resorptionsverhaltens eines CPC's in Hinblick auf die für die jeweilige Anwendung gewünschte Resorptionsgeschwindigkeit.

[1] Monma H, Kanazawa T. J Ceram Soc Jpn 1976; 84:209-213.

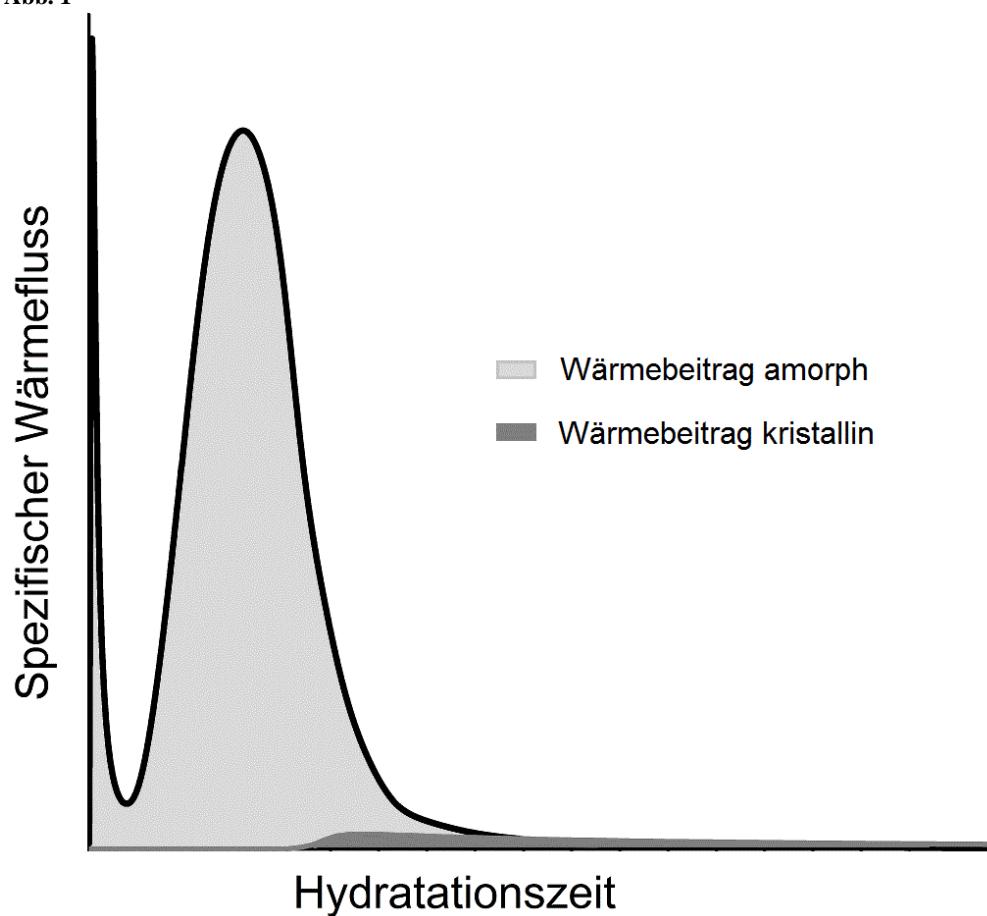
[2] Gbureck U, Grolms O, Barralet JE, Grover LM, Thull R. Biomaterials 2003; 24:4123-31.

[3] Jansen D, Stabler Ch, Goetz-Neunhoeffer F, Dittrich S, Neubauer J. Powder Diffraction 2011; 26:31-38.

[4] Ectors D, Goetz-Neunhoeffer F, Neubauer J. J Appl Cryst 2015; 48:189-194.

[5] Hurle K, Neubauer J, Bohner M, Doebelin N, Goetz-Neunhoeffer F. Acta Biomater 2015; 23:338-46.

Abb. 1



S07-02

Extruded composite nanofibres as novel synthetic extracellular matrices

N. Aslankoohi¹, J. Young¹, J. P. Spatz¹, *D. Brüggemann²

¹Max Planck Institute for Medical Research, Department of Biointerface Science & Technology, Stuttgart, Deutschland

²Universität Bremen, Institut für Biophysik, Emmy Noether-Gruppe für nanostrukturierte Biomaterialien, Bremen, Deutschland

Cells are surrounded by a complex composite of proteins and glycosaminoglycans, which comprises the extracellular matrix (ECM). Many functions like cell adhesion, cell-to-cell-communication or the structural support of tissues are regulated by this nanofibrous meshwork. In this study we developed a synthetic extracellular matrix system based on extruded biopolymer nanofibres, which can closely mimic the nanofibrous structure and molecular composition of native ECM.

We established a new extrusion technique to prepare nanofibrous scaffolds from various biopolymer solutions. Different ECM proteins and polysaccharides were extruded through anodic aluminium oxide (AAO) nanopores in physiological buffers (see fig. 1). Nanofibre assembly could be achieved for a wide range of ECM proteins including fibronectin, collagen and elastin. We could also apply this new process to prepare nanofibres from polysaccharides like hyaluronan and chitosan.

Using scanning electron microscopy (SEM) we found that extruded nanofibres either assembled into highly aligned fibre bundles up to millimetre length or into randomly oriented meshes, which resemble the nano-architecture of the native ECM. With this technique we were able to control the diameter of single nanofibres by adjusting the AAO pore diameter and the concentration of the protein feed solution. The use of blends containing different proteins facilitated the successful extrusion of composite nanofibres. Immunofluorescence staining of these nanofibrous protein composites revealed that both proteins were present in the extruded scaffolds. Furthermore, we could extrude nanofibrous composites with embedded nanoparticles, which were blended into different biopolymer solutions prior to extrusion. In first biocompatibility studies with MDA-MB-321 cancer cells on extruded meshes of collagen and fibronectin nanofibres we could show exemplarily that the cells adhered well to our nanofibrous scaffolds.

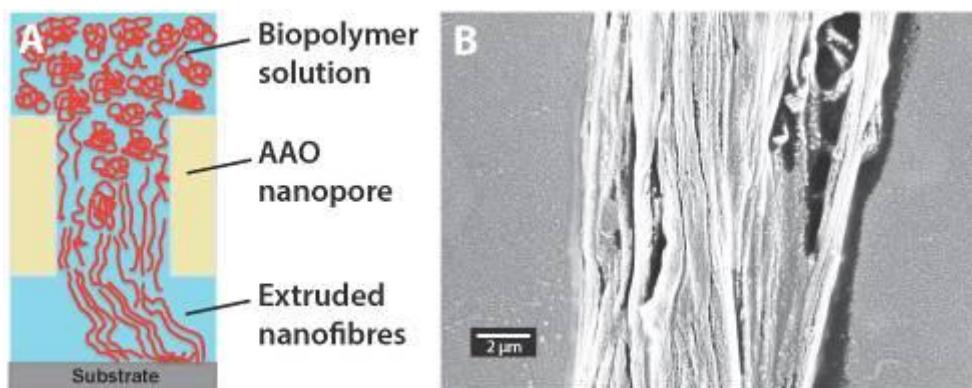
In future this template-assisted extrusion technique will offer a universal approach to prepare synthetic ECM systems with tailored composition and nanotopography, which will lead to new avenues in the development of nanofibrous biomaterials.

Figure 1: Extrusion of nanofibres in physiological buffers: (A) Scheme of biopolymer solution being extruded through AAO nanopores. (B) SEM image of an aligned bundle of extruded fibronectin nanofibres (adapted from [1])

References

[1] Raoufi, M. et al. Nanopore Diameters Tune Strain in Extruded Fibronectin Fibers. *Nano Lett* 15, 6357-6364 (2015).

Abb. 1



S07-03

Entwicklung einer antibakteriellen Beschichtung für Mesh-Implantaten aus bioabbaubaren Polylactid-co-Glycolid (PLGA) Mikropartikeln

*J. Reinbold¹, A. Freisinger¹, L. Urich¹, T. Hierlemann¹, I. Müller², C. Schlensak¹, H. P. Wendel¹, S. Krajewski¹

¹Universitätsklinikum Tübingen, Tübingen, Deutschland

²Hochschule Albstadt-Sigmaringen, Sigmaringen, Deutschland

Einleitung

In den letzten Jahrzehnten nahm die Bedeutung von Mesh-Implantaten aus Polypropylen (PP) kontinuierlich zu. Sie werden nicht nur bei Leistenbrüchen, sondern auch verstärkt zur chirurgischen Behandlung von Stressharninkontinenz oder Scheidenprolaps eingesetzt. Alleine in den USA werden im Jahr durchschnittlich 1 Million Operationen dieser Art durchgeführt. Der kritische Faktor besteht hier in späteren Implantat-induzierten Infektionen, welche mit einer Wahrscheinlichkeit von 0 bis 9 % auftreten. Solche Infektionen führen zwangsläufig zu einer oralen Antibiotikatherapie. Hat sich bereits ein Biofilm auf dem Mesh gebildet, bleibt diese jedoch oftmals ohne Erfolg. Durch eine antibakterielle Beschichtung des Implantats, besteht die Möglichkeit solche Infektionen zu verringern.

Bioabbaubare Polymere bieten sich für eine solche Beschichtung an. Polylactid-co-Glycolid (PLGA) wird, aufgrund guter Eigenschaften in der Bioabbaubarkeit und Biokompatibilität, in den letzten Jahren immer mehr Aufmerksamkeit gewidmet. Heutzutage wird PLGA sehr häufig in Systemen mit kontrollierter Wirkstofffreisetzung verwendet. Dies beinhaltet sowohl Mikro- als auch Nanopartikel.

In PLGA Mikropartikel eingearbeitete Wirkstoffe werden innerhalb weniger Tage bis hin zu mehreren Wochen freigesetzt. In Kombination mit einem Antibiotikum, wie Rifampicin, kann so eine hochpotente antibakterielle Beschichtung auf Mesh-Implantaten hergestellt werden.

Rifampicin ist durch seine hochpotente Wirkung gegen grampositive sowie einige gramnegative Bakterien für einen solchen Einsatz als antibakterielle Beschichtung bestens geeignet.

Material und Methoden

Die Herstellung der mit Antibiotika beladenen Mikropartikel erfolgte über das Lösungsmittel-Verdampfungsverfahren, welche anschließend verschiedenen physikalisch-chemischen Analysen, *in vitro*, unterzogen worden sind. Hierbei wurden die Einschlusseffizienz, die kinetische Freisetzungsgeschwindigkeit und die antibakteriellen Eigenschaften untersucht. Zusätzlich wurden zytotoxische Untersuchungen unter Verwendung eines MTT-Assay mit BJ Fibroblasten durchgeführt.

Die Realisierung der Beschichtung auf den Mesh-Implantaten erfolgte unter Verwendung einer Airbrush Pistole. Die Oberfläche musste hierfür im Vorfeld leicht modifiziert werden.

Die antimikrobielle Wirkung der Beschichtung wurde *in vitro* unter der Verwendung von *Staphylococcus aureus* bestrichenen Agarplatten untersucht. Diese Methode wurde ebenfalls für die Langzeitfreisetzungsanalyse herangezogen. Hierfür wurden beschichtete Mesh-Implantate jeweils nach 48 Stunden auf neu bestrichene Agarplatten umgesetzt.

Ergebnisse und Diskussion

Die durchgeführten *in vitro* Untersuchungen ergaben runde, rötliche Mikropartikel mit einer Einschlusseffizienz des Antibiotikums von 60 - 75%. Der Mittelwert der Partikelgrößenverteilung lag im Bereich zwischen 50 und 70 µm. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten eine glatte und porenfreie Oberfläche.

Die antibakterielle Wirkung der beladenen Mikropartikel und beschichteten Implantate wurde auf mit *Staphylococcus aureus* bestrichenen Agarplatten ermittelt. Nach 24 Stunden waren deutliche Hemmhöfe rund um die eingesetzten Mesh-Implantate vorhanden. Dieses Ergebnis zeigt sich auch bei den Langzeitversuchen über 40 Tage. Weiter zeigte der MTT-Assay keine Beeinflussung des Zellwachstums *in vitro* durch beladene Mikropartikel und beschichtete Mesh-Implantate.

Mit dieser Arbeit wurde erfolgreich demonstriert, wie eine mögliche Infektionsprophylaxe für Mesh-Implantate aussehen könnte. Die Beschichtung entfaltet seine antimikrobielle Wirkung über einen Zeitraum von 40 Tagen.

Diese Technik, der Einschluss von Antibiotika oder anderen antimikrobiell wirkenden Stoffen in Mikropartikel, könnte in Zukunft vor Mesh-Implantat-induzierten Infektionen schützen und somit die Heilungschancen der Patienten erhöhen. Es wäre auch denkbar diese Technik auf andere Implantatarten anzuwenden und so das Infektionsrisiko nach chirurgischen Eingriffen zu minimieren.

Diese vielversprechenden Ergebnisse der *in vitro* Tests sollen im nächsten Schritt durch *in vivo* Studien bestätigt werden.

S07-04

Antibacterial activity of microstructured silver/platinum-group metals (Ag/Pd, Ag/Pl, Ag/Ir) sacrificial anode thin films

*P. Bellova¹, C. Khare², Y. Motemani², S. Memarjavid², A. Ludwig², K. Tschulik³, C. Sengstock¹, M. Köller¹

¹University Hospital Bergmannsheil, Surgical Research, Bochum, Deutschland

²Ruhr-University Bochum, Institute for Materials, Bochum, Deutschland

³Ruhr-University Bochum, Faculty of Chemistry and Biochemistry, Bochum, Deutschland

Implant-associated infections may lead to serious consequences including revision surgery, tissue debridement, and prolonged antibacterial treatment. Therefore, the development of biomaterials with antibacterial surfaces which hinder or prevent bacterial colonization and growth is an important challenge in biomaterial research. Many strategies have been followed to inhibit initial bacterial colonization on implant surfaces. These include the use of various silver (Ag) coatings due to their broad anti-bacterial activity (both gram-negative and positive bacteria). In general, an oxidative dissolution of Ag releases Ag ions (Ag^+) which induce the antimicrobial activity. Accordingly, the antibacterial activity could be controlled by adjusting the Ag^+ -release. Recently we have demonstrated that enhanced silver ion release can be achieved by the combination with gold as a sacrificial anode principle (silver in combination with more noble elements). In this study, we replaced the Au by other platinum-group metals (Pd, Pt, and Ir), and investigated the respective antimicrobial performance.

Ten different Ag dots arrays (16 to 625 microstructured dots -each 20 μm diameter- per square mm) were fabricated on a continuous Pt, Pd or Ir thin film and for comparison also on Ti thin film by sputter deposition along with photolithographic patterning. To analyze the antibacterial activity of these microstructured films *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were placed onto the array surfaces and cultivated overnight. To analyze the viability of planktonic as well as surface adherent bacteria, the applied bacterial fluid was subsequently aspirated, plated on blood agar plates and quantitated by colony counting. Adherent bacteria were detected by fluorescence microscopy after staining with Syto9. Tissue compatibility was measured by cell viability of adherent human mesenchymal stem cells (MSC) cultured on the test samples. Silver dot dissolution was visualized by SEM and silver ion release was quantitated by AAS.

A particular antibacterial effect towards *E. coli* and *S. aureus* induced by Ag dot arrays on the platinum, palladium or iridium film was observed. Ag dots on titanium showed a decreased antibacterial activity with respect to the other sacrificial anode systems with the same dots density. The bare platinum, palladium or iridium control thin films did not show any comparable antibacterial effects. Antibacterial activity of the Ag on Ir was the most effective among the tested combinations. An enhanced antibacterial activity of Ag/Ir system is correlated to the maximum Ag ion release in this system.

We demonstrated the feasibility of an antibacterial effect in Ag/ platinum-group metals (Pt, Pd, and Ir) sacrificial anode systems. Advantages of such systems are the low amount of total silver needed and the possibility for a time-limited activity by adjustments of Ag dot thickness and dot density. The investigated sacrificial anode systems are promising for development of metallic implant surfaces.

S07-05

Einfluss einer BSP-Beschichtung von Knochenersatzmaterialien auf die Knochenheilung - *in vitro* & *in vivo*

*A. Klein¹, A. Baranowski¹, U. Ritz¹, A. Ackermann¹, H. Götz², P. M. Rommens¹, A. Hofmann¹

¹Universitätsmedizin Mainz, Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie, BiomaTiCS-Gruppe, Mainz, Deutschland

²Universitätsmedizin Mainz, Plattform Biomaterialien, BiomaTiCS-Gruppe, Mainz, Deutschland

Einführung

Bei der Behandlung von Knochendefekten kritischer Größe ist die autologe Knochentransplantation die Therapie der Wahl. Der Mangel an geeigneten Knochentransplantaten ist weiterhin ein Problem. Biomaterialien mit osteokonduktiven und osteoinduktiven Eigenschaften zeigen Potential, dieses Problem zu lösen. Daher war Ziel dieses Projektes zu untersuchen, ob Calciumphosphat Knochenzemente (CPC), modifiziert mit Bone Sialoprotein (BSP) in der Lage sind, Knochenwachstum zu induzieren. BSP ist ein Hauptbestandteil der Extrazellulären Matrix und spielt sowohl bei der Knochenbildung als auch bei Remodelling-Prozessen eine wichtige Rolle.

Methoden

In unseren Versuchen verwendeten wir Calciumphosphat Knochenzemente (CPC, InnoTERE GmbH, Radebeul), die mit BSP durch Physisorption beschichtet wurden. Die auf den CPCs verbleibende BSP-Menge wurde anhand eines BSP-ELISA Tests (freigesetztes BSP) überprüft.

Primäre humane Osteoblasten wurden auf die CPCs ausgesät und ihre Viabilität (Alamar Blue Assay), sowie die Genexpression typischer Knochenmarker (Real-Time-PCR) unter Einfluss von zwei verschiedenen BSP-Konzentrationen analysiert. In allen Versuchen dienten unbeschichtete Knochenzemente als Kontrolle.

Für die *in vivo* Überprüfung des BSP Einflusses auf das Knochenwachstum wurde ein etabliertes Kalotten-Defekt-Modell in der Maus eingesetzt. Es wurden je Tier zwei kritische Defekte (\varnothing 2,5 mm) gesetzt und die Implantate entsprechend ihrer Gruppeneinteilung (1 - keine Behandlung „Leer-Defekt“, 2 - Implantation unbeschichteter CPCs, 3 - Implantation BSP-beschichteter CPCs und 4 - Implantation BMP-7 beschichteter CPCs) eingesetzt. Nach einer Beobachtungszeit von 8 Wochen wurden die Tiere abgesetzt und die Knochenheilung anhand von μ CT- Untersuchungen analysiert.

Ergebnisse und Diskussion

Mit Physisorption ist eine einfache und kostengünstige BSP-Beschichtung von Knochenersatzmaterialien möglich. Die Beschichtung mit höheren BSP-Konzentrationen resultierte in einer vermehrten BSP-Menge auf dem Scaffold. Daher ist Physisorption eine effektive Methode zur Beschichtung von CPC-Knochenersatzmaterialien.

Sowohl die Viabilitäts- als auch die Genexpressionsanalysen zeigten einen Vorteil der mit BSP-beschichteten CPCs. Dabei erwies sich die höhere BSP-Konzentration als vorteilhafter im Vergleich zur niedrigeren Konzentration. Die tendenzielle Erhöhung der Genexpression der Osteoblast-Zelldifferenzierungs-Marker (Runx2 und Sp7) bei einer BSP-Beschichtung mit hoher Konzentration, könnte die Knochenheilung positiv beeinflussen. Die *in vivo* Mausversuche zeigten nach 8 Wochen eine statistisch signifikante Erhöhung der Knochendicke an der Grenzfläche Implantat-Knochen für alle drei Gruppen (CPC unbehandelt, CPC-BSP - hohe Konzentration, CPC-BMP-7) im Vergleich zur Negativkontrolle. Innerhalb dieser drei Gruppen gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede. Es zeigte sich jedoch die Tendenz, dass die BMP-7-Gruppe die größte Knochendicke gefolgt von der BSP-Gruppe und den unbehandelten CPCs aufwies. Sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* Versuche lassen einen positiven Effekt der BSP-Beschichtung auf das Knochenwachstum erkennen; aufgrund der fehlenden Signifikanz sind jedoch weitere Studien notwendig um den Einfluss von BSP auf die Knochenheilung klarer herauszustellen.

Danksagung

Für die Finanzierung dieses Projektes bedanken wir uns bei der Firma Immundiagnostik AG (Bensheim).

S07-06

Bio-based heparin functionalized hydrogels for controlled VEGF-release II: radical-initiated cross-linking

*C. Claaßen¹, A. Southan¹, G. E. M. Tovar^{1,2}, B. V. Stanzel³, K. Borchers^{1,2}

¹Universität Stuttgart, IGP, Stuttgart, Deutschland

²Fraunhofer IGB, Stuttgart, Deutschland

³Universität Bonn, Universitätsaugenklinik, Bonn, Deutschland

Purpose

Presently insufficient oxygen and/or nutrient supply in tissue engineered grafts resulting in improper integration or death of encapsulated cells remain current limitations for clinical translation. [1] One strategy to overcome this is the controlled release of proangiogenic growth factors to induce vascularization and thereby bio-integration of the scaffold. Here we describe the preparation and characterization of hydrogels with tunable physico-chemical properties based on radical cross-linkable gelatin and heparin with application perspective as a tissue engineering scaffold allowing for storage and controlled release of proangiogenic growth factors.

Methods

Cross-linkable gelatin and heparin derivatives were prepared by reaction of the biopolymers with methacrylic anhydride. [2] Their degrees of methacrylation were quantified by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Chemical cross-linking of hydrogels based on gelatin methacrylamide (9 % w/w) and heparin methacrylate (1 % w/w) was achieved by thermal-induced radical cross-linking in the presence of a water-soluble redox initiator system (APS Ammoniumperoxodisulfate / TEMED *N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine*). Hydrogels were characterized concerning gel yield and equilibrium degree of swelling by gravimetric analysis. Viscoelastic properties were tuned by degree of modification of gelatin and characterized using rheological measurements. Release of VEGF₁₆₅ (vascular endothelial growth factor) from the hydrogels was quantified by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Furthermore cytocompatibility of hydrogels was investigated with human primary endothelial cells.

Results

We will present results on biopolymer derivatization and physico-chemical properties of hydrogels of different compositions. Three gelatin derivatives with methacrylation-degrees between 0.78 mmol/g and 1.45 mmol/g and methacrylated heparin with 0.17 mmol methacrylate groups per gram were prepared. A suitable initiator concentration range for cross-linking of hydrogels consisting of the different derivatives was found by varying the TEMED / APS ratio between 0.0 and 0.5 and the APS concentration between 0.025 M and 0.100 M. We show results on the impact of gel composition, cross-linking time, initiator concentration, and composition on gel yield, equilibrium degree of swelling, and viscoelastic properties. The gels had lower swelling capacities and higher mechanical stiffness's with higher methacrylation degrees of gelatin, whereas gel yield of all preparations were comparable. Furthermore we observed a significant effect of hydrogel drying on its swelling behavior. The swelling capacity was on average halved for all dried hydrogels compared with hydrogels swollen directly after preparation. We will also show effects of gel composition on release of VEGF. Finally, we aim to show results on the reaction of HDMVEC (human dermal microvascular endothelial cells) towards the hydrogel system.

Conclusion

Chemically cross-linked hydrogels composed of gelatin methacrylamide and heparin methacrylate have tunable physico-chemical properties. Hence this system might be suitable as a tissue engineering scaffold for storage and controlled release of growth factors.

Acknowledgements

The authors thank the *Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG* for funding (BO 4252/1-1).

References

- [1] Rouwkema, J., N.C. Rivron, and C.A. van Blitterswijk, *Vascularization in tissue engineering*. Trends in Biotechnology, 2008. 26(8): p. 434-41.
- [2] Hoch, E., et al., *Stiff gelatin hydrogels can be photo-chemically synthesized from low viscous gelatin solutions using molecularly functionalized gelatin with a high degree of methacrylation*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2012. 23(11): p. 2607-2617.

S08-01

Makrophagen und mesenchymale Stromazellen im direkten und indirekten Co-Kultur-System

*T. Tylek¹, K. Schlegelmilch¹, A. Ewald¹, F. Jakob², J. Groll¹

¹Uniklinikum Würzburg, ZMK/FMZ, Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, Würzburg, Deutschland

²Orthopädische Klinik König-Ludwig-Haus Würzburg, Würzburg, Deutschland

Monozyten und die sich daraus entwickelnden Makrophagen sind wichtige Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie beteiligen sich an der Beseitigung von Krankheitserregern durch Phagozytose, Einleitung von Entzündungsreaktionen, sowie der Gewebereparatur. Unterschieden werden sie in entzündungsfördernde M1- und entzündungshemmende M2-Makrophagen [1]. Gemeinsam mit multipotenten humanen mesenchymalen Stromazellen (hMSCs) beteiligen sie sich an Gewebeerneuerungen und entzündungshemmenden Reaktionen. Die Erforschung beider Zelltypen ist aufgrund dieser Eigenschaften für die regenerative Medizin und das Tissue Engineering von großer Bedeutung [2].

Um die Interaktion beider Zelltypen miteinander zu untersuchen und die dadurch ausgelösten Reaktionen besser zu verstehen, wurde eine Co-Kultur zwischen primären humanen Makrophagen und hMSCs in direktem, sowie indirektem Kontakt, über das Transwell-System und konditioniertem Medium, etabliert. Dabei wurden die gegenseitige Beeinflussung der Genexpression, die Übertragung der Mitochondrien, und die Veränderung der Phagozytoseaktivität der Makrophagen untersucht.

Makrophagen zeigten nach der Kultivierung mit hMSCs ein verändertes Differenzierungsmuster, wobei sowohl anti-inflammatoryische Marker wie CD206, als auch inflammatorye Marker angeschaltet wurden. Anhand der Mitochondriübertragung konnte gezeigt werden, dass beide Zelltypen in direktem Kontakt zueinander stehen und es untereinander zum Austausch kommt. Mittels Färbung der Mitochondrien und der Analyse durch Mikroskopie und Fluoreszenz-Zytometrie zeigte sich sowohl in direktem, als auch bei indirektem Kontakt eine Übertagung auf den jeweils anderen Zelltyp. Im direkten Kontakt trat diese im Vergleich zum indirekten System verstärkt auf. Weiterhin wurde die Phagozytoseaktivität mittels fluoreszenzmarkierter Latexbeads untersucht, um Unterschiede in der Aufnahmerate von M1- und M2- induzierten Makrophagen, spontan-differenzierten Makrophagen und den verschiedenen Co-Kultursystemen aufzuzeigen.

Im Laufe dieses Projekts konnten bereits wichtige Methoden zur Untersuchung der Interaktion zwischen Makrophagen und hMSCs etabliert werden, welche eine große Bedeutung bei Entzündungsreaktionen im menschlichen Körper spielen. Diese werden im weiteren Verlauf genutzt, um die zellulären Interaktionen der beiden Zelltypen auf 3D-Scaffolds zu untersuchen und damit weitere wertvolle Informationen für das Tissue Engineering und die regenerative Medizin zu gewinnen.

Danksagung

Wir danken dem Europäischen Forschungsrat für die Förderung des Fördervertrags Nummer 617989 (Design2Heal).

Referenzen

- [1] Eggenhofer, E. & Hoogduijn, M. J. Mesenchymal stem cell-educated macrophages. *Transplant Res* 1, 12, doi:10.1186/2047-1440-1-12 (2012).
- [2] Kim, J. & Hematti, P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol* 37, 1445-1453, doi:10.1016/j.exphem.2009.09.004 (2009).

S08-02

Characterization of Bone Matrix Development in Gelatin-based Hydrogels

*A. Wenz¹, G. Tovar^{1,2}, K. Borchers², P. J. Kluger^{2,3}

¹Universität Stuttgart, Stuttgart, Deutschland

²Fraunhofer IGB, Stuttgart, Deutschland

³Hochschule Reutlingen, Reutlingen, Deutschland

For the fabrication of bone tissue equivalents via tissue engineering and bioprinting approaches, one crucial element is the used biomaterial which on the one hand should support and enhance the function of the used cells, and on the other hand guarantee processability with the chosen manufacturing technique. The use of gelatin-based hydrogels for cell encapsulation provides the positive properties of the base material collagen, and offers the possibility of adjusting composition as well as characteristics like viscosity and gelling behavior [1,2]. Further modification of the material with components like hydroxyapatite (HAp) was shown to have a positive impact on processability with bioprinting approaches and properties of the material as well as its bioactivity [3,4,5]. In the current study, bioinks based on methacrylated gelatin (GM) and modified with HAp particles were used and analyzed for said parameters.

The viscosity of the bioinks was measured, as well as water uptake by the hydrogels and the gels' mechanical properties. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue (hASCs) of three donors were encapsulated in differently modified GM hydrogels, and matrix development during culture for 28 days in standard and osteogenic media was examined. To prove the development of a bone matrix, the mechanical properties of the hydrogels were analyzed, and the hydrogels were stained for bone matrix markers like collagen type I and osteocalcin. Further analysis of matrix composition was conducted via Raman spectroscopy.

The modification with HAp led to improved properties of the bioinks as well as the resulting hydrogels, as being shown by increased ink viscosity and mechanical properties of the hydrogels. The degree of water uptake, however, was not influenced. The staining of the hASC-laden hydrogels cultured under osteogenic conditions showed an increased deposition of bone components like collagen and non-collagenous proteins like osteocalcin in the modified hydrogels compared to the control GM gels after 28 days of culture. Surprisingly, this increase was also seen in the HAp-containing gels cultured under standard conditions (Fig. 1A), what illustrated the significant positive impact of the added HAp onto osteogenesis. Similarly, the spectroscopic analysis of said hydrogels on day 1 and day 28 of culture revealed peaks resulting from typical bone components like the collagen-related amino-acid proline ($853/869/1067\text{ cm}^{-1}$) or carbonate which is found in the biological mineral phase of bone (1074 cm^{-1}) (Fig. 1B). The developing bone matrix could also be detected by a rising storage module of the gels, resulting in an increase between 25% and 100% compared to day 1 (Fig. 1C) and representing the mechanical strength of the newly formed matrix.

In the current study, we could show the suitability of a GM-based material for the use in bone tissue engineering. The properties of the analyzed inks and resulting hydrogels could be modified by the addition of HAp, and the osteoinductive impact of the added mineral phase leading to a significant increase in osteogenesis in the hydrogels was shown. We therefore anticipate that the material will be highly suitable as a bioink for the bioprinting of bone tissue equivalents.

[1] J Mater Sci: Mater Med (2012) 23:2607-2617

[2] J. Mater. Chem. B (2013) 1, 5675-5685

[3] Acta Biomaterialia 10 (2014) 630-640

[4] Materials Science and Engineering C 49 (2015) 835-843

[5] Mater. Chem. B (2016) 4,1070

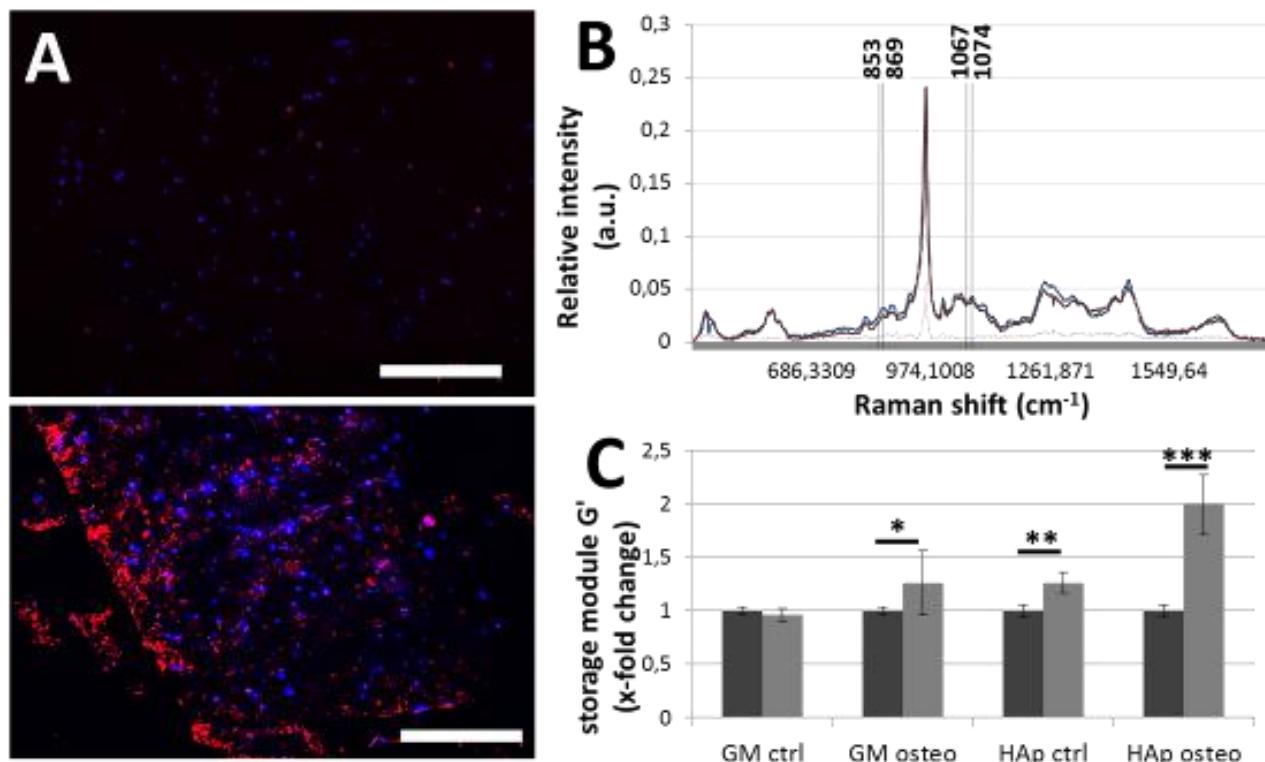
Acknowledgements

The authors thank the Fraunhofer Gesellschaft (München), and the Carl Zeiss Stiftung (Stuttgart) for financial support.

Figure 1: Analysis of hASC-laden GM- and HAp-modified hydrogels after culture under control (ctrl) and osteogenic (osteо) conditions.

(A) Immunofluorescence staining of collagen type I (red) and cell nuclei (blue) on sections of GM-hydrogels modified with HAp particles. Shown are the gels on day 1 (upper picture) and on day 28 of culture in control medium (lower picture). Scale: 400 μ m. (B) Mean Raman spectra of HAp-modified hydrogels on day 1 (blue) and day 28 (red) of culture under control conditions, as well as the respective standard deviations (dotted lines) ($n = 3$). Wavenumbers of typical bone components which increased over culture are indicated. (C) Measurement of the storage moduli G' of the different hydrogel variants cultured under control and osteogenic conditions ($n = 3$, triplicates). Shown are the changes in G' over 28 days of culture (light grey) compared to the respective values of day 1 (dark grey). Significant differences between the mean values are indicated (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Abb. 1



S08-03

Towards a synthetic stem cell niche: on the significance of physical parameters from nano to macro

L. Rödling¹, A.-L. Winkler¹, R. Gralla-Koser¹, T. Tischer¹, *C. Lee-Thedieck¹

¹Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Institute of Functional Interfaces, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland

Blood is replenished with billions of fresh cells every day throughout the entire life span. The source of these cells are the so-called hematopoietic (= blood forming) stem cells (HSCs). Their ability to reconstitute the entire blood system makes them the key to the cure of many hematological diseases such as leukemia or lymphoma. Upon transplantation from a healthy donor, HSCs are able to replace the diseased hematopoietic system of the patient. However, this treatment is restricted by the limited availability of HSCs. To overcome that limitation, controlling HSC behavior in terms of proliferation or differentiation *in vitro*, is an important goal of nowadays HSC research.

In vivo HSCs are controlled by a highly specialized microenvironment - the niche - within the bone marrow. In this niche HSCs are supported by mutual cell-cell as well as cell-matrix interactions. While it is clear that biological and/or chemical parameters play an important role in this interplay, surprisingly little attention was paid to physical signals that are transmitted by the niche microenvironment. In the last years, we found that these physical signals include matrix stiffness, nanostructure as well as the three-dimensional architecture. In reductionist approaches, in which we studied only one parameter at a time, we could show that all of these parameters impact HSC behavior.

In order to achieve the goal of a synthetic stem cell niche to guide HSC behavior, the complexity of the natural HSC niche, which combines a variety of different signals, has to be taken into account. For this purpose, we increased the complexity of our systems to study the synergistic effects of different biological and/or physical signals. With these experiments we hope to get one step closer towards a synthetic stem cell niche that is as simple as possible but as complex as necessary to instruct HSCs.

S08-04

Towards Vascularized Tissue Engineered Bone for Elderly Patients

*M. Bienert^{1,2}, C. Bergmann³, M. Tohidnezhad⁴, J. Abert³, M. Hoss⁵, W. Jahnen-Decent¹, T. Pufe⁴, H. Fischer³, S. Neuss^{1,2}

¹Biointerface Group - Helmholtz-Institute for Biomedical Engineering, RWTH Aachen University, Aachen, Deutschland

²Institute of Pathology, University Hospital RWTH Aachen, Aachen, Deutschland

³Department of Dental Materials and Biomaterials Research (ZWBF), University Hospital RWTH Aachen, Aachen, Deutschland

⁴Institute of Anatomy and Cell Biology, University Hospital RWTH Aachen, Aachen, Deutschland

⁵Electron Microscopic Facility, University Hospital RWTH Aachen, Aachen, Deutschland

Introduction

The need for biomaterials to reconstruct bone defects in elderly patients is increasing. Today, commonly used scaffolds insufficiently consider age-specific changes in bone e.g. osteoporosis. Biodegradable beta-tricalcium phosphate (β -TCP) is widely used for the reconstruction of bone defects. Strontium is known to enhance osteoblast-mediated bone remodeling and to inhibit osteoclast activity.

Methods

Individually tailored 3D-scaffolds with defined pore design and size have been developed by the Department of Dental Materials and Biomaterials Research (ZWBF) of the RWTH Aachen. Strontium atoms were directly incorporated into the crystal lattice of β -TCP scaffolds, without adversely affecting the structure. When incorporated into the crystal lattice, strontium can be released continuously during the degradation of β -TCP in the implant, whereas most β -TCP scaffolds are only coated with strontium resulting in a burst-release. Furthermore, to promote bone healing, a vascular network is necessary. In this project the scaffolds were co-cultured with human mesenchymal stem/stromal cells (MSC) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) to reinforce the bioactivity of the biodegradable scaffold. Different ratios of strontium with β -TCP were tested for optimal material composition *in vitro*. Cytotoxicity of different materials was determined using live dead staining. Potential of materials to support MSC proliferation was tested using cell titer blue assay. In addition cells on different materials are counted and osteogenic differentiation on different materials was determined using alkaline phosphatase quantification which is a marker for osteogenic differentiation. It is not established at the moment, which media is the best to for a coculture of MSC and HUVEC. VEGF, β -glycerophosphate, ascorbic acid and dexamethasone were used for an osteogenically differentiated coculture including capillary-like structures. Afterwards β -TCP +/- strontium with and without coculture was tested in an osteoporotic mouse model for their effect to promote osteoporotic fractures *in vivo*.

Results

To determine the optimal strontium composition inside the scaffold, MSC are seeded on materials with different strontium concentrations. MSC growing on β -TCP with 13% strontium showed necrotic effects, reduced cell growth, proliferation and low osteogenic differentiation potential in comparison to β -TCP with 2.6% strontium. Conditions to promote angiogenesis and osteogenic differentiation of MSC/HUVEC cocultures are established *in vitro* and later *in vivo*. Sequential feeding of VEGF supplemented media followed by osteogenic induction media results in capillary-like structure formation and a strong osteogenic differentiation. Using scanning electron microscopy, intense formation of extracellular matrix (ECM) on appropriate scaffold materials is visible *in vitro*. Two-photon microscopy showed homogeneously cell distribution inside the scaffold pores which is crucial for the *in vivo* experiments. Scaffolds with and without 2.5% strontium either cellfree or with cocultures are prepared for *in vivo* experiments. Scaffolds are implanted in osteoporotic mice using *fixateur externe*. Collagen distribution inside the pores is visible 3 months after implantation in all conditions.

Conclusion

It is known that strontium can increase osteoblast formation and here we showed that this effect is concentration dependent. Beta-TCP with 13% strontium induces necrosis in MSC *in vitro*. Media for capillary-like structure formation in osteogenic differentiated MSC/HUVEC cocultures could be established. Intense ECM production of the coculture on the scaffold could be achieved. Current evaluation and quantification of the *in vivo* experiments will demonstrate the impact of coculture system for bone regeneration.

S08-05

Differenzierungsverhalten humaner mesenchymaler Stromazellen auf geometrisch definierten 3D Faser-Scaffolds

*C. Blum¹, K. Schlegelmilch¹, T. Jungst¹, A. Ewald¹, F. Jakob², P. Dalton¹, J. Groll¹

¹Universität Würzburg, FMZ, Würzburg, Deutschland

²Orthopädische Klinik König-Ludwig-Haus, Würzburg, Deutschland

Einleitung

Es ist bekannt, dass die Geometrie eines Scaffolds die Zelladhäsion, das Einwachsen von Gewebe sowie auch Zelldifferenzierungssprozesse beeinflusst. Eine jüngst entwickelte Methode, das *Melt Electrospinning Writing (MEW)*, erlaubt durch das Elektrospinnen von Polymerschmelzen mit einer computergesteuerten Bewegung des Kollektors, das gezielte Ablegen einzelner Fasern und somit die Produktion präziser Scaffold-Geometrien mit definierter Faserdicke von wenigen Mikrometern und Maschengrößen im Bereich zellulärer Dimensionen [1]. Für die Zelldifferenzierung spielt die extrazelluläre Matrix (EZM) eine entscheidende Rolle [2], so dass es sich anbietet, die Oberfläche des Scaffolds mit Komponenten dieser Matrix zu funktionalisieren. Primäres Ziel dieses Projekts ist zu untersuchen, in wie weit die Struktur und Morphologie eines Scaffolds als geometrisch definierte zelluläre Mikroumgebung das Differenzierungsverhalten humaner mesenchymaler Stromazellen (hMSCs) beeinflusst. Darauf aufbauend sollen EZM Komponenten an die Faseroberfläche gebunden werden, um die Kombination der Stimuli aus Geometrie und Adhäsionsmotiven zu untersuchen.

Material und Methoden

Für *in vitro* Testungen wurden zellinvasive Scaffolds aus Poly-ε-Caprolacton (PCL) über MEW hergestellt. Definierte und geordnete Scaffold-Strukturen mit Faserdurchmessern im einstelligen μm-Bereich und verschiedenen präzisen Maschengrößen und -geometrien, sowie Oberflächenfunktionalisierungen (u.a. Beschichtung mit der Laminin-abgeleiteten Peptidsequenz YIGSR) wurden mit primären hMSCs aus dem Knochenmark besiedelt. Die Adipogenese der hMSCs wurde durch Zugabe diverser Differenzierungsreagenzien im Kulturmedium induziert, wobei hier verschiedene Medienzusammensetzungen getestet wurden. Die induzierte und spontane adipogene Differenzierung der hMSCs auf den Scaffold-Strukturen wurde über mehrere Wochen mittels RT-PCR und Western Blot analysiert. Die Visualisierung akkumulierter intrazellulärer Fettröpfchen erfolgte mittels Ölrot O Färbung.

Ergebnisse und Diskussion

Es wurde das adipogene Differenzierungsverhalten von hMSCs unter Verwendung verschiedener Kulturmedien auf 3D Faser-Scaffolds mit verschiedenen Geometrien und Oberflächenfunktionalisierungen charakterisiert. Analysen verschiedener adipogener Marker zeigen deutliche Unterschiede der Expressionsmuster von hMSCs kultiviert in Monolayeransätzen, verglichen mit der Kultivierung in 3D Gerüststrukturen. Bei letzterem scheint besonders der Faserdurchmesser von großer Bedeutung für die Induktion der Adipogenese zu sein. Erste Ergebnisse weisen auf eine erhöhte Expression verschiedener adipogener Marker der spontanen Differenzierung im 3D Faser-Scaffold gegenüber der Monolayerkultur hin. Weiterhin zeigt sich der Einfluss der verschiedenen Kulturmedien auf Anzahl und Größe der akkumulierten intrazellulären Fettröpfchen, dargestellt mittels Ölrot O Färbung.

Zusammenfassung

Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl die Geometrie als auch die Morphologie der Faser-Scaffolds das adipogene Differenzierungsverhalten von hMSCs beeinflussen. 3D Scaffolds, hergestellt über MEW, stellen auf Grund der definierten geometrischen Struktur vielversprechende Substrate für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich des adipogenen Differenzierungsverhaltens von hMSCs dar.

Danksagung

Wir danken dem Europäischen Forschungsrat für die Förderung des Fördervertrags Nummer 617989 (Design2Heal).

Referenzen

- [1] Brown TD, Dalton PD, Hutmacher D. Direct writing by way of melt electrospinning. *Advanced Materials* 2011;23:5651-7.
- [2] Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomaterialia* 2009;5:1-13.

S08-06

Mit GDF-5 aufgerüsteter Fibrinkleber für die osteochondrale Integration von Tissue-Engineering-Konstrukten

*Y. Renz¹, S. Diederichs¹, E. Seebach¹, E. Hesse¹, B. Lotz¹, W. Richter¹

¹Universitätsklinikum Heidelberg, Forschungszentrum für Experimentelle Orthopädie, Heidelberg, Deutschland

Fragestellung

Die langfristige Regeneration von Knorpeldefekten nach Behandlung mit Tissue-Engineering-Konstrukten scheitert häufig an der mangelnden Integration in das umliegende Gewebe. Unsere Hypothese ist, dass eine aktive Interaktion mit dem subchondralen Knochen die Integration von Tissue-Engineering-Konstrukten und damit die Defektheilung verbessern wird. GDF-5 (*growth and differentiation factor 5*) ist ein Wachstumsfaktor, der die Reifung von Chondrozyten unterstützt und die chondrogene Differenzierung und Hypertrophie mesenchymaler Stromazellen (MSCs) fördert. Ziel der Studie war es herauszufinden, ob GDF-5 fähig ist, die enchondrale Differenzierung von MSCs *in vitro* und *in vivo* zu beschleunigen und als bioaktiver Zusatz zu Fibrinkleber vielversprechend ist, einen besseren Verbund von Tissue-Engineering-Konstrukten mit benachbartem Knochengewebe einzuleiten.

Methoden

Um den Einfluss von GDF-5 auf die Chondrogenese von MSCs zu messen, wurden MSCs mit Fibrinkleber vermengt und in chondrogenem Medium mit oder ohne 150 ng/mL GDF-5 kultiviert. Nach 4 Wochen wurden die Qualität und die Quantität des gebildeten Knorpels untersucht. Weitere Konstrukte wurden nach 4 Wochen chondriger Kultur subcutan in immundefiziente Mäuse implantiert. Nach weiteren 2 oder 4 Wochen wurde die enchondrale Ossifikation mithilfe µCT und Histologie untersucht. Die Fähigkeit von GDF-5-Fibrinkleber, einen Verbund eines Tissue-Engineering-Konstruktes mit Knochengewebe zu induzieren, wurde in einem ektopen Modell getestet. Dazu wurden Hydrogele mittels MSC-haltigem GDF-5-Fibrinkleber auf runde Knochenscheiben aus dem Mäuseschädeldeckel geklebt und subcutan in immundefiziente Mäuse implantiert. Kontrollkonstrukte enthielten kein GDF-5. Nach 7 Wochen *in vivo* wurde die Knochenbildung mittels µCT und histologischer Untersuchung quantitativ und qualitativ beurteilt. Zusätzlich wurde mit GDF-5 aufgerüsteter Fibrinkleber im Vollschicht-Knorpeldefekt in Minipigs auf seine orthotope Biokompatibilität untersucht.

Ergebnisse

Bei den In-vitro-Untersuchungen der MSC-Chondrogenese war die Knorpelbildung unter Behandlung mit GDF-5 ebenso erfolgreich wie unter Standardbedingungen. Auffällig war jedoch eine signifikante Erhöhung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase in der GDF-5-Gruppe, die eine verstärkte enchondrale Differenzierung anzeigen. In Übereinstimmung damit waren mit GDF-5 differenzierte Tissue-Engineering-Konstrukte *in vivo* signifikant stärker mineralisiert als Kontrollkonstrukte und enthielten nach 28 Tagen signifikant mehr Knochengewebe. Auch bei der ektopen Simulation der Fixierung von Tissue-Engineering-Konstrukten auf Knochenplatten waren Konstrukte mit GDF-5 nach 7 Wochen *in vivo* stärker mineralisiert als GDF-5-freie Kontrollen. Bei der orthotopen Testung von GDF-5-Fibrinkleber in vollschichtigen Knorpeldefekten von Minipigs zeigten alle Defekte eine gute Füllung ohne Nebenwirkungen auf den subchondralen Knochen.

Schlussfolgerungen

Mit GDF-5 aufgerüstetes Fibrin erscheint aufgrund seiner Adhäsionskraft kombiniert mit seiner osteochondralen Aktivität als äußerst vielversprechend als Kleber für die Fixierung von Tissue-Engineering-Konstrukten in Knorpeldefekten. Weitere Studien müssen nun zeigen, ob die Bioaktivität von GDF-5 die osteochondrale Differenzierung von MSCs zu fördern auch wirklich die Integration von Tissue-Engineering-Konstrukten in den subchondralen Knochen verbessern kann.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch das 7. Rahmenprogramm der Europäischen Union (Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) HydroZONES under grant agreement no. 309962) gefördert.

S09-01

Co-Kultur-Untersuchungen an Hämocyanin modifizierten Chitin- und Chitosan Scaffolds und der Einfluss von Calcium auf das Osteoblasten/Osteoklasten-Verhältnis

*J. Farack¹, B. Kruppke¹, S. Weil², E. D. Aflalo², D. Polaková³, A. Sagi², T. Hanke¹

¹TU Dresden, Institut für Werkstoffwissenschaft, Professur für Biomaterialien, Gruppe Biomimetische Materialien und Biomaterialanalytik, Dresden, Deutschland

²Ben-Gurion University of the Negev, Faculty of Natural Sciences, Be'er Sheva, Israel

³Technical University of Liberec, Faculty of Mechatronics and Interdisciplinary Engineering Studies, Liberec, Tschechische Republik

Bei der Entwicklung neuartiger Knochenersatzmaterialien stehen natürliche Materialien im Focus der Forschung, von denen eine höhere Bioverträglichkeit zu erwarten ist und die biodegradierbar sind ohne toxische Nebenprodukte zu generieren. Chitin, das zweithäufigste Biopolymer nach Zellulose, stellt ein solches Biomaterial dar und ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Das Exoskelett von Crustacean, welches hauptsächlich aus Chitin besteht, unterliegt einem zyklischen Auf- und Abbau, bei dem verschiedene Proteine eine wichtige Rolle spielen wie z.Bsp. Hämocyanin, das aus den Hämolympfen des Flusskrebs *Cherax quadricarinatus* isoliert und zur Modifizierung von Chitin- und Chitosan-Scaffolds verwendet wurde.

Chitosan ist aufgrund besserer Löslichkeit *in vitro* leichter handhabbar als Chitin, weshalb Scaffolds aus beiden Materialien untersucht wurden. Die Herstellung der Scaffolds erfolgte nach Anpassung in der Literatur beschriebener Methoden nach [1] für Chitin und [2] für Chitosan. Um Effekte durch Gammastrahlung auszuschließen, wurde Hämocyanin erst nach der Sterilisation in die Scaffolds eingebracht.

Durch die Modifikation mit Hämocyanin konnten Adhäsion und Proliferation von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) auf allen untersuchten Chitin Scaffoldvarianten deutlich verbessert werden. Dies wirkte sich positiv auf die osteogene Differenzierung aus. Auf Monozyten scheint Hämocyanin keinen Einfluss zu nehmen. Bei Chitosan Scaffolds konnte ebenfalls eine positive Wirkung auf die Proliferation von hMSC durch Hämocyanin erzielt werden, wohingegen die Adhäsion nicht beeinflusst wurde.

Die Adhäsion von hMSC war auf reinen Chitin Scaffolds (Abb. 1) höher als auf Chitin-CaCO₃. Bei der Proliferation dagegen konnte zum Teil eine höhere Zellzahlzunahme auf Chitin-CaCO₃ (mit/ohne HCl-Behandlung) beobachtet werden als auf reinen Chitin Scaffolds. Messungen der Alkalischen Phosphatase-Aktivität ergaben auf reinem Chitin und auf HCl-behandelten Chitin-CaCO₃ Scaffolds eine gesteigerte osteogene Differenzierung im Vergleich zu Chitin-CaCO₃ ohne HCl-Behandlung.

Bei Chitosan Scaffolds bewirkte Brushit (B) bzw. Hydroxylapatit (HA) ebenfalls eine Reduktion der Adhäsion. Die Ursache hierfür liegt in der Bioaktivität der beiden Calciumphosphatphasen. Durch die damit einhergehende Erniedrigung der Calciumionenkonzentration im Medium war insbesondere bei Zugabe osteogener Zusätze in den ersten 14 Tagen die hMSC-Proliferation gehemmt. Während auf Chitosan-HA die Zellen am besten im Basismedium proliferierten, konnte auf Chitosan-B vor allem im Differenzierungsmedium die Zellzahl deutlich gesteigert werden.

In Co-Kulturuntersuchen war dieser Effekt ebenfalls zu beobachten, erst nach Absetzen der osteogenen Additive erfolgte eine gesteigerte hMSC-Proliferation auf Chitosan-B und Chitosan-HA sowohl in Mono- als auch in Co-Kultur. Dabei war festzustellen, dass Monozyten Chitosan-HA bevorzugten und hMSCs Chitosan-B. Entsprechend [3] wurde in der Co-Kultur auf M-CSF und RANKL verzichtet. Durch TRAP5b Aktivitätsmessungen konnte nachgewiesen werden, dass ohne diese Stimuli die Osteoklastogenese auf allen untersuchten Scaffoldvarianten erfolgte. Insbesondere auf Chitosan (mit/ohne B oder HA) war in Co-Kultur sowohl eine gesteigerte hMSC-Proliferation als auch eine erhöhte Osteoklastenaktivität im Vergleich zur Mono-Kultur zu beobachten. Auf Chitin Scaffolds konnten keine Unterschiede zwischen Mono- und Co-Kultur festgestellt werden. Hier adhärierten die Monozyten am besten auf Chitin-CaCO₃ ohne HCl-Behandlung, während die hMSC bevorzugt auf den HCl-behandelten Scaffolds adhärierten und eine gesteigerte TRAP 5b Aktivität der Osteoklasten bewirkten.

Die Kommunikation von Knochen aufbauenden Osteoblasten und resorbierenden Osteoklasten ist entscheidend für den Erfolg eines Knochenimplantats. Dabei spielt die Bioaktivität des Materials, die Fähigkeit, auf der Oberfläche eine Apatitschicht zu bilden, eine wichtige Rolle. Durch die Einbringung von CaCO₃ in die Chitin Scaffolds bzw. verschiedenen Calciumphosphatphasen in die Chitosan Scaffolds konnte gezielt das Zellverhalten und damit das Osteoblasten/Osteoklasten-Verhältnis beeinflusst werden. Die positive Wirkung des Hämocyanins soll in Zusammenhang mit anderen Crustacean-Proteinen weiter untersucht werden - *in vitro* als auch *in vivo*.

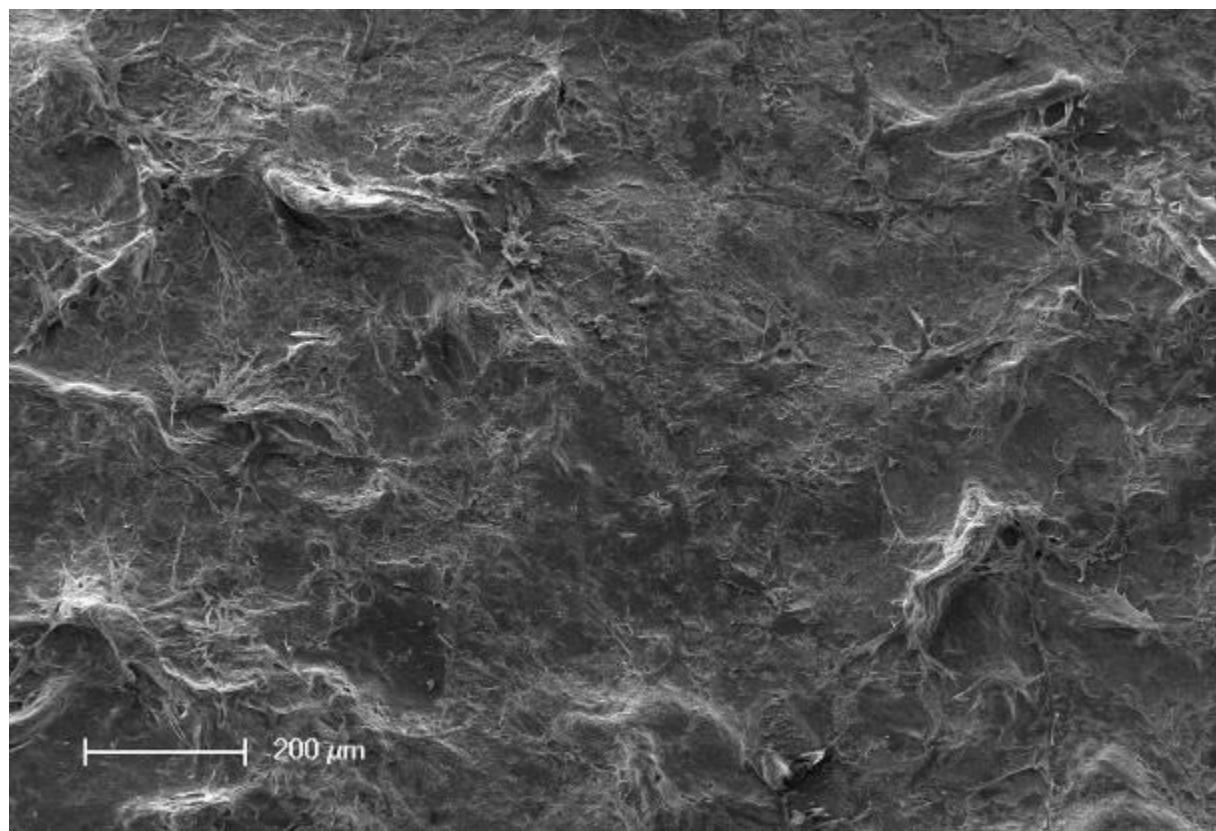
[1] K.S. Chow and E. Khor, Biomacromolecules 1 (2000), 61-67

[2] N. Nwe et al., Materials 2 (2009), 374-398

[3] C. Heinemann et al., European Cells and Materials 21 (2011), 80-93

Die Autoren danken dem BMBF (13GW0025) für die finanzielle Unterstützung.

Abb. 1



S09-02

clickECM - a new approach to covalently immobilize human ECM on artificial surfaces

*S. Keller¹, S. M. Ruff¹, M. Bach¹, P. Kluger^{2,3}

¹Universität Stuttgart, Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie, IGPV, Stuttgart, Deutschland

²Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Zell- und Tissue Engineering, Stuttgart, Deutschland

³Hochschule Reutlingen, Fakultät Angewandte Chemie, Reutlingen, Deutschland

The extracellular matrix (ECM) is a complex three-dimensional network of biomolecules that surround the cells within a human tissue. The ECM is tissue-specific and is considered the natural environment of the cells. Due to the high biological activity, various types of ECM are able to promote cell adhesion, proliferation and differentiation in a tissue specific manner [1]. Primary cells are capable of producing an ECM in vitro, which can be isolated after several days of culture [2]. Due to its diverse functions, the isolated ECM is a promising biomaterial for use in tissue engineering and regenerative medicine.

However, if this isolated ECM is used as a biomaterial for surface coatings, a major limitation is the lack of mechanical stability, since physisorption is the primary source of adhesion between the molecules [3].

To overcome this limitation our approach was to covalently immobilize the human ECM on artificial surfaces. Therefore, we performed metabolic oligosaccharide engineering (MOE) to introduce click groups into the glycan structures of the ECM. Here we demonstrate that this method is suitable to fabricate a “clickable” human ECM (*clickECM*) which can be covalently immobilized on click-functionalized artificial surfaces via copper-free click reaction [4] (Fig. 1).

We cultured primary human dermal fibroblasts over a period of six days to generate a human dermal ECM. By treating the cells with an azide-modified monosaccharide (Ac₄GalNAz), we were able to introduce click functionalities into the glycans of the ECM. Histochemical and immunofluorescence analysis were performed to characterize the biological composition of the resulting *clickECM* in comparison with untreated ECM and human skin dermis. Then, artificial surfaces were functionalized with activated alkynes for the covalent immobilization of *clickECM*. Coating of unmodified ECM via physisorption served as a control. The stability of these coatings was compared by calculating the percentage area covered with ECM before and after an intensive washing step in detergent-supplemented buffer. The bioactive properties of these coatings were evaluated by quantifying the cell proliferation of HaCaT cells seeded on either *clickECM*-coated or uncoated glass substrates.

We could show that MOE can be used to introduce click groups into the ECM of human dermal fibroblasts. This *clickECM* is comparable to the unmodified ECM and to human skin dermis in terms of the distribution of glycans and typical ECM components. The *clickECM* can be covalently immobilized on alkyne-modified surfaces resulting in a significant increase in coating stability compared to a conventional ECM coating via physisorption (Fig. 2). Cell proliferation of HaCaT cells was significantly enhanced on the *clickECM*-coated surfaces compared to uncoated glass substrates. These results demonstrate that the covalent immobilization provides high stability, while also preserving the biological activity of the human ECM.

We therefore propose that *clickECM* is a promising biomaterial for the use in tissue engineering and regenerative medicine e. g. as a tissue-specific coating material to mimic the natural environment of cells.

References

- [1] Lu, H. et al. Biomaterials 32, 9658-9666 (2011)
- [2] Fitzpatrick, L. E. & McDevitt, T. C. Biomater. Sci. 3, 12-24 (2015)
- [3] Goodman, S. B., Yao, Z. Y., Keeney, M. & Yang, F. Biomaterials 34, 3174-3183 (2013)
- [4] Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 40, 2004-2021 (2001)

Figure 1: Preparation of a *clickECM* coating on artificial surfaces
Figure 2: Evaluation of the coating stability of ECM-coated surfaces.

Abb. 1

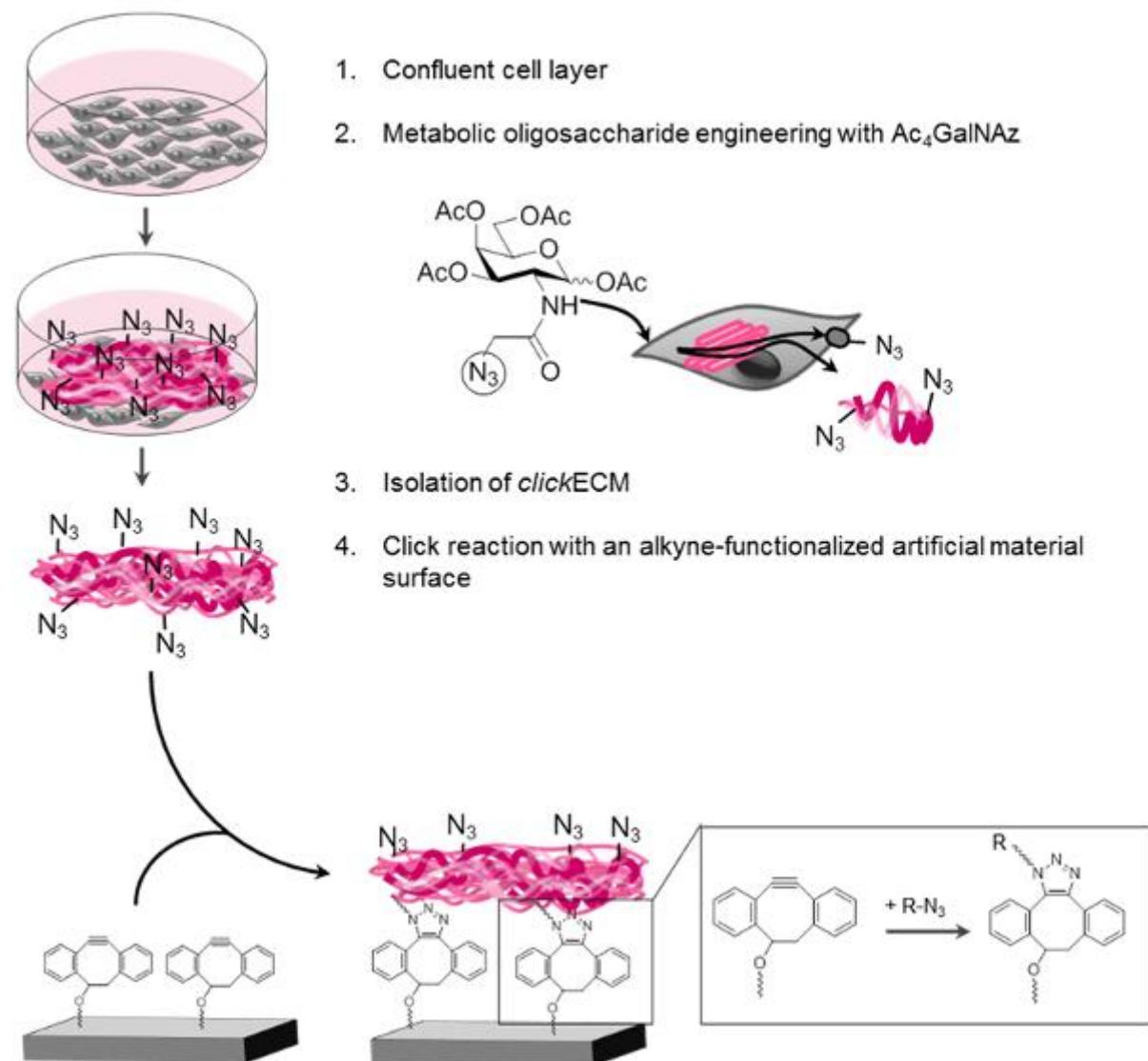
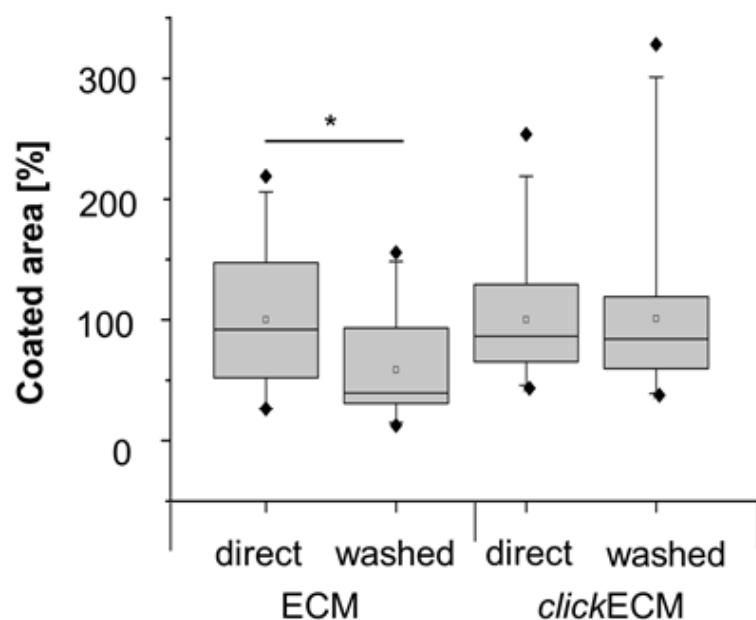


Abb. 2



S09-03

Peptid-Funktionalisierung eines starPEG/Heparin Hydrogels zur Steuerung von Proliferation, Zellmorphologie und Knorpelmatrixverteilung *in vitro* und *in vivo* für das Knorpel Tissue Engineering

*E. Hesse¹, U. Freudenberg², T. Niemietz¹, C. Greth¹, M. Weisser¹, Y. Renz¹, S. Hagmann³, M. Binner², C. Werner², W. Richter¹

¹Universitätsklinikum Heidelberg, Experimentelle Orthopädie, Heidelberg, Deutschland

²Institut für Polymerforschung, Dresden, Deutschland

³Universitätsklinikum Heidelberg, Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, Heidelberg, Deutschland

Fragestellung

Zellbasiertes Tissue Engineering (TE) ist ein vielversprechender Ansatz, um Knorpelschäden zu behandeln. Viele Trägermaterialien bieten aber nur ein inertes Gerüst zur Verankerung von Zellen im Knorpeldefekt und führen zu Knorpelersatzgewebe mit unzureichenden biochemischen und mechanischen Eigenschaften im Vergleich zu nativem Knorpel. Biomaterialien mit zellinstruktiven Signalen könnten das funktionelle TE von Knorpel maßgeblich verbessern, indem die Zellantwort durch die Aufrüstung mit physiologisch relevanten Peptiden selektiv beeinflusst wird. Ziel dieser Studie war es, mehrere zellinstruktive Peptide wie eine Matrix-Metalloprotease (MMP)-Spaltsequenz, das Adhäsionsmotiv RGD oder die kollagenbindenden Peptide CKLER und CWYRGRL in einem modularen Hydrogelsystem zu kombinieren, um effektive Signale ausfindig zu machen, die es ermöglichen die Defizite von unmodifizierten PEG-basierten Hydrogelen zu überwinden und dadurch ein knorpelähnliches Matrix-Netzwerk zu fördern.

Material und Methoden

Die Hydrogele wurden hergestellt indem thiol-endfunktionalisiertes starPEG oder starPEG-MMP-Konjugate, welche MMP-sensitive Peptide an jedem Arm tragen, mit Maleimid-funktionalisiertem Heparin [1], in Ab- oder Anwesenheit von zellinstruktiven Peptiden (RGD, CKLER und CWYRGRL) vermengt wurden. Humane mesenchymale Stromazellen (MSC) oder porzine Chondrozyten wurden in die Hydrogele eingebettet und bis zu vier Wochen *in vitro* unter chondrogenen Bedingungen kultiviert oder *in vivo* in subkutane Taschen von immundefizienten Mäusen implantiert.

Ergebnisse

StarPEG/Heparin Hydrogele unterstützten unabhängig von der Präsenz der MMP-Spaltsequenz die chondrogene Differenzierung von MSC gemäß der Induktion von COL2A1, BGN und ACAN mRNA. Eine verstärkte Abbaubarkeit, über erhöhte MMP-Spaltsequenz-Anteile steigerte die Zellviabilität und Proliferation. Die RGD-Modifikation der Hydrogele induzierte das Ausbreiten der Zellen und führte zu einem stark vernetzten Zellverbund. Anders als vermutet, waren CKLER und CWYRGRL nicht in der Lage die Kollagenablagerung in den Konstrukten *in vitro* zu erhöhen. In Chondrozyten-beladenen Hydrogelen war die Matrixproduktion hoch und wir waren in der Lage die lediglich perizelluläre Ablagerung von Knorpelmatrix, die für unmodifizierte PEG-Hydrogele charakteristisch ist, zu überwinden und eine konstruktweite Matrixverteilung zu ermöglichen.

Schlussfolgerung

Systematische Variation verschiedener zellinstruktiver Signale in einem modularen starPEG/Heparin Hydrogel zur Veränderung der Abbaubarkeit (MMP-Spaltsequenz), Zelladhäsion (RGD) und Matrixbindung (CKLER und CWYRGRL) beeinflussten nachhaltig die Zellmorphologie, Zellnetzwerkbildung, Proliferation und Matrixverteilung, wobei *in vivo* Ergebnisse von zellinstruktiven Hydrogelen Befunde aus *in vitro* Versuchen übertreffen konnten. Zusammenfassend erlaubte die Peptid-Instruktion über Heparin-angereichertem MMP-spaltbarem starPEG die Verbesserung von Zellproliferation und Knorpelmatrixverteilung und stelle somit bessere Ergebnisse für MSC- und Chondrozytenbasierte Knorpelregenerationsstrategien in Aussicht.

Referenzen

- [1] M. V. Tsurkan, K. Chwalek, S. Prokoph, A. Zieris, K. R. Levental, U. Freudenberg, and C. Werner, 'Defined Polymer-Peptide Conjugates to Form Cell-Instructive StarPEG-Heparin Matrices *in Situ*', *Adv Mater*, 25 (2013), 2606-10.

Danksagung

Diese Arbeit wurde von dem „Seventh Framework Programme HydroZONES“ der Europäischen Union (FP7/2007-2013) unter der Zuwendungsvereinbarung n° 309962 finanziert.

S09-05

Nano contact points control initial microbial adhesion on biomaterials surfaces

*C. Dewald^{1,2,3}, C. Lüdecke-Beyer^{1,2,3}, M. Roth^{2,3}, J. Bossert¹, K. D. Jandt^{1,3}

¹Friedrich Schiller University Jena, Chair of Materials Science, Jena, Deutschland

²Hans Knöll Institute Jena, Bio Pilot Plant, Jena, Deutschland

³Friedrich Schiller University Jena, Jena School for Microbial Communication, Jena, Deutschland

Introduction

An increased use of antibiotic drugs has led to the development of numerous multi-resistant microbes in the last years. Due to this medical situation the treatment of biomaterials-associated infections (BAI) with antibiotics is critically discussed. Therefore, a reduced adhesion of microorganisms on biomaterials surfaces is of high interest for preventing BAI. One strategy is the modification of the topographical characteristics of biomaterials surfaces. We immobilized nanoparticles (\varnothing 15 nm diameter) in order to nanostructure biomaterials surfaces. The aims of the study were [i] to investigate microbial adhesion on nanostructured biomaterials surfaces and [ii] to identify and understand the physical mechanisms of microbial adhesion on the nanostructured surfaces.

Experimental Methods

For reproducible fabrication of gold surfaces physical vapor deposition (PVD) was used. Different concentrations of COOH-functionalized gold nanoparticles were immobilized on polyethylenimine-functionalized gold surfaces. The surfaces were characterized by atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM), X-ray photoelectron spectroscopy and contact angle measurements. *Escherichia coli* cells adhesion to the modified gold surfaces and to the unstructured control surfaces was measured by confocal laser scanning microscope after 3 h, 6 h and 9 h. For investigation of the material-microbe interfaces, a SEM equipped with a focused ion beam was used.

Results and Discussion

AFM images indicated the successful immobilization of gold nanoparticles with different concentrations on the activated gold surfaces. After 6 h and 9 h of adhesion, a statistically significantly reduced surface coverage on the nanostructured gold surfaces compared to the unstructured control surface was observed. With decreasing the amount of immobilized nanoparticles the microbial adhesion was reduced. The material-microbe interface indicated that the contact points given by the nanoparticles mediate the initial adhesion contact between the microbial cell and the surface. With a reduced amount of immobilized nanoparticles the number of contact points decreases resulting in less microbial adhesion.

Conclusion

Our study deepen the knowledge about the mechanisms of interactions between bacterial cells and nanostructured biomaterials surfaces. The modification of biomaterials surfaces with nanoparticles is, therefore, a promising antibiotic-free strategy for reducing BAI.

S09-06

Knochenersatzwerkstoff auf der Basis von Calcium-/Strontiumphosphatmineralisierter Gelatine

*B. Kruppke¹, A. S. Wagner², C. Kreschel¹, C. Heinemann¹, H. Worch¹, S. Wenisch², T. Hanke¹

¹Technische Universität Dresden, Max Bergmann Zentrum für Biomaterialien, Dresden, Deutschland

²Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, Gießen, Deutschland

Einleitung

Die Einbindung von organischen Molekülen in einen Mineralisationsprozess oder Verbundwerkstoffe aus organischen und anorganischen Bestandteilen für den Knochenersatz verfolgen das Ziel, den Knochen in seiner Struktur und/oder Funktion nachzuahmen. Im Bereich der resorbierbaren Knochenersatzwerkstoffe liegt der Fokus auf der Beeinflussung des Gleichgewichtes zwischen Osteoblasten und Osteoklasten, um eine möglichst rasche Einbindung des Materials in den Remodellierungsprozess zu ermöglichen.

Material/Methode

Die Mineralisation von Gelatine, die mittels phosphathaltiger Lösung vorstrukturiert wurde, mit Calcium- und Strontiumlösungen führt zu morphologisch und strukturell stark variierbaren Mineralphasen. Die Eignung dieser organisch modifizierten Minerale wurde in Bezug auf unterschiedliche Verfahren der Probekörperherstellung untersucht, um die Porosität, scheinbare Dichte und Degradation variieren. Neben der azellulären Degradation in physiologischen Medien wurde ein Schwerpunkt auf die zelluläre Reaktion von humanen mesenchymalen Stammzellen und humanen Monozyten unter Differenzierung zu Osteoblasten bzw. osteoklastären Zellen gelegt.

Die mechanische Charakterisierung erfolgte mittels Druck- und Spaltzugfestigkeitsprüfung unter Berücksichtigung der Veränderung des Materials durch fortschreitende Inkubation in Zellkulturmedium.

Diskussion

Im Rahmen der Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Co-Präzipitation von Calcium-/Strontiumphosphatmineralisierter Gelatine eine Eigenschaftskombination ermöglicht, die vorteilhaft gegenüber den einzelnen Fällungsprodukten, also reinem Calciumphosphat (Monetit/Brushit) mit Gelatine bzw. Strontiumphosphat mit Gelatine ist. Das Zusammenspiel aus Degradation und Trockenfestigkeit/Handhabbarkeit zeichnet das Calcium/Strontiumphosphat mit Gelatine aus, da eine Kompensation der Apatitabscheidung in physiologischen Lösungen durch die Kationenfreisetzung möglich ist.

Die Kultivierung von humanen Mesenchymalen Stammzellen, deren hohe Proliferation und Differenzierung zu Osteoblasten sind ebenfalls Indikatoren für die Eignung von Calcium-/Strontiumphosphatmineralisierte Gelatine als Knochenersatzwerkstoff. Insbesondere die Differenzierung von humanen Monozyten zu Osteoklasten könnte die Basis für die Einbindung des Materials in den Remodellierungsprozess dienen, bei dem sich die Abbauprodukte und hier insbesondere die Strontiumionen als zusätzliche osteogene Stimulation auf die humanen mesenchymalen Stammzellen auswirken.

Finanzielle Unterstützung

Die Autoren danken für die Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Transregio 79/ M3.

S10-01

3D culture of primary human osteocytes for the study of physiological function

*A. Bernhardt¹, M. Gelinsky¹

¹TU Dresden, Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung, Dresden, Deutschland

Introduction

Osteocytes play an important role at the regulation of bone homeostasis and turnover. However, osteocytes are difficult to isolate and study, since the cells are embedded in the rigid extracellular bone matrix. Furthermore isolated primary osteocytes quickly dedifferentiate when cultured in monolayers. Therefore, most *in vitro* investigations on osteocytes are performed with murine immortalized osteocyte cell lines. The aim of the present study was to establish three-dimensional osteocyte networks within collagen gels based on both primary osteocytes and primary osteoblasts, which were further differentiated along the osteogenic lineage.

Methods

Primary osteocytes and osteoblasts were isolated from human femoral heads after total hip arthroplasty with informed consent of the patients. Osteoblasts were isolated from bone chips after one digestion by outgrow. For osteocyte isolation bone chips were digested and demineralized in several steps according to a protocol previously published for murine bone [1]. Osteocytes and osteoblasts were embedded into collagen gels and the osteocyte marker Dentin Matrix Protein 1 (DMP-1) was analysed by immunostaining directly after isolation for osteocytes and after three weeks of osteogenic stimulation for osteoblasts.

Results

Cells with osteocyte-like dendritic morphology were successfully isolated after several steps of collagenase digestion and demineralisation. Osteocyte marker DMP-1 was expressed as verified by immunostaining (figure 1). Furthermore, gene expression of the osteocyte markers E11/podoplanin and DMP-1 was confirmed after isolation of the cells. Osteoblasts embedded in collagen gels changed their morphology under osteogenic stimulation into osteocyte-like dendritic appearance. Positive DMP-1 immunostaining as well as gene expression of osteocyte markers indicated the differentiation of osteoblasts into osteocytes.

Figure 1: cLSM images of primary human osteocytes isolated from trabecular bone, nuclei blue (DAPI), cytoskeleton green (Alexa Fluor488 phalloidin), DMP-1 red (Alexa Fluor 546) , scale bar 50 µm

Conclusion

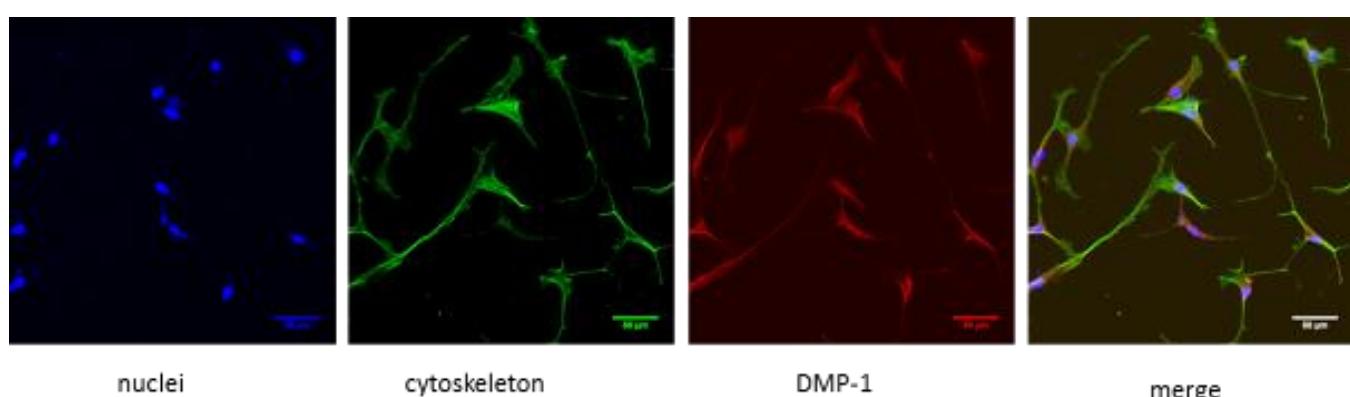
Both osteoblast-derived and directly isolated osteocytes show typical osteocytic morphology and expression of osteocyte markers when embedded in collagen gels. The established three-dimensional osteocytic culture is useful tool to study osteocyte function. Further work will involve co-cultures of osteocytes with other bone cells.

This work was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (BE 5139/3-1).

Reference

[1] Stern AR, Stern MM, Van Dyke ME, Jähn K, Prideaux M, Bonewald LF. Isolation and culture of primary osteocytes from the long bones of skeletally mature and aged mice. *Biotechniques*. 2012;52(6):361-73.

Abb. 1



S10-03

Angiogenese in druckbaren Hydrogelen

*F. Kreimendahl¹, M. Köpf², N. Hepp¹, H. Fischer², S. Jockenhoevel¹

¹Institut für Angewandte Medizintechnik, RWTH Aachen, Universitätsklinikum der RWTH Aachen, Biohybride und Textile Implantate, Aachen, Deutschland

²RWTH Aachen, Universitätsklinikum der RWTH Aachen, Lehr- und Forschungsgebiet für Zahnärztliche Werkstoffkunde und Biomaterialforschung, Aachen, Deutschland

Einleitung

Aufgrund einer limitierten Sauerstoff- und Nährstoffversorgung durch Diffusion von nur 100-200 µm stellt die Prävaskularisierung ein großes Potential für die Erzeugung von komplexen und dickeren Geweben und Organen im Rahmen des Tissue Engineerings dar [1]. Die aktuellen Ansätze basieren meist auf einer erfolgreichen Ko-Kultivierung von Endothelzellen (ECs), welche die kapillaren Strukturen ausbilden und Angiogenese-unterstützenden Fibroblasten. Die Kultivierung der beiden Zellarten erfolgt häufig in 3D Hydrogelscaffolds, welche durch ihre Eigenschaften die Migration, Proliferation und den für die Angiogenese typischen Sprouting-Prozess beeinflussen. Hydrogele auf Kollagen und Fibrin-Basis erfüllen die meisten Anforderungen für 3D *In vitro*-Angiogenese-Assays [2]. Die Biofabrikation dieser Hydrogele ist allerdings durch lange Polymerisationszeiten und geringe Steifigkeit stark limitiert.

Das Ziel dieser Studie war es, Materialkombinationen zu untersuchen, die die positiven Hydrogel-Eigenschaften mit der Druckbarkeit vereinen. Damit soll in der Zukunft das Tissue-Engineering von komplexen sowie tubulären Geweben und Organen ermöglicht werden.

Material und Methoden

Die Experimente (n=3) wurden mit humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVECs) und dermalen Fibroblasten (HDFFs) mit jeweils 3×10^6 Zellen/mL Hydrogel durchgeführt. Als Kontrolle wurde Fibrin (5 mg/mL) eingesetzt, welches unter Zugabe von 4.75 mM Kalziumchlorid (CaCl_2) und 3 U/mL Thrombin polymerisiert. Die Hydrogel Blends wurden wie folgt angesetzt: Die Agaroselösung wurde jeweils auf eine finale Konzentration von 2 mg/mL und 5 mg/mL verdünnt. Die Typ I Kollagen-Lösung wurde mit 1 M NaOH, 10x DMEM Glutamax und DMEM Medium zu finalen Konzentrationen von 2 mg/mL und 5 mg/mL verdünnt. Für die Blends ergaben sich demnach folgende Ansätze: AGR0.2COLL0.5, AGR0.5COLL0.2, AGR0.5COLL0.5. Die Kultivierungszeit betrug 14 Tage. Im Anschluss daran wurden die Proben fixiert, immunhistochemisch gegen CD31/Alexa Fluor 594 und HE gefärbt. Die Auswertung wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie, inversen Lichtmikroskopie und 2-Photonen-Laser-Scanning Mikroskopie (TPLSM) durchgeführt. Zur Quantifizierung wurden die Strukturlänge, das Volumen und die Strukturfläche der entstandenen Kapillaren mittels ImagePro Software bestimmt.

Ergebnisse

Die Studie offenbarte einen signifikanten Unterschied der ausgebildeten kapillar-ähnlichen Strukturen im Vergleich zwischen der Fibrin Kontrolle und den Hydrogel Blends. Im direkten Vergleich untereinander zeigten die Gele mit einer erhöhten Agarose Konzentration von 0.5 % eine bessere Ausbildung von kapillaren Strukturen. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) sowohl für die Gefäßlänge als auch das Volumen und die Strukturfläche ergab sich für AGR0.5COLL0.5 im Vergleich zu den anderen Blends. Im Mittel erreichten diese Proben eine durchschnittliche Strukturlänge von 43.56 µm, ein Volumen von 11724.65 µm³ und eine Strukturfläche von 3995.25 µm².

Diskussion & Zusammenfassung

Die Entwicklung eines druckbaren Hydrogels, welches gleichzeitig proangiogene Eigenschaften besitzt, ist eine komplexe Herausforderung. Mittels eines iterativen Prozesses konnten wir einen Lösungsansatz aufzeigen. Basierend auf den Ergebnissen könnte es in Zukunft möglich werden, komplexe und sogar tubuläre Organe wie zum Beispiel die Trachea erfolgreich mit Hilfe des Tissue Engineerings herzustellen.

Referenzen

- [1] Phelps, E. A. & García, A. J. Engineering more than a cell: vascularization strategies in tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 704-9 (2010).
- [2] Morin, K. T. & Tranquillo, R. T. In vitro models of angiogenesis and vasculogenesis in fibrin gel. *Exp. Cell Res.* 319, 2409-17 (2013).

Danksagung

Die Studie wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG unterstützt (Förderung FI 975/23-1).

S10-04

3D-Plotten eines Alginat-Laponit-Methylcellulose-Komposit für die Biofabrikation: Herstellung, Charakterisierung und *in vitro*-Untersuchungen

*T. Ahlfeld¹, G. Cidonio², A. R. Akkineni¹, A. Lode¹, J. I. Dawson², R. O. C. Oreffo², M. Gelinsky¹

¹Technische Universität Dresden, Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus und Medizinische Fakultät, Dresden, Deutschland

²University of Southampton, Bone and Joint Research Group, Centre for Human Development Stem Cells and Regeneration, Institute of Developmental Sciences, Southampton, Vereinigtes Königreich

Einleitung

Derzeit wird das Prinzip der schichtweisen Fertigung (*Additive Manufacturing*) im Hinblick auf die Herstellung von medizinischen Implantaten und Tissue Engineering-Konstrukten intensiv erforscht. Zunehmend spielt dabei die Integration von Zellen schon während des Fertigungsprozesses eine wichtige Rolle. Ein Verfahren, welches diese sogenannte „Biofabrikation“ erlaubt, ist das 3D-Plotten. Zellhaltige Pasten können strangweise abgelegt werden, wodurch dreidimensionale Scaffolds mit definierter Porenstruktur entstehen. Das Hydrogel-basierte Biomaterial sollte dabei zwei Anforderungen erfüllen: (i) eine ausreichend hohe Viskosität, damit formgenaue Scaffolds gefertigt werden können. Dies wird in der Regel über den Polymergehalt erreicht. (ii) Das Hydrogel muss den Zellen einen hohen Wasseranteil bieten, um die Vitalität der Zellen sicherzustellen. Es gilt als große Herausforderung beide Anforderungen zu erfüllen [1]. Eine Möglichkeit ist die Integration einer nicht vernetzbaren, sich nach dem Plottvorgang schnell herauslösenden Komponente wie Methylcellulose [2]. Es soll ein neuartiges Komposit aus Alginat, Laponit und Methylcellulose vorgestellt werden, welches zu Scaffolds mit hoher Formgenauigkeit verplottet werden kann, und eine attraktive Umgebung für Zellen bietet. Laponit ist ein Smektitmineral, welches bemerkenswerte Eigenschaften hinsichtlich Wachstumsfaktorfreisetzung zeigt und als Matrix für eingekapselte Zellen fungieren kann [3]. Die Kombination mit Alginat und Methylcellulose soll die Verarbeitbarkeit mittels Drucktechnologien ermöglichen.

Materialien & Methoden

Laponit- (*laponite XLG, BYK Additives Ltd, UK*), Alginat- (*alginic acid from brown algae, Sigma-Aldrich, UK*) und Methylzellulosepulver (*Sigma-Aldrich, USA*) wurden autoklaviert. 3 (Gew-)% Laponit wurde unter Rühren in deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurden 3 (Gew-)% Alginatpulver hinzugegeben und bis zum Auflösen gerührt. 3 (Gew-)% Methylzellulose wurden mit dem entstandenen Sol vermengt und die Paste wurde über Nacht gelagert. Zum Vergleich wurde eine gleichartige Paste hergestellt und nachträglich autoklaviert. Die Viskosität beider Pasten wurde mittels Rheometer (*Rheotest® RN 4.1, Medingen*) untersucht. Mithilfe eines 3D-Plotters (*Bioscaffolder 3.1, GeSiM, Großberkmannsdorf*) erfolgte die Verarbeitung der Pasten. Direkt nach dem Plotten wurden die Scaffolds für 10 min in 100 mM CaCl₂-Lösung vernetzt. Die Scaffolds wurden hinsichtlich ihrer Quellung und Stabilität in Zellkulturmedium untersucht, die Freisetzung der Methylzellulose wurde mit Hilfe einer Chlorzinkiod-Färbung nachgewiesen. Die mechanischen Eigenschaften der Scaffolds wurden durch uniaxiale Drucktests (*Zwick-Roell Z010, Kraftmessdose: 100 N, Ulm*) erfasst. MG63-Zellen und humane mesenchymale Stromazellen (hMSC) wurden mit der Paste vermischt und geplottet; die Vitalität, Morphologie und Verteilung der Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der *in vitro*-Kultivierung getestet.

Ergebnisse & Diskussion

Es konnten Plottpasten aus Laponit, Alginat und Methylzellulose hergestellt werden; verschiedene Zusammensetzungen und Konzentrationen wurden hinsichtlich Rheologie- und Plotteigenschaften evaluiert. Eine Paste mit 3% Laponit, 3% Alginat und 3% Methylzellulose erfüllte die Anforderungen hinsichtlich einer ausreichenden Viskosität bei für das Zellenplotten geeigneten Drücken, sowie einer hohen Formgenauigkeit der gedruckten Schichten nach dem Plotten. Die rheometrischen Messungen der Pasten ergaben, dass die nachträglich autoklavierte Paste eine leicht erhöhte Viskosität aufwies. Scaffolds konnten in klinisch relevanten Dimensionen geplottet werden, die Laponitphase war über den gesamten Scaffold homogen verteilt. Die Methylzellulose löste sich in einem Zeitraum von 28 Tagen beinahe vollständig heraus, während die vernetzten Bestandteile, Alginat und Laponit, die Form des Scaffolds aufrecht erhielten. Die Stränge quollen innerhalb der ersten Tage auf ein Maximum von ca. 150% des Strangdurchmessers vor dem Vernetzen. Mechanische Untersuchungen vollständig gequollener Scaffolds zeigten ein viskoelastisches Verhalten unter Druckbelastung. Lebende Zellen waren nach dem Plotten, sowie im kompletten Beobachtungszeitraum vorhanden. Das Material zeigte eine gute Cytokompatibilität, die sich mit zunehmender Zeit erhöhte.

[1] Malda et al., *Adv Mater*, 2013, 25, 5011-5028

[2] Schütz et al., *J Tissue Eng Regen Med*, 2015, DOI: 10.1002/term.2058

[3] Dawson et al., *Adv Mater*, 2011, 23, 3304-3308

S10-05

Boron doped bioactive glass scaffolds with ALP functionalisation for bone tissue engineering: osteogenesis and angiogenesis studies

*A. Boccaccini¹, R. Detsch¹, P. Balasubramanian¹

¹Univ. of Erlangen-Nuremberg, Inst. Biomaterials, Erlangen, Deutschland

Bioactive glasses (BGs) are promising materials for bone tissue regeneration [1]. One attractive approach to enhance the biological activity of BGs is the incorporation of metallic ions (bioinorganics), which are capable of eliciting specific biological responses, in particular enhancing osteogenesis and angiogenesis [2]. In the broad family of BGs, boron-doped BGs are attracting increasing attention [3]. Recent *in vitro* and *in vivo* studies have shown that Boron containing BGs exhibit increased vascularization potential of high interest for bone tissue engineering [4]. In this study, the development of three-dimensional, highly porous boron-doped BG scaffolds using the foam replication technique [5] was investigated. The biodegradation behaviour and the mechanical properties of scaffolds with different Boron content were investigated, and robust, mechanically competent scaffolds were produced by avoiding crystallisation of the glass struts. The scaffold surfaces were functionalised with biologically active enzymes or molecules as a convenient strategy to enhance both the inorganic and biological responses of the scaffolds. Alkaline phosphatase (ALP) is a metalloenzyme involved significantly in osteogenesis and it is highly expressed in mineralized tissue cells. The presence and activity of ALP on the surface of the scaffolds was characterized by X-ray photoelectron spectroscopy and enzymatic activity tests. The ability of the boron-doped BG scaffolds, with and without ALP grafting, to stimulate the expression and secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) from ST-2 cells (mouse bone marrow stromal cells) was investigated. VEGF secretion was measured quantitatively using the VEGF ELISA Kit. *In addition, the osteogenic differentiation capability of ST-2 cells on ALP functionalized boron-doped scaffolds was investigated aiming at elucidating synergisms arising from the release of B ions and the presence of ALP.* The cell proliferation was determined using the BrdU (calorimetric) assay and cell morphology was observed using fluorescence microscopy (FM). The results confirmed the influence of the enzyme (ALP) functionalization and the ion release kinetics on directing superior cell-matrix interactions, leading to enhanced osteogenic differentiation and angiogenic potential. The suitability of the novel family of functionalized B-containing scaffolds for bone regeneration applications is discussed in comparison with similar results on standard BG scaffolds.

References

- [1] Gerhardt, L.-C., Boccaccini, A. R., Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Materials* 3 (2010) 3867-3910.
- [2] Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR, A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics, *Biomaterials* 32 (2011) 2757-2774.
- [3] Fu, Q., Rahaman, M. N., Bal, B. S., et al., Silicate, borosilicate, and borate bioactive glass scaffolds with controllable degradation rate for bone tissue engineering applications. II. *In vitro* and *in vivo* biological evaluation, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 95 (2010) 172-9.
- [4] Haro Durand, L. A., Vargas, G. E., Romero, M., Vera Mesones, R., Porto López, J. M., Boccaccini, A. R., Zago, P., Baldi, A., Gorustovich, A., Angiogenic effects of ionic dissolution products released from a boron-doped 45S5 bioactive glass, *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 1142-1148.
- [5] Chen, Q. Z., Thompson, I. D., Boccaccini, A. R., 45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 27 (2006) 2414-2425.

S10-06

Hybrid Materials Consisting of Hydroxyapatite and Bio-based Polymers Used as Scaffolds for Bone Tissue Engineering

M. Markus¹, B. Hansen¹, T. Hausen¹, F. Elsayed¹, S. Witzleben¹, E. Tobiasch¹, *M. Schulze¹

¹Hochschule Bonn-Rhein-Sieg, FB Angewandte Naturwissenschaften, Rheinbach, Deutschland

Large bone defects require fabricated bone constructs that consist of three main components: an artificial extracellular matrix scaffold, stem cells with the potential to differentiate into osteoblasts, and bioactive substances, such as osteoinductive growth factors to direct the growth and differentiation of cells toward osteogenic lineage within the scaffold. Scaffolds provide a 3-dimensional environment for cell seeding and proliferation as well as filling bone defects while affording mechanical competence during the process of bone regeneration. Today, best scaffolds are inorganic-organic composites (hybrids), mainly prepared using natural and synthetic polymers (i.e. collagen, chitosan and polycaprolactone), and inorganic hydroxylapatite (HA), tricalcium phosphate (TCP). In recent years, tissue engineers used various modifications such as addition of bioactive molecules or nanoparticles to enhance attachment and proliferation of stem cells on the scaffold. The application of so-called "smart scaffolds" enhances osteogenic differentiation of stem cells. [1] In addition, purinergic receptors, P₂X and P₂Y play a key role in osteogenic lineage commitment of human mesenchymal stem cells (MSCs). Via addition of corresponding P2X/Y receptor ligands (agonists and antagonists) the differentiation process can be triggered towards osteoblast formation. [2]

The main focus of this contribution is the presentation of correlations between scaffold structures (bulk and surface) and cell adhesion/differentiation. In addition, the controlled release of P₂ receptor ligands is investigated. The performed analyses to investigate HA scaffold materials (human, bovine, artificial) provide information on their chemical composition, 3D bulk and surface structure. Therefore, FTIR spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), small angle X-ray scattering (SAXS), scanning electron microscopy (SEM) and zeta potential measurements were used. Biocompatibility tests were performed using MTT and crystal violet test. The human MSCs were gained through isolation of jar bone chip and liposuction material harvested during surgery intervention. The stem cell character was assured according to the recommendation of the International Society for Cellular Therapy Position Statement.

The osteogenic differentiation including expression of specific surface markers was analyzed and the mineralization process was monitored by specific staining (von Kossa and Alizarin Red) of extracellular matrix components. Administration of potent and selective P2Y1 antagonist MRS2500 results in enhanced matrix mineralization confirming the functional role of P2X7 during osteogenesis.

References

- [1] M. Schulze, E. Tobiasch, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Series Ed. T. Schepers; Volume Editors C. Kaspar, R. Pörtner, F. Witte. Springer, 2011.
- [2] Leiendoer A, Schulze M, Tobiasch E, Witzleben S. *Template-mediated Biominerization for Bone Regeneration*. Current Stem Cells Res Therapy. Feb 20, 2016.

S11-02

Preventing tissue scaffold contraction using a 3D-printed Polycaprolactone Cage

*D. Visscher¹, E. J. Bos¹, M. Peeters¹, N. Kuzmin², M. L. Groot², M. Helder¹, P. van Zuijlen^{1,3}

¹VU Medical Center, Amsterdam, Niederlande

²VU University, LaserLaB , Amsterdam, Niederlande

³Red Cross Hospital, Burn Center, Beverwijk, Niederlande

Introduction

Scaffold contraction is a common but underestimated problem in the field of tissue engineering. It becomes particularly problematic when creating anatomically complex shapes such as the ear or nose. The aim of this study was to develop a contraction-free biocompatible scaffold construct for ear cartilage tissue engineering using the optimal combination of biomaterials and cells.

Methods

To address the above aim, we analyzed three different constructs: (i) a fibrin/hyaluronic acid (FB/HA) hydrogel, (ii) a FB/HA hydrogel combined with a collagen I/III scaffold, and (iii) a cage construct containing (ii) surrounded by a 3D-printed poly-e-caprolactone mold. A wide range of different cell types were tested within these constructs, including chondrocytes, perichondrocytes, adipose-derived mesenchymal stem cells, and their combinations. These cell combinations were cultured *in vitro* in the constructs for 1, 14, and 28 days and analyzed for contraction, cartilage production and mechanical strength.

Results

Macroscopic observation showed severe contraction of the cell-seeded hydrogel alone (i). This contraction could be prevented, in part, by combining the hydrogel with the collagen I/III scaffold (ii) and prevented in total using the 3D-printed cage construct (iii). (Immuno)histological analysis showed glycosaminoglycan production and collagen type II deposition while multiphoton laser scanning microscopy showed detailed collagen bundle deposition throughout the scaffold. Finally, biomechanical analysis showed an increased Young's modulus. Combined these data show the feasibility of ear cartilage engineering in the 3D-printed cage construct.

Conclusion

The above results demonstrated that the 3D-printed cage construct is an adequate model for contraction-free ear cartilage engineering using a range of cell combinations. This cage construct may be used in various anatomical shapes to rapidly produce contraction-free engineered cartilage constructs for craniofacial reconstruction.

Abb. 1

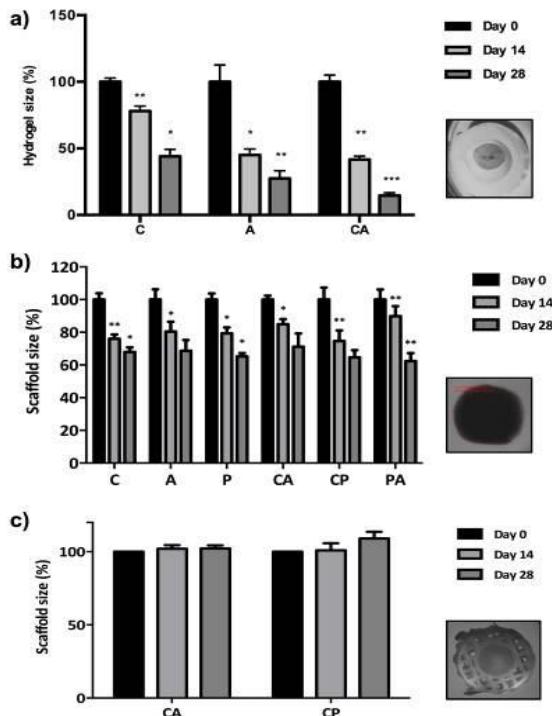


Figure 4. *In vitro* macroscopic contraction of a) the hydrogel (i), b) the scaffold (ii) and c) the internal scaffold (iii). Macroscopic pictures adjacent to graphs show morphology of hydrogel, scaffold and internal scaffold *in vitro*. C: Chondrocytes, A: Adipose stem cells, P: Perichondrocytes, CA: Chondrocytes-adipose stem cells (20:80), CP: Chondrocytes-perichondrocytes (20:80), PA: Perichondrocytes-adipose stem cells (20:80). *** p<0.0001, ** p<0.005, * p<0.05

Abb. 2

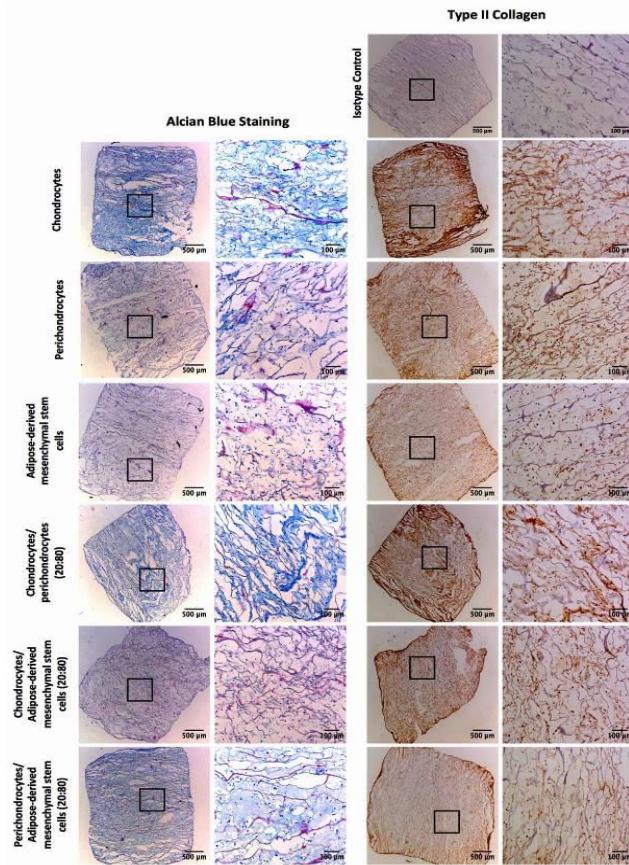


Figure 5. Alcian Blue and immunohistological staining for type II collagen of the scaffold (ii) after 28 days of *in vitro* culturing. Scaffolds were seeded with different cell types as shown in figure. Black squares show magnified areas.

S11-03

Gradient screening platforms for identifying optimum biomaterial surface parameters directing cellular behavior

*P. van Rijn¹, P. Kuehn¹, Q. Zhou¹, T. van Kooten¹

¹University Medical Center Groningen, Biomedical Engineering, Groningen, Niederlande

Introduction

Cell-surface interactions are influenced by various factors including surface chemistry, mechanics and nano-/micro-topography. [1] A lot of investigations show that these surface parameters can be used to direct cellular behavior. However, there is still little known about how combined surface parameters affect cellular behavior as there are so many different parameter combinations. [2] Screening platforms of surface parameters in a gradient fashion are being developed to elucidate which cellular behaviors are affected by specific parameters in a more high-throughput fashion [3]. However, as biomaterial surfaces always have several combinations of parameters, more complex gradient biointerfaces need to be developed in order to elucidate combined parameter effects on cell behavior without becoming a laborious endeavor.

Aim

To understand combined surface parameter effects on cellular behavior by means of complex gradient biointerface development as a platform to study the effects in a high-throughput fashion.

Methods

Gradients of wettability, topology and stiffness have been prepared using polydimethylsiloxane combined with shielded air plasma treatments. [2-4] In addition to the single parameter gradients, also double parameter gradients have been created where on a single surface both stiffness and wettability were gradually altered in a coupled fashion and compared to a wettability gradient with uniform stiffness. Gradients have been used in combination with osteoblast-like cells (SaOs) and human bone marrow mesenchymal stem cells (hBM-MSC) and cell adhesion, spreading and orientation was determined using fluorescence imaging.

Results

Topology gradients of aligned wrinkle structures with features going from 20nm amplitude and 200nm wavelength up to 280nm amplitude and 1100nm wavelength display an increase in response of seeded SaOs cells towards the aligned topology by orienting themselves accordingly. An opposite behavior was found for cell adhesion indicated by the focal adhesion area per cell which decreased with increasing features. On wettability gradients with homogenous stiffness, hBM-MSCs displayed increased cell spreading as well as increasing focal adhesion area per cell. Compared to the same wettability range but coupled to a changing stiffness, altered behavior was found where not the most hydrophilic side had the largest response but less hydrophilic and lower stiffness and overall had a larger cell spreading area and larger focal adhesion area per cell as compared to the single parameter gradient.

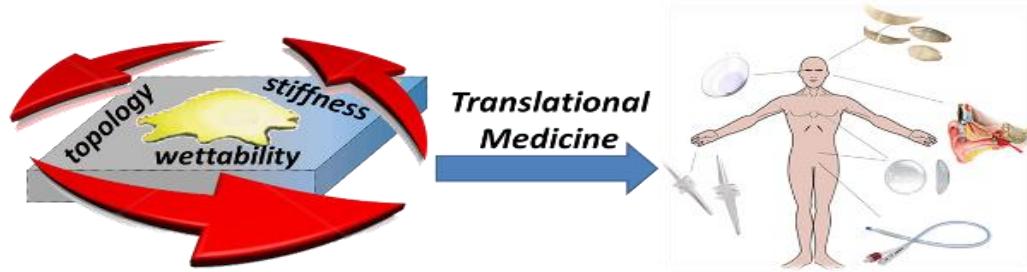
Conclusion

To elucidate cell behavior is tremendously important and as shown not only single parameters important but also combined parameters. This is something which seems logical but in order to identify this combined behavior new platform approaches need to be developed. The importance of combined influences has been shown here for the first time where wettability has been coupled to stiffness which significantly altered the cell behavior as compared to wettability alone. Future endeavors are focused on further combining physical surface parameters in a coupled fashion to efficiently screen for cellular behaviors as a result of those physical cues. This should ultimately lead to a novel approach for biomaterial design enabling increased success rate for medical treatments.

References

- 1) A. M. Schaap-Oziemlak, P. T. Kühn, T. G. van Kooten, P. van Rijn, *RSC Adv.* 2014, 4, 53307
- 2) Philipp T. Kühn, Qihui Zhou, Torben A. B. van der Boon, Aneta M. Schaap-Oziemlak, Theo G. van Kooten and Patrick van Rijn, *ChemNanoMat*, 2016, 10.1002/cnma.201600028
- 3) Q. Zhou, P. T. Kühn, T. Huisman, E. Nieboer, C. van Zwol, T. G. van Kooten, P. van Rijn, *Sci. Rep.* 2015, 5, 16240
- 4) P. T. Kühn, B.S. de Miranda, P. van Rijn, *Adv. Mater.*, 2015, 27, 7401

Abb. 1



S12-01

Polymer-Keramik-Kompositmaterialien für den Knochenersatz durch generative Fertigungsmethoden

*J. Nelsen¹, G. Dördelmann¹, M. Epple¹

¹Universität Duisburg-Essen, Anorganische Chemie, Essen, Deutschland

Fragestellung

In den letzten Jahrzehnten wurde der Bereich der Medizintechnik durch eine Vielfalt von Anwendungsmöglichkeiten erweitert, welche durch generative Fertigungsmethoden (selektives Lasersintern, Schmelzschichtung, etc.) realisiert werden können.[1] Ein mögliches Anwendungsgebiet ist das *bone tissue engineering*, welches die Generierung von porösen, knochenähnlichen 3D-Strukturen beschreibt, um ein Einwachsen von Knochengewebe in dieses zu induzieren.[2] Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Herstellung von Knochenersatzmaterialien, welche für die Konstruktion von individuellen, biodegradierbaren Implantaten herangezogen werden können.[3] Hierzu wurden für generative Fertigungsmethoden geeignete Knochenersatzmaterialien in Form von Polymer-Keramik-Mikrokompotipulvern synthetisiert. Diese basieren auf einer organischen Matrix aus verschiedenen Polyester sowie Calciumphosphat und Calciumcarbonat als anorganischem Bestandteil. Dieses Material ist biodegradierbar, osteokonduktiv und weist gute Fließeigenschaften auf und sollte somit in Bezug auf die Prozessierbarkeit für generative Fertigungsmethoden gut geeignet sein.

Methoden

Die Polymer-Keramik-Mikrokompotipulver wurden über verschiedene Emulsionstechniken hergestellt. Zum einen wurde eine Feststoff-in-Öl-in-Wasser-Lösungsmittelverdampfungsmethode, zum anderen eine Feststoff-in-Öl-in-Wasser-Lösungsmitteldiffusionsmethode angewendet. Die Analyse der Pulver erfolgte durch Rasterelektronenmikroskopie, Röntgenpulverdiffraktometrie, Thermogravimetrie, dynamische Differenzkalorimetrie und Fließfähigkeitsuntersuchungen. Des Weiteren wurden Degradationsexperimente mit heißgepressten Formkörpern durchgeführt. Zu diesen Untersuchungen gehörten beispielsweise die Proliferation von MC3T3-Zellen sowie mechanische Analysen (Dreipunktbiegung) zur Bestimmung des E-Moduls.

Ergebnisse

Die beiden verwendeten Emulsionstechniken zur Synthese der Polymer-Keramik-Mikrokompotipulver, führten zu sphärischen Mikropartikeln mit einer homogenen Verteilung der Keramiken in der Polymermatrix. Die ermittelten Größen der Mikropartikel lagen in einem Bereich, der für generative Fertigungsmethoden geeignet ist. Röntgenpulverdiffraktogramme zeigten alle zu erwartenden Reflexe der jeweils eingesetzten Komponenten. Zellexperimente ergaben, dass die Proliferation der MC3T3-Zellen auf zylinderförmigen Presslingen durch die Zugabe der Keramik zum Komposit deutlich gesteigert wurde. Ebenfalls führte die Verwendung der Mikropulver mit anorganischen Komponenten zu einer Erhöhung des E-Moduls (ermittelt über Dreipunktbiegeversuche).

Schlussfolgerung

Es wurde ein Polymer-Keramik-Mikrokompotipulver entwickelt, welches alle Anforderungen erfüllt, um als mögliches Knochenersatzmaterial in der generativen Fertigung eingesetzt werden zu können.

Danksagung

Wir danken Evonik Industries für die langjährige erfolgreiche Zusammenarbeit.

Literatur

- [1] E. Sheydaian, M. Vlasea, A. Woo, R. Pilliar, E. Hu, E. Toyserkani, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2016.
- [2] B. Stevens, Y. Yang, A. Mohandas, B. Stucker, K. T. Nguyen, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2008, 85B, 573-582.
- [3] C. Schiller, C. Rasche, M. Wehmöller, F. Beckmann, H. Eufinger, M. Epple, S. Weihe, *Biomaterials* 2004, 25, 1239-1247.

S12-02

Kardiovaskuläres Tissue Engineering: In vivo Untersuchung eines neuartigen Gefäßersatzes aus bakterieller Nanocellulose (BNC) zum Ersatz schmalkalibriger Gefäße im Schafmodell.

*M. Wacker¹, D. Klemm², M. Scherner¹, C. Weber¹, K. Eghbalzadeh¹, S. Reinhardt¹, T. Wahlers¹, K. Petzold-Welcke³, F. Kramer⁴, J. Wippermann¹

¹Uniklinik Köln, Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie, Köln, Deutschland

²Polymet Jena Association, Nanocellulose R&D, Weimar, Deutschland

³Jenpolymer Materials, Jena, Deutschland

⁴Polymet Jena Association, Jena, Deutschland

Fragestellung

Allein in den vereinigten Staaten und in Deutschland werden jedes Jahr über 450.000 schmalkalibrige Gefäßersätze durchgeführt [1]. Viele Patienten verfügen aufgrund chronischer Gefäßerkrankungen oder vorangegangener Operationen nicht über ausreichend autologes Gefäßmaterial. Trotz intensiver Arbeit führender Implantat-Hersteller und internationaler Arbeitsgruppen wurden bislang keine schmalkalibrigen Gefäßersätze mit einem Durchmesser kleiner 6 mm entwickelt, die den hohen Ansprüchen in Bezug auf Offenheitsrate und Biokompatibilität gerecht werden.

Methoden

In den letzten 6 Jahren konnten wir, basierend auf dem natürlichen Polymer bakterieller Biocellulose, reproduzierbare, zylindrische Implantate verschiedener Formen, Dimensionen und funktionsbeeinflussender Oberflächenmerkmale entwickeln und testen. Zwischen 2011 und 2015 wurde einseitig die Arteria carotis communis bei einer Gesamtzahl von 28 Schafen durch BNC-Zylinder ersetzt. Diese Zylinder hatten eine Länge von 100 mm, einen Innendurchmesser von 4.0-5.0 mm und wurden durch Acetobacter xylinum und Glukose als Kohlenstoffquelle produziert. In einer ersten Gruppe (n=10) wurden Standard BNC-Zylinder von Bambustemplates über einen Zeitraum von 3 Monaten ohne Zugabe von Thrombozytenaggregationshemmern implantiert. Eine zweite Gruppe (n=18) erhielt Zylinder, die durch Inversion oberflächenmodifiziert wurden. Die zweite Gruppe wurde unterteilt in eine Subgruppe (n=9) mit Substitution von ASS und Clopidogrel und in eine Kontrollgruppe (n=9). Die Beurteilung des funktionellen in vivo Verhaltens erfolgte mittels farbkodierter Duplexsonographie direkt postoperativ sowie 4, 12 und 18 Wochen nach Explantation. Die Explantate wurden anschließend immunhistologisch und elektronenmikroskopisch analysiert im Hinblick auf a) technische Machbarkeit, b) Neoformation einer dreischichtigen Gefäßwand und c) proinflammatorisches Potential.

Ergebnisse

In der ersten Gruppe betrug die Offenheitsrate 50%, in der zweiten Gruppe 33%. Die Subgruppenanalyse der zweiten Gruppe ergab, dass nach 3 Monaten 67 % (n=6) der Grafts in der Medikationsgruppe und 0 % (n=9) in der Kontrollgruppe offen waren. Die dopplersonographisch gemessene Blutflussgeschwindigkeit der offenen Zylinder zeigte keinen signifikanten Unterschied zur kontralateralen, nativen Seite. Somit konnte eine exzellente Funktion der offenen Zylinder gezeigt werden.

Die histologischen Untersuchungen zeigten eine beginnende Endothelialisierung in umschriebenen Bereichen auf der ganzen Länge der Interponate. Zudem zeigten sich einwandernde glatte Gefäßmuskelzellen in die Nanocellulosematrix und eine Ummantelung des Zylinders mit Adventitiagewebe im Sinne einer Vorstufe eines Umbauprozesses der Nanocellulose zu einer neuen dreischichtigen Gefäßwand. Es zeigte sich keine nennenswerte inflammatorische Reaktion des umgebenden Gewebes.

Schlussfolgerungen

Obwohl die Offenheitsrate noch nicht zufriedenstellend ist, konnten wir im Schafmodell zeigen, dass Zylinder aus bakterieller Nanocellulose ein vielversprechender Ansatz im Bereich des Tissue-Engineering sind und als stabile, kleinkalibrige Gefäßersätze das Gerüst für die Bildung einer dreischichtigen Gefäßwand bieten können. Weitere Oberflächenmodifikationen werden zukünftig notwendig sein, um eine bessere Offenheitsrate zu gewährleisten.

[1] Nerem, R. M. Tissue engineering a blood vessel substitute: the role of biomechanics. *Yonsei Med J* 41, 735-739, doi:10.3349/ymj.2000.41.6.735 (2000).

S12-03

Odontoblastäre Differenzierung und stammzellinduzierte Biominerbildung im dentalen Wurzelkanal-3D-Zellsphäroide in der regenerativen Endodontie

*J. Neunzehn¹, M.-T. Weber², S. Pötschke², C. Hannig², H.-P. Wiesmann¹

¹Technische Universität Dresden, Professur für Biomaterialien, Dresden, Deutschland

²Universitätsklinikum Carl Gustav Carus Dresden, Poliklinik für Zahnerhaltung mit Bereich Kinderzahnheilkunde, Dresden, Deutschland

Fragestellung

Eine wichtige und in der alltäglichen zahnärztlichen Praxis fest etablierte Behandlungsform der Endodontie ist die Wurzelkanalbehandlung. Diese wird in der Regel durchgeführt, wenn aufgrund irreversibler Schädigungen das entzündete oder nekrotische Pulpagewebe entfernt und durch künstliches Füllmaterial ersetzt werden muss. Neben dieser traditionellen Wurzelkanalbehandlung, der Versorgung aufbereiteter Wurzelkanäle durch Füllung mit synthetischen Materialien wie üblicherweise Guttapercha, wird von vielen internationalen Arbeitsgruppen die Revitalisierung bzw. Regeneration der Pulpa durch zellbasierte Verfahren untersucht. Im Gegensatz zu anderen Studien stand in der vorliegenden Studie nicht die Regeneration des Pulpagewebes sondern die Möglichkeit der physiologischen, zellbasierten Biominerbildung im Wurzelkanal im Vordergrund. Von entscheidendem Interesse waren in diesem Zusammenhang die Interaktion der Pulpasphäroide untereinander und vor allem die Interaktion mit dem Dentin aufbereiteter humaner Wurzelkanäle.

Methoden

Aus humanem Pulpagewebe gewonnene Zellen mit Stammzellcharakter wurden in D-MEM (low glucose, 20% FKS, HEPES, 50 µg/ml Gentamycin, 2,5 µg/ml Amphotericin B) angezüchtet und anschließend zu dreidimensionalen Zellsphäroiden kultiviert. Diese wurden auf zuvor endodontisch aufbereiteten humanen Wurzelkanalproben ausgesiedelt und die Entwicklung der Zellsphäroide sowie der aus den Sphäroiden ausgewachsenen Zellen nach unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Hierbei erfolgte sowohl eine immunhistologische (immunhistologische Nachweise von Dentinmatrix-Protein 1 und Dentinsialophosphoprotein) als auch rasterelektronenmikroskopische Untersuchung.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen zeigten ein gleichmäßiges radiäres Auswachsen der Zellen aus dem sphäroidalen Zellverbund nach der Anhaftung der Spheres auf den Dentinproben. Zusätzlich zu einem oberflächenorientierten Migrationsverhalten der Zellen konnte auch das Einwachsen der Zellen in Dentintubuli nachgewiesen werden. Neben dem Nachweis der zellinduzierten Mineralbildung einzelner Zellen und massiven Mineralisationserscheinungen in fusionierten Zellsphäroiden konnten rasterelektronenmikroskopisch auch aus den Spheres ausgewachsene Zellen mit odontoblastärem Phänotyp nachgewiesen werden. Die odontoblastäre Differenzierung der Zellen wurde zusätzlich durch immunhistochemische Nachweisreaktionen der odontoblastentypischen Markerproteine Dentinmatrix-Protein 1 und Dentinsialophosphoprotein bestätigt.

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen das Potential von Pulpazellen zur regenerativen Behandlung in der Endodontie. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass nach vorheriger Generierung von dreidimensionalen Zellsphäroiden, die Zellen ohne spezielle Zugabe von Wachstumsfaktoren oder differenzierungsfördernden Zusätzen zur Biominerproduktion neigen. Diese physiologische mineralische Füllung des Wurzelkanals stellt einen Forschungsansatz dar, der neben der Revitalisierung des Pulpagewebes durchaus als vielversprechende Alternative zur Wurzelkanalfüllung mit synthetischen Materialien zu bewerten ist.

S12-04

Modelling and additive manufacturing of scaffolds for bone tissue engineering as a precision medicine approach

*R. Brünler¹, C. Heinemann², D. Aibibu¹, T. Hanke², C. Cherif¹

¹Institut für Textilmaschinen und Textile Hochleistungswerkstofftechnik der TU Dresden, Bio- und Medizintextilien, Dresden, Deutschland

²Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien, Biomimetische Materialien und Biomaterialanalytik, Dresden, Deutschland

Introduction

Textile Technology allows manufacturing load-adapted, bionically-inspired scaffolds providing interconnected pores and large functional surfaces [1]. The flexible Net-Shape-Nonwoven process [2] is a modular short-fiber-based additive manufacturing technology that is capable of processing multiple biomaterial-fibers into patient-specific geometries. To manufacture scaffolds with pore-sizes adapted to the targeted tissue (i.e. cancellous or compact bone), the characteristics of the Net-Shape-Nonwoven process were modeled. The modeled structures are examined with a simulation tool to determine the pore-sizes and thus allow an efficient use of the used biomaterials as the approach overcomes the trial-and-error method.

The scaffolds are mineralized by a novel procedure to deposit calcium phosphates on the fiber surfaces. The functionalized surfaces along with the specifically adapted pore-sizes show an advantageous cell response (hMSC and hMc) regarding proliferation and osteoblastic differentiation.

Materials and Methods

The software GeoDict® (Math to Market GmbH, Germany) was used to model the scaffold structures and simulate the porosity and pore-sizes according to the liquid displacement porosimetry (LDM). The scaffolds were manufactured from chitosan fibers with diameters of 20 µm to 40 µm and lengths of 0.5 mm to 2 mm via NSN process. The pore-sizes were determined with a PSM 165 (Topas GmbH, Germany) that uses the LDM principle.

For mineralization, the scaffolds were embedded in a gelatine gel that was perfused with calcium- and phosphate ions depositing on the scaffold surface.

HMSC from bone marrow and hMc from buffycoat were seeded in monocultures and were cultivated in Alpha MEM for 28 days. Osteoblastic differentiation was induced from day 3 by adding ascorbate, β-glycerophosphate and dexamethasone. Osteoclastic differentiation was induced by the additives M-CSF and RANK-L.

Results and Discussion

The comparison of the modeled NSN-scaffolds and scanning electron microscopy of the real-life structures shows very good agreement between both morphologies especially regarding the characteristic joints between fibers and the open, interconnected pore-space.

The correspondence of the pore-sizes examined via simulation and validation of the different scaffolds featuring various fiber lengths and fiber diameters shows that the modeling approach is well-suited to mimic the process characteristics of the NSN technology and thus allows a precise adjustment of the scaffold morphologies to the targeted bone tissue.

Subsequent mineralization with calcium and phosphate via double-migration leads to evenly distributed hydroxyapatite particles deposited on the fiber surfaces, not affecting the pore-sizes.

Fluorescence microscopy shows a homogeneous hMSC adhesion on both, mineralized and unmodified chitosan scaffolds. The proliferation rate on the mineralized scaffolds is three times higher in comparison to the unmodified structures. The cell layer on the mineralized scaffolds is very dense and spans over several fibers while the cells on the unmodified scaffolds mainly spread along the fibers as seen on figure 1. BSP2- and osteocalcin expression along with alkaline phosphatase quantification reveals an appropriate differentiation. HMc cultivation on both types of scaffolds led to osteoclast-like, TRAP-positive cells adhering on the fiber surface.

Figure 1: Fluorescence microscopy of hMSC on (a) unmodified and (b) mineralized NSN scaffolds

References

- [1] Aibibu *et al.* Textile cell-free scaffolds for in situ tissue engineering applications. In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 27(3):63
- [2] Hild *et al.* Net Shape Nonwoven: a novel technique for porous three-dimensional nonwoven hybrid scaffolds. In: *Textile Research Journal* 84(10), pp. 1084-1094

Abb. 1

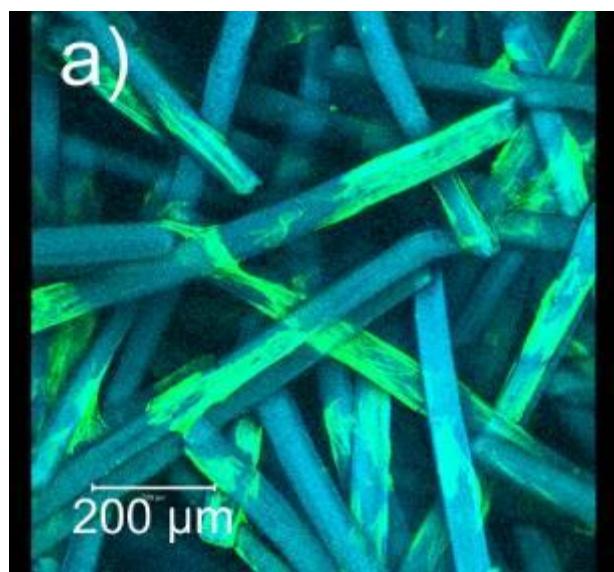
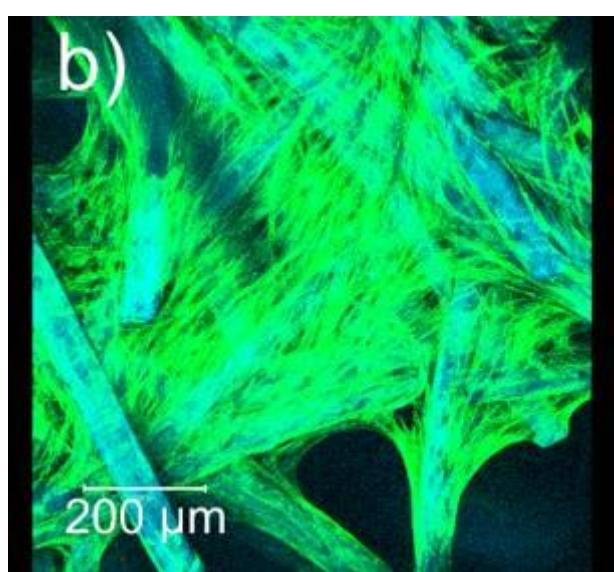


Abb. 2



S13-01

Single-chain nanoparticles: a new class of drug carriers

*A. P. P. Kröger¹, R. J. E. Boonen¹, J. M. J. Paulusse^{1,2}

¹University of Twente, Department of Biomaterials Science and Technology, Enschede, Niederlande

²University Medical Center Groningen, Department of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Groningen, Niederlande

Introduction

Due to their chemical diversity, polymeric nanoparticles have gained popularity in a multitude of medical applications, and importantly in drug delivery. Whereas large nanoparticles up to 200 nm display prolonged blood circulation times, small particles below 5 nm avoid accumulation in the body through renal excretion, thus circumventing the need for biodegradability. [1,2] Furthermore, smaller particles have shown enhanced penetration through dense tissues such as solid tumors. [3]

The blood-brain barrier (BBB) is the tightest endothelium of the body, and drug carrier systems able to cross this barrier are essential for effective drug delivery, to treat diseases such as Alzheimer's disease. In particular, gold nanoparticles display a clear size dependence for BBB passing of nanoparticles. [4,5] Whereas the smallest gold nanoparticles of 10 nm have demonstrated the highest brain uptake, size investigations of polymeric nanoparticles are still pending.

Currently employed polymeric nanoparticles are typically in the size range of 20-100 nm. [6] In order to widen the range of existing polymeric drug carrier systems to the sub-20 nm size regime, *single-chain polymer nanoparticles* (SCNPs) are investigated here. SCNPs are prepared through intramolecular crosslinking of individual polymer chains into individual nanoparticles and thus offer tremendous control over size and dispersity. Through exclusively intramolecular crosslinks, SCNPs are a magnitude smaller than conventional polymer nanoparticles, without the requirement of complex synthetic strategies.

Results and Discussion

In this work, SCNPs were prepared via intramolecular crosslinking of vinyl polymers with bifunctional crosslinkers. To gain monodisperse and size-controlled precursors, the polymers were polymerized using RAFT, whereby two kinds of monomers were implemented. The first monomer forms the backbone of the polymer and therefore, determines general physicochemical properties, such as solubility and hydrophobicity/hydrophilicity. The second monomer, which was incorporated between 10-20 mol%, provides the crosslinkable units. Polymers were added dropwise into a dilute solution of crosslinker to form SCNPs. Before isolation of the particles, remaining crosslinkable units were removed through endcapping.

Methyl and benzyl methacrylate were used as backbone monomers for standard systems in organic solvents. Size exclusion chromatography showed a size reduction of up to 90%, indicating formation of SCNPs. Moreover, a clear dependence of the particle sizes on the precursor chain length was demonstrated. AFM and STEM images illustrate the flat shape of the particles and confirm the sub-10 nm diameters, which were observed by DLS (Figure 1).

Through employing solketal methacrylate as backbone monomer, polymers were achieved that can be rendered water-soluble by hydrolysis at low pH. The resulting diglycol copolymer was successfully crosslinked with a PEG-based crosslinker, both in water as well as in DMSO. The resulting nanoparticles were imaged via AFM and a diameter of 12 nm was confirmed by DLS.

After incubation of COS-7 kidney cells with these nanoparticles, no significant toxicity was observed, even at particle concentrations of up to 100 µg/mL, making these nanomaterials highly promising for biomedical applications. Furthermore, labeling the glycol moieties with *N*-methylisatoic anhydride resulted in blue-fluorescent nanoparticles with an excitation/emission maximum of ~360/436 nm. These particles represent a preliminary model for evaluation in a BBB *in vitro* model.

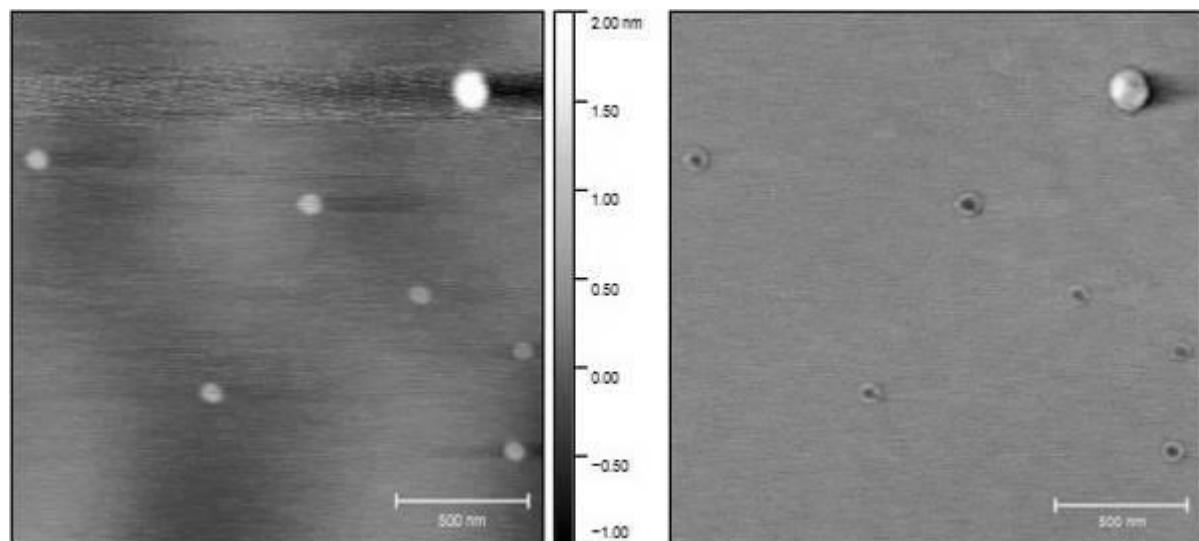
Conclusion

Owing to the ease of preparation, the majority of currently developed SCNPs are soluble only in organic media, impeding their biomedical application. By means of hydrolyzed solketal moieties, water-soluble and fluorescent SCNPs were developed. These particles are currently under investigation for BBB crossing in *in vitro* models.

Figure 1: AFM height (right) and phase (left) images of MMA SCNP.

References

- [1] Li, S.-D.; Huang, L. *Mol. Pharm.* 2008, **5**, 496.
- [2] Kukowska-Latallo, J. F.; Candido, K. A.; Cao, Z.; Nigavekar, S. S.; Majoros, I. J.; Thomas, T. P.; Balogh, L. P.; Khan, M. K.; Baker, J. R. *Cancer Res.* 2005, **65**, 5317.
- [3] Kawai, M.; Higuchi, H.; Takeda, M.; Kobayashi, Y.; Ohuchi, N. *Breast Cancer Res.* 2009, **11**, R43.
- [4] De Jong, W. H.; Hagens, W. I.; Krystek, P.; Burger, M. C.; Sips, A. J. A. M.; Geertsma, R. E. *Biomaterials* 2008, **29**, 1912.
- [5] Sonavane, G.; Tomoda, K.; Makino, K. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 2008, **66**, 274.
- [6] Kumari, A.; Yadav, S. K.; Yadav, S. C. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 2010, **75**, 1.

Abb. 1

S13-02

New high-resolution imaging techniques to assess efficacy and safety of biomaterials for bone healing in clinical patients.

*J. Arts¹

¹Maastricht University Medical Centre, orthopaedic surgery, Maastricht, Niederlande

Introduction

With the introduction of new biomaterials and tissue repair techniques for (infected) bone tissues, better imaging techniques to determine efficacy and safety are warranted for insight in longitudinal metabolic and mechanical changes and material incorporation, remodeling and resorption. At Maastricht University Medical Centre in conjunction with Eindhoven University of Technology High Resolution peripheral Quantitative Computed tomography (HR-pQCT) [1,2] and 18F-fluoride Positron Emission Tomography CT scans [3,4] is being used for this purpose in clinical translational research in clinical patients.

Aim

To determine if longitudinal changes in bone density and bone microarchitecture can be assessed with HR-PQCT and 18F-Fluoride PET-CT in clinical patients.

Methods

HR-pQCT study: HR-pQCT was used to follow the healing process of distal radius fractures and compared with the contralateral (CL) side. Eighteen postmenopausal women (64 ± 8 years) were enrolled with conservatively treated distal radius fracture and assessed with HR-pQCT scans of the fracture at 1-2, 3-4, 6-8, 12 weeks and 2 years follow-up. On the last visit is also the same area scanned at CL side and we determined bone density, bone micro-architecture and bone stiffness parameters, based on micro FEA analysis) at the fractured and contralateral side.

18F-fluoride PET-CT study: 18F-fluoride PET was used to assess bony fusion in patients after lumbar spinal interbody fusion (PLIF) in a cohort of 36 patients with PET-CT assessment of : 1) Number of bony bridges between vertebrae. 2) Endplate activity and intervertebral disc space activity. 3) Clinical well-being as measured by Oswestry disability index (ODI), VAS and EQ-5D questionnaires.

Results

HR-pQCT study: At 2-year follow-up were found to have recovered all fractures. Total and trabecular bone density showed a peak by 6-8 weeks, but were at 2 years post fracture equal to CL-side ($p = 0.486$ and $p = 0.317$). [5] Trabecular thickness remained on the fracture side 56% higher than at CL-side ($p < 0.001$). Remarkably torsional and strong increases in 6-8 weeks flexural rigidity to 2 years post-fracture, and that the 2-year post-fracture 31%, respectively ($p = 0.016$) and 29% ($p = 0.030$) were higher than CL side. Despite conservatively treated fractures are not seen after 4-5 weeks at the clinic, there are still major changes in the bone instead. These changes lead to bone stiffness up to that the fracture side at 2 years after the break is significantly higher than on CL-side.

18F-fluoride PET-CT study: 18F-fluoride activity at the vertebral endplates was significantly higher in the low fusion group with lowest ODI category ($p=0.01$). [6,7] Results for VAS and EQ-5D were similar correlated although less pronounced. PET findings in the fusion region, correlate better with symptomatic pseudarthrosis compared to the fusion status on CT. With CT the number of bony bridges as consolidation status can be assessed, while with PET you can pinpoint the ‘stress reaction’ at the vertebral endplates.

Conclusion

HR-pQCT and 18F-fluoride PET-CT scanning allows better insight in the process of bone remodeling and both methods can be used to assess safety, efficacy and also metabolic (PET) and mechanical changes and material incorporation, remodeling and resorption of biomaterials used for bone healing. Both techniques can also be used for diagnostic purposes and can predict non-union or delayed healing at early follow-up time points.

References

- 1: de Jong JJ et al. Bone. 2014 Jul;64:65-74.
- 2: Meyer U et al. J Bone Miner Res. 2014 Sep;29(9):2065-73.
- 3: Peters MJ et al. Ann Nucl Med. 2015 Nov;29(9):799-809.
- 4: Brans B e al. EJNMMI Res. 2012 Jul 30;2(1):42.
- 5: de Jong JJ et al. J Bone Miner Res. 2016 May;31(5):1114-22.
- 6: Peters MJ et al. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2015 Nov;42(12):1891-8.
- 7: Peters MJ et al. submitted.EJNMMI 2016.

S13-04

Development and application of an osteoblast/osteoclast-based co-culture model for the investigation of magnesium degradation products.

*S. Behr¹, R. Willumeit-Römer¹, B. Lüthringen¹

¹Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Geesthacht, Deutschland

Introduction

Most of the currently used implants are made of non-resorbable materials therefore they have to be explanted using an additional surgical procedure after tissue reparation or to stay permanently in the body. Alternatively biodegradable implant should be resorbed by the body when its function is fulfilled thus avoiding second surgery. Magnesium (Mg) is a metallic material of special interest and has similar mechanical and physical properties to ones of bone and its degradation rate can be tailored by adjusting (e.g.) the alloy composition. Recent in vivo works highlighted the positive effect of Mg-silver based alloys on bone remodelling [1]. Bone remodelling primarily involves the bone forming cells or osteoblasts (OB) and the bone resorbing cells or osteoclasts (OC). To unveil the mechanisms involved in the in vivo bone remodelling, we developed an OB/OC coculture model (with or without Mg degradation products - MgDP) and are investigating the major inter- and intracellular signalling pathways.

Material and Methods

The coculture was established using two human primary cell types: (I) peripheral blood mononuclear cell (PBMC; for OC) and (II) mesenchymal stem cells or human umbilical cord perivascular (HUCPV; for OB). Different conditions were tested (e.g., cells seeding densities and preliminary OB differentiation) to optimise the differentiation of OC without adding receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF); factors which are both normally necessary to trigger osteoclastogenesis. After protocol optimisation, the cocultures were exposed to MgDP. MgDP were obtained according to EN ISO standards I. 10993-5:2009 and I. 10993-12:2012 (0.2 g material/mL extraction medium). Three materials or alloys were selected: pure Mg, Mg-8Ag, and Mg-5Gd. Mg, calcium (Ca), silver (Ag), gadolinium (Gd), and phosphorous (P) contents were measured via inductively coupled plasma mass spectrometry. Concentration of the MgDP in the cell culture media was set to 10 mmol/mL to monitor not only the Mg effect (control: without Mg-degradation product) but also the one of Ag (5.84 nmol/mL) and Gd (0.73 nmol/mL). Parameters to describe the cell growth and differentiation were investigated for up to 28 days by using biochemistry assays, as well as spectrophotometric and microscopical methods, targeting cell-specific markers. Among them, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and alkaline phosphatase (ALP) were selected to monitor OC and OB, respectively. The general cell viability, cytotoxicity or metabolic activity was measured using water soluble tetrazolium (WST) test and lactate dehydrogenase (LDH) release.

Results

Coculture optimisation showed that (e.g.) the passage number of the HUCPV cells has a great influence on the OC differentiation. HUCPV on passage 10-15 has a more established osteoblastic phenotype and were therefore selected for this study.

Preliminary results show that the numbers of OC decrease in presence of all types of MgDP (especially for Ag containing one). Only in the presence of Gd, it could be observed that the OB number increase.

The enzymatic activity of ALP, an indicator for OB early mineralisation activity, was increased at day 14. In parallel, OC formation was observed, indicating an intracellular signalling.

Conclusion

Preliminary results indicate that all MgDP disturbs the osteoclast formation/differentiation and favours the osteoblast differentiation. The effects of alloying elements are increasing the complexity of the in vitro model. Ag seems to have a general inhibitory effect on both OC and OB while Gd seems to have a synergistic effect with Mg on OB formation.

Further experimental work will focus on the underlying mechanisms via genes and proteins expressions.

References

- [1] Jähn K, Saito H, Taipaleenmäki H, Gasser A, Hort N, Feyerabend F, et al. Intramedullary Mg2Ag nails augment callus formation during fracture healing in mice. *Acta Biomaterialia*.

S13-05

Bioglass incorporation into a collagen guiding structure supports and impairs endochondral bone regeneration – a dose-response analysis

*A. Petersen¹, H. Leemhuis², A. Höss³, A. Ellinghaus¹, A. Herrera¹, B. Nies³, I. Heschel², G. N. Duda¹

¹Charité - Universitätsmedizin Berlin, Julius Wolff Institut, Berlin, Deutschland

²Matricel GmbH, Herzogenrath, Deutschland

³InnoTERE GmbH, Radebeul, Deutschland

Introduction

For a long time biomaterials for bone regeneration have aimed to support direct, intramembranous ossification by the incorporation of calcium phosphates (CaPs). Lately, however, bone regeneration via a cartilage phase (endochondral ossification) is discussed as a promising strategy [1] and new materials are needed, which support the formation of cartilage as a transitory matrix. In this study we investigated how the incorporation of small amounts of bioglass microparticles influences the capability of a soft collagen-based biomaterial with channel-like orientated pores to induce endochondral ossification through the endochondral route in critical sized bone defects.

Methods

Highly orientated collagen scaffolds S_{Co} with 1.5% collagen (wt/wt) were produced by directional freezing, freeze-drying and chemical crosslinking (Fig 1a). Bioglass (BG) type 45S5 (Schott) microparticles were added to the collagen dispersion before freezing resulting in scaffolds S_{BG} with microparticles embedded within the scaffold walls (Fig 1b,c). Extracellular matrix formation inside scaffold pores (S_{Co} vs. S_{BG} with 1:1, 1:2, and 1:5 wt:wt ratios of BG and collagen) and expression of chondrogenic and osteogenic genes (qPCR) were investigated in vitro using human primary fibroblasts and mesenchymal stromal cells. Finally, in vivo bone formation in scaffolds implanted into a 5mm critical sized femoral defect in rats was quantified at 2, 4, and 6 weeks via μ -CT (bone growth) and at 6 weeks via histomorphometry (tissue types).

Results

BG microparticles were uniformly distributed inside the highly orientated collagen scaffolds. Neither the particle properties nor the pore architecture were negatively affected (Fig 1a-c). No significant influence of BG particles on cell proliferation and fibronectin matrix formation was found. However, signal intensity for fibrillar collagen detected by second harmonic generation microscopy was almost twice as high in $S_{BG}(1:5)$ compared to S_{Co} . As a consequence of the changed microenvironment, osteogenic (RUNX2, osteo-pontin, osteocalcin, ALP, collagen I) and chondrogenic (aggrecan) gene expression was upregulated in $S_{BG}(1:5)$. Surprisingly, the elevated expression of chondrogenic genes vanished with increasing particle amount in $S_{BG}(1:2)$ and $S_{BG}(1:1)$, while the upregulation of osteogenic genes was further enhanced. This indicated a shift from a pro-chondrogenic to a pro-osteogenic environment. While histology of the bone defect region revealed that endochondral ossification was progressing in S_{Co} and $S_{BG}(1:5)$ (Fig 1d,e), no cartilage was observed in $S_{BG}(1:1)$ at 6 weeks (Fig 1f). At 2 weeks $S_{BG}(1:5)$ and $S_{BG}(1:1)$ showed almost the same volume of newly formed bone, significantly higher than in S_{Co} , indicating an improved early biological activity. At 4 weeks, however, $S_{BG}(1:5)$ outperformed $S_{BG}(1:1)$ with a significantly higher volume of new bone. CONCLUSIONS: The absence of cartilage in $S_{BG}(1:1)$ at 6 weeks indicated that the induction of endochondral ossification observed in S_{Co} is impaired by higher amounts of BG microparticles. This is in agreement with increased osteogenic gene expression observed for $S_{BG}(1:2)$ and $S_{BG}(1:1)$. We interpret the positive effect of low amounts of BG microparticles $S_{BG}(1:5)$ on endochondral bone growth as the consequence of a temporal synchronization between the early support of chondrogenic differentiation (increased gene expression), collagenous ECM formation and a subsequent enhancement of mineralization of the fibrocartilage matrix. For the latter, BG-particles might act as nucleation sites for CaP. This study highlights the importance of a careful coordination of mechanical, architectural and biochemical signals for a purely material-based endochondral regeneration of large bone defects.

References

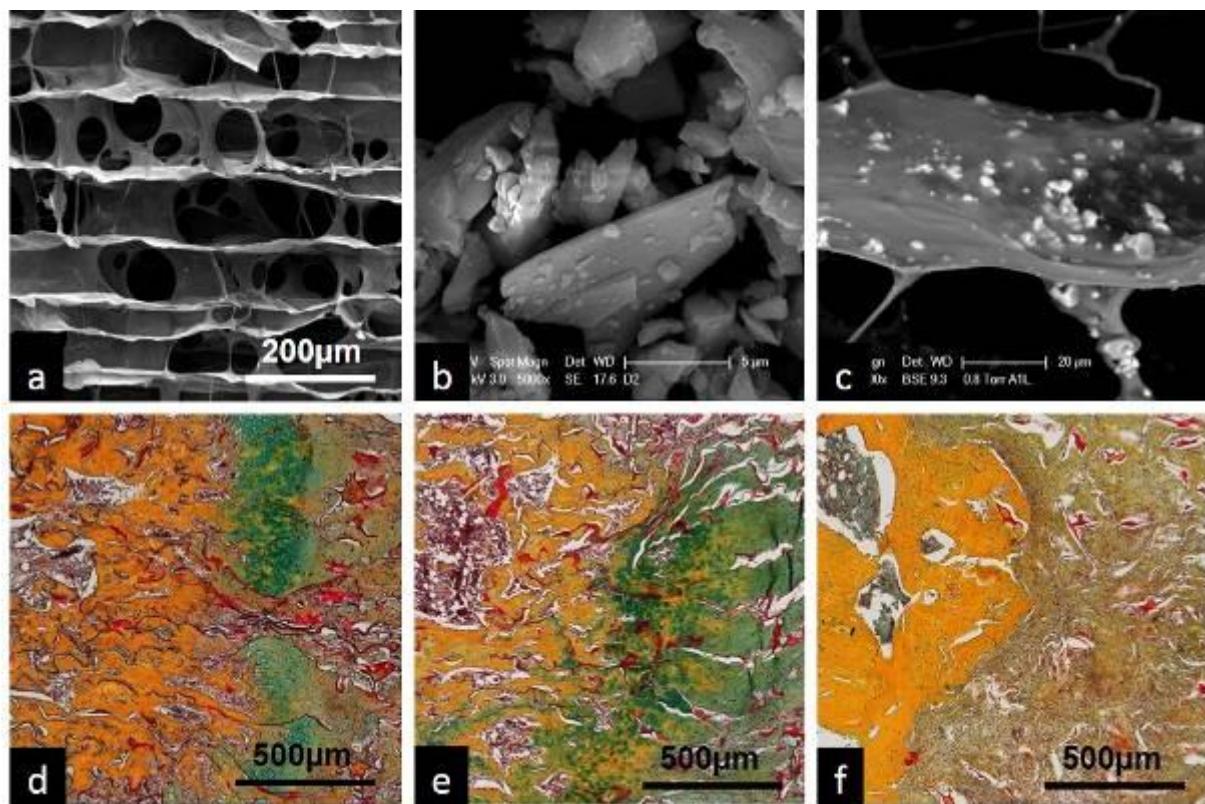
[1] Thompson et al. (2015), TERM; 9(8): 889-902.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support by the German Federal Ministry of Education and Research (grants no. 13N12154, 13N12152, and 13N12518).

Figure 1: Scanning electron microscopy images showing the collagen scaffold pore architecture (a) and BG particles before (b) and after incubation into scaffold walls (c); Endochondral ossification (cartilage in green, scaffold in red) was observed within S_{Co} (d) and $S_{BG}(1:5)$ (e) but not in $S_{BG}(1:1)$ (f) in the rat bone defect model at 6 weeks.

Abb. 1



S14-01

Entwicklung, Testung und präklinischer Einsatz des *Very-Large-Array-Retina-Stimulators (VLARS)* zur Erzeugung künstlichen Sehens für die Behandlung von degenerativen Netzhauterkrankungen

*T. K. Lohmann¹, A.-C. Schnitzler¹, C. Werner¹, G. Rößler¹, F. Waschkowski², W. Mokwa², P. Walter¹

¹Uniklinik Aachen, Augenheilkunde, Aachen, Deutschland

²RWTH Aachen, Institut für Werkstoffe der Elektrotechnik I, Aachen, Deutschland

Fragestellung

Verschiedene degenerative Netzhauterkrankungen führen im menschlichen Auge zum Verlust der Sehkraft - eine Vielzahl ist nicht kurativ zu behandeln, sodass die betroffenen Patienten unweigerlich erblinden. Einen modernen Ansatz zur Behandlung dieser Erkrankungen stellt das Erzeugen künstlichen Sehens durch elektrische Stimulation noch erhaltener retinaler Strukturen dar. In den letzten Jahren hat es hier bedeutende Fortschritte gegeben, die Wiederherstellung eines substanzialen Gesichtsfeldes hingegen ist aber bis heute nicht gelungen. Unsere Forschungsgruppe hat einen großflächigen Retinastimulator entworfen und hergestellt, welcher zum Ziel hat, ein bisher unerreichtes Sichtfeld wiederherzustellen.

Methoden

Der Stimulator hat einen Durchmesser von 12 mm, eine Fläche von ca. 110 mm² und kann bis zu 250 Stimulationselektroden tragen. Das Multielektrodenarray ist in Polyimid eingebettet, die Elektroden, sowie die Leiterbahnen bestehen aus Gold. Für eine optimale Stimulation sind die einzelnen Elektroden mit Iridiumoxid beschichtet. Um eine verlängerte Haltbarkeit und bessere Biokompatibilität zu erhalten, erfolgte eine Beschichtung des Implantates mit Parylene C. Um eine generelle Stimulationsfähigkeit des VLARS-Implantates sicherzustellen, wurden explantierte Retinae von Ratten im in-vitro Aufbau stimuliert und die Reaktion aufgenommen. Im nächsten Schritt musste die chirurgische Machbarkeit der Implantation des VLARS sichergestellt werden. Hierzu wurden zuerst Kadaveraugen des Schweins genutzt. Neben der chirurgischen Machbarkeit ist die Biokompatibilität von großer Bedeutung. Hierzu wurde zehn Kaninchen der Stimulator für je zwölf Wochen implantiert. Zu festgelegten Zeitpunkten nach jeweils einem Tag, einer beziehungsweise zwei, vier, sechs, acht und zwölf Wochen wurden die Versuchstiere mittels klinischer Diagnostik, Funduskopie, OCT (*optical coherence tomography*) sowie Sonographie untersucht. Im Anschluss wurden die Augen histologisch aufbereitet und auf Zellmigration und Vernarbung untersucht.

Ergebnisse

Die in-vitro Stimulation der explantierten Rattennetzhäute erzeugte eine neuronale Antwort der retinalen Ganglionzellen in Form von typischen *spikes*. Die Implantation im Kadaverauge des Schweins stellte sich sowohl in Zeitverbrauch als auch Handhabung des Implantates als komplex, aber machbar dar. Die semi-chronische Implantation in den zehn Kaninchen führte bei drei Tieren zu einer Netzhautablösung, bei zwei Tieren kam es zu Glaskörperblutungen, welche jedoch intraoperativ gestillt werden konnten. Die Hornhaut zeigte in den meisten Tieren eine temporäre Eintrübung, welche auf den relativ großen kornealen Einschnitt zurückzuführen war, und mit Kortisonpräparaten behandelt werden konnte. Die Fixierung der Implantate am hinteren Netzhautpol war suffizient, jedoch zeigte sich ein signifikanter Abstand des Implantates zur Netzhaut in der Peripherie. Die histologische Auswertung zeigte eine zu erwartende retinale Gliese an der Stelle der Nagelfixierung.

Schlussfolgerung

Das VLARS-Implantat zeigt sich funktionell als leistungsfähig und es ermöglicht theoretisch den Wiedergewinn eines bedeutenden Gesichtsfeldes. Die verbauten Materialien waren im Tiermodell gut verträglich. Die Flexibilität des Polymids bei gleichzeitiger Robustheit gegenüber Flüssigkeit und Gewebe sind essentiell, was durch die Beschichtung von Parylene C noch gesteigert werden konnte. Die Größe des Implantates ist sowohl ein wichtiges Alleinstellungsmerkmal, als auch eine chirurgische Hürde. Diese konnte nach Modifikation der Operation überwunden werden. Die atraumatische Befestigung des Implantates an der Netzhaut ist Bestandteil aktueller Forschung. Ergebnisse bezüglich der akuten Stimulation in Kleintieren mit kortikaler Ableitung sind in Kürze zu erwarten.

S14-02

Etablierung eines standardisierten Großtiermodells zur Evaluation von Bauchwandnetzen für die Hernienchirurgie

*R. Eickhoff¹, A. Lambertz¹, U. Klinge¹, U. P. Neumann¹, R. Tolba², C. D. Klink¹

¹Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie Uniklinik RWTH Aachen, Aachen, Deutschland

²Institut für Versuchstierkunde und experimentelle Chirurgie, RWTH Aachen, Aachen, Deutschland

Einleitung

Im Bereich der abdominellen Narbenbrüche werden ca. 50.000 Operationen im Jahr durchgeführt, wobei in ca. 15.000 Fällen das textile Implantat in sogenannter IPOM Technik (Intraperitoneal Onlay Mesh) eingebracht wird. Intraperitoneale Implantate induzieren über eine chronische inflammatorische Fremdkörperreaktion insbesondere in Bereichen von peritonealen Schäden gefährliche Verklebungen zwischen Bauchfell und Darmschlingen (Adhäsionen). Die großflächigen Netze werden vom Gewebe als Fremdkörper identifiziert und in Abhängigkeit von ihrer Konstruktion von mehr oder weniger Narbengewebe eingeschieden. Dabei fördert eine starke Bindegewebesbildung durch die nachfolgende Narbenkontraktion nicht nur eine Implantatschrumpfung und das Auftreten von Rezidivhernien, sondern auch die Entwicklung chronischer Schmerzen. Eine zuverlässige präklinische Beurteilung der Biokompatibilität und Funktionalität verlangt den Einsatz im biologischen Gewebeverband in einer mit der humanen Situation weitgehend vergleichbaren Versuchsanordnung. In bisherigen Modellen wurden Materialprüfungen meist als subkutane Implantate in kleinen Nagetieren durchgeführt; IPOM-Netze dagegen in Kaninchen oder Schweinemodelle implantiert, hier jedoch ohne chirurgisches Trauma und vielfach ohne mechanische Testung evaluiert. Um Materialien mit in einer der Humanmedizin vergleichbaren Versuchsanordnung testen zu können, wählten wir das Minipig mit seiner dem Menschen vergleichbaren Implantationsfläche und -kräften, platzierten das Mesh laparoskopisch in IPOM-Technik, setzten einen umschriebenen Peritonealschaden, überprüften die Festigkeit der Gewebeintegration durch biomechanische Testung und bestimmten das morphologische Korrelat mittels differenzierter histologischer Evaluation im Granulom und in der Pore.

Methoden

Implementierung der genannten Aspekte durch eine laparoskopische Implantation von jeweils 2 unterschiedlichen, modifizierten 15 cm x 10 cm großen Netzen (FEG Textiltechnik, Aachen) in IPOM Position analog zur Anwendung in der Humanmedizin in Göttinger Minipigs. Zuvor herausschneiden eines 2cm x 2 cm großen Peritonealstückes zur Simulation eines „Hoch-Risiko-Bereiches“ für Adhäsionen im Sinne eines chirurgischen Traumas. Spannungsfreie Fixation der Netze nach Ablassen des Pneumoperitoneums mittels 6 transfazialen Nähten (ebenfalls analog zur humanen Anwendung) in der Bauchdecke. Messung der Fixationspunkte vor und nach Einbringen des Netzes, sowie mit und ohne Pneumoperitoneum. Nach 30 Tagen erfolgt eine erneute Laparoskopie mit anschließender Explantation der Netze zur Bestimmung der Zielparameter: 1. Beurteilung von Netzlage (Dehnung, Schrumpfung, Fixation) und Adhäsionen (Diamond-Score); 2. Histologische Evaluation (Entzündungsreaktion im Granulom und Pore, sowie Narbenbildung); 3. Mechanischen Testung (Zugversuch zur Bestimmung der Adhäsionskraft von Peritoneum-Netz).

Ergebnisse

Es konnten je 2 Netze mit unterschiedlicher Flexibilität laparoskopisch erfolgreich in IPOM-Position platziert werden. Postoperativ kam es zu keiner netzassoziierten Komplikation (Migration, Ileus) im Beobachtungszeitraum. Während der finalen Laparoskopie ließen sich die Adhäsionen differenziert am Peritonealdefekt, an den Fixierungs nähten oder an der Netzfläche beschreiben. In einigen Tieren zeigte sich eine diskrete Faltenbildung, die auf eine unzureichende Vordehnung bei der Applikation mit Pneumoperitoneum hinweist. Histologisch konnte die chronisch inflammatorische Fremdkörperreaktion um die Filamente sowie die Narbenbildung in Abhängigkeit von der Porengröße zur weiteren Netzcharakterisierung hinreichend dargestellt werden. Durch biomechanische Messungen ließen sich die Dehnbarkeit der Bauchwand, die Netzschrumpfung und die Netz-Peritoneum Adhäsionskraft qualitativ und quantitativ erfassen.

Schlussfolgerung

Wir konnten ein standardisiertes Großtiermodell zur Evaluation von Netzen in IPOM-Position etablieren. Durch die Kombination aus makroskopischer (inkl. chirurgischem Trauma), histologischer und mechanischer Testung ist eine umfassende Bewertung der relevanten Einflussgrößen von modifizierten Bauchwandnetzen möglich. Dadurch kann die Eignungsfähigkeit für den humanen Einsatz zuverlässiger vorhergesehen werden. Aufgrund einer standardisierten Modellbeschreibung konnte zudem die Belastung und Anzahl der verwendeten Tiere auf ein Minimum reduziert werden.

S14-03

Analyse von humanen Explantaten für den Knochenersatz-Einwachsverhalten, Beeinflussung der zellulären Umgebung

*A. Bernstein¹, N. P. Südkamp¹, H. O. Mayr¹

¹Universitätsklinikum Freiburg, Klinik für Orthopädie und Traumatologie, Freiburg, Deutschland

Ziel

Für den Knochenersatz werden Materialien wie Metalle, Polymere und Keramiken erfolgreich eingesetzt. Aussagen über die Osteointegration und die Beeinflussung der zellulären Umgebung durch die verschiedenen Implantatmaterialien kann man aus der Analyse von humanen Explantaten gewinnen. Dazu muss eine präzise histologische Aufarbeitung des periimplantären Gewebes erfolgen. Insbesondere muss die Grenzschicht Implantat - Knochen genau analysiert werden.

Material und Methode

Für die histologische Untersuchung von Explantaten wird zum einen die Paraffinhistologie und zum anderen die Hartschliffhistologie genutzt. Abriebpartikel können identifiziert werden. Ein Vergleich verschiedener Materialien für den Knochenersatz in der Klinik ist so möglich. Weiter besteht die Möglichkeit, die histologischen Daten mit den Ursachen, die zur Explantation führten, zu korrelieren. Über einen Zeitraum von 20 Jahren wurden verschiedene Explantate analysiert und hier beispielhaft für die einzelnen Werkstoffgruppen vorgestellt.

Ergebnisse

Das In-vitro-Verhalten der Implantate wird durch eine Vielzahl von Faktoren bestimmt. Zu diesen zählen unter anderem die chemische Zusammensetzung, Oberflächenstruktur, die Kristallinität, die Phasenreinheit und das Degradationsverhalten. Abriebpartikel rufen zelluläre Reaktionen hervor.

Schlussfolgerungen

Die histologische Untersuchung von humanen Explantaten stellt eine essentielle Basisuntersuchung sowohl für die Entwicklung neuer Implantate als auch in der Versagensanalyse explantiert Implantate dar.

S14-04

Wirkung einer Fetuin-Applikation auf die aseptische Partikel-induzierte Osteolyse im murinen Kalvariamodell

*C. Polan¹, S. Rüdiger¹, H. Jablonski¹, G. Hilken², M. Jäger¹, C. Wedemeyer³, M. D. Kauther¹

¹Universitätsklinikum Essen, Orthopädie und Unfallchirurgie, Essen, Deutschland

²Universitätsklinikum Essen, Zentrales Tierlaboratorium, Essen, Deutschland

³St. Barbara-Hospital, Orthopädie und Unfallchirurgie, Gladbeck, Deutschland

Fragestellung

Fetuin-A, ein 60kDa großes Protein der Cystatin-Superfamilie [1], reichert sich unter anderem in Knochengewebe an [2,3] verhindert die ektopische Verkalkung von Weichgewebe und Organsystemen [4,5] und beeinflusst die Produktion proinflammatorischer Entzündungsmediatoren [6]. Die Partikel-induzierte Osteolyse, eine chronische inflammatorische Reaktion [7], stellt die Hauptursache für das Langzeitversagen von Endoprothesen dar [8]. In dieser tierexperimentellen Studie wurde untersucht, ob Fetuin-A die Partikel-induzierte Inflammation und Knochenresorption reduziert.

Methoden

28 männliche C57BL/6 Mäuse wurden randomisiert in 4 Gruppen eingeteilt und erhielten jeweils eine Operation im Bereich der Schädelkalotte und eine intraperitoneale Substanzapplikation. Den Gruppen 2 und 4 wurden im Bereich der Sagittalsutur 30µl kommerziell erhältlicher ultrahochmolekularer Polyethylen (UHMWPE)-Partikel implantiert, während die Gruppen 1 und 3 eine Scheinoperation ohne Partikelimplantation erhielten. Den Gruppen 1 und 2 wurde eine physiologische Kochsalzlösung (NaCl) verabreicht, während die Gruppen 3 und 4 einmalig 20mg eines bovinen Fetus erhielten. Es erfolgte eine laborchemische Analyse der Knochenstoffwechselparameter, die Bestimmung der Knochenvolumina mittels Mikro-CT (μ CT), sowie eine qualitative und quantitative histopathologische Analyse der Osteolyseregion. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA und des t-Testes für unabhängige Stichproben analysiert.

Ergebnisse

Bei Fetuinapplikation zeigten Partikel-behandelte Tiere im Zentrum der Sagittalsutur ein signifikant höheres Knochenvolumen als die Kochsalz-behandelte Kontrollgruppe ($0,54\text{mm}^3 \pm 0,01\text{mm}^3$ vs. $0,51\text{mm}^3 \pm 0,04\text{mm}^3$; pDie histomorphometrischen Analysen ergaben bei Fetuin-substituierten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen auch eine geringere Osteolysenfläche (pIn der histo-pathologischen Analyse zeigten Partikel-behandelte Tiere Osteolysen im Bereich der Sagittalsutur und ein durch Makrophagen und Polyethylenpartikel dominiertes Granulationsgewebe. Kontrolltiere hingegen wiesen kaum Osteolysen auf.

Schlussfolgerung

Die Bedeutung des Fetuin-A in Bezug auf die aseptische Osteolyse ist bisher noch weitgehend unerforscht. In dieser Studie führte die Applikation von Fetuin-A unter osteolytischen Bedingungen im Zentrum der behandelten Region zu einem geringeren Knochensubstanzverlust. Somit könnte Fetuin-A potentiell osteoprotektiv bei der Partikel-induzierten Osteolyse eingesetzt werden. Hierbei wäre neben der untersuchten antiinflammatorisch-osteoprotektiven Wirkung ein Einfluss auf die ektopische Verkalkung zu analysieren, um gegebenenfalls auch periartikuläre Ossifikationen zu behandeln.

Literatur

- [1] Gejyo *et al.* (1981) *Biochim Biophys Acta*. 1981 Nov 30;671(1):78-84.
- [2] Triffitt *et al.* (1976) *Calcif Tissue Res*. 1976 Nov 24;22(1):27-33.
- [3] Seto *et al.* (2012) *PLoS One*. 2012;7(10):e47338.
- [4] Schäfer *et al.* (2003) *J Clin Invest*. 2003 Aug;112(3):357-66.
- [5] Jahnens-Dechent *et al.* (2011) *Circ Res*. 2011 Jun 10;108(12):1494-509.
- [6] Wang *et al.* (2012) *Curr Mol Med*. 2012 Jun;12(5):625-33.
- [7] Atkins *et al.* (2011) *World J Orthop*. 2011 Oct 18;2(10):93-101.
- [8] Sundfeldt *et al.* (2006) *Acta Orthop*. 2006 Apr;77(2):177-97.

S14-05

Evaluation in Tissue Engineering hergestellter Knochentransplantate im Tiermodell zur der Kieferspaltosteoplastik

*P. Korn¹, U. Range², C. Kunert-Keil³, W. Pradel¹, G. Lauer¹

¹Technische Universität Dresden, Medizinische Fakultät “Carl Gustav Carus”, Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Dresden, Deutschland

²Technische Universität Dresden, Medizinische Fakultät “Carl Gustav Carus”, Institut für medizinische Informatik und Biometrie, Dresden, Deutschland

³Institut für medizinische Informatik und Biometrie, Poliklinik für Kieferorthopädie, Dresden, Deutschland

Die sekundäre Kieferspaltosteoplastik ist ein integraler Bestandteil der Therapie von Kindern mit Lippen-, Kiefer- und Gaumenspalten. Derzeit ist die Transplantation von autologem Knochen in den Alveolarfortsatzdefekt der klinische Standard. Dieser ist zum einen nur begrenzt verfügbar und weiterhin kann eine Entnahmemorbidität auftreten. Somit wird nach Alternativen für die autologen Transplantate gesucht. Ziel der Studie ist die Evaluation von mittels Tissue Engineering hergestellten Transplantaten im Tiermodell zur Kieferspaltosteoplastik.

In 84 adulten Lewis Ratten wurde chirurgisch im anterioren Oberkiefer ein Defekt mit einem Durchmesser von 3,3 mm geschaffen. Pro Tier konnte eines der folgenden, vorher *in vitro* hergestellten und charakterisierten, Transplantate inseriert werden: bovinen Hydroxylapatit (bHA) mit undifferenzierten mesenchymalen Stromazellen (MSC), bHA mit osteogen differenzierten MSC oder pures bHA. In der Kontrollgruppe verblieb ein Leerdefekt. Die Evaluation der Osteogenese erfolgte *ex vivo* nach 6, 9 und 12 Wochen mittels polychromer Sequenzmarkierung, Histomorphometrie (verbliebene Defektbreite, prozentuale Knochenneubildung) und radiologisch mittels digitaler Volumentomographie (verbliebenes Defektvolumen).

Die Besiedelung der Scaffolds mit MSC war ohne Einschränkungen möglich. Die polychrome Sequenzmarkierung zeigte eine homogene Defektossifikation ausgehend vom Defektrand mit im Verlauf der Heilung abnehmender Intensität. In keiner Gruppe war eine vollständige Defektossifikation feststellbar. Knochentransplantate aus bHA führten, im Vergleich zum Kontrolldefekt, nicht zu einer signifikant gesteigerten Osteogenese. Dies war unabhängig von der Zellbesiedlung, wobei die undifferenzierten MSC potenter hinsichtlich der Defektossifikation waren als die *in vitro* osteogen differenzierten Zellen.

Das experimentelle Design ist geeignet zur Evaluation von Knochentransplantaten im Spaltmodell. In dieser Studie zeigte keine Förderung der Defektossifikation durch mittels Tissue Engineering hergestellter Transplantate aus bHA. Somit bedarf es der weiteren wissenschaftlichen Analyse, um eine mögliche Alternative zum autologen Knochentransplantat zu finden.

S14-06

Ein elastisches Netz für die Hernienchirurgie - Strukturstabilität und erhaltene *Effektive Porosität* unter mechanischem Zug

*A. Lambertz¹, L. v.d. Hil², K. Kossel³, R. Eickhoff¹, U. Klinge¹, U. P. Neumann¹, C. D. Klink¹

¹Universitätsklinikum der RWTH Aachen, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Aachen, Deutschland

²Universitätsklinikum Maastricht, Klinik für Chirurgie, Maastricht, Niederlande

³RWTH Aachen, Institut für Textiltechnik, Aachen, Deutschland

Hintergrund

Die Verwendung kleinporiger Netze führt in der Hernienchirurgie nach Implantation zu einer weitgehenden, bindegewebigen Auskleidung der Poren. Die Dehnbarkeit des Netzes wird somit reduziert und klinische Probleme wie chronischer Schmerz oder Hernienrezidive werden begünstigt. Wegen der hohen anatomischen Flexibilität der Bauchdecke und der im Gegensatz dazu lediglich geringen elastischen Eigenschaften von herkömmlich verwendeten Netzen, kollabieren die Poren selbst bei initial großporigen Netzen durch den mechanischen Zug der Bauchdecke. Entsprechend wird die Biokompatibilität des Netzes reduziert. Das Ziel dieser Arbeit war somit die Entwicklung und Evaluation eines neuartigen, elastischen Netzes mit thermoplastischen Polyurethan (TPU) Filamenten und dessen Evaluation im Tiermodell. Durch Strukturstabilität und erhaltene *Effektive Porosität* unter mechanischem Zug sollte eine Optimierung der Biokompatibilität des Netzes erreicht werden.

Material und Methoden

Es wurde ein Netz aus PVDF mit elastischen TPU Filamenten entwickelt und mechanisch getestet. Im Kaninchenmodell wurden die Netze erstmals *in vivo* evaluiert und auf ihre Adhäsionsbildung untersucht. Anschließend wurden 10 Schweine laparoskopiert und mittels IPOM-Netz (20x10cm, TPU- und PVDF-Gruppe) versorgt. Nach 8 Wochen wurde die Netz-Dehnung unter Pneumoperitoneum im MRT gemessen und dargestellt. Anschließend wurden die Bauchdecken zur immunhistochemischen Untersuchung explantiert.

Ergebnisse

Im Vergleich zu herkömmlichen PVDF-Netzen zeigte das elastische TPU-Netz bei den *in vitro* Versuchen eine deutlich geringere Reduktion seiner *Effektiven Porosität*. *In vivo* heilten beide Netze gut ein. Im Kaninchenmodell deutete sich eine erhöhte Biokompatibilität des neuen Netzes an und es konnte gezeigt werden, dass sich so eine signifikante Reduktion der intestinalen Adhäsionsbildung erreichen lässt. Im Großtiermodell bewies das TPU-Netz seine Elastizität nach 8 Wochen unter Pneumoperitoneum und zeigte im MRT eine signifikant höhere Flächenzunahme als das PVDF-Netz ($33\pm7\%$ vs. $8\pm2\%$, $p=0.043$). Immunhistochemisch zeigte sich auch hier eine Verringerung der Fremdkörperreaktion.

Schlussfolgerung

Das neu entwickelte TPU-Netz zeigte *in vitro* Elastizität mit Strukturstabilität und erhaltener effektiver Porosität unter mechanischem Zug. Im Tiermodell deutete sich eine im Vergleich zu herkömmlichen PVDF-Netzen verbesserte Biokompatibilität und eine reduzierte Adhäsionsbildung an. Im MRT konnte *in vivo* ein Erhalt der elastischen Eigenschaften nach 8 Wochen dargestellt werden.

P01

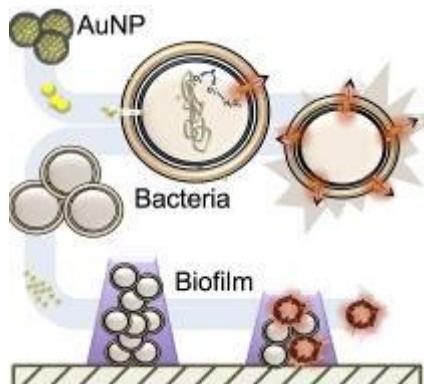
Cytotoxicity of Ultrasmall Gold Nanoparticles on Planktonic and Biofilm Encapsulated Gram-Positive Staphylococci

*W. Jahnens-Dechent¹, S. K. Boda¹

¹RWTH Aachen University, Biomedical Engineering, Biointerface Lab, Aachen, Deutschland

The emergence of multidrug resistant bacteria, especially biofilm-associated Staphylococci, urgently requires novel antimicrobial agents. The antibacterial activity of ultrasmall gold nanoparticles (AuNP) was tested against two gram positive - *S.aureus* and *S.epidermidis* and two gram negative - *E.coli* and *P.aeruginosa* strains. Ultrasmall AuNP with core diameters of 0.8 nm and 1.4 nm and a triphenylphosphine-monosulfonate (TPPMS) shell, (Au0.8MS and Au1.4MS) both have minimum inhibitory concentration(MIC) and minimum bactericidal concentration of 25 μ M [Au]. Disc agar diffusion test demonstrates greater bactericidal activity of the Au0.8MS nanoparticles over Au1.4MS. In contrast, thiol-stabilized AuNP with a diameter of 1.9 nm (AuroVist™) cause no significant toxicity in any of the bacterial strains. Ultrasmall AuNP cause a near 5 log bacterial growth reduction in the first 5 h of exposure, and incomplete recovery after 21 h. Bacteria show marked membrane blebbing and lysis in biofilm-associated bacteria treated with ultrasmall AuNP. Importantly, a 2-fold MIC dosage of Au0.8MS and Au1.4MS each cause around 80-90% reduction in the viability of *Staphylococci* enveloped in biofilms. Altogether, this study demonstrates potential therapeutic activity of ultrasmall AuNP as an effective treatment option against staphylococcal infections.

Abb. 1



P02

Elektrospinning von Chitosan mit Gruppen zur Photovernetzung

*D. de Cassan¹, H. Christ¹, H. Menzel¹

¹TU Braunschweig, Institut für Technische Chemie, Braunschweig, Deutschland

Einleitung

Elektrogesponnene Materialien können als Implantate u. a. als Ersatz für komplexe Gewebe im menschlichen Körper eingesetzt werden. Dabei bietet die Nutzung von biokompatiblen und bioabbaubaren Materialien einen vielversprechenden Ansatz, um die körpereigenen Funktionen temporär zu ersetzen und diese im Rahmen einer kontrollierten Degradation durch körpereigenes Material wieder herzustellen. Solche elektrogesponnenen Gewebe werden dabei vor allem im Rahmen des Tissue Engineering (TE) und des Knochenersatzes eingesetzt. Die Produktion von Nanofasern mittels Elektrospinnen ist dabei relativ einfach zu realisieren und produziert Materialien mit einem hohen Oberfläche/Volumen-Verhältnis und einer hohen Porosität. Chitosan (CS) bietet aufgrund seiner guten Biokompatibilität, seiner einstellbaren Biodegradabilität sowie einer relativ einfachen chemischen Modifizierung einige wichtige Vorteile, um als elektrogesponnenes Gewebe im menschlichen Körper eingesetzt werden zu können. Unmodifiziertes Chitosan wird jedoch in physiologischem Medium abhängig vom Deacetylierungsgrad vergleichsweise schnell aufgelöst bzw. abgebaut. Eine Möglichkeit diese Abbaubarkeit zu steuern, ist mithilfe von funktionellen Gruppen eine Quervernetzung zu generieren. Der Vernetzungsgrad beeinflusst dabei maßgeblich die Löslichkeit und Degradierbarkeit des Chitosans im Fasergewebe. Chitosan ist nur in leicht sauren Lösungsmitteln löslich, was eine Herausforderung für den Prozess des Elektrospinnens darstellt.

Materialien und Methoden

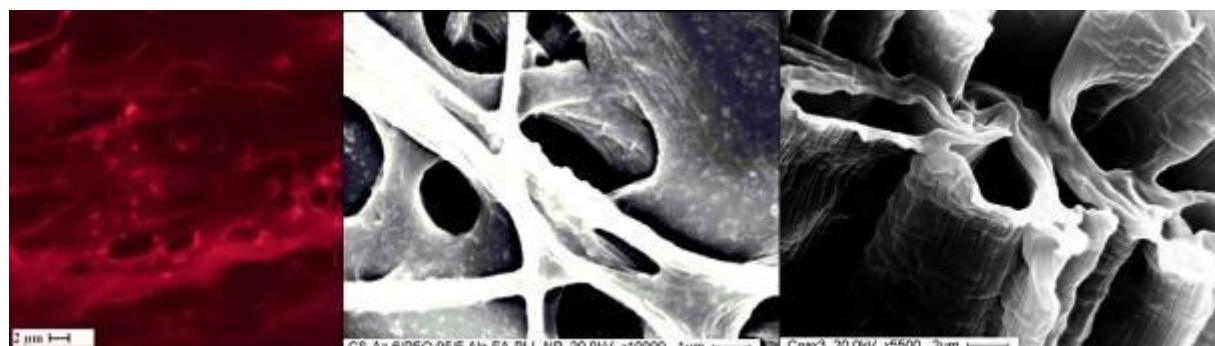
Um die elektrogesponnene Fasermatte aus Chitosan in physiologischem Medium zu stabilisieren, wurde dieses mit einer photovernetzbaren Gruppe versehen. Chitosan wurde dazu in einer Kupplungsreaktion mit DMT-MM in wässrigem Medium mit Azidobenzoesäure zu CS-Azid umgesetzt. Die Arylazidgruppe ermöglicht mittels einer C-H Insertions-Reaktion (CHIC) eine kontrollierbare Quervernetzung. CS-Azid wurde anschließend mittels Electrospinning zu Faservliesen verarbeitet. Im Rahmen der Versuche wurden die für das Elektrospinnen von funktionalisiertem Chitosan essentiellen Parameter ermittelt. Die erhaltenen Vliese wurden mittels REM hinsichtlich Ausrichtung und Struktur der Fasern untersucht. Zudem wurden an den quervernetzten Fasergeweben Stabilitätstests in physiologischem Medium durchgeführt. Die Änderungen in der Morphologie durch das Aufquellen der Fasern wurde mittels REM untersucht. Das CS-Azid wurde auch in einem Kern-Schale-Spinnprozess als Hülle auf eine Polycaprolacton (PCL)-Faser versponnen, um so die guten mechanischen Eigenschaften des PCL mit der Biokompatibilität des Chitosans zu kombinieren. Um die Machbarkeit der Anbindung eines Drug-Delivery-Systems zu zeigen, wurden die Fasermatten mit Alginat-Poly-L-Lysin-Fluoresceinamin (Alg-PLL-FA) Nanopartikeln beschichtet.

Resultate und Diskussion

Abbildung 1: Fluoreszenzsignal einer CLSM-Aufnahme einer vernetzten Probe aus CS-Azid mit Alg-FA Nanopartikeln beschichtet (links), REM-Aufnahme einer vernetzten Probe aus CS-Azid mit Alg-FA Nanopartikeln beschichtet (mitte), REM-Aufnahme einer Core(PCL)-Shell(CS-Azid) Faser (rechts)

Es konnte gezeigt werden, dass sich das CS-Azid mittels Elektrospinnen verarbeiten lässt und in den Fasermatten anschließend photovernetzt werden kann. Nach der Photovernetzung konnte beobachtet werden, dass die Faserstrukturen auch bei Benetzung mit Wasser bzw. physiologischem Medium erhalten bleiben, die Fasermatten lagern sich nicht zu einem Film um. Die Vernetzung der Fasern konnte zudem mittels IR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Es konnten auch bereits erste Core-Shell-Systeme produziert werden (siehe Abb. 1). Die Auftragung von Alg-PLL-FA Nanopartikeln als Drug-Delivery-System wurde mittels CLSM und REM beobachtet (siehe Abb. 1). Auf den Proben konnten mittels REM zunächst Unregelmäßigkeiten auf der sonst glatten Faserstruktur beobachtet werden. In hochauflösenden Aufnahmen konnten Strukturen nachgewiesen werden, die in Form und Größe den eingesetzten Nanopartikeln ähneln. In CLSM Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass diese im REM beobachteten Strukturen eine stärkere Fluoreszenz zeigen als das umgebende Fasergewebe. Die Beschichtung mit nanopartikulären Freisetzungssystemen könnte eine gute Möglichkeit bieten Wirkstoffe ortsspezifisch an das umliegende Gewebe freizusetzen.

Abb. 1



P03

Novel delivery system of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) based on nanoporous silica nanoparticles and collagen matrices for bone and tooth regeneration

*A. Satalov¹, P. Behrens¹

¹Leibniz Universität Hannover, Institut für Anorganische Chemie, 30167, Deutschland

Introduction

Bone morphogenetic protein 2 (BMP2) is a growth factor that has the potential to induce new bone formation by triggering of mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts.[1] A similar approach can be used for the regeneration of dental tissue such as enamel, dentin and periodontium. Due to the fact that BMP2 acts locally it should be delivered directly to the regeneration site via an appropriate carrier.[2] Hence, BMP2 is non-covalently immobilized on the surface of nanoporous silica nanoparticles (NPSNPs). With this simple and efficient approach it is possible to achieve a sustained release of BMP2.

Methods

First, the nanoporous silica nanoparticles were loaded with 5 µg ml⁻¹ BMP2 in PBS with 0.1% BSA by diffusional loading at 4 °C overnight. After the protein loading silica nanoparticles were subsequently combined with a collagen scaffold by immersing into the nanoparticle suspension for 24 hours. The *in vitro* release of BMP2 was carried out in PBS with 0.1% BSA in a convection oven at 37 °C. The release medium was refreshed every 24 hours. The total amount of immobilized BMP2 and the release profiles of BMP2 were determined by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

Results

About 0.8 µg of BMP2 were loaded on the surface of both types of nanoporous silica nanoparticles. All samples show a sustained release of BMP2, where amino-modified NPSNPs demonstrate a faster BMP-2 release than non-modified silica nanoparticles.

Discussion & Conclusions

Successful fabrication of nanocomposite structures between collagen and BMP2-loaded NPSNPs was achieved. Upon choosing an appropriate functional group on the surface of NPSNPs the release of BMP2 could be accelerated (amine groups) or slowed down (silanol groups). It could be shown that the release of BMP2 was sustained over 5 weeks.

References

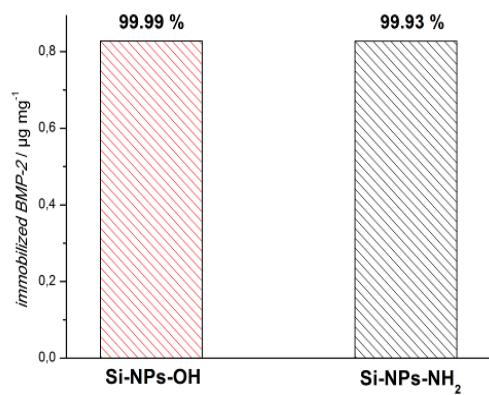
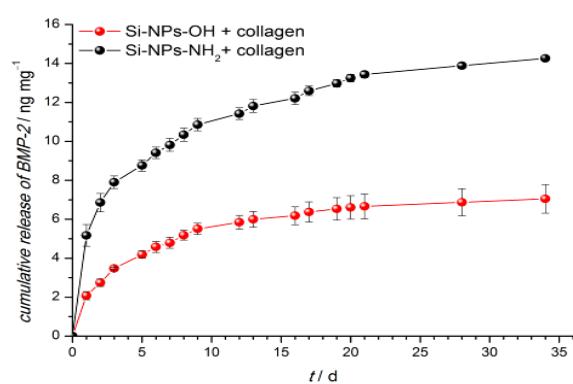
[1] A. Neumann, A. Christel, C. Kasper, P. Behrens (2013) *RSC Adv* 3:24222-30. ²R.H. Li, J.M. Wozney (2001) *Trends Biotechnol* 19:255-65.

Acknowledgements

This work is funded by NIFE (Niedersächsisches Zentrum für Biomedizintechnik, Implantatforschung und Entwicklung) within the interdisciplinary research program Biofabrication.

Figure 1: BMP2 amounts that were loaded on the surface of 1 mg of unmodified and amino-modified nanoporous silica nanoparticles.

Figure 2: Controlled BMP2 release from nanocomposites upon choosing an appropriate functional group.

Abb. 1**Abb. 2**

P04

Synthese von polymeren Nanopartikeln mit integrierten autofluoreszierenden Metallpartikeln

*D. K. Wey¹, M. Epple¹

¹Universität Duisburg-Essen, Anorganische Chemie und Center for Nanointegration Duisburg-Essen (CeNIDE), Essen, Deutschland

Nanopartikel sind in der medizinischen Anwendung als lokale Wirkstoffträgersysteme von großem Interesse. Besonders Gold- und Silber-Nanopartikel finden in der Medizin immer mehr Anwendung, beispielsweise in der Krebstherapie (Gold) und als antibakterielle Wirkstoffe (Silber). Ultrakleine bimetallische Gold-Silber-Nanopartikel zeigen aufgrund ihrer geringen Größe (bis 2,0 nm) eine Autofluoreszenz. Werden HeLa-Zellen mit diesen inkubiert, lagern sich die Nanopartikel verstärkt an der Zellmembran an und sind nach 24 h nur in geringen Mengen im Zytosol vorhanden. Um viele dieser ultrakleinen Partikel gezielt in die Zellen hinein transportieren zu können, besteht die Möglichkeit der Einkapselung in ein Polymer. Besonders eignet sich dazu PGLA, ein häufig verwendetes Trägersystem für Nanopartikel, das sich durch seine Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit auszeichnet.

Zunächst wurden nach *Ristig et al.* autofluoreszente, bimetallische Gold-Silber-Nanopartikel durch Reduktion von AgNO_3 und HAuCl_4 mit NaBH_4 synthetisiert und mit 11-Mercaptoundekansäure (11-MUA) stabilisiert.[1] Der Durchmesser der Nanopartikel betrug 1,7 bis 1,8 nm. Gold und Silber wurden im molaren Verhältnis 1:1 legiert. Die Charakterisierung der metallischen Nanopartikel erfolgte mittels Scheibenzyklone (DCS), Rasterelektronenmikroskopie (REM) und spektroskopischer Methoden: UV-Vis-Spektroskopie, Fluoreszenzspektroskopie und Atomabsorptionsspektroskopie (AAS).

Mit einer Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion ($\text{W}_1/\text{O}/\text{W}_2$) nach *Dördelmann et al.* wurden die metallischen Nanopartikel mit Poly(*D,L*-lactid-co-glycolid) (PLGA) verkapselt.[2] Für die Charakterisierung der resultierenden PGLA-Gold-Silber-Nanopartikel wurden dynamische Lichtstreuung (DLS), REM und UV-Vis-Spektroskopie durchgeführt, sowie die Verkapselungseffizienz bestimmt. Die Verkapselungseffizienz beschreibt den prozentualen Massanteil der in das Polymer eingeschlossenen, bimetallischen Nanopartikel.

Die hergestellten, aufgereinigten PGLA-Gold-Silber-Nanopartikel wurden für Zellaufnahmestudien mit HeLa-Zellen herangezogen. Die visuelle Verfolgung der Nanopartikel erfolgte mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie. Durch die Autofluoreszenz der ultrakleinen Gold-Silber-Nanopartikel ist eine Markierung der Partikel durch organische Fluorophore nicht erforderlich.

Literatur

- [1] S. Ristig, D. Kozlova, W. Meyer-Zaika, M. Epple, *Journal of Materials Chemistry B* 2014, 2, 7887-7895.
- [2] G. Dördelmann, D. Kozlova, S. Karczewski, R. Lizio, S. Knauer, M. Epple, *Journal of Materials Chemistry B* 2014, 2, 7250-7259.

P05

Mesoporöse bioaktive Gläser als Wirkstoffträger

*F. Schmidt¹, F. Zemke¹, V. Schölch¹, M. Bekheet¹, A. Gurlo¹

¹FG Keramische Werkstoffe, TU Berlin, Berlin, Deutschland

Sol-Gel abgeleitete Materialien werden schon seit einiger Zeit, neben Polymeren, als mögliche Trägermaterialien für Medikamente untersucht. Sie zeigen oft gute Biokompatibilität und bessere mechanische Eigenschaften als polymere Systeme. Besonders geeignet als Wirkstoffträger sind sol-gel-synthetisierte Gläser, da über die Synthese eine breite Spanne an Zusammensetzungen und Eigenschaften realisierbar ist. Insbesondere hohe spezifische Oberflächen, geordnete Porenstrukturen, einstellbare Porositäten und gut kontrollierbare Oberflächeneigenschaften sind von Vorteil. Bioaktive Gläser führen aufgrund ihrer Degradation und resultierenden Freisetzung von ionischen Auflösungsprodukten zu Osteogenese und Angionese in verschiedenen Geweben. Daher werden sie seit vielen Jahren besonders für Anwendungen in Knochenregeneration und -aufbau eingesetzt. Die Kombination bioaktiver Gläser mit Wirkstoffen, z.B. Antibiotika oder Wachstumsfaktoren, verspricht lokale Wirkstofffreisetzung an der Implantationsstelle, wodurch die Effizienz des Wirkstoffes deutlich gesteigert werden kann.

In diesem Projekt wurden Gläser mit einer Zusammensetzung von 57:40:3 mol% SiO₂-CaO-P₂O₅ über den Sol-Gel-Prozess hergestellt. Als Porentemplates wurden die amphiphilen Polymere P123 und F127 verwendet. Die resultierenden Pulver (s. Abb. 1) haben eine mittlere Partikelgröße von 15 µm und eine runde Morphologie. Sie besitzen eine spezifische Oberfläche von ca. 300 m²/g und Meso- und Makroporen (s. Abb. 2). Die Pulver wurden mittels REM/EDX, FT-IR, und BET charakterisiert.

Abb. 1

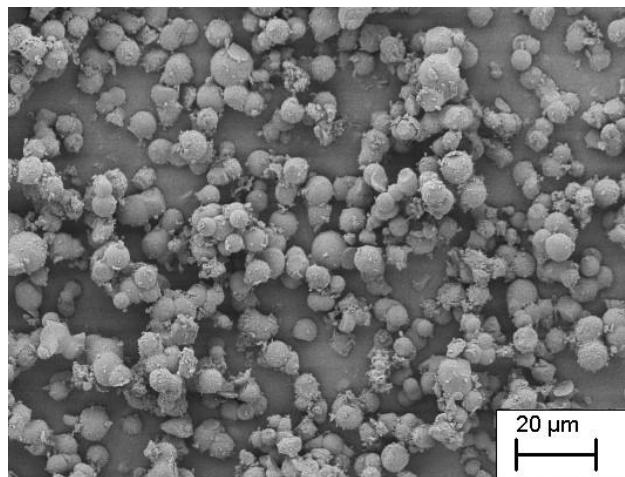
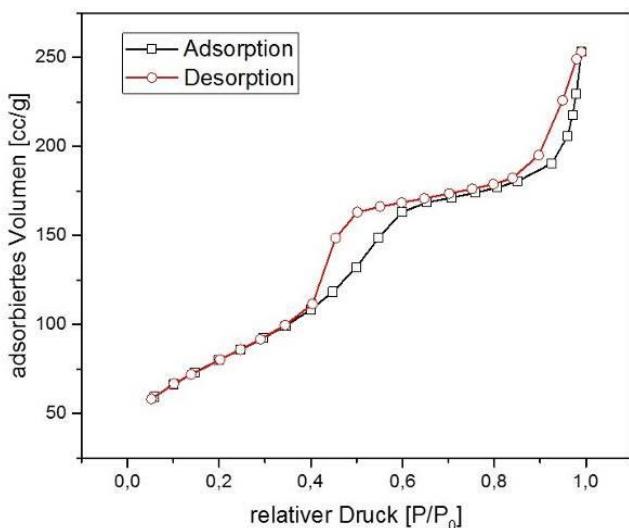


Abb. 2



P06

Antibiotic loaded electrospun non-woven mats - a promising approach to local periodontitis therapy

*R. Wyrwa¹, M. Reise², D. Schkarpetkin², A. Völpel², B. W. Sigusch², D. C. Watts³, M. Schnabelrauch¹

¹INNOVENT e. V., Biomaterialien, Jena, Deutschland

²Universitätsklinikum Jena, Poliklinik für Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie, Jena, Deutschland

³University of Manchester, School of Dentistry and Photon Science Institute, Manchester, Vereinigtes Königreich

Objectives

The adjuvant use of locally administered antibiotics plays an important role in the effective treatment of periodontitis, however an adequate, resorbable oral or maxillofacial delivery system enabling the controlled and sustained release of antibiotics is lacking [1,2]. It was the aim of this study to prepare electrospun polylactide fibers with metronidazol (MNZ) as well as a combination of ampicillin (AMP) and MNZ ("van-Winkelhoff-Cocktail") and to investigate the release characteristics of the antibiotics and its antibacterial efficiency against periodontitis-associated oral pathogens in vitro.

Methods

Poly(L-lactide-co-D,L-lactide) (70:30, PLA) non-woven mats containing different amounts of MNZ (up to 40 % w/w) were fabricated by electrospinning [3]. AMP and MNZ were integrated in amounts of 20 % w/w as a combination of two separate fibers (dual fiber mats) of electrospun PLA fiber mats by means of multijet electrospinning and in a single fiber (single fiber mats) [4]. To investigate the release of metronidazole and ampicillin, respectively from the different fleece forms, weighted pieces of the materials were incubated in PBS solution. Aliquots from each solution were taken daily during a period up to 28 days. The antibiotic release and efficacy were determined by measuring inhibition zones of drug-containing eluates in an agar diffusion test. For this study three periodontal pathogenic bacterial strains: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* and *Enterococcus faecalis* were used. In addition, UV-VIS spectroscopy and HPLC (high-performance liquid chromatography) were applied to measure the released drug quantities of MNZ and AMP. Cytotoxicity testing was performed exposing human gingival fibroblasts (hGFs) directly onto metronidazole and MNZ/AMP-loaded non-woven mats and determining viable cells by a live/dead staining and the neutral red test.

Results

The release of the drug substances varied with the antibiotic concentrations initially used in the fiber mats, but also with the distribution of the drug substances in the one or a two fiber system. The drug amount released from non-woven mats loaded with 40 % w/w MNZ resulted in a significant decrease in viability of *F. nucleatum* and *P. gingivalis* within 28 days and also for the highly resistant *A. actinomycetemcomitans* within 2 days. Even eluates from non-woven mats containing lower metronidazole concentrations (0.1 % w/w for *F. nucleatum* and 1 % w/w for *P. gingivalis*) exceeded the minimal inhibitory concentration (MIC) of these bacteria. It was found that non-woven mats with high MNZ concentrations (40 % w/w) show a linear release behaviour over time, while non-woven mats containing 0.1 - 5 % w/w exhibit a faster drug release falling below the MIC within the first 7 days. Based on the total quantity of MNZ (AMP), the dual fiber mat system released >60 % (>70 %) within a span of 5 min, and 76 % (71%) after 96 h. Eluates from MNZ/AMP-loaded non-woven mats were found to inhibit the growth of all tested bacteria strains. With released drug concentrations ($\geq 5\%$), an antibacterial effect was achieved on *A. actinomycetemcomitans* and on all other bacteria tested. All of the investigated non-woven mats did show an excellent cytocompatibility viabilities greater than 96%.

Conclusions

This study demonstrates that MNZ and MNZ/AMP containing electrospun non-woven mats represent promising resorbable drug delivery systems. Non-woven mats of high antibiotic concentrations exhibit ideal drug release properties and cytocompatibility emphasizing their clinical applicability as drug delivery systems for the local treatment of periodontal diseases.

References

- [1] B. W. Sigusch, *J. Periodontol.* 72 (2001), 275.
- [2] W. A. Soskolne, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 8 (1997), 164.
- [3] M. Reise et al., *Dent. Mater.* 28 (2011) 179.
- [4] D. Schkarpetkin et al., *Dent. Mater.* (2016) doi: 10.1016/j.dental.2016.05.002.

P07

Aligned PCL/Collagen electrospun nanofibers for skeletal muscle tissue engineering using benign solvents

*D. Dippold¹, D. W. Schubert¹, J. P. Beier², A. R. Boccaccini³

¹Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg, Lehrstuhl für Polymerwerkstoffe, Erlangen, Deutschland

²Universitätsklinikum Erlangen, Plastisch- und Handchirurgische Klinik, Erlangen, Deutschland

³Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg, Lehrstuhl für Biomaterialien, Erlangen, Deutschland

Under compromised conditions, such as severe trauma, skeletal muscles lack the ability to reorganize, and the loss of muscle functionality is inevitable. The application of tissue engineered constructs is a promising approach in regenerative therapies for damaged muscular tissue. It aims to deliver healthy and functional cells on a mechanically supporting matrix to the damaged area of the tissue. Moreover, aligned and patterned topographies can guide cell alignment and support the formation of aligned myotubes. Therefore, the development of highly aligned scaffolds based on polycaprolactone (PCL) has been studied extensively [1]. In this study, aligned polycaprolactone/collagen (PCL/Col) biocomposite nanofibers were fabricated via electrospinning using environmentally benign acetic acid as solvent. Nanofiber scaffolds containing collagen have mostly been fabricated via electrospinning using highly corrosive 1,1,1,3,3 hexafluoro-2-propanol (HFIP) so far [2,3]. Acetic acid was used only once with the PCL/Col material combination, resulting in very inhomogeneous fibers and bead formation [4]. Therefore the solubility and spinnability of different PCL/Col ratios in various types of diluted acetic acid were investigated in this study. Furthermore, ultrasonic treatment was introduced in order to enhance the intrinsically weak solubility of PCL in acetic acid. The final solutions were spun at various conditions and collected with different collector setups in order to determine ideal processing conditions for the fabrication of highly aligned nanofibers. Light microscopy and SEM were used to investigate the fiber morphology, yield and alignment. The results demonstrate that ultrasonic treatment helps to fully dissolve PCL and that it is possible to fabricate homogenous PCL/Col fibers with nanoscale diameter using benign solvents and depending on the change of process parameters. As an additional processing step various parameter fields were investigated in order to determine the most stable and suitable settings for nanofiber fabrication.

[1] Doergens, A.; Materials Letters, 2015, 140, 99.

[2] Schnell, E.; Biomaterials, 2007, 28, 3012.

[3] Ekaputra, A K.; Biomaterials, 2011, 32, 8108.

[4] Yogeshwar Chakrapani, V.; Journal of Applied Polymer Science, 2012, 125, 3221.

Bakterielle Nanocellulose als genaktivierte Matrix

*Y. Pötzinger¹, L. Rahnfeld¹, D. Kralisch¹, D. Fischer¹

¹Friedrich-Schiller-Universität Jena, Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie, Jena, Deutschland

Einleitung

Die biomedizinische Anwendung bakterieller Nanocellulose (BNC) ist aufgrund ihrer hohen Reinheit, Biokompatibilität und herausragenden mechanischen Eigenschaften gegenwärtig von großem Interesse. Sowohl die Eignung zum Gewebe- oder Knorpelersatz als auch als Implantat oder Wundaflage wird intensiv untersucht [1]. Durch die Beladung mit verschiedenen Wirkstoffen kann das Potential der BNC als Drug Delivery-System für solche Anwendungen gesteigert werden [2]. Flächige BNC sollte daher mit Nukleinsäuren beladen und ihre Eignung als GAM („genaktivierte Matrix“) untersucht werden. Dabei standen die DNA-Beladungseffektivität und das Freisetzungsvolumen, der Schutz vor Nukleasen sowie die biologische Verträglichkeit und Aktivität im Vordergrund.

Material und Methoden

Die BNC-Vliese wurden durch statische Kultivierung von *K. xylinus* in 24-Well Platten biosynthetisiert [3]. Nach Aufreinigung der BNC wurden diese mittels einer Injektions- oder Requellungsmethode mit Plasmid-DNA (pDNA; pGL3 oder pSV-β-Gal) beladen. Die pDNA wurde vorher ggf. mittels linearem Polyethylenimin (LPEI, 2,5 kDa) zu Polyplexen komplexiert [4]. Die BNC-Vliese wurden bezüglich Morphologie und physikochemischen Eigenschaften charakterisiert. Das Freisetzungsvolumen wurde in PBS pH 7,4 unter Schütteln bei Raumtemperatur ermittelt. Der Schutz vor Nukleasen wurde durch Inkubation der beladenen BNC-Vliese in DNase I-Lösung, Extraktion der pDNA und anschließender Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Außerdem wurde die Biokompatibilität durch Untersuchungen am Gefäßsystem befruchteter Hühnereier *ex ovo* bestimmt [5]. Die Transfektionseffizienz *in vitro* wurde an CHO K1-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

Durch Optimierung der Beladungsmethoden konnten Parameter identifiziert werden, welche die Steuerung der Beladung hinsichtlich Beladungszeit und Beladungseffektivität ermöglichen. Mit Hilfe der Injektions- und Requellungsbefüllung ließen sich die BNC-Vliese so mit 50 µg pDNA pro Vlies beladen. Weder die dreidimensionale Netzwerkstruktur noch die mechanischen Eigenschaften der BNC wurden dadurch nachteilig beeinflusst. Das Freisetzungsvolumen der pDNA konnte in Abhängigkeit von der Beladungsmethode gesteuert werden. Sowohl eine schnelle Freisetzung der pDNA, gekennzeichnet durch einen initialen Anstieg innerhalb der ersten 24 h, als auch eine Langzeitfreisetzung bis ca. 336 h mit einem annähernd linearen Profil konnten erreicht werden. Die beladenen BNC-Vliese waren in der Lage, die pDNA über 8 h (Injektionsmethode) bzw. 72 h (Requellungsmethode) vor dem Abbau von Nukleasen zu schützen. Nach lokaler Applikation der beladenen BNC-Vliese in einem schalenlosen Hühnereimodell konnten innerhalb von 24 h keine schädigenden Einflüsse beobachtet werden. In Transfektionsversuchen mit CHO K1-Zellen wurden je nach Beladungsmethode unterschiedliche Transfektionsraten erzielt, welche mit den Freisetzungssprofilen korrelierten.

Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich BNC-Vliese als GAM in der lokalen Gentherapie eignen. Durch die Beladung von BNC mit pDNA bzw. Polyplexen mit Hilfe verschiedener Methoden konnte die Freisetzung gezielt modifiziert und die pDNA vor Nukleasen geschützt werden. Die hervorragende Biokompatibilität der BNC-Vliese wurde durch die Beladung mit pDNA oder Polyplexen nicht beeinträchtigt und die Transfektionseffizienz konnte *in vitro* als erster proof-of-concept bestätigt werden.

Danksagung

Wir danken der JeNaCell GmbH für die Bereitstellung der *K. xylinus*-Kultur.

Referenzen

- [1] Jorff, M. and Foster, E.J., *J Appl Polym Sci*, 2015. 132(14)
- [2] Moritz, S., et al., *Int J Pharm*, 2014. 471(1-2): p. 45-55.
- [3] Kralisch, D., et al., *Biotechnol Bioeng*, 2010. 105(4): p. 740-7.
- [4] Fischer, D., et al., *Pharm Res*, 1999. 16(8): p. 1273-1279.
- [5] Müller, R., et al., *J Magn Magn Mater*, 2015. 380: p. 61-65.

P10

Kovalente Funktionalisierung von Silica-Nanopartikeln mit Antikörpern und Farbstoffen

*T. Ruks¹, M. Epple¹

¹Universität Duisburg-Essen, Anorganische Chemie und Center for Nanointegration Duisburg-Essen (CeNIDE), Essen, Deutschland

Einleitung

Durch eine Funktionalisierung der Nanopartikeloberfläche, z.B. mit Fluoreszenzfarbstoffen und spezifischen Antikörpern, können diese als spezifische Markierungssubstanz eingesetzt werden. Die Adressierung von bestimmten Gewebe (z.B. Tumorzellen) ist durch den Einsatz solcher spezifisch funktionalisierter Nanopartikel möglich.[1-3] Neben der Visualisierung von Zellen können Nanopartikel u.a. auch zur direkten Zerstörung von bestimmten Zellen eingesetzt werden.[4]

Materialien und Methoden

Ein Modellsystem für nanopartikuläre Markierungssubstanzen konnte mit kommerziell in Dispersion erhältlichen Silica-Nanopartikeln (Ludox® TMA, 22 nm) sowie pulverförmigen Silica-Nanopartikeln (Nanopowder, 10-20 nm) realisiert werden. In Verbindung mit guter Biokompatibilität und geringer Toxizität sowie durch ihre Partikelgröße eignen sich SiO₂-Nanopartikel besonders gut für biomedizinische Anwendungen.[5,6]

Die Oberfläche der SiO₂-Nanopartikel wurde zunächst mit Thiol-Gruppen (SH-Gruppen) funktionalisiert, um sie für weitere Reaktionen zu aktivieren. Als Silanisierungsreagenz wurde 3-Mercaptopropyltrimethoxsilan (MPS) verwendet. Anschließend konnten an die so aktivierte Oberfläche sowohl der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 555 C₂ Maleimid als auch der mit Fluoreszeinisothiocyanat-(FITC-) markierte Modellantikörper Immunglobulin G (IgG) kovalent gebunden werden (Abb. 1).

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Schritte zur Herstellung co-funktionalisierter SiO₂-Nanopartikel.

In Zellexperimenten an HeLa-Zellen wurden die Aufnahme der funktionalisierten SiO₂-Nanopartikel sowie die Bioverträglichkeit der Partikel gegenüber Zellen gezeigt.

Die synthetisierten SiO₂-Nanopartikel wurden mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) und analytischer Scheibenzentrifuge (DCS) sowie Rasterelektronenmikroskopie analysiert. Die Beladung der Nanopartikeloberfläche mit Antikörpern sowie einem Fluoreszenzfarbstoff wurde mittels UV-Vis-Spektroskopie und Fluoreszenzspektroskopie ermittelt. Für die Zellaufnahmestudien wurde die Fluoreszenzmikroskopie genutzt.

Ergebnisse und Diskussion

Es wurden die Reaktionsbedingungen für eine optimale Oberflächenbedeckung mit SH-Gruppen ermittelt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass nach einer Reaktionszeit von 5 h etwa 50 % der Oberfläche der Ludox-Nanopartikel mit SH-Gruppen bedeckt wurde, während die Oberfläche der Nanopowder-Partikeln bei gleicher Reaktionszeit zu ca. 60 % mit SH-Gruppen bedeckt werden konnte. Daraus ergibt sich eine Bindungskapazität von $2.5 \cdot 10^{17}$ MPS-Molekülen pro m² Partikeloberfläche. Eine weitere Erhöhung der Reaktionszeit bewirkte keinen signifikanten Anstieg in der Oberflächenbeladung. Somit scheint die Partikeloberfläche abgesättigt, sobald die Hälfte der Oberfläche mit MPS-Molekülen besetzt ist.

Bei der nachfolgenden Konjugation mit Farbstoff oder Antikörper konnte gezeigt werden, dass Nanopowder-Partikel bis zu 30 % mehr Farbstoff und Antikörper an ihre Oberfläche kovalent binden können als Ludox-Nanopartikel.

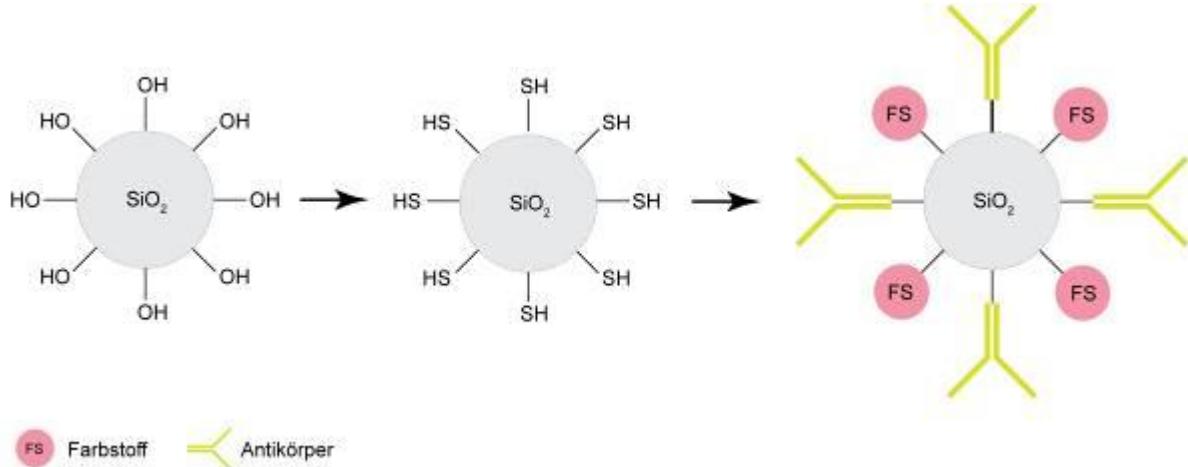
Es wurde eine schrittweise Konjugation der SH-funktionalisierten SiO₂-Nanopartikel sowohl mit Farbstoff als auch mit Antikörpern und damit die Herstellung von co-funktionalisierten SiO₂-Nanopartikeln durchgeführt. Hier wurde festgestellt, dass der Farbstoff und der Antikörper in einem Massenverhältnis von 1:1 die Partikel-Oberfläche bedecken, wenn zuerst der Farbstoff und anschließend der Antikörper an die SH-funktionalisierte Partikeloberfläche gekoppelt werden.

Das erhaltene Trägersystem aus co-funktionalisierten SiO₂-Nanopartikeln konnte durch den Zusatz von Rinderserumalbumin (BSA) als Ligand kolloidal-dispers stabilisiert werden.

In Zellexperimenten konnte die Aufnahme der kolloidal mit BSA stabilisierten co-funktionalisierten SiO₂-Nanopartikel beider Partikelarten durch HeLa-Zellen sowie die Verträglichkeit der hergestellten Nanopartikel gegenüber der Zellen nachgewiesen werden. Die Zell-Vitalität lag dabei oberhalb von 80 % für beide stabilisierten und co-funktionalisierten Partikelarten.

Literatur

- [1] Ferrari M., *Nat. Rev. Cancer*, 5, 2005, 161-171.
- [2] Veiseh O., Sun C., Fang C., Bhattacharai N., Gunn J., Kievit F., Du K., Pullar B., Lee D., Ellenbogen R.G., *Cancer Res.*, 69, 2009, 6200-6207.
- [3] Riehemann K., Schneider S.W., Luger T.A., Godin B., Ferrari M., Fuchs H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48, 2009, 872-897.
- [4] Jordan A., Maier-Hauff K., Wust P., Rau B., Johannsen M., *Onkologie*, 13, 2007, 894-902.
- [5] Tang L., Cheng J., *Nano Today*, 8, 2013, 290-312.
- [6] Bitar A., Ahmad N.M., Fessi H., Elaissari A., *Drug Discovery Today*, 17, 2012, 1147-1154.

Abb. 1

P11

Characterizing pathophysiological mechanisms underlying EPR-mediated tumor accumulation

*S. K. Golombek¹, R. Pola², M. Pechar², D. Klein³, F. Kiessling¹, T. Lammers¹

¹Experimental Molecular Imaging, RWTH Aachen University Clinic, Aachen, Deutschland

²Academy of Sciences, Institute of Macromolecular Chemistry, Prag, Tschechische Republik

³Institute for Molecular Cardiovascular Research, RWTH Aachen University Clinic, Aachen, Deutschland

Introduction

The accumulation of nanomedicine formulations at pathological sites often depends on the enhanced permeability and retention effect (EPR) [1]. EPR is known to be very heterogeneous, both in animal models and in patients, and even within a single patient and tumor, certain vessels are more leaky than others. To better understand the (patho-) physiological parameters contributing to EPR, we visualized and quantified the tumor accumulation of 10 nm-sized fluorophore-labeled polymeric drug carriers in three tumor models.

Methods

A431 epidermoid, CT26 colon and MLS ovarian carcinoma cells were subcutaneously inoculated into CD-1 nude mice (n=5 per model). When tumors reached a diameter of 7-10 mm, alexa-750 and alexa-488-labeled pHPMA-based polymers were injected intravenously, and tumor accumulation was longitudinally monitored using hybrid computed tomography / fluorescence molecular tomography (CT-FMT²) at 0.25, 4, 24 and 72 hours. Findings were validated using ex-vivo fluorescence reflectance imaging (FRI), fluorescence microscopy and a two-photon laser-scanning microscope (TPLSM).

Results

The fluorophore-labeled polymeric drug carrier gradually accumulated in tumors over time. Figure 1 shows clear difference of polymer accumulation among the tumor models. The highest overall amounts of tumor accumulation were observed in CT26 (10 % injected dose (ID) per 250 mm³ tumor), followed by MLS (8 % ID) and A431 (5 % ID). Fluorescent microscopy showed a dense vascular network in CT26 tumors, and a relatively deep penetration of the polymers out of the blood vessels into the tumor interstitium. Collagen content was assessed by second-harmonic generation TPLSM imaging, showing significantly higher levels of collagen in CT26 and in MLS than in A431 tumors. CT26 presented with an increased collagen value especially directly next to the vessels, which indicates that a certain amount of collagen might be necessary to stabilize the vessels and hinder them from collapsing and thus enhancing perfusion, extravasation and nanomedicine accumulation. A correlation between selected tumor-specific markers was performed, showing that tumor volume, cellularity, vessel maturity, angiogenesis and macrophage content play an important role in EPR-mediated tumor accumulation.

Conclusions

Different factors contribute to EPR-mediated tumor accumulation of nanocarriers. We here demonstrate that not only vascularization and collagen content play an important role, but also vessel maturity, angiogenesis, macrophage content, cellularity and the tumor volume need to be considered. In currently ongoing experiments, we are attempting to correlate tumor accumulation with antitumor efficacy. Such systematic and mechanistic studies looking at the principles of EPR and at the correlation between EPR imaging and therapeutic efficacy are considered to be important for improving the clinical translation of nanomedicines.

Acknowledgements

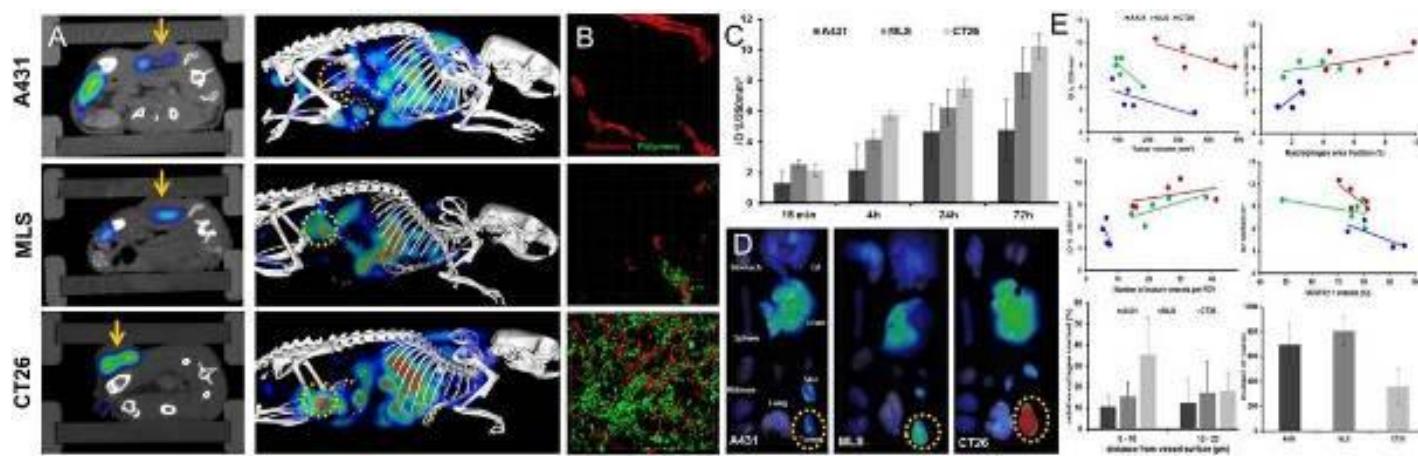
This work was financially supported by the ERC (starting grant 309495: NeoNaNo), by the EU (COST-Action TD1004) and by the DFG (La2937/1-2).

References

- [1] Yasuhiro Matsumura and Hiroshi Maeda, *Cancer Res.* 12, 1 (1986)
- [2] Sijumon Kunjachan et al., *ACS Nano* 7, 1 (2013)

Figure 1: EPR mediated tumor accumulation of pHPMA-DY750 polymers

A) 2D and 3D CT-FMT images of pHPMA-DY750 tumor accumulation in A431, MLS and CT26 (tumor indicated by yellow arrows or circle). **B)** 2-photon images showing a highly different penetration of polymers and distribution of vessels. **C)** Injected dose (%) normalized on 250 mm³ for each tumormodel (n=5) indicating different accumulations according to the tumors EPR. **D)** Ex-vivo fluorescent FMT 2D-images showing different fluorescence intensities for each tumormodel. **E)** Correlation between injected dose (%) and various tumor-specific factors.

Abb. 1

P12

Multimodal optical imaging of ultrasound mediated blood-brain barrier opening

S. K. Golombek¹, *J.-N. May¹, R. Pola², M. Pechar², L. van Bloois³, F. Kiessling¹, T. Lammers¹

¹RWTH Aachen University Clinic, Experimental Molecular Imaging Institute, Aachen, Deutschland

²Academy of Sciences, Institute of Macromolecular Chemistry, Prague, Tschechische Republik

³Utrecht University, Department of Pharmaceutics, Utrecht, Niederlande

Introduction

The drug delivery to the central nervous system (CNS) is impaired by the blood-brain barrier (BBB). Ultrasound mediated blood brain barrier disruption is an interesting strategy to overcome this obstacle and has been even already used in the clinics [1]. We here demonstrate that ultrasound in combination with poly (*n*-butyl-cyanoacrylate) (PBCA)-based microbubbles (MB) can be used to open the barrier locally and transiently [2,3]. The opening of the barrier was followed via fluorescently labeled liposomes (100 nm) or polymers (10 nm), which showed that the larger liposomes could not cross the barrier, but the polymers did. In the future, this method could be used to maximize the accumulation of various nano-carriers in the brain tissue.

Methods

Four nmol of polymers or liposomes (each marked with Alexa Fluor 488 and 750) were injected in CD-1 nude mice. These mice were divided into two groups with 3-5 animals each (1: control without ultrasound, polymers/liposomes; 2: PBCA-MB with polymers/liposomes). Alexa-750 and Alexa-488-labeled pHMPA-based polymers or liposomes were injected intravenously and the biodistribution in the brain was longitudinally monitored using hybrid computed tomography / fluorescence molecular tomography (CT-FMT). Findings were validated using ex-vivo fluorescence reflectance imaging (FRI), fluorescence microscopy and a two-photon laser-scanning microscope (TPLSM). The opening of the BBB was validated by histological analysis using fluorescence microscopy [4].

Results

CT-FMT analysis showed that liposomes have not accumulated in the brain tissue, but polymers did (figure 1C). The injected dose (ID) for liposomes decreased constantly over time while the ID of the polymers remained stable for the whole experiment, indicating that the polymers could overcome the blood brain barrier. This could also be seen in the histological analysis (figure 1D) where the liposomes (yellow) could only be found in the vessel lumen (red) whilst the polymers were also able to penetrate into the brain tissue (figure 1D white arrows). To further validate these findings, histological stainings against extravasated IgG, which naturally does not occur in brain tissue, will be performed and TPLSM images will be taken.

Conclusions

We here show that image guided BBB disruption is a feasible method to non-invasively monitor the blood brain barrier opening and to evaluate the penetration of different-sized nano-carriers into the brain tissue.

Acknowledgements

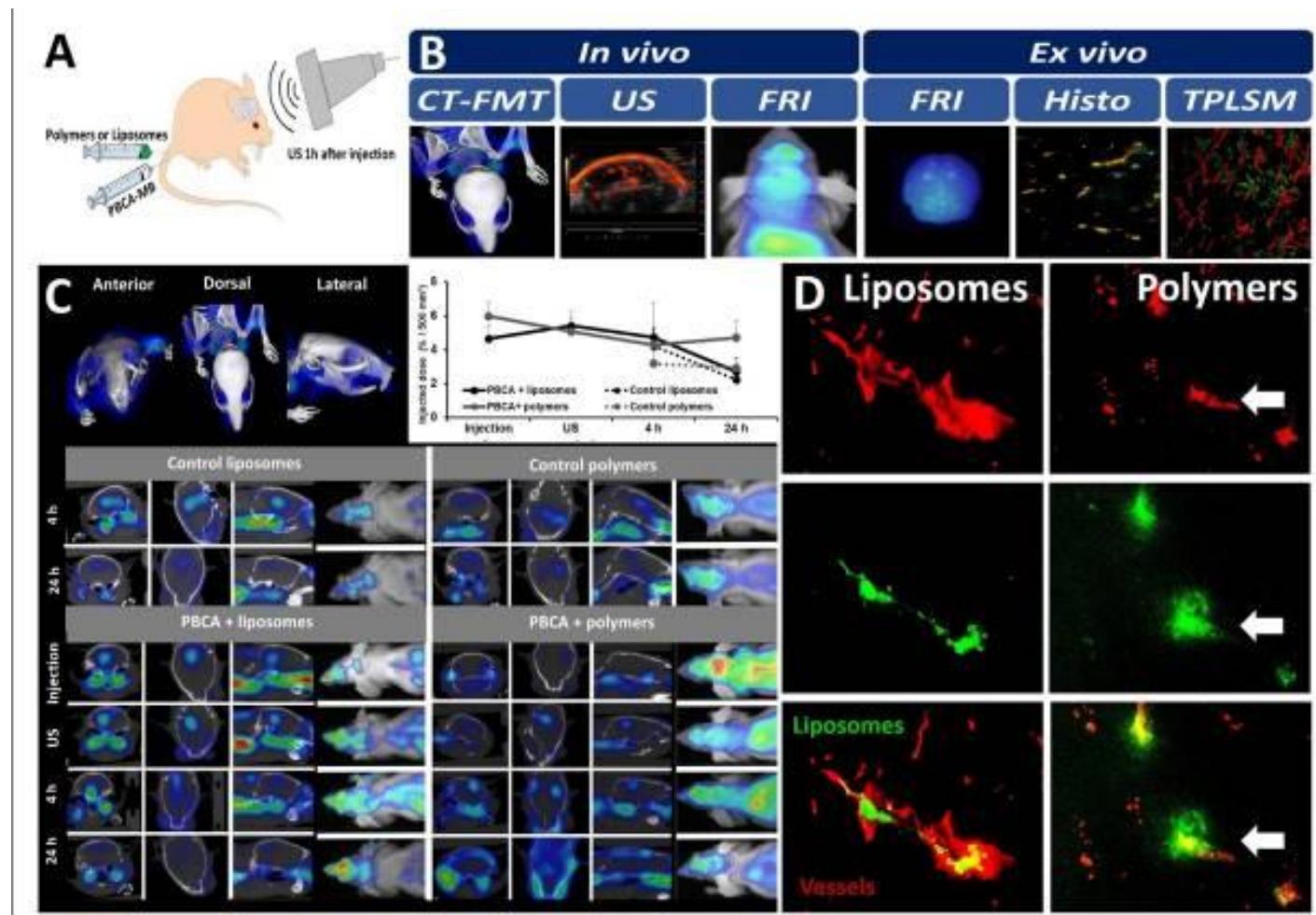
This work was financially supported by the ERC (starting grant 309495: NeoNaNo), by the EU (COST-Action TD1004) and by the DFG (La2937/1-2).

Figure 1: Distribution of polymers and liposomes after BBB disruption. Schematic overview of mice treatment (A). Overview of the used imaging techniques (B). CT-FMT of mice brains over time (C). Fluorescence microscopy images of liposome and polymer injected mice after BBB disruption showing that polymers penetrate into the brain tissue (D), white arrows.

References

- [1] <https://www.sciencedaily.com/releases/2015/11/151109085103.htm> (Blood-brain barrier opened non-invasively with focused ultrasound for the first time).
- [2] Lammers T, Koczera P, Fokong S, Gremse F, Ehling J, Vogt M, et al. Theranostic USPIO-Loaded Microbubbles for Mediating and Monitoring Blood-Brain Barrier Permeation. Advanced Functional Materials. 2015;25(1):36-43
- [3] Aryal M, Arvanitis CD, Alexander PM, McDannold N. Ultrasound-mediated blood-brain barrier disruption for targeted drug delivery in the central nervous system. Advanced drug delivery reviews. 2014;72:94-109
- [4] Cristante E, McArthur S, Mauro C, Maggioli E, Romero I, Wylezinska-Arridge M, et al. Identification of an essential endogenous regulator of blood-brain barrier integrity, and its pathological and therapeutic implications. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America. 2013;110:832-841

Abb. 1



P14

Aufreinigung funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel mittels asymmetrischer Fluss Feld-Fluss Fraktionierung

*S. Büscher^{1,2}, M. Epple^{1,2}

¹Universität Duisburg-Essen, Anorganische Chemie, Essen, Deutschland

²Center for Nanointegration Duisburg-Essen, Essen, Deutschland

Einleitung

Das Forschungsinteresse an Nanopartikeln für medizinische Anwendungen wächst stetig. Obwohl Nanomaterialien bereits in vielen alltäglichen Bereichen verwendet werden, gibt es trotz ihres hohen Potentials bisher nur begrenzte Anwendung im klinischen Bereich.

Neben metallischen Nanopartikeln wie Gold und Silber eignen sich hierfür besonders Calciumphosphat-Nanopartikel sehr gut, da sie eine hohe Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit aufweisen. Zudem besitzen sie eine hohe Affinität zu Nukleinsäuren, wodurch sie sehr leicht mit derartigen Molekülen funktionalisiert werden können.^[1] Ebenso lassen sie sich verhältnismäßig leicht mit Proteinen, Antikörpern oder anderen Molekülen beladen und stellen damit ein überaus vielseitiges Wirkstofftransportsystem dar.

Die Feld-Fluss Fraktionierung (FFF) gewinnt seit ihrer Einführung im Jahr 1966 durch John Calvin Giddings in diversen Bereichen zunehmend an Bedeutung.^[2] Die sanften Bedingungen und die hohe Selektivität ermöglichen den Einsatz der Feld-Fluss Fraktionierung in diversen Bereichen. Dazu zählen insbesondere die Aufreinigung oder Trennung von Nanopartikeln, Polymeren sowie Biopolymeren, z.B. Proteinen und Peptiden.^[3]

Die herkömmliche Vorgehensweise zur Aufreinigung funktionalisierter Nanopartikel, i.d.R. Zentrifugation, gefolgt von Redispergierung mittels Ultraschall, führt jedoch oft zur Degradation der verwendeten (Bio-) Moleküle. Aus diesem Grund wurde von uns die Feld-Fluss Fraktionierung (FFF) als Methode zur milden Aufreinigung funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel untersucht.

Methoden

Für unsere Studien haben wir die asymmetrische Fluss Feld-Fluss Fraktionierung der Firma Postnova (AF2000) mit angeschlossenem UV/Vis-Detektor und dynamischer Lichtstreuung zur Online-Charakterisierung verwendet. Des Weiteren wurde ein Fraktionssammler an die AF4 gekoppelt, um die gereinigten Partikel aufzufangen. Die eingesetzten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden über eine Fällungsreaktion und anschließende Funktionalisierung mit diversen Polymeren dargestellt. Benutzt wurden hierfür Polyethylenimin (PEI) und Carboxymethylcellulose (CMC) um stabile Partikel mit einer positiven (PEI) bzw. negativen (CMC) Oberflächenladung zu erhalten.

Ergebnisse und Schlussfolgerung

Die durchgeführten Messungen haben gezeigt, dass die asymmetrische Fluss Feld-Fluss Fraktionierung in der Lage ist, die von uns verwendeten Nanopartikel (<200 nm) zu reinigen. Um darüber hinaus ein Rückgewinnung in zufriedenstellendem Ausmaß zu erreichen ist eine akkurate Anpassung der Parameter erforderlich. Neben der Stärke von Elutions- und Querfluss spielen auch die Oberflächenladung der verwendeten Membran sowie der Partikel eine große Rolle.

Unter den richtigen Bedingungen stellt die AF4 eine vielversprechende Alternative zur herkömmlichen Aufreinigung von Nanopartikeln dar. Aufgrund der erforderlichen Parameter, die für jede Partikelsorte separat eingestellt werden müssen, erscheint es jedoch sinnvoll, die AF4 nur in Bereichen mit hoher Produktionsrate zu verwenden.

[1] Sokolova, V.; Rotan, O.; Klesing, J.; Nalbant, P.; Buer, J.; Knuschke, T.; Westendorf, A. M.; Epple, M.; *J Nanopart Res.*; 2012; 14; 910

[2] Reschiglian, P.; Zattoni, A.; Roda, B.; Michelini, E.; Roda, A.; *Trends Biotechnol.*; 2005; 23; 475

[3] Williams, S. K. R.; Runyon, J.R.; Ash Ames A. A.; *Anal. Chem.*; 2011; 83; 634

P15

Multifunctional magnetic nanoparticles as potential drug carriers for implant-directed magnetic drug targeting

*D. P. Warwas¹, J. Reifenrath², M. Kietzmann³, P. Behrens¹

¹Institut für Anorganische Chemie, Hannover, Deutschland

²Niedersächsisches Zentrum für Biomedizintechnik, Implantatforschung und Entwicklung, Hannover, Deutschland

³Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Hannover, Deutschland

Implant related infections are a major challenge for the medicines in the orthopedic surgery. Due to an insufficient agent accumulation in the peri-implant area, the selective treatment of acute inflammations is difficult. In combination with an external applied magnetic field and magnetizable implants, the utilization of magnetic nanoparticles as carriers allows an accumulation of pharmaceuticals in selective areas of the organism.[1] The aim of this study is the synthesis and characterization of multifunctional magnetic core-shell nanoparticles for the implant-directed magnetic drug targeting. These nanoparticles could be used simultaneously in diagnosis, imaging, and therapy. They consist of a magnetic core composed of magnetite (Fe_3O_4) and maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) which is encapsulated in a nanoporous silica shell. The magnetic cores are synthesized with an organometallic compound and a reducing agent in inert atmosphere.[2] An important property for these cores is the superparamagnetism which depends on the particle size and the temperature. After the removal of an external magnetic field, superparamagnetic substances retain no remnant magnetization. Thus the risk of particle aggregation is reduced. To prevent the agglomeration into large clusters the magnetic cores are modified with anionic molecules like citrate to achieve an electrostatic stabilization. The encapsulation of the magnetic cores in nanoporous silica shells is realized by a cooperative self-assembly of the cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and silica species.[3] Based on the hydrolysis and condensation of the silica precursor tetraethyl orthosilicate (TEOS) the porous silica system is formed around the cores in the solution. The surfactants are removed by calcination or an ionic exchange method with ethanolic NH_4NO_3 solution to avoid the dissolution of the magnetic nanoparticles occurring under acidic conditions. Due to the nanoporous silica system the particles exhibit a high specific surface area and a large pore volume which enables high loading levels of guest molecules for potential drug delivery applications. Beside the magnetic properties, which allow the tracking via magnetic resonance imaging techniques, the core-shell particles are also modifiable with luminophores for use in *in vitro* and *in vivo* bioimaging applications. One possibility for such a modification is the decoration of the silica system with a dye like fluorescein isothiocyanate (FITC), a widely used fluorophore.[4] This molecule is incorporated in the silica framework via a co-condensation method after a previous reaction of FITC with 3-Aminopropyl-trimethoxysilane (APTMS) to a thiourea. Another aspect of the multifunctionality lies in the decoration of the outer particle surface with polyethylene glycol chains (PEG) via covalent grafting with PEG-silane.[5] This so-called PEGylation is a versatile method to improve the general biocompatibility and biodistribution for *in vivo* applications based on an increasing hydrophilicity, a lower decomposition rate and thus a higher blood circulation time.

[1] N. Angrisani, F. Foth, M. Kietzmann, S. Schumacher, G. Angrisani, A. Christel, P. Behrens, J. Reifenrath, *J. Nanobiotechnology* 2013, **11**, 34.

[2] V. Yathindranath, L. Rebbouh, D. F. Moore, D. W. Miller, J. van Lierop, T. Hegmann, *Adv. Funct. Mater.* 2011, **21**, 1457-1464.

[3] X. Zhang, H. Niu, W. Li, Y. Shi, Y. Cai, *Chem. Commun.* 2011, **47**, 4454.

[4] Y.-S. Lin, C.-P. Tsai, H.-Y. Huang, C.-T. Kuo, Y. Hung, D.-M. Huang, Y.-C. Chen, C.-Y. Mou, *Chem. Mater.* 2005, **17**, 4570-4573.

[5] Y.-S. Lin, C. L. Haynes, *Chem. Mater.* 2009, **21**, 3979-3986.

P17

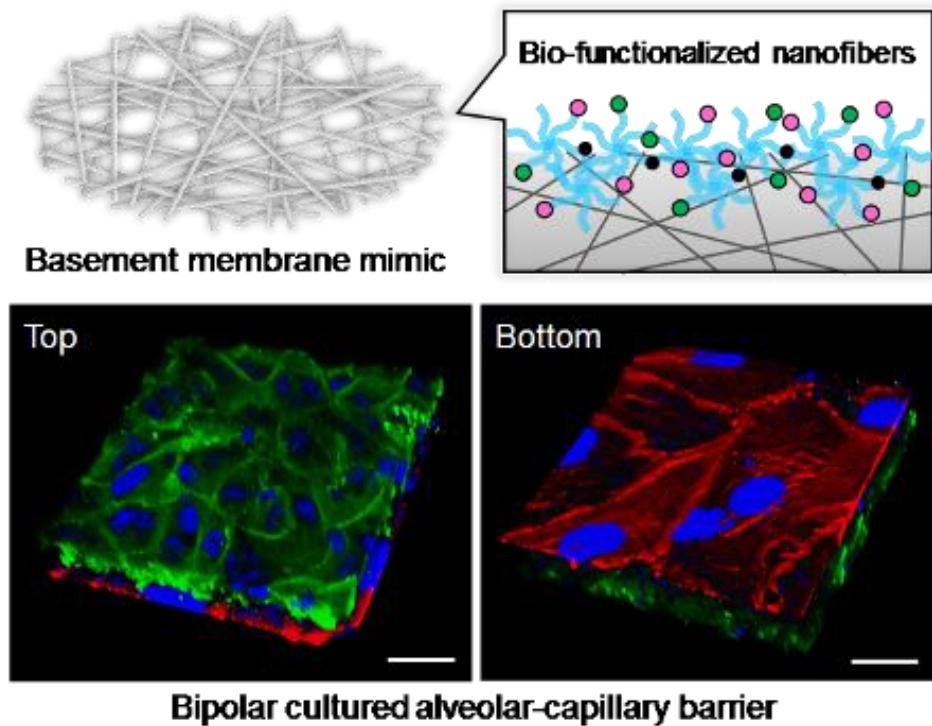
Bipolar-Cultured Human Alveolar-Capillary Barrier Model with Bioresorbable Nanofiber Mesh

*A. Nishiguchi¹, S. Singh¹, J. Lölsberg¹, M. Wessling¹, M. Möller¹

¹DWI Leibniz Institute for Interactive Materials, Aachen, Deutschland

Engineering approaches for in vitro tissue models can provide reproducible and high-throughput pharmaceutical platforms for drug discovery, diagnosis, and regenerative medicine. Among them, alveolar barrier structure is physiologically crucial as an interface between body and external environments. Modeling normal lung functions and adverse events leads to advanced drug discovery systems and safety tests. Despite of much efforts for in vitro lung barrier model, these methods have not recapitulated organ-level barrier functions so far because these membranes used as a basement membrane (BM) were not bioresorbable and have structural and biochemical differences from natural one comprising ECM ultrathin fibrous sheet with interconnected pores. Here we report an alveolar-capillary barrier model of human primary cells using BM mimics of fully-synthetic bifunctional nanofiber. One-step electrospinning process using bioresorbable polyester and multi-functional star-shaped PEG provided an ultrathin nanofiber mesh with interconnected pores (BM mimic). The nanofiber surface hydrophilized and decorated with the additives and bioactive ligands suppressed unspecific protein adsorption and enhanced ligand-specific cellular adhesion. Biofunctionalized nanofiber mesh allowed for bipolar cultivation with fundamental alveolar functionality. Nanofiber mesh revealed higher mass transport as compared to conventional porous film due to high porosity and separate culture of cell layers. Bipolar cultured models were combined to microfluidic device built by a 3D-printer, and the flow culture was performed. The mechanical stimulation can be applied to epithelial/endothelial cells by the pumping in conjugation with the compliance of the barriers. The bipolar cultured barriers would contribute to an organ-level in vitro model for pathological disease, environmental pollutants, and nanotoxicology and an extracorporeal lung oxygenator for chronic lung disease therapy.

Abb. 1



Untersuchungen zur Biokompatibilität innovativer Laser-nanostrukturierter Titanoberflächen und deren Einfluss auf die Osteoblastenaktivität

*H. Jablonski¹, C. Wedemeyer², H. Fietzek³, T. Mertens³, H. Rekasi¹, M. Jäger¹, M. D. Kauther¹

¹Universitätsklinikum Essen, Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, Essen, Deutschland

²St. Barbara-Hospital, Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, Gladbeck, Deutschland

³Airbus Defence and Space GmbH, Airbus Group Innovations, Ottobrunn, Deutschland

Fragestellung

Die Fixierung und Funktion orthopädischer Endoprothesen ist abhängig von ihrer Verankerung im nativen Knochen. Das Einwachsverhalten, die sogenannte „Osseointegration“, von Implantaten ist daher entscheidend für ihre Langzeitstabilität. Es ist bekannt, dass Oberflächenveränderungen an Biomaterialien den Prozess der Osseointegration verbessern können. Eine Vergrößerung der Oberfläche begünstigt dabei die spontane Adhäsion von knochenaufbauenden Osteoblasten sowie deren Proliferation und Mineralisierung (Breusch *et al.* 2000; Durmus & Webster 2012).

Ein innovatives laserbasiertes Verfahren aus der Luft- und Raumfahrttechnik ermöglicht die reproduzierbare und kosteneffiziente Erzeugung von Kavitäten im Nanometerbereich (5-100 nm) (Kurtovic *et al.* 2013). Solch nanostrukturierte Oberflächen könnten vielversprechende Eigenschaften für den Einsatz in der Endoprothetik besitzen (Durmus & Webster 2012). In dieser Studie wurde daher der Einfluss der neuartigen Titanoberflächen auf humane Osteoblasten analysiert.

Methoden

Primäre humane Osteoblasten (pHOB) wurden für unterschiedliche Zeiträume (3-28 Tage) auf Titan (Ti)-Scheiben (Kern: Ti6Al4V) mit unterschiedlichen Oberflächenbeschichtungen (Titan-Niob-Nitrit, TiNbN bzw. Titanplasmaspray, TPS) kultiviert. Laser-nanostrukturierte (nano) wurden mit unbehandelten Oberflächen verglichen.

Die Viabilität der Zellen wurde über einen Lactatdehydrogenase (LDH)-Assay ermittelt, während die Proliferation mit Hilfe des CyQuant Assays bestimmt wurde. Die Morphologie der Zellen wird rasterelektronenmikroskopisch beurteilt. Die Aktivität und Mineralisierung der Zellen wurde anhand der Sekretion der osteoblastenspezifischen Proteine Osteoprotegerin (OPG), Osteopontin (OPN), Osteocalcin (OCN), Pro-Collagen (Pro-COL) und knochenspezifischer alkalischer Phosphatase (BALP) mittels ELISA analysiert. Außerdem wurde die relative Genexpression der Differenzierungs- und Aktivitätsmarker *Runx2*, *Osterix*, *OPG*, *OPN*, *OCN*, *Decorin (DCN)* und *Bone Sialoprotein (BSP)* mittels quantitativer RT-PCR ermittelt.

Ergebnisse

Die Laserbehandlung führte zu gleichmäßigen Nanostrukturen sowohl auf TiNbN- als auch auf TPS-beschichteten Oberflächen. Die Ti nano Oberflächen zeigten keinen negativen Einfluss auf die Zellviabilität von pHOB, während die Proliferation jedoch zum Teil stark inhibiert wurde. Die nano Oberflächen beeinflussten die osteoblastäre Genexpression, insbesondere von *Runx2* und *Osterix*, nur in geringem Ausmaß. Die Proteinsekretion der Osteoblastenmarker OPG, OCN und Pro-COL ebenso wie die BALP-Aktivität wurden hingegen durch die nano Oberflächen gesteigert.

Schlussfolgerungen

Laser-nanostrukturierte Oberflächen wirkten nicht zytotoxisch auf pHOB. Allerdings wurde ihre Proliferation durch die hier verwendeten Laserparameter inhibiert. Dies geschah nicht uneingeschränkt zugunsten einer erhöhten Differenzierung oder Mineralisierung der Zellen. Die Expression osteoblastenspezifischer Gene wurde durch die nano Oberflächen tendenziell inhibiert. Allerdings wurde eine erhöhte Sekretion osteoblastenspezifischer Proteine gemessen. Dies entspricht der Beobachtung, dass die Nanotopographie von Oberflächen die osteogene Differenzierung steigern kann (Zhao *et al.* 2007; Webster *et al.* 2000; Boyan *et al.* 2003). Dabei führt eine Zunahme der Oberflächenrauheit zu einem erhöhten Reifungsgrad der Osteoblasten (Martin *et al.* 1995; Schwarz *et al.* 2006).

Einige Studien konnten zeigen, dass die Laserbehandlung von Implantatoberflächen deren Biokompatibilität verbessern kann (Ayobian-Markazi *et al.* 2014; Mariscal-Munoz *et al.* 2015). Allerdings kann Laserstrahlung mit hoher Energie auch Oberflächenveränderungen hervorrufen, welche die Biokompatibilität beeinträchtigen (Thomson-Neal *et al.* 1989). Der Effekt von nano Oberflächen auf die osteogene Differenzierung ist somit offenbar abhängig von den gewählten Laserparametern (Ayubianmarkazi *et al.* 2015). Möglicherweise erklärt dies auch den hier beobachteten unterschiedlichen Einfluss der nano Oberflächen auf Gen- und Proteinexpression ausgewählter Osteoblastenmarker.

P19

Physiological shear stress promotes a less inflammatory phenotype of endothelial cells by regulation of endothelial surface molecules

*A. Babendreyer¹, I. Simons¹, L. Molls¹, D. Dreymueller¹, A. Ludwig¹

¹RWTH Aachen , Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Aachen, Deutschland

Within the vasculature leukocytes and endothelial cells (EC) encounter complex mechanic forces like wall shear stress caused by blood flow. The vascular cells are well adapted to these forces and respond to alteration of the mechanical environment by altered gene expression, protein function and cell differentiation. This project investigates vascular responses in a more physiologically and clinically relevant cell culture setting by applying physiological (30 dyn/cm) and pathophysiological flow conditions.

We propose that shear stress critically regulates proteases of the disintegrin and metallo-proteinase family (ADAM) and their substrate molecules. These proteases and their substrates including the transmembrane chemokine fractalkine/CX3CL1 are involved in leukocyte recruitment and cell survival. We here investigate how shear stress can modulate ADAMs and their substrates and thereby regulate inflammation in the vasculature.

We showed that TNF-induced expression and release of endothelial fractalkine were reduced at physiological shear stress (30 dyn/cm). Moreover, inflammatory induction of fractalkine was strongly suppressed. This was correlated with reduced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells under physiological flow conditions. The decreased maturation of ADAM17 indicated that ADAM17 activity is reduced under physiological shear stress which could further reduce the generation of inflammatory mediators including fractalkine. In contrast to ADAM17, physiological shear stress upregulated ADAM15 mRNA and protein expression in endothelial cells. Stimulation with TNF suppressed flow-induced ADAM15 induction. Gene silencing and overexpression experiments indicated that ADAM15 contributes to improved cell survival under flow.

The data indicate that both ADAMs and their substrates are regulated under physiological flow conditions to reduce inflammation and promote survival of endothelial cells.

P20

Inkjet printed periodical micropatterns made of inert alumina ceramics induce contact guidance and stimulate osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells

*I. Lauria¹, K. Michael², T. Schröder¹, S. Kant³, A. Hausmann¹, F. Böke¹, R. Leube³, R. Telle², H. Fischer¹

¹Universitätsklinikum RWTH Aachen, Zahnärztliche Werkstoffkunde und Biomaterialforschung, Aachen, Deutschland

²RWTH Aachen, Institut für Gesteinshüttenkunde, Aachen, Deutschland

³Universitätsklinikum RWTH Aachen, Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie, Aachen, Deutschland

Introduction

Bioinert high performance ceramics exhibit detrimental features for implant components with direct bone contact because of their low osseointegrating capability. Numerous approaches have been employed to bioactivate alumina surfaces, e. g. by inorganic coatings, hydroxylation, and immobilization of biomolecules. However, strict regulations associated with these pharmaceutically active surfaces have prompted implant developers to explore alternative solutions yielding similar results. We hypothesized that periodical microstructures made of inert alumina ceramics can influence the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells (hMSC).

Material and Methods

In this study, we manufactured pillared arrays made of alumina ceramics with periodicities as low as 100 µm and pillar heights of 40 µm employing direct inkjet printing (DIP) technique. The response of hMSC to the microstructured surfaces was monitored by measuring cell morphology by scanning electron microscopy, viability by resazurin reduction, and formation of focal adhesion complexes visualized by focal adhesion kinase (FAK), integrin, and vinculin immunofluorescence microscopic analyses. Osteogenic differentiation of hMSC was investigated by alkaline phosphatase activity, mineralization assays and expression analysis of respective markers by qPCR, Western Blot and ELISA.

Results and Discussion

We demonstrated that hMSC react to the pillars with contact guidance. Subsequently, cells grow onto and form connections between the microstructures as shown by SEM. By focal adhesion immunostainings hMSC are proven to directly attach to the pillars. Cells build up tissue-like constructs with heights up to the micropillars resulting in increased cell viability and osteogenic differentiating properties. We conclude that periodical alumina micropatterns on the micrometer scale can mediate focal adhesion dependent cell adhesion and stimulate osteogenic differentiation of hMSC, which is a remarkable observation as it occurred on a bioinert oxide ceramic surface.

P21

2D/3D-Koregistrierung von Histologie und microCT zur Bewertung der Osseointegration von Implantaten

*D. Linde¹, J. Helemann¹, S. Kottke¹, D. Baum², K. Becker³, G. Schneider¹

¹Universitätsklinikum Jena, Klinik für HNO-Heilkunde, Biomateriallabor, Jena, Deutschland

²Konrad-Zuse-Zentrum für Informationstechnik, Berlin, Deutschland

³Universitätsklinikum Düsseldorf, Poliklinik für Kieferorthopädie, Düsseldorf, Deutschland

Fragestellung

Zur Evaluierung der Osseointegration von Implantaten im Schädelknochen von Kaninchen wurden 2D- (Histologie) und 3D- (μ CT) Bilddaten erstellt. Diese Bildgebungsverfahren haben komplementäre Vor- und Nachteile.[1] Die Hartgewebe-Histologie visualisiert Implantate, Knochenmatrix und Weichgewebe in hoher Auflösung, liefert aber stichprobenartig nur wenige Bilder pro Präparat. μ CT-Scans ermöglichen eine komplett dreidimensionale Darstellung, haben allerdings eine begrenzte räumliche Auflösung und sind mit Bildartefakten behaftet. Darüber hinaus ist in μ CT-Scans die Unterscheidung von Strukturen mit ähnlicher Röntgendiffektivität und die Visualisierung von Materialien geringer Röntgendiffektivität wie z.B. Weichgewebe nur eingeschränkt möglich. Für eine optimale Auswertung wird deshalb eine Kombination dieser Bildgebungsverfahren durch Koregistrierung (d.h. exakte Zuordnung des 2D-Histologie-Bildes zur korrespondierenden Position im μ CT-Volumendatensatz) angestrebt.

Methoden

Für die Anwendung auf die vorliegenden Bilddaten wurden zwei Algorithmen zur Koregistrierung evaluiert.

Methode 1 wurde in AmiraZIBEdition® implementiert.[2] Sie beruht auf der Wiederfindung definierter Kanten der 2D-Aufnahme im korrespondierenden 3D-Bild mittels Generalisierter Hough Transformation. Das 2D-Bild wird in ein Gradientenbild konvertiert. Entlang einer geeigneten Kante werden Punkte und deren Normale automatisch generiert bzw. manuell markiert. Dieses sogenannte Template wird nachfolgend automatisch im Gradientenfeld des 3D-Bildes identifiziert.

Methode 2 wurde in Matlab® realisiert.[3] Als Voraussetzung für die Koregistrierung werden durch Segmentierung der 2D- und 3D- Bilddaten Binärbilder erstellt. Im 3D-Bild wird anhand des Implantates eine Hauptachse definiert und das 2D-Bild manuell danach ausgerichtet. Die Koregistrierung erfolgt durch 2D-2D Chamfer Matching. Die Histologie wird mit virtuellen Schnitten, die durch schrittweise Rotation des 3D-Bildes um die Hauptachse erzeugt werden, verglichen. Das Alignment mit dem höchsten Score ist Ausgangspunkt für die Feinregistrierung mittels Simulated Annealing, wobei die Registrierung mit sechs Freiheitsgraden, unter anderem Rotation und Translation, implementiert wird.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Die evaluierten Methoden waren für die Koregistrierung der vorliegenden 3D- μ CT-Scans und 2D-Histologien von in Knochen eingebetteten Implantaten aus Titan, Composit, Keramik und Polymer geeignet.

Eine Voraussetzung für die Anwendung dieser automatischen Koregistrierungsalgorithmen ist die Skalierung der Bilddaten, eine Markierung signifikanter Strukturen bzw. Segmentierung und eine grobe Ausrichtung des 2D Bildes im 3D- μ CT. Bei größeren Volumendatensätzen (mehrere GB) kann die Leistungsfähigkeit der Hardware des Computers bzw. die für die Kalkulationen erforderliche Zeit zum limitierenden Faktor werden. In diesem Fall bietet sich eine Reduzierung der Auflösung der 3D-Bilddaten an. Als potentielle Schwierigkeit zeigten sich die zwischen den Bildgebungsverfahren bestehenden prinzipiellen Unterschiede bei der Visualisierung der abgebildeten Strukturen. Histologie und μ CT stellen die enthaltenen Materialien und Gewebe sehr unterschiedlich dar, das betrifft insbesondere die resultierenden Graustufen bzw. Farben. Dieses Problem kann mittels vorhergehender Segmentierung der Bilder gelöst werden. Eine manuelle Segmentierung bedeutet allerdings einen erheblichen zeitlichen Mehraufwand. Eine automatische Kantenfindung und grobe manuelle Markierung signifikanter Strukturen ist hier eine zeitsparende Alternative.

Insbesondere für die Bewertung der Biokompatibilität von Implantatmaterialien ist die effiziente Zuordnung von 2D-Bildern zu den korrespondierenden virtuellen Schnitten von 3D-Datensätzen ein wichtiger Schritt, um die qualitative und quantitative Aussagekraft des Bildmaterials zu erhöhen. Die getesteten Koregistrierungsmethoden haben darüber hinaus Potenzial für andere Anwendungsbereiche.

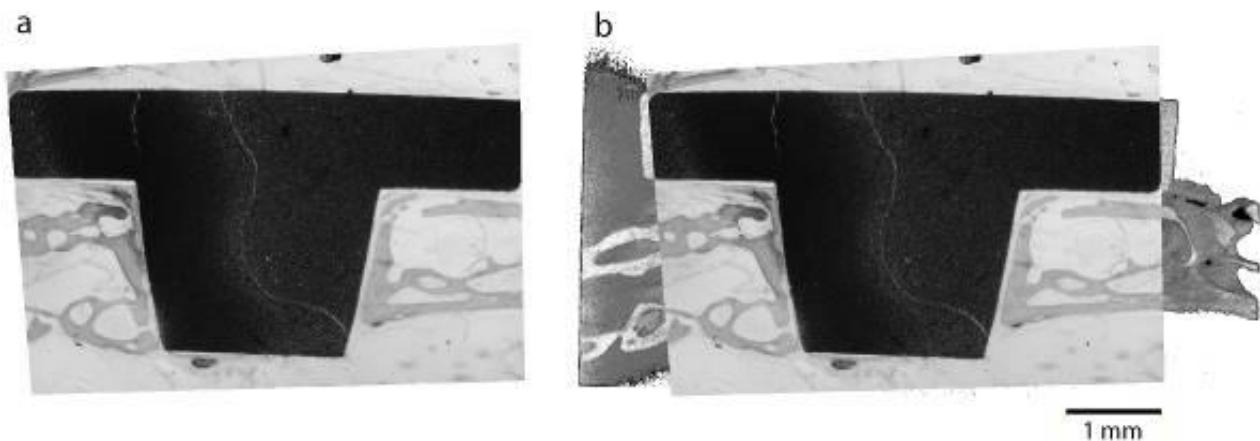
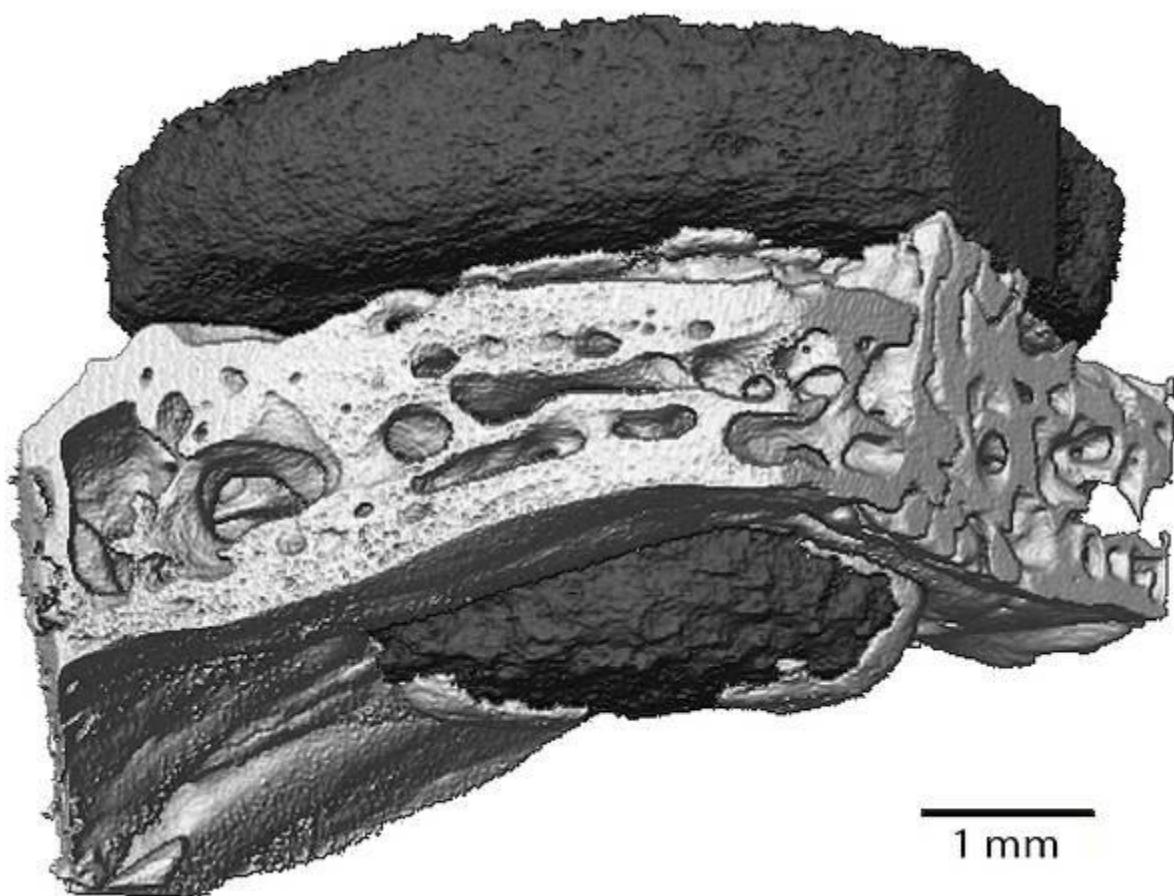
[1] Linde D, Diebowski S, Greiner-Petter C, Schneider G (2012) Biomed Tech (Berlin) 57(S1) 557-560; DOI: 10.1515/bmt-2012-4307

[2] Hoerth RM, Baum D, Knotel D, Prohaska S, Willie BM, Duda GN, Hege HC, Fratzl P, Wagermaier W (2015) Connect.Tissue Res. 56(2) 133-143; DOI: 10.3109/03008207.2015.1005210

[3] Becker K, Stauber M, Schwarz F, Beissbarth T (2015) Comp Med Imaging Graphics 44 62-68; DOI:10.1016/j.compmedimag.2015.04.005

Abbildung 1: a) Histologie von Implantat und Knochen, b) Überlagerung von Histologie und μ CT

Abbildung 2: μ CT Datensatz, Implantat im Knochen

Abb. 1**Abb. 2**

In-vivo Untersuchungen zur Biokompatibilität und Einwachsverhalten innovativer Laser-nanostrukturierter Titanoberflächen im Kaninchen

*M. D. Kauther¹, A. Mumdzic-Zverotic¹, H. Jablonski¹, H. Fietzek², T. Mertens², M. Jäger¹, C. Wedemeyer³

¹Universitätsklinikum Essen AöR, Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, Essen, Deutschland

²Airbus Defence and Space GmbH, Airbus Group Innovations, Ottobrunn, Deutschland

³St. Barbara-Hospital Gladbeck, Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, Gladbeck, Deutschland

Fragestellung

Die Primärstabilität orthopädischer Implantate ist wesentlich beeinflusst durch ihr Design, Material und Oberflächenbeschaffenheit. Die Sekundärstabilität kann durch eine vergrößerte Oberfläche verbessert werden und ergibt sich durch die spontane Adhäsion von knochenauftreibenden Osteoblasten sowie deren Proliferation und Mineralisierung (Breusch *et al.* 2000; Durmus & Webster 2012). Ein innovatives laserbasiertes Verfahren aus der Luft- und Raumfahrttechnik ermöglicht die reproduzierbare und kosteneffiziente Erzeugung von Kavitäten im Nanometerbereich (5-100 nm) (Kurtovic *et al.* 2013). Solch nanostrukturierte Oberflächen könnten vielversprechende Eigenschaften für den Einsatz in der Endoprothetik besitzen (Durmus & Webster 2012).

Methoden

Titanzyylinder (5x10mm) wurden mit herkömmlichen Oberflächenmodifikationen (Titan Plasma Spray (TPS) und Titan-Niob-Nitrid (TiNbN)) beschichtet. Die Hälfte dieser Titanzyylinder wurde mit Hilfe von Laserstrahlung nanostrukturiert. Die Implantate wurden mittels REM-Analyse charakterisiert. Es erfolgten zunächst press-fit Implantationen im Kunstknochen (PCF30) und Ausrißversuche zur Testung der Primärstabilität. *In-vivo* erfolgte die press-fit Implantation in das distale mediale Femur von 40 New Zealand white rabbits. Rechts wurden jeweils laser-nanostrukturierte TPS- oder TiNbN- Implantate und links nicht-laser-nanostrukturierte TPS- oder TiNbN- Implantate eingesetzt. Der Versuch wurde nach 0, 28 oder 56 Tagen beendet. Es wurden Röntgenaufnahmen zur Kontrolle der Implantatlage angefertigt. Zur Analyse der Knochenverankerung wurden pull-out Testungen durchgeführt. Der Knochen-Implantat-Kontakt sowie die Knochenneubildung wurden histomorphometrisch beurteilt. Es erfolgte eine histologische Untersuchung auf Osteolysen, Fremdkörperreaktion und Infektion.

Ergebnisse

Die Testung im Kunstknochen ergab signifikant größere Ausrißkräfte für TPS gegenüber TiNbN Oberflächen (ungelasert: 404,0N±38,5 vs 172,3N±32,4, p<0,001; gelasert: 356,9N±25,4 vs. 215,1N±49,3, p<0,001). Die zusätzliche Nanostrukturierung ergab keine signifikante Ausrißstärke von TPS oder TiNbN im Kunstknochen. Im Tierversuch zeigten die postoperativen Röntgenaufnahmen in allen Fällen die metaphysäre Positionierung ohne peri-Implantäre Fraktur. Nach 28 und 56 Tagen kam es in allen Fällen zur Osteointegration ohne Infektion. Es zeigten sich histologisch keine Unterschiede bezüglich Infektion oder Fremdkörperreaktion im Knochen und Weichgewebe durch Laser-Nanostrukturierungen. Osteolysen traten nicht auf. In der pull-out Testung zeigte sich eine signifikante Steigerung der Stabilität von unstrukturierten TPS und TiNbN Oberflächen von Tag 0 nach Tag 28 (TPS: 124,4N±35,8 vs 580,0N±71,1, p<0,001; TiNbN: 72,9N±6,6 vs. 150,4N±58,5, p<0,001). Ausrißkräfte bei TPS Oberflächen waren signifikant höher nach 28 und 56 Tagen als im Vergleich zu TiNbN Flächen. Die zusätzliche Laser-Nanostrukturierung zeigte keine signifikanten Auswirkungen auf Auszugskräfte im Vergleich zu unbehandelten TPS und TiNbN Beschichtungen an den Tagen 0, 28 und 56.

Schlussfolgerung

Laser-nanostrukturierte Oberflächen zeigten keine Infektionen oder Osteolysen verglichen mit den nicht-laser-nanostrukturierten Implantaten. Die Testung im Kunstknochen sowie die *in-vivo* Untersuchung von TPS und TiNbN Oberflächen zeigte keine Überlegenheit der Laser-Nanostrukturierung bezüglich Primär- und Sekundärstabilität im Kaninchenmodell nach 0, 28 und 56 Tagen. Einige Studien konnten zeigen, dass die Laserbehandlung von Implantatoberflächen deren Biokompatibilität verbessern kann (Ayobian-Markazi *et al.* 2014; Mariscal-Munoz *et al.* 2015). Allerdings kann Laserstrahlung mit hoher Energie auch Oberflächenveränderungen hervorrufen, welche die Biokompatibilität beeinträchtigen (Thomson-Neal *et al.* 1989). Der Effekt von nano Oberflächen auf die osteogene Differenzierung ist somit offenbar abhängig von den gewählten Laserparametern (Ayobianmarkazi *et al.* 2015).

In-Vitro-Studie zum Degradationsverhalten von mikrostrukturiertem Bioglas unter physiologischen Flussbedingungen in einem neuartigen Simulated Body Fluid-Reaktor

*M. Höner¹, F. Böke¹, M. Weber¹, H. Fischer¹

¹ZWBF, Aachen, Deutschland

Einleitung

Bioaktive Gläser sind etablierte und vielversprechende Knochenersatzmaterialien. Bei Implantation *in vivo* reagieren sie mit der umgebenden Körperflüssigkeit. Dabei degradieren sie langsam und entwickeln parallel eine bioaktive Hydroxylapatitschicht. Diese kann eine feste Bindung zum umliegenden Hart- oder Weichgewebe bilden. Dieser bioaktive Mechanismus kann *in vitro* in Körperersatzflüssigkeit (Simulated Body Fluid, SBF) untersucht werden. In dieser Studie wurde ein SBF-Reaktor entwickelt, der es erlaubt, dieses Verhalten unter physiologischen Flussbedingungen mit einer Flussgeschwindigkeit von 3 µm/s an der Probenoberfläche zu untersuchen, was den tatsächlichen Bedingungen *in vivo* deutlich näher kommt als die konventionelle statische Methode.

Mikrostrukturen können das Zellverhalten entscheidend beeinflussen, allerdings ist es dazu notwendig, dass die Oberflächentopographie für einen gewissen Zeitraum erhalten bleibt ohne abzuplatzen oder zu schnell einzuebnen. Dies wurde im entwickelten Reaktor untersucht.

Material und Methoden

Der SBF-Reaktor wurde mittels *Computational Fluid Dynamics*-Simulation entwickelt, um eine Flussgeschwindigkeit von 3 µm/s an der Probenoberfläche zu realisieren und an strukturierten und polierten bioaktiven Glasoberflächen des Glases 13-93 getestet. Diese wurden mittels Schwerkraftguss in eine strukturierte Form hergestellt. Der Einfluss der Oberflächentopographie auf mesenchymale Stammzellen wurde in Vitalfluoreszenz-Doppelfärbungen und REM-Analysen nachgewiesen. Um den Einfluss von physiologischen Bedingungen auf die Proben zu untersuchen, wurden sie für 1, 2, 7 und 30 Tage im Reaktor gelagert und anschließend gravimetrisch, röntgenographisch, mittels REM und EDX analysiert. Als Kontrolle dienten entsprechende Proben in statischem SBF.

Ergebnisse und Diskussion

Die Oberflächenstruktur der Proben zeigte einen deutlichen Einfluss auf die Ausrichtung von mesenchymalen Stammzellen. Um diesen Effekt jedoch auch für längerfristige Prozesse, wie z.B. die osteogene Differenzierung, nutzen zu können, ist es unabdingbar, dass die Strukturen den Körperflüssigkeiten und deren Bewegung *in vivo* eine gewisse Zeit standhalten. Dies wurde im entwickelten SBF-Reaktor untersucht. Die Glasoberflächen konnten den angebrachten Strömungen widerstehen und auch nach 30 Tagen in SBF waren die Strukturen noch nachweisbar. Die Proben bildeten wesentlich dickere Hydroxylapatitschichten als die entsprechenden Proben in statischem SBF-Medium, was eine verbesserte Stimulation der Knochenneubildung *in vivo* zur Folge haben könnte. Zudem entwickelten die Proben gleiche Hydroxylapatit-Schichtdicken wie sie in publizierten *In-Vivo*-Experimenten nach der gleichen Zeit auftraten. Der entwickelte SBF-Reaktor stellt demnach eine Verbesserung zur Untersuchung der *In-Vitro*-Bioaktivität unter physiologischen Bedingungen dar und erlaubt realitätsnähere Aussagen zum Verhalten von bioaktivem Glas.

Schlussfolgerung

Ein neuartiger SBF-Reaktor wurde entwickelt, der es erlaubt, physiologische Flussbedingungen an der Probenoberfläche zu imitieren. Die im Reaktor behandelten Proben zeigten Ergebnisse, die der *in vivo* Situation wesentlich näher kommen als diejenigen, die unter konventionellen, statischen SBF-Bedingungen gelagert wurden. Strukturierte bioaktive Glasoberflächen waren auch nach 30 Tagen unter den relativ aggressiven körperähnlichen Bedingungen noch präsent. Sie birgen folglich großes Potential hinsichtlich einer gezielten topographischen Beeinflussung von Zellen und der Verbesserung von biologischen Langzeitprozessen.

Heterogeneity of biomaterial-induced multinucleated giant cells: possible importance for the regeneration process?

*M. Barbeck¹, R. Sader¹, C. J. Kirkpatrick¹, S. Ghanaati¹

¹Universitätsklinikum Frankfurt, FORM-Lab, Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, Frankfurt/Main, Deutschland

Introduction

Biomaterial-associated multinucleated giant cells (BMGCs) have been found within the implantation beds of many different biomaterials. However, their exact differentiation and their involvement in the inflammatory and healing events of the foreign body response still remain mostly unclear. Various findings suggest a phenotypic heterogeneity of BMGCs equivalent to that of macrophages, whose pro-inflammatory activation profile has been supposed to promote the process of biomaterial-mediated tissue regeneration [1,2]. Further knowledge is essential to evaluate the role of BMGCs in these processes, especially on the basis of different biomaterial characteristics, as this is required to ensure their successful clinical application. To substantiate our hypothesis of the phenotypic and functional relationship between macrophages and BMGCs, antibodies for the detection of the different pro- and anti-inflammatory macrophage subpopulations were applied to investigate the heterogeneity of BMGCs.

Experimental Methods

For conduction of this study an established subcutaneous implantation model was used in 24 female 6-8 weeks old Wistar rats to implant silk fibroin (SF) scaffolds as well as different collagen membranes. Established histological methods, i.e., specialized (immune-) histochemical staining methods and histomorphometrical techniques, were applied [3,4].

Results and Discussion

Up until now the present data show that biomaterial-associated multinucleated giant cells (BMGCs) express both pro- and anti-inflammatory molecules to the same extent within the implantation beds of silk fibroin scaffolds 15 days after implantation. These data substantiate the heterogeneity of BMGCs comparable to that of macrophages, whose M2-phenotype appears to be related to a successful tissue remodeling outcome. Thus, the question arises concerning to what extent BMGCs can „support“ the process of tissue regeneration in concert with macrophages and other involved cells. Furthermore, the data also question to what extent TRAP-expression within a biomaterial implantation bed can be taken as a predictive marker for an inflammatory condition, as in this study no obvious correlation could be observed between TRAP-expression and other pro-inflammatory markers. More profound knowledge of the inflammatory differentiation of BMGCs, especially on the basis of the physicochemical characteristics of the biomaterial is required to develop interactive (“smart”) biomaterials that can guide the tissue regeneration process.

Conclusion

Further research should not only concentrate on the different macrophage polarization related to the physicochemical properties of biomaterials but also on different BMGC subtypes and correspondingly on their role in tissue regeneration in relation to the material-specific tissue reaction. Furthermore, the applications of marker molecules such as TRAP and its role in the „inflammatory“ tissue reaction to biomaterials have to be examined in greater depth.

References

- [1] Ghanaati S *et al.*, Biomaterials 32 (32): 8150-60, 2011.
- [2] Kokkinopoulou M *et al.*, PLoS One 9 (6): e101078, 2014.
- [3] Barbeck M. *et al.*, Ann Maxillofac Surg Jul-Dec; 4 (2): 150-7, 2014.

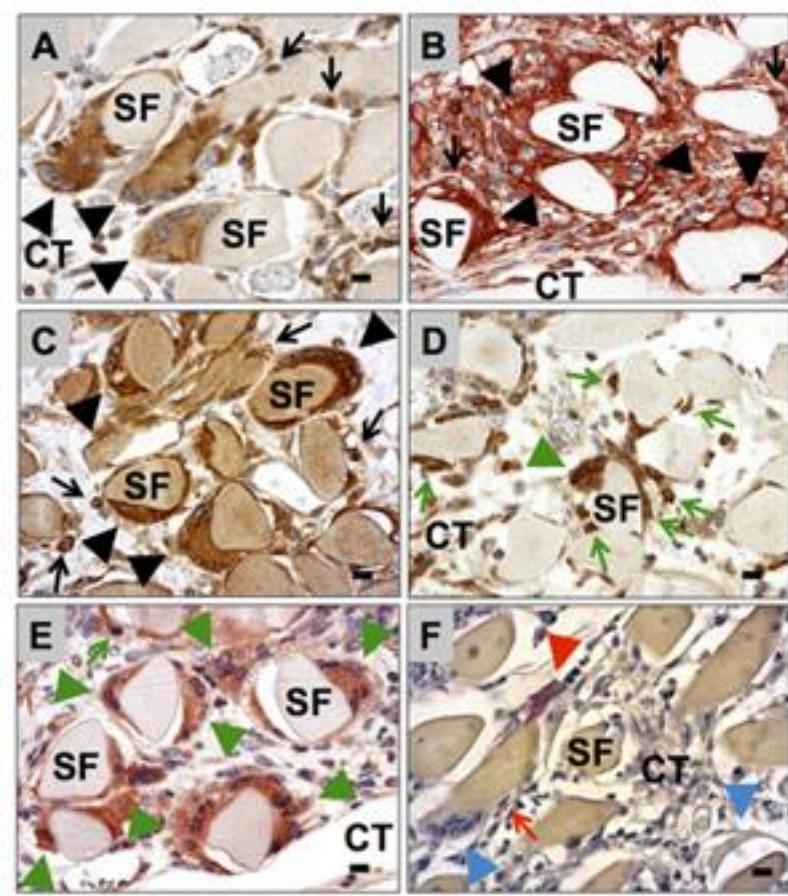
Acknowledgements

The authors would like to thank Ms. Verena Hoffmann for her technical assistance.

Figure

The immunohistochemical detection of pro-inflammatory (**A, B and C**) and anti-inflammatory (**D and E**) molecules within the tissue ingrowth into the subcutaneously implanted silk fibroin (SF) scaffolds. Both the mononuclear cells (black arrows) as well as the BMGCs (black arrowheads) showed expression of COX-2 (**A**), of CCR7 (**B**) and of NF- κ B (**C**) (A: COX-2-immunostaining, B: CCR7-immunostaining, C: NF- κ B-immunostaining, 600x magnifications, scale bars = 10 μ m). Furthermore, mononuclear cells (green arrows) and BMGCs (green arrowheads) within the tissue ingrowth of the SF scaffolds also expressed the anti-inflammatory molecules HO-1 (**D**) and CD206 (**E**) (D: HO-1-immunostaining, E: CD206-immunostaining, 600x magnifications, scale bars = 10 μ m). (**F**) The histochemical detection of TRAP shows that only some of the BMGCs (red arrow heads) and the mononuclear cells (red arrows) were positive within the SF scaffold (blue arrowheads = TRAP-negative BMGCs) (TRAP-staining, 600x magnification, scale bar = 10 μ m).

Abb. 1



P25

Novel Wet-Chemistry based Technique for the Surface Modification of Polydimethylsiloxane

*M. Gabriel¹, C. Raynaud¹, J. Chapron¹, C. Bollensdorff¹

¹Sidra Cardiovascular Research, Doha, Katar

Introduction

Polydimethylsiloxane (PDMS, silicone) is an elastomeric polymer frequently used as implant material, for flexible tubing and in microfluidic devices. Ease of processability and comparatively good chemical resistance are opposed to the highly hydrophobic nature of the material. As a consequence this property prevents wetting of e.g. microchannels and induces unspecific protein adsorption, which - in blood contacting devices - may result in platelet adhesion and subsequent thrombosis. Furthermore the pristine polymer does not promote cell adhesion and growth. Treatments which improve the biological performance of PDMS mostly include coating procedures (physisorption) or plasma techniques. Both methods are either considered to be non permanent or restricted to accessible surfaces, respectively. Here we propose a novel wet-chemical process based on surface activation achieved by a combined aminolysis/alcoholysis reaction. The resulting amino-functionalized surface was used for subsequent immobilization of biomolecules. This was exemplified by the conjugation of the RGD peptide, polyethylene glycol (PEG) and heparin, yielding surfaces with cell-adhesive or non-thrombogenic properties respectively.

Methods

PDMS sheets of 2 mm thickness (prepared from Sylgard 184) were treated with the sodium alcoholate of neat ethanolamine for 1 hour at room temperature and washed with water. RGD immobilization was achieved using a diepoxyde as crosslinker and hexamethylenediisocyanate (HMDI) was used for the conjugation of heparin. PEGylation was accomplished with an amine-reactive PEG derivative. Surfaces were characterized by means of infrared spectroscopy, contact angle measurements and colorimetric assays. Immortalized human cardiomyocytes were used to probe the RGD-bearing material over a period of one week and PEG and heparin modified samples were tested with platelet-rich plasma for 45 minutes. Micrographs of fluorescence stained cells were analyzed with ImageJ software and results were expressed as percentage coverage of total area.

Results & Discussion

Successful introduction of amino-functionalities was confirmed by IR spectroscopy and quantified colorimetrically. The versatility of pendant amines served for further conjugations. Heparin, PEG and peptide modification resulted in permanently hydrophilic surfaces in contrast to aminated PDMS which was prone to hydrophobic recovery. RGD modification resulted in pronounced cell adhesion and colonization (blank; 1 d: $0.4 \pm 0.07\%$ coverage, blank; 1 w: $0.8 \pm 0.17\%$, RGD/1 d: $2.0 \pm 0.62\%$, RGD/1 w: $10.4 \pm 0.99\%$). Pristine PDMS was readily covered with attached thrombocytes whereas heparinized as well as PEGylated material dramatically reduced platelet adhesion (blank: $12.4 \pm 1.27\%$ coverage, PEG: $1.16 \pm 0.76\%$, heparin: $1.89 \pm 0.5\%$).

Conclusion

Combined aminolysis/alcoholysis of PDMS substrate yields amine-bearing surfaces which are a suitable platform for a multitude of subsequent bioconjugation applications.

Figure

Cell-adhesive RGD modification renders PDMS a good substrate for cell colonization. PEGylation and heparin immobilization endow the polymer with non-thrombogenic properties.

Abb. 1



Plasma functionalization of electrospun polymer scaffolds to improve biocompatibility and endothelialization

*C. Matschegowski^{1,2}, S. Kohse¹, M. Teske¹, T. Eickner¹, N. Grabow¹, K.-P. Schmitz^{1,2}

¹Institute for Biomedical Engineering, Rostock University Medical Center, Rostock-Warnemünde, Deutschland

²Institute for ImplantTechnology and Biomaterials e.V., Rostock-Warnemünde, Deutschland

Introduction

Polymeric nanofiber scaffolds are promising materials for innovative developments of cardiovascular prosthetics, such as artificial heart valves or drug delivery systems [1]. To ensure the biological integrity of implants, its chemical and topographical surface characteristics have to be considered since both essentially influence cellular physiology [2]. Surface functionalization via plasma-chemical processes is assumed as potential method for enhancing cell adhesion and biocompatibility [3]. This study aims at biological evaluation of plasma-functionalized nanofibrous polymer scaffolds towards the improvement of biocompatibility and endothelialization. The elucidation of cell-biomaterial interactions will promote the introduction of smart materials, such as polymeric nonwovens as promising matrices for several cardiovascular applications like alloplastic heart valves, patches or stent coatings and will improve implant technology.

Materials and Methods

Nanofibrous nonwovens of the polymers poly-(L-lactide) Resomer L210 S (PLLA L210) and polyurethane EG60D were fabricated by free-surface electrospinning (Nanospider LAB 200, ELMARCO). Plasma-chemical surface modification was conducted by plasma etching in an ammonia (NH_3) plasma (type: Femto, frequency: 13.56 MHz, Diener Electronic GmbH & Co. KG).

Human umbilical endothelial cells (EA.hy926, ATCC) were seeded at a density of 1.5×10^4 cells/cm² on the nanofibrous polymer surfaces and cultured for 48 h in DMEM (GIBCO) with 10% fetal calf serum (FCS, PAN Biotech) at 37°C and 5% CO₂. Cell morphology was analyzed by scanning electron microscopy (QuantaTM FEG 250, FEI Company). Cell viability was quantified with CellQuanti-BlueTM assay (BioAssaySystems). Data was normalized to cells grown on plane polystyrene control surface (NC). Four independent biological replications were performed.

Results

Cell morphology analysis revealed enhanced cell adhesion and spreading of human endothelial EA.hy926 cells on NH₃-functionalized polymeric nonwovens of PLLA L210 and EG60D compared to the unmodified nanofiber scaffolds, on which cells exhibited mainly spherical phenotypes. Cell viability of human endothelial EA.hy926 cells was higher on NH₃-plasma functionalized polymer nonwovens with $68.3\% \pm 17.8$ for PLLA L210 and $31.8\% \pm 5.0$ for EG60D in comparison to the unmodified electrospun polymers with only $54.2\% \pm 14.2$ und $26.1\% \pm 3.9$, respectively (mean \pm SD; normalized to NC). Generally, cell viability was higher on PLLA L210 nonwovens compared to EG60D nonwovens.

Discussion

Nanofibrous polymer scaffolds of PLLA L210 and EG60D were successfully fabricated by electrospinning while exhibiting morphological features that mimic the extracellular matrix and thus, enabling its usage as appropriate matrices for endothelialization. Surface modification with NH₃-plasma was shown to positively affect the biocompatibility of electrospun polymer scaffolds proven by enhanced cell adhesion and viability of the endothelial cells. This is consistent with other studies that also documented increased biocompatibility of plasma-treated polymers for fibroblast and primary human endothelial cells [4]. The physico-chemical influences of polymeric nonwoven surfaces on cell physiology detected in the present study might be utilized for further developments of sophisticated nanofibrous polymer matrices to guide cellular response. Systematic modulation of topographical features of nanofibrous polymer scaffolds together with chemical surface modifications will benefit implant design towards the development of innovative heart valve prosthetics or novel drug-eluting stent platforms.

Acknowledgements

Partial financial support by the European Regional Development Fund (ERDF) and the European Social Fund (ESF) within the collaborative research between economy and science of the state Mecklenburg-Vorpommern and by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) within RESPONSE "Partnership for Innovation in Implant Technology" is gratefully acknowledged.

References

- [1] Murugan R and Ramakrishna S, *Tissue Engineering* 2006; 12(3): 435-47
- [2] Matschegowski C et al., *Biomaterials* 2010; 31(22): 5729-40
- [3] Pappa AM et al., *Beilstein J Nanotechnol.* 2015; 6: 254-62
- [4] Rudolph A et al., *PLoS One* 2015; 10(12): e0142075

Nanostructured multifunctional polymer films as hematopoietic stem cell culture substrates

*D. Kratzer¹, T. Tischer¹, C. Barner-Kowollik², C. Lee-Thedieck¹

¹Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Funktionelle Grenzflächen, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland

²Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institute for Chemical Technology and Polymer Chemistry & Institute for Biological Interfaces (IBG 3), Karlsruhe, Deutschland

Hematopoietic stem cells (HSCs) play an important role in the regeneration of blood, as well as the function and maintenance of the immune system, due to their ability to differentiate into all types of blood cells. Furthermore, HSCs are used for the treatment of malignant diseases of the blood system (*e.g.* leukemia).^[1] Unfortunately, the demand for HSCs exceeds the current supply from donors for treating the aforementioned conditions. The targeted *in vitro* culture of HSCs in an undifferentiated state would provide an elegant solution to overcome this problem. At present, the *in vitro* culturing of undifferentiated HSCs aiming for biomedical applications is strongly limited by currently available cell culture techniques.^[2,3] The reliable maintenance of the HSCs properties is only possible in the stem cell niche, their natural environment, located in the bone marrow. There, the proliferation and differentiation is regulated by both biochemical (cell-cell contacts, extracellular matrix (ECM), soluble factors) and physical (*e.g.* nanostructure and material properties) information. Hence, the development of fully synthetic cell culture systems, mimicking specific bone marrow properties, is critical for determining factors that control cell proliferation and differentiation, allowing for the future expansion of HSCs' clinical applications.

Although both the composition and the highly ordered structure of the bone marrow are well known, their mutual interactions with HSCs are far less understood. Recent *in vitro* studies show that not only the ligand types presented by the immediate environment influence the behavior of HSCs, but also their arrangement on the nanometer scale.^[4,5] In order to understand and control HSCs' proliferation and differentiation, cell culture substrates presenting several different ligand types in a spatially controlled manner are required. Thus, we are aiming for the development of fully synthetic nanostructured polymer coatings with tailored domains bearing different biomolecules to conduct systematic studies of their influence on the behavior of HSCs. The suitable ligand combination, the optimal ligand distribution as well as the stoichiometric ratios are key parameters investigated to elucidate their influence on HSCs' behavior with regards to proliferation and differentiation.

Here we introduce multifunctional honeycomb-patterned porous polymer films prepared *via* the breath figure approach^[6] as potential cell culture systems which might fulfil the above mentioned requirements. Amphiphilic block-copolymers with domains bearing different functional groups suitable for an orthogonal modification with ligands (*e.g.* RGD, DLL1) are synthesized. A solution of this polymer type is then casted onto a substrate and exposed to a humid airflow. As the solvent evaporates, condensation and growth of water droplets occur on the organic surface while the polymer concentrates at the interface stabilizing the water droplets.^[7] With further evaporation of the liquids, pores are created by the water droplets leading to honeycomb-patterned polymer films when proper conditions are applied. The successful formation of hexagonal water droplet arrays and the quality of the order depend on multiple factors, for instance the humidity, the structure and architecture of the polymer, the polymer concentration and the airflow. In the future, this polymer films will be compared to natural ECM derived surface coatings with regards to their effects on the proliferation of undifferentiated HSCs in order to establish the applicability of this approach.

- [1] WW. Tse, SL. Zang, K. D. Bunting, M. J. Laughlin, *Bone Marrow Transplant* 2008, **41**, 465-472.
- [2] A. Dahlberg, C. Delaney, I. D. Bernstein, *Blood* 2011, **17**, 6083-6090.
- [3] JJ. Xie, CC. Zhang, *Sci China Life Sci* 2015, **58**, 839-853.
- [4] C. Lee-Thedieck, J. P. Spatz, *Macromol Rapid Commun* 2012, **33**, 1432-1438.
- [5] E. Altrock, C. A. Muth, G. Klein, J. P. Spatz, C. Lee-Thedieck, *Biomaterials* 2012, **33**, 3107-3118.
- [6] G. Widawski, M. Rawiso, B. Francois, *Nature* 1994, **369**, 387-389.
- [7] W. Bai-Heng, Z. Liang-Wei, O. Yang, T. Wen, W. Ling-Shu, X. Zhi-Kang, *J Phys Chem C* 2015, **119**, 1971-1979.

Potential of SURGEL Thin Films as Platform for Stem Cell Culture

*J. Hümmel¹, S. Schmitt¹, S. Kraus¹, A. Welle^{1,2}, S. Grosjean³, M. Hanke-Roos^{4,5}, S. Bräse^{3,6}, H. Gliemann¹, C. Wöll¹, M. Tsotsalas^{1,3}, C. Lee-Thedieck¹

¹Karlsruhe Institute of Technology, Institute of Functional Interfaces, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland

²Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe Nano Micro Facility (KNMF), Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland

³Karlsruhe Institute of Technology, Institute for Organic Chemistry, Karlsruhe, Deutschland

⁴Heidelberg University, Department of Medicine V, Heidelberg, Deutschland

⁵Ruhr-University Bochum, Analytical Chemistry - Biointerfaces, Bochum, Deutschland

⁶Karlsruhe Institute of Technology, Institute of Toxicology and Genetics, Karlsruhe, Deutschland

Controlling the structure and surface chemistry of biomaterials on a molecular level is crucial for an optimized performance. Here, we describe the synthesis of molecularly structured “ideal network polymer” thin films (SURGELs) and their surface modification by using two orthogonal metal free click chemistries. Due to their high porosity and implemented functional groups SURGELs offer the possibility of additional surface functionalization, incorporation of bioactive molecules and tailoring of their physical properties, which makes them an exciting platform to study cell-material interactions [1]. We here demonstrate for the first time the biocompatibility of SURGEL thin films for eukaryotic cells showing their high potential as a cell culture substrate, which is further enhanced by surface modification. In addition, the use of light triggered reactions in combination with photo masks allows a patterned functionalization of the substrates. The high variability in the design of the SURGEL materials, combined with the ability to functionalize their surface with any desired chemistry and pattern structure, will allow the targeted design of novel SURGEL-based biomaterials for applications in nanomedicine or as tissue engineering scaffolds, wound dressing or medical implants.

Next, we want to apply this material class for drug-release applications. Functionalization of SURGEL thin films with photosensitive donating moieties should yield a drug-release platform, which is responsive to irradiation with light as an external trigger. As a model drug Nitric Oxide (NO) will be employed, since NO signaling is crucial in biology and has been shown to regulate the metabolic state of hematopoietic stem cells in their niche [2-4]. These features render NO an interesting candidate for the *in vitro* expansion of hematopoietic stem cells, which is an important challenge, as these are the only stem cells used routinely in the clinic to treat patients and their number is limited [5]. However, *in vitro* multiplication of hematopoietic stem cells cannot be achieved without differentiation and loss of stem cell potential [6]. The biological effects of NO are highly dependent on its concentration [7]. Therefore, release systems that allow tight and spatiotemporal control of NO concentration are needed to be able to use the potential of NO to control hematopoietic stem cell behavior *in vitro*. SURGELs as well-defined, porous material systems fulfil the requirements for such a system—controlled release due to the homogenous distribution of NO donating moieties and unhindered diffusion of the gas—and are thus promising candidates as platforms for hematopoietic stem cell culture.

- [1] Tsotsalas, M., et al., *Fabrication of Highly Uniform Gel Coatings by the Conversion of Surface-Anchored Metal-Organic Frameworks*. Journal of the American Chemical Society, 2014. 136(1): p. 8-11.
- [2] Cohen, S.G., et al., *PARI signaling regulates the retention and recruitment of EPCR-expressing bone marrow hematopoietic stem cells*. Nat Med, 2015. 21(11): p. 1307-1317.
- [3] Nogueira-Pedro, A., et al., *Nitric Oxide-Induced Murine Hematopoietic Stem Cell Fate Involves Multiple Signaling Proteins, Gene Expression, and Redox Modulation*. STEM CELLS, 2014. 32(11): p. 2949-2960.
- [4] Hall, Christopher J., et al., *Infection-Responsive Expansion of the Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Compartment in Zebrafish Is Dependent upon Inducible Nitric Oxide*. Cell Stem Cell, 2012. 10(2): p. 198-209.
- [5] Dahlberg, A., C. Delaney, and I.D. Bernstein, *Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells*. Blood, 2011. 117(23): p. 6083-90.
- [6] Walasek, M.A., R. van Os, and G. de Haan, *Hematopoietic stem cell expansion: challenges and opportunities*. Ann N Y Acad Sci, 2012. 1266: p. 138-50.
- [7] Thomas, D.D., *Breathing new life into nitric oxide signaling: A brief overview of the interplay between oxygen and nitric oxide*. Redox Biology, 2015. 5: p. 225-233.

P29

Impact of the mechanophysical environment on keratin network dynamics in migrating cells

*A. Pora¹, B. Hoffmann², R. Merkel², R. Windoffer¹, R. Leube¹

¹MOCA Institute (Uniklinik RWTH Aachen), Anatomie, Aachen, Deutschland

²ICS-7 Biomechanics (Forschungszentrum Jülich), Jülich, Deutschland

Cell migration is a fundamental biological process. It occurs throughout multicellular organisms both in physiological situations such as embryogenesis and tissue regeneration and in pathological situations such as wound healing and tumor cell invasion and metastasis. Cell migration is a highly complex process whereby different physical and chemical signals act on many different cell components, most notably the force-generating cytoskeleton.

Intermediate filaments are one of the three major components of the cytoskeleton. Keratin intermediate filaments are the main type of cytoplasmic intermediate filaments of epithelial cells. They are anchored to hemidesmosomes which are involved in the attachment of epithelial cells to the extracellular matrix of the basement membrane. Although keratin intermediate filaments are involved in the mechanical resilience of tissues, they are highly dynamic structures. Keratin intermediate filaments are subject to continuous turnover in sessile keratinocytes. This turnover is part of a spatially-defined cycle of assembly and disassembly. However, the behavior of keratin intermediate filaments and their associated hemidesmosomes in migrating epithelial cells has not been investigated in detail. It is also not known how keratin dynamics are affected by the mechanophysical environment.

We aim at elucidating how the dynamic behavior of the keratin intermediate filament cytoskeleton and its associated hemidesmosomes is integrated in migrating epithelial cells, and how mechanophysical characteristics of the matrix affect keratin network dynamics. In particular, we want to study the effects of matrix elasticity, of stretch applied to the matrix, and of confinement. Such situations are physiologically relevant as cells encounter various degrees of stiffness in the human body because of local differences in tissue arrangement and extracellular matrix composition, and because of pathological situations as they occur, for example in scleroderma. Cell mechanics are determined by the forces that cells exert constantly on the matrix and, conversely, on the external forces acting on the cell. The steady state equilibrium of sessile cells has to be overcome in migrating cells, when forces mediate cell translocation in a defined direction.

Methods

We use primary normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) that are known to be highly migratory cells. These cells are grown on extracellular matrices of different elasticities (ranging from 1,7kPa to 1,2MPa) that are generated by mixing different ratios of curing agent with silicon oil. Keratin network dynamics are recorded in NHEK cells transfected with a keratin5-YFP expression construct by confocal time-lapse fluorescence microscopy.

Results

We demonstrate that matrix stiffness influences cell morphology and observe that keratin network dynamics become highly polarized in migrating cells. We also observe that keratinocytes have a higher migration speed and persistence on soft matrices as was previously reported for other cell types. On such soft matrices keratin cycling is faster. We also show that hemidesmosomal components are organized in highly specialized patterns in migrating cells. We measure by traction force microscopy the forces that adhesion sites apply on the matrix. We determine how keratin dynamics are affected when a unidirectional stretch is applied to the matrix. Finally we examine the effects of confinement in a microchannel and compare this to the restriction imposed by micro-patterned stripes that are generated by deep UV micropatterning.

Conclusion

Taken together, our findings show that the mechanophysical matrix properties impact keratin intermediate filament network dynamics, and suggest that the underlying cross-talks are important for epithelial cell migration as it occurs in wound healing and tumor invasion.

P30

Modification of polyelectrolyte multilayer coatings using nanoparticles to optimize adhesion and proliferation of different cell types

*B. Gittel^{1,2}, R. Kemkemer^{1,3}, R. Krastev^{1,2}, K. Athanasopulu¹, A. Rudt¹

¹Hochschule Reutlingen, Fakultät Angewandte Chemie, Reutlingen, Deutschland

²Naturwissenschaftliches Medizinisches Institut, Biomaterialien, Reutlingen, Deutschland

³Max Planck Institut für Intelligente Systeme, Stuttgart, Deutschland

Introduction

Adapting characteristics of biomaterials specifically for *in vitro* and *in vivo* applications is becoming increasingly important in order to control interactions between material and biological systems. These complex interactions are influenced by surface properties like chemical composition, charge, mechanical and topographic attributes. In many cases it is not useful or even not possible to alter the base material but changing surface, to improve biocompatibility or to make surfaces bioactive, may be achieved by thin coatings. An already established method is the coating with polyelectrolyte multilayers (PEM). To adjust adhesion, proliferation and improve vitality of certain cell types, we modified the roughness of PEM coatings. We included different types nanoparticles (NP's) in different concentrations into PEM coatings for controlling surface roughness. Surface properties were characterized and the reaction of 3 different cell types on these coatings was tested.

Materials and Methods

To generate different coatings the layer-by-layer (LbL) technique was used. Wells of cell culture plates and silica wafer were alternating covered with solutions of the polyelectrolytes polystyrene sulfonate (PSS) and polyallylamine hydrochloride according to the following scheme: (PSS/PAH)₅ + NP + (PSS/PAH)₂.

Coatings with polystyrene or functionalized Fe₃O₄ NP's ($f = 100$ nm) with different concentrations of NP's and coatings without NP's were generated. Layer build up and the amount of bound NP's was monitored by QCM (quartz crystal microbalance). Additionally the surface was characterized by AFM imaging. The reaction - adhesion and proliferation - of different cell types on the different surfaces was tested in cell culture experiments.

Results and Discussion

We could generate different uniformly NPs-coated LbL-surfaces, with different roughness as well as different chemical characteristics and surface charge. Depending on the concentration of the NP in suspensions different numbers of NPs were bound into the coating. According to difference in charge between the different types of NPs, they built up varying surfaces characteristics. In first experiments, endothelial, smooth muscle cells, and fibroblasts showed diverse reactions to the surface modifications with NPs. So this technique may offer a way to adjust surfaces specifically for growth of different cell types.

P32

Modeling and application of tin oxide sensors for detection of different pathogens

A. Chandran¹, G. Stojanovic¹, V. Srdic², *L. Heinrich³

¹University of Novi Sad, Department for Electronics, Faculty of Technical Sciences, Novi Sad, Serbien

²University of Novi Sad, Department of Materials Engineering, Faculty of Technology, Novi Sad, Serbien

³marcotech oHG, Münster, Deutschland

Introduction

The development of biosensors has got an increasing attention over the last two decades. The detection of pathogens is very important in the wound care management and the clinical hygiene control avoiding or signaling infections, as well as to improve the food safety [1]. One of the methods using for the detection of pathogen system is impedance microbiology [2]. The first attempt by Stewart et al.; was the first to detect a microorganism using impedance technique [3]. Afterwards several studies were published explaining impedance detection of various pathogens. In this method we measure change in the impedance and other electrical parameters of SnO₂ films in pathogen medium.

Materials and Methods

We explain the application of SnO₂ thick films for monitoring different pathogen system using impedance spectroscopic analysis. For this purpose SnO₂ nano-powder was synthesized using co-precipitation method. The obtained powder was used for the fabrication of sensing devices using the thick film technology by screen-printing method. Fabricated devices were processed at three different temperatures. Moreover, SnO₂ thick-films were characterized. The crystallinity was confirmed using X-ray diffraction and Raman analysis. Sensing performances were performed by exposing SnO₂ thick films to *candida albicans* and *pseudomonas aeruginosa*, and the influence of frequency in impedance and electro chemical changes during sensing process were analyzed using MEISP software.

Results

Electrical/ Electrochemical impedance analysis and sensing performance of SnO₂-thick films in different pathogen medium were performed by using HP-4194A complex impedance analyser. The analysis were carried out using *candida albicans*, *pseudomonas aeruginosa* and pathogen samples, from colonies of 24-hour cultures on blood agar (HiMedia, India) for all mentioned bacteria as well as of the colonies on Sabouraud dextrose agar (HiMedia, India) for *candida*, in sterile tubes, suspensions with the density of 0.5 MCF were made in 4.5 ml of physiological saline using EUCAST standard.

Figures 1a and 2b: Comparison of Nyquist plots from experimental and simulated results

Figure 1a explains comparison of Nyquist plot responses from simulated results and experimental results of samples SnO₂-600, SnO₂-700 and SnO₂-800 in *candida albicans* and Fig. 2b gives a comparison of Nyquist plot response from simulated and experimental results of SnO₂-600 in *candida albicans*, and *pseudomonas aeruginosa* respectively.

Acknowledgement

This work is partially supported by European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 690876.

References

- [1] Chassy, B. M., Food safety risks and consumer health, *New. Biotechnol.* 2010, 27 (5), 534-544.
- [2] P. Silley, S. Forsythe., Impedance microbiology—a rapid change for microbiologists. *J. Appl. Bacteriol.* 1996, 80 (3), 233-243.
- [3] Stewart, G. N., the charges produced by the growth of bacteria in the molecular concentration and electrical conductivity of culture media. *The Journal of Experimental Medicine* 1899, 4 (2), 235-243.

Abb. 1a

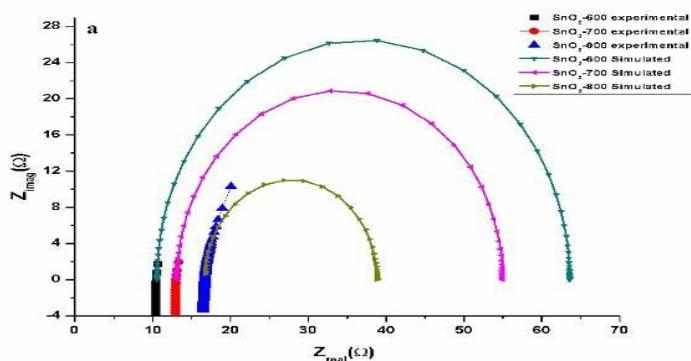
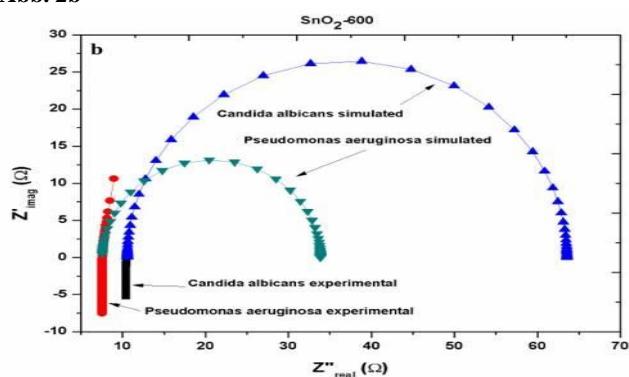


Abb. 2b



Electrospun native collagen nanofleeces for large scale applications

*J. Milosevic¹, M. Schröpfer², T. Kürbitz^{3,4}, C. Heine¹, S. Hasan^{1,3}, A. Heilmann^{3,4}, M. Meyer², H.- J. Meisel¹

¹SpinPlant GmbH, Leipzig, Deutschland

²Research Institute of Leather and Plastic Sheeting (FILK gGmbH), Freiberg, Deutschland

³Fraunhofer IMWS, Biological and Macromolecular Materials, Halle (Saale), Deutschland

⁴ Anhalt University of Applied Sciences, Electrotechnics and machine building, Köthen, Deutschland

Background and Objectives

Electrospinning is a leading technique for the production of biomimetic, nanoscale scaffolds for stem cell hosting or delivery in various tissue-engineering applications. Especially electrospinning of collagen, the abundant extracellular matrix (ECM) protein, promise advantageous options for clinical applications, assuming that characteristic features remain unaffected. However, electrospinning of native collagen by preserving the triple helical structure is a challenge and resulted so far in the production of denatured collagen, which shows swelling and fast degradation by collagenases and other proteases [1].

In this study we were able to generate three-dimensional (3D) nanostructured collagen fleeces with preserved native triple-helical structure and thereby sustain its unique properties including long-term stability and cellular interaction. This might be of particular importance for applications in complex clinical conditions, such as extensive bone regeneration.

Methods

To produce 3D collagen fleeces, a needle-free multijet electrospinning device was utilized. This novel and affordable technology allows a mass industrial fabrication of various nanofibrous collagen constructs mimicking natural ECM architecture. Fiber morphology and fleece architecture of the scaffolds were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). By means of different analytical, biochemical and cell-biological techniques, the spun fleeces were comprehensively characterized, with regard to the maintenance of the triple helix, the nano- and microporosity, biocompatibility as well as cell adhesion and migration.

We further established procedures to modify the spun collagen nanofibers using cross-linkers without losing the 3D nanostructure, in order to make them stable and applicable for *in vitro* and *in vivo* trials. In addition, we developed formulations to enrich collagen nanofibers with nanoceramics to stimulate bone regeneration.

Results

For the first time, native and stable 3D collagen nanofleeces have been produced. The biocompatible fleeces promote interaction and attachment with human stem cells important for good integration, demonstrate permeability, as well as osteoconductivity and -inductivity, favoring the use of this material in Regenerative Medicine.

Conclusions

In summary, we developed methods for the production of collagen fleeces within a unique and scalable electrospinning process, while preserving the triple-helical native collagen structure. Thus, we successfully combined nanofiber structure for cell ingrowth and collagen integrity to trigger signaling pathways and direct cell responses.

References

- [1] Zeugolis, D.I., Khew, S.T., Yew, E.S.Y., Ekaputra, A.K., Tong, Y.W., Yung, L.-Y.L., Hutmacher, D.W., Sheppard, C., Raghunath, M., 2008. Electro-spinning of pure collagen nano-fibres - Just an expensive way to make gelatin? *Biomaterials* 29, 2293-2305.

Textilbasierte Sensornetzwerke für das Monitoring chronischer Wunden

*J. Wendler¹, D. Aibibu¹, A. Nocke¹, C. Cherif¹

¹ITM TU Dresden, Dresden, Deutschland

In Deutschland leiden 3 - 4 Millionen Menschen an chronischen Wunden. Die Therapiekosten belaufen sich jährlich auf ca. 10.000 Euro pro Patient. Diese Kosten setzen sich zum Großteil aus Personal- und Materialkosten zusammen, die vor allem durch die Wundverbandwechsel entstehen. Nur mit einer Wundverbandöffnung kann das medizinische Personal bislang eine Einschätzung über den konkreten Wundheilungsbz. Wundinfektionsstatus treffen. Aus medizinischer und wirtschaftlicher Sicht ist es deshalb erstrebenswert, einen intelligenten sensorbasierten Wundverband (Abb. 1) zu konzipieren und umzusetzen. Textilbasierte Sensoren sind aufgrund der nötigen Flexibilität bei gleichzeitig geringen Herstellungskosten besonders geeignet. Durch die Detektion wundrelevanter Parameter können Rückschlüsse auf den Heilungszustand der Wunde gezogen und die notwendigen Maßnahmen zur Vermeidung von Komplikationen rechtzeitig und gezielt eingeleitet werden. Ferner können durch den Einsatz der textilbasierten Sensornetzwerke neue Erkenntnisse beim Heilungsprozess von chronischen Wunden erlangt werden, die eine Verbesserung der Wundtherapie ermöglicht.

Abbildung 1: Wundverband mit integrierten Sensoren

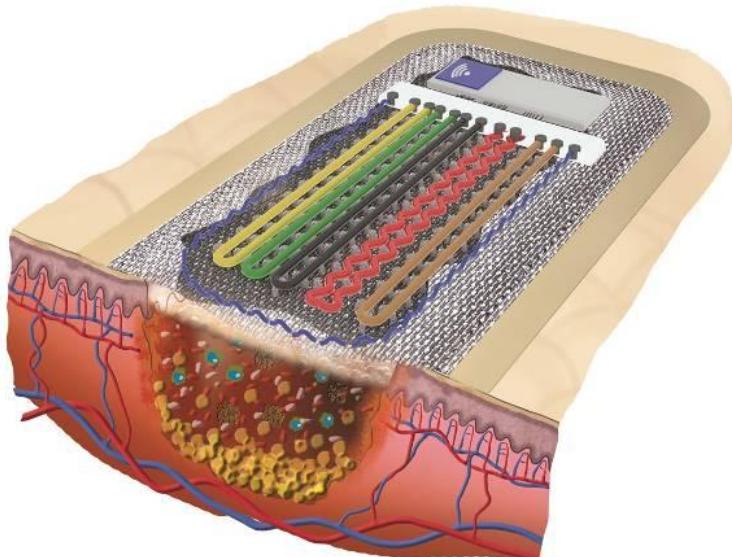
Die wichtigsten sensorisch erfassten Parameter sind pH-Wert und Lactatgehalt des Wundexsudats, sowie die Temperatur der Wundränder. Bei den realisierten textiltechnisch hergestellten pH-Wert-Sensoren reagiert eine, zwischen zwei textilen Elektroden liegende, Funktionsschicht aus quervernetztem Chitosan auf den pH-Wert und ändert entsprechend ihre dielektrischen Eigenschaften. Diese Änderungen werden messtechnisch durch ein zwei-Elektrodensystem aus Titandrähten aufgezeichnet und ausgewertet. Der Lactatgehalt wird durch eine amperometrische Messung mithilfe eines drei-Elektrodensystems ermittelt. Durch gezielte enzymatische Aufspaltung des Lactats wird H_2O_2 freigesetzt, welches an der katalytisch wirkenden Arbeitselektrode aus Gold bzw. Platin unter Freisetzung von Elektronen aufgespalten wird. Mithilfe einer Gegen- und Referenzelektrode aus Silber, bzw. Silber-Silberchlorid fließt ein vom Lactatgehalt abhängiger Messstrom. Die Messung der Wundtemperatur basiert auf dem Prinzip der Änderung des elektrischen Widerstands infolge einer Temperaturänderung. Die resistive Messung erfolgt an einem Edelstahldraht mit einer biokompatiblen Isolationsschicht aus Parylen.

Mit den entwickelten Konstruktionen der textilbasierten Sensoren ist eine kontinuierliche Überwachung von chronischen Wunden möglich, indem maßgebliche physiologische Parameter gemessen werden. Durch Verbindung dieser Sensoren zu einem Sensornetzwerk ist ein kontinuierliches Monitoring von chronischen Wunden zur Detektion von Infektionen möglich. Der Erkenntnisgewinn aus den erfassten Parametern kann zudem zur Verbesserung der Wundtherapie beitragen.

Danksagung

Die IGF-Vorhaben 17826 BR/1 und 18640 BR/1 der Forschungsvereinigung Forschungskuratorium Textil e.V. in Kooperation mit der Forschungsgesellschaft für Messtechnik, Sensorik und Medizintechnik e.V., Dresden werden über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Abb. 1



Bacterial Adhesion to Novel CAD/CAM Machinable Polymeric Biomaterials for Permanent Dental Restorations

*C. Lyu¹, S. Lutz¹, S. Spintzyk¹, F. Rupp¹, E. Schweizer¹, J. Geis-Gerstorfer¹

¹University Hospital Tuebingen, Section Medical Materials Science and Technology, Tuebingen, Deutschland

Nowadays manufacturers are competing to develop new esthetic metal-free materials suitable for the increasingly used CAD/CAM manufacturing techniques. Different categories of materials are used, ranging from pure ceramics to various resin composite blocks (RCBs) and alternative materials between ceramics and RCBs like polymer-infiltrated ceramic networks. Mechanical properties of these materials have still to be improved. One approach is the development of RCBs with higher filler content, using different combinations of micro- and nano-filler particles. Improvement of mechanical properties, however, should not be accompanied by an increased bacterial adhesion to these modified materials.

Objectives

This in-vitro study was conducted to compare bacterial adhesion to a novel, experimental nanofilled RCB material (Voco Exp, Voco, Germany) and four marketed CAD/CAM machinable metal-free dental materials for permanent indirect restorations. Besides roughness, the influence of materials' surface free energy (SFE) on bacterial adhesion was also investigated.

Materials and Methods

Disc specimens (12 mm x 1.5 mm) were manufactured from 5 materials (Table 1) and polished with silicon carbide grinding paper to finally 4000 grit. Surface roughness was characterized by profilometry (Perthometer, Mahr). Contact angles of specimens were measured with water, ethylene glycol and diiodomethane by the sessile drop method (Drop shape analysis system DSA 10 Mk2, Kruess GmbH, Germany). Specimens' total SFE γ_s , apolar term γ_s^{LW} , polar term γ_s^{AB} , acid term γ_s^+ and base term γ_s^- were calculated according to Lifshitz-van der Waals/acid-base approach respectively. To investigate initial bacterial adhesion, the specimens (n=4/group) were incubated with mixed oral bacterial cultures in a stirred reaction vessel under stop/flow conditions for 4 hours. Bacterial colonization of the different materials was quantified by luminescence (Bac Titer-GloTMMicrobial Cell Viability Assay, Promega Corporation, USA). Subsequently, specimens were stained with crystal violet and plaque layers were qualitatively assessed by microscopy. 4 h bacterial adhesion tests were repeated 3 times in independent experiments. Quantification: IPS e.maxCAD was selected as internal reference for all experiments. After background subtraction, the mean luminescence count of the reference samples (e.max) was set to 100%. All other luminescence data of the respective experiments were related to this internal reference and presented as relative viability (in %). For statistical evaluation, the results of three experiments (total n=12) were combined and means and standard deviations were calculated. Statistical significance ($p<0.05$) of differences between means was evaluated by ANOVA and Tukey-HSD post-hoc test.

Results

Materials under investigation, their average surface roughness Ra and SFE data are presented in Table 1. The average surface roughness (Ra) values of all materials range between 0.038 μm and 0.064 μm . Concerning surface free energy, the reference IPS e.maxCAD has the lowest γ_s value, significantly different from all other materials, and its surface is completely apolar (γ_s^{AB} is nearly zero). Enamic, Exp, Ultimate and Cerasmart surfaces show polar properties to some extent, mainly formed by basic components according to their γ_s^{AB} and γ_s^- value. The combined results of 3 bacterial adhesion tests are presented in Fig 1. The by far lowest bacterial adhesion was observed on e.max (100±8%), significantly different from other materials (Exp 188±64%, Ultimate 195±53%, Cerasmart 215±73%) except Enamic (157±27%). The mean relative viability values increase from Enamic to Cerasmart, but no significant difference can be observed between Enamic, Exp, Ultimate and Cerasmart.

Conclusions

Within the limits of this *in vitro* study, results indicate that bacterial adhesion to the highly filled Voco experimental CRB is comparable to the established materials Enamic, Ultimate and Cerasmart. IPS e.maxCAD showed the lowest bacterial adhesion of all materials. In our experimental model, surfaces with higher total SFE (γ_s) and polar properties (mainly contributed by the basic component) increased bacterial adhesion of the mixed oral cultures. The slight differences in surface roughness could not be related to bacterial attachment. The clinical relevance of these results, for example, whether the observed enhanced bacterial adhesion on CRB restorations compared to glass ceramic will induce dental calculus formation and periodontal diseases has to be confirmed by further *ex vivo* and clinical investigations.

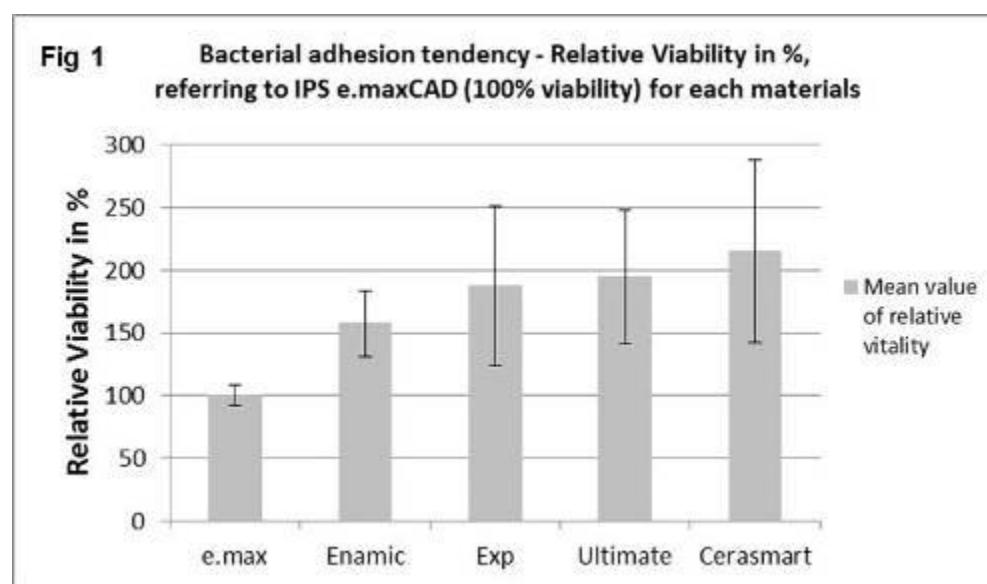
Abb. 1

	IPS e.maxCAD	Enamic	Voco Exp	Lava Ultimate	Cerasmart
Abbreviation	e.max	Enamic	Exp	Ultimate	Cerasmart
Manufacture	Ivoclar Vivadent	Vita	Voco	3M	GC
Material category	Lithium disilicate glass ceramic	Polymer-infiltrated ceramic network	Voco's experimental CAD/CAM CRBs	Established CAD/CAM CRBs products	
Filler content (% wt) ¹	-	90,8±0,7	82,8±0,4	71,9±0,5	65,3±0,3
Ra (µm)	0,064±0,004	0,038±0,002	0,052±0,004	0,045±0,004	0,054±0,005
γ_s^2	37,38±1,38	43,36±1,96	45,35±2,05	46,04±0,74	47,67±0,79
$\gamma_s^{LW}2$	38,10±1,02	39,41±1,64	43,31±0,60	45,08±0,53	44,09±0,37
$\gamma_s^{AB}2$	-0,72±1,55	4,07±1,42	2,04±2,01	0,82±0,64	3,59±0,48
γ_s^+2	0,01±0,02	0,19±0,21	0,06±0,05	0,01±0,01	0,25±0,06
γ_s^-2	50,22±3,29	28,36±6,11	35,72±5,57	19,49±3,13	13,19±0,77
Relative Viability (%)	100±8	157±27	188±64	195±53	215±73

γ_s , total surface free energy of specimens
 γ_s^{LW} , apolar term of the specimens' surface free energy
 γ_s^{AB} , polar term of the specimens' surface free energy
 γ_s^+ , acid term of the specimens' surface free energy
 γ_s^- , base term of the specimens' surface free energy

1 Filler content data were collected from former experiments by ash method.
 2 Unit of surface free energy [mJ/m²]

Abb. 2



Preparation of biocompatibility polymer composites and investigation of their surface's properties

*Y. Shapovalova¹, V. Syussyukina¹, K. Irina¹

¹Tomsk State University, Laboratory of polymers and composite materials, Tomsk, Russische Föderation

Introduction

Polymer composite materials are used in modern medicine as bone substitutes. Such materials are biocompatible and their functional properties similar to natural bone. In this study composite materials based on hydroxyapatite (HA) and polylactide (PL) were obtained.

Methods

Elemental and phase compositions of the materials were investigated by infrared spectroscopy, X-ray. Contact angles of two liquids (water and glycerol) were determined Easy Drop (KRUSS). The roughness of the samples was measured on the device "Profilometer-296" on the value of the R_a parameter.

Results

Analysis of elemental and phase compositions of the materials showed that in composites hydroxyapatite and polylactide phases are retained. A huge role in the biochemical processes that occur at the materials surface in living organism plays wettability. This phenomenon is characterized by the contact angle Θ , the apex of which is the point of contact of the three phases. Results of investigation are shown in Table 1. The dependence of the contact angle on the polymer content is shown on Fig.1. All samples are hydrophilic ($\Theta < 90^\circ$), hydroxyapatite absorbs liquid. These properties provide good cell adhesion and attachment.

It was found that a bone-like calcium phosphate layer is actively formed in the SBF solution after 28 days of 37°C solution on the surface of samples containing calcium phosphates. It will further to a good osseointegration with material of bone tissue.

Acknowledgements

This Research is supported by Tomsk State University Competitiveness Improvement Program.

References

Kulinets, Biomaterials and their application in medicine, in: S. Amato, B. Ezzell (Eds.), Regulatory Affairs for Biomaterials and Medical Devices, Woodhead Publ., 2015, pp. 1-10.

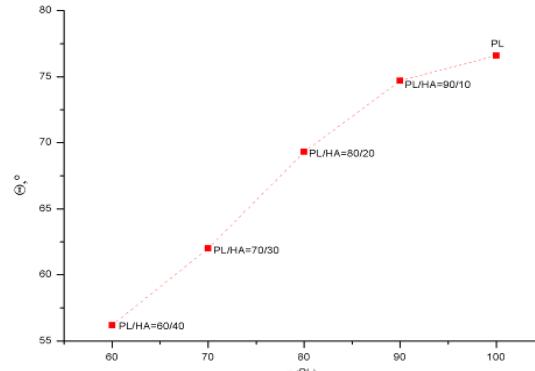
Table 1: Contact angles and roughness

Figure 1: The dependence of the contact angle on the polymer content

Table 1

Polylactide, weight %	Hydroxyapatite, weight %	Θ , deg water	Θ , deg glycerol	R_a , μm
100	0	76,6±1,45	69,3±0,64	7,56±0,50
90	10	74,7±4,35	78,5±1,14	2,65±0,18
80	20	69,3±0,98	76,3±0,74	2,39±0,20
70	30	62,0±2,93	75,6±2,17	4,21±0,39
60	40	56,2±3,84	55,3±4,61	3,31±0,15
0	100	-	-	1,27±0,10

Figure 1



Antioxidantien gegen strahlungsinduzierten oxidativen Stress zur Anwendung in der intraoperativen Radiotherapie

*K. Borrmann¹, B. Greve¹, U. Haverkamp², B. Pajaziti³, I. A. Kurzina⁴, L. Heinrich^{4,5,6}

¹Universitätsklinikum Münster, Klinik für Strahlentherapie - Experimentelle Radioonkologie, Münster, Deutschland

²Universitätsklinikum Münster, Klinik für Strahlentherapie - Radioonkologie, Münster, Deutschland

³Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Münster, Deutschland

⁴National Research Tomsk State University, Dep. Physical and Colloid Chemistry, Tomsk, Russische Föderation

⁵Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Biochemie, Münster, Deutschland

⁶marcotech oHG, Münster, Deutschland

Einleitung

Therapien mit ionisierenden Strahlen zielen auf die Zerstörung des Tumorgewebes ab, wobei gesundes Gewebe partiell geschädigt wird. Das Verhältnis zwischen Normalgewebsreaktion und Tumorkontrolle definiert die therapeutische Breite. Sind weniger Normalgewebsreaktionen zu erwarten, kann die Strahlendosis zur Behandlung des Tumors erhöht werden, wodurch die Tumorkontrolle gesteigert wird. Direkte Wechselwirkungen ionisierender Strahlung mit Tumor und Normalgewebe führen zur DNA-Schädigung wie z.B. zu Doppelstrang- oder Einzelstrangbrüchen und Basenveränderungen. Darüber hinaus werden Strahlenschäden auch in Folge der Radiolyse von Biomolekülen und Wasser bewirkt. Solche sekundär generierten radikalischen Spezies, insbesondere zelltoxische reaktive Sauerstoff- (ROS) sowie Stickstoffspesies (RNS) schädigen ebenfalls die DNA. Weiterhin modulieren sie u.a. den NF-κB-Signalweg mit Auswirkungen auf das Immunsystem, Mitosefähigkeit und Apoptose. Im Gegensatz zur systemischen Prophylaxe gegen strahlungsinduzierten oxidativen Stress, lässt die lokale Anwendung von Antioxidantien einen für gesunde Zellen effizienteren Schutz erwarten. In vergleichenden Bestrahlungsexperimenten an Zellkulturen von Tumorzellen und Zellen aus gesundem Gewebe wurden Antioxidantien auf ihre Schutzwirkung gegen Röntgenstrahlen untersucht. Hintergrund ist die Entwicklung eines Overlays als lokales Drug-delivery-System für die intraoperative Strahlentherapie (IORT). Ergänzend zu den Ergebnissen der *in vitro*-Experimente werden die pharmakokinetische Modellierung und das Realisierungskonzept diskutiert.

Materialien und Methoden

Aufgrund der antioxidativen Wirkung von Vitamin E wurden DL- α -Tocopherol (α -T0) und ein Tocotrienol-reiches Palmölraffinat (Palm-TRF, 32% DL- γ -Tocotrienol) ausgewählt sowie D- α -Tocopheryl-polyethyleneglycol-1000-succinat (TPGS) und Hydroxytyrosol (HT) für *in vitro*-Bestrahlungsexperimente an Zellkulturen verwendet. Mittels Filmmethode wurden die wasserunlöslichen α -T0 und Palm-TRF in die lipophile Doppelschicht von Liposomen (PBS, pH=7,4) auf Basis von Phosphatidylcholin und Cholesterol eingelagert. TPGS und HT sind hinreichend wasserlöslich. TPGS bildet partiell Mizellen. Die Konzentrationen wurden auf Werte um 100 μ Mol/L eingestellt.

Sowohl die Keratinozyten-Zelllinie HaCat als auch die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 wurden mit den präparierten Antioxidantien inkubiert und auf Zelltoxizität geprüft. Anschließend wurden die Kulturen mit einer therapierelevanten Dosis von 2 Gy bestrahlt und die strahlenschützende Wirkung der Antioxidantien mittels Koloniebildungstest untersucht.

Die Charakterisierung der gelösten und verkapselten Antioxidantien erfolgte durch Bestimmung ihrer TROLOX-Äquivalente, für die Ermittlung der effektiven Diffusionskoeffizienten stand eine FRANZ-Diffusionszelle zur Verfügung. Mit Blick auf die vorgesehene klinische Anwendung in der IORT wurden ein pharmakokinetisches Modell für den Stofftransport durch Gewebe entwickelt und zeitabhängige Penetrationsprofile mittels MatLab simuliert.

Ergebnisse und Diskussion

Weder α -T0, Palm-TRF noch HT zeigten zelltoxische Wirkung. TPGS überraschte im gewählten Konzentrationsbereich mit negativen zelltoxischen Befunden. Anhand der TROLOX-Äquivalente konnte gezeigt werden, dass offenbar auch das Liposomen bildende Phosphatidylcholin zur antioxidativen Wirkung der verkapselten Wirkstoffe beiträgt. Nach Bestrahlung der Kulturen ergaben die Koloniebildungstests, dass die präparierten Antioxidantien HaCat-Zellen in unterschiedlicher Ausprägung, in allen Fällen aber stärker gegen strahleninduzierte ROS schützen als MCF-7-Zellen. Die mit Palm-TRF beladenen Liposomen führten bei HaCat-Zellen zu einer Überlebensrate von 87% und bei MCF-7 zu einer Rate von 65%. HT bewirkte bei HaCat-Zellen eine Überlebensrate von 68% und bei MCF-7 von 28%.

Der effektive Diffusionskoeffizient von gelöstem HT in PBS ergab sich zu $D_{eff} = 3,5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$. Liposomen mit Durchmessern von 150 bis 200 nm und $2 \cdot 10^{-11} \leq D_{eff} \leq 6 \cdot 10^{-11} [\text{m}^2/\text{s}]$ diffundieren erwartungsgemäß deutlich langsamer. Um die lokale antioxidative Wirkung sicherzustellen, sind die mit Antioxidantien beladenen Overlays über den Zeitraum der fraktionierten strahlentherapeutischen Behandlung als Wundaflage zu applizieren. Der Zusatz von Antiseptika zielt auf die Reduzierung des Infektionsrisikos ab. Die Weitentwicklung des Overlays zur Plattform für die Prophylaxe gegen kurz- und langfristige Strahlenschäden ist vorgesehen.

P39

Mechanical stress and muscle fiber atrophy: Involvement of ER stress, UPR and autophagy

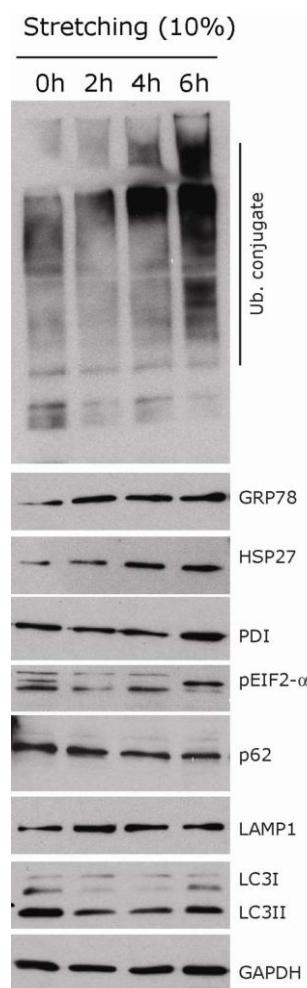
*A. Dreser¹, A. Duda¹, A. Goswami¹, B. Hoffmann², R. Merkel², J. Weis¹

¹Uniklinik RWTH Aachen, Neuropathologie, Aachen, Deutschland

²Forschungszentrum Jülich, Institute of Complex Systems, ICS-7: Biomechanics, Jülich, Deutschland

Skeletal muscle is constantly exposed to mechanical forces, which are converted into molecular signals and in turn enable the skeletal muscles to adapt to mechanical stimuli. As a matter of fact mechanical forces actually regulate muscle function and moderate levels of mechanical burden are essential for proper muscle homeostasis. Chronic or prolonged mechanical stress can be coupled to intracellular signalling pathways that are responsible for the hypertrophic response via integrins and the cytoskeleton or via sarcolemmal proteins, such as phospholipases, ion channels and ion exchangers. Furthermore the mechanical stress signalling may stimulate calcium/calmodulin-dependent hypertrophic pathways. During physical activity high amounts of ROS are produced and may damage cellular components which need to be cleared. Autophagy is required for the clearance of old and damaged organelles and is also known as part of physiological response which is activated during mechanical stress to maintain muscle fiber homeostasis. However, the molecular mechanisms facilitating this appropriate adaptation to mechanical stress are largely unclear. Here in this study, we hypothesize that ER stress and autophagy play a crucial role in the process of skeletal muscle adaptation to mechanical stress. In order to investigate the effect of mechanical stretching on human skeletal muscle cells, RCMH cells were cultured on pre-stretched PDMS elastomer chambers. After 24h RCMH cells were subjected to uniaxial stretching with 10% amplitude at a frequency of 1Hz for different periods of time to mimic mild mechanical stress. Western blot analysis of cell lysates derived from stretched RCMH cells showed elevated levels of ER stress and UPR markers including GRP78, PDI, HSP27 and pEIF2 α compared to the unstretched control. Moreover, immunoblotting with ubiquitin antibodies revealed the accumulation of ubiquitinated proteins with proceeding mechanical stretching. Because prolonged UPR is known to compromise UPS function, we investigated the proteasome's chymotrypsin-like activity. RCMH cells exposed to mechanical stretching showed a significant inhibition of UPS without an increase of Caspase-3 activity. These results were confirmed by functional experiments using the known ER stressor thapsigargin with or without uniaxial stretching. Thapsigargin treatment combined with mechanical stretching initiated even more ER stress and increased the accumulation of ubiquitinated conjugates compared to thapsigargin treatment alone. Moreover, we observed a decrease in the autophagy markers p62, LC3-II and LAMP-1 indicating an increased autophagic flux after mechanical stretching. In conclusion, our findings demonstrate that mild mechanical stretching induces ER stress, UPR and autophagy thereby promoting the adaptation of muscle fibers to mechanical strain.

Abb. 1



Biokompatibilität dünner, abbaubarer Beschichtungen zur Optimierung der Osteointegration bei gleichzeitiger Infektionsprophylaxe

*S. Burtscher¹, M. Seidenstücker¹, P. Krieg², N. P. Südkamp¹, R. Gadow², A. Bernstein¹

¹Universitätsklinikum Freiburg, Department Orthopädie und Traumatologie, Freiburg, Deutschland

²Universität Stuttgart, Institut für Fertigungstechnologie keramischer Bauteile, Stuttgart, Deutschland

Einleitung

Zu den häufigsten Ursachen für Implantatversagen in der Endoprothetik zählt die aseptische Prothesenlockerung. Diese ist auf eine fehlende Induktion der Sekundärstabilität, also der endgültigen Verankerung der Prothese in den umgebenden Knochen, zurückzuführen. Weitere häufige Komplikationen sind die mikrobielle Besiedlung der Prothesenoberfläche und die damit verbundenen Infektionen, die nicht selten in einen Prothesenwechsel münden [1]. Ein Ansatz zur Reduktion dieser Komplikationen ist das Aufbringen von bioaktiven Substanzen auf Implantatoberflächen [2]. Diese sollen sowohl antibakteriell als auch stimulierend auf das Osteoblastenwachstum wirken.

Zielsetzungen dieser Arbeit

Es wurden dünne, abbaubare Beschichtungen in Hinsicht auf Biokompatibilität und bakteriostatische Wirksamkeit untersucht. Auch die Oberflächeneigenschaften der Beschichtungen wurden ermittelt. Die Untersuchungen sollten ebenfalls zu einer Optimierung des High Velocity Flame Suspension Spraying-Verfahrens zur Herstellung dünner abbaubarer Schichten führen.

Material und Methoden

Die Schichten waren aus resorbierbaren Keramiken und integrierten bakterizid wirksamen Ionen zusammengesetzt. Sie bestanden aus jeweils entweder β -Tricalciumphosphat, Hydroxylapatit (HA), GB14 oder Bioglas angereichert mit Silber-, Kupfer oder Bismuthionen. Jeweils zwei der o.g. Komponenten wurden in ca. 20 μ m Dicke mittels HVSFS auf Titanplatten aufgebracht. Zur Biokompatibilitätstestung wurden Bewuchsversuche über jeweils 24h, 48h, 72h oder 3, 7, 14 und 21 Tagen mithilfe der Zellkulturlinie MG-63 (ATCC, CRL 1427) durchgeführt. Zur Kontrolle wurde immer eine reine Titankontrolle mitbeurteilt. Die Zellviabilität wurde mittels Live/Dead- assay überprüft. Zur Quantifizierung der Zellproliferation und -vitalität in vitro kam das WST-1 Tetrazolium Salz Kit zum Einsatz. Die Zytotoxizität wurde mittels LDH Cytotoxicity detection Kit quantifiziert. Die Oberflächen-Kennwerte wurden mittels Freisetzungsversuchen in destilliertem Wasser nach 6, 24, 48, 72h mit anschließender Ionenmessung durch Atomabsorptionsspektrometrie und Ablichtung der Oberflächen mittels 3D-Laser-scanningmikroskop (3D-LSM) ermittelt. Es wurde die Bildung von HA-kristallen nach 28 Tagen in SBF mit dem ESEM überprüft.

Ergebnisse

Mehrheitlich waren nach 21 Tagen der Bewuchsversuche Zellvitalität und -konfluenz an den Oberflächen nachweisbar. Durch die Freisetzungsversuche konnte gezeigt werden, dass nur ein sehr geringer Teil der Keramiken und Ionen im genannten Zeitraum aus den Beschichtungen gelöst wird.

Diskussion

Das HVSFS-Verfahren eignet sich durchaus zur Herstellung dünner abbaubarer Beschichtungen. Es muss jedoch beachtet werden, dass die Sprayparameter (Temperatur, Gaskomposition, Lösungsmittel...) die angedachten Eigenschaften der Oberflächen grundlegend modifizieren können.

Abbildung 1: Zellrasen auf Bioglas mit Kupfer-Beschichtung. Darstellung mittels Live/Dead Assay und Fluoreszenzmikroskop, 10fache Vergrößerung. Vitale Zellen in grün, tote Zellen in rot.

Abbildung 2: Oberflächenbeschaffenheit der Bioglas-Kupfer-Schicht, Darstellung mittels 3D-LSM, 200fache Vergrößerung.

Quellen

[1] HKK Gesundheitsreport Endoprothetik, Knie- und Hüft-(Total-)Endoprothesen 2008 bis 2011.

[2] Eckardt A. Zementfreie Hüftendoprothetik mit Hydroxylapatit-beschichteten Implantaten. Shaker Verlag Aachen; 1999.

Abb. 1

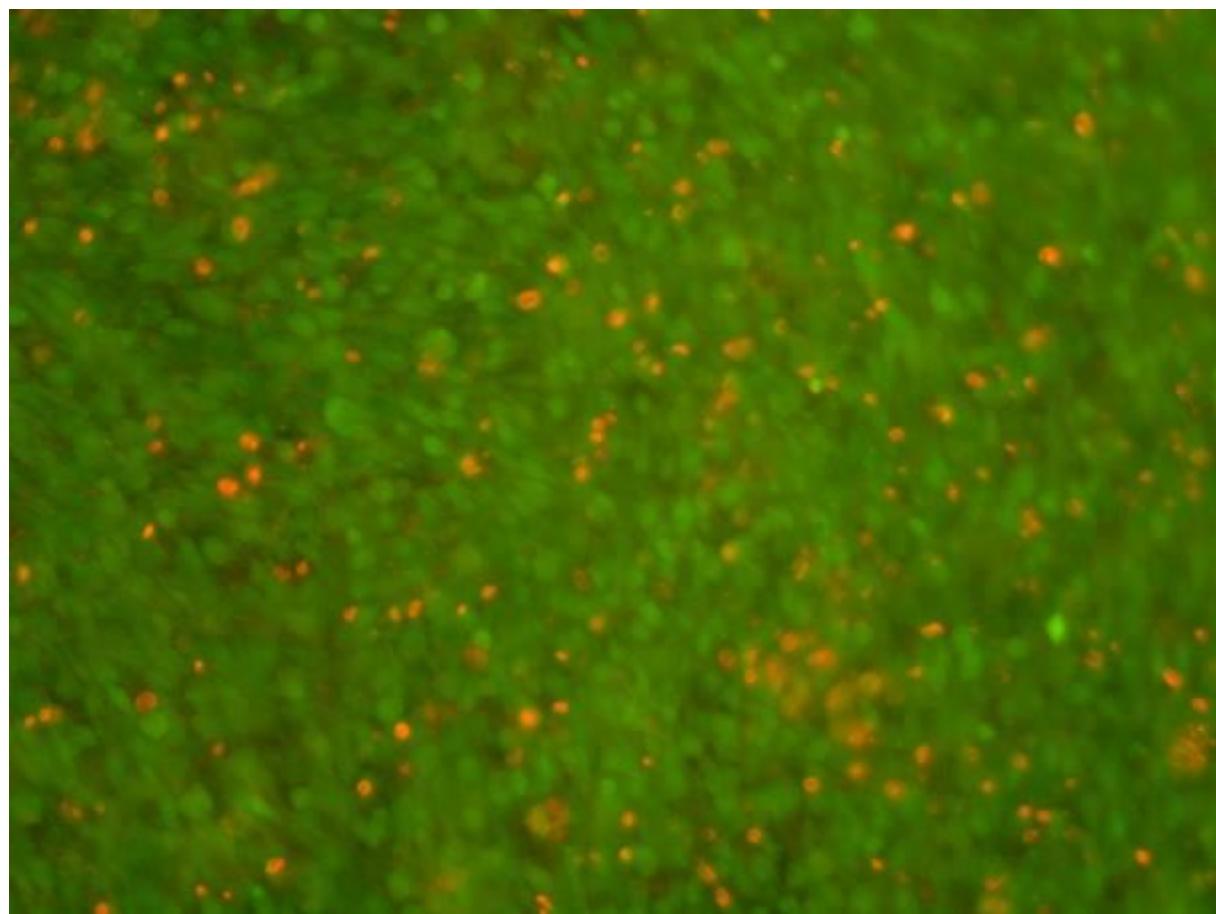
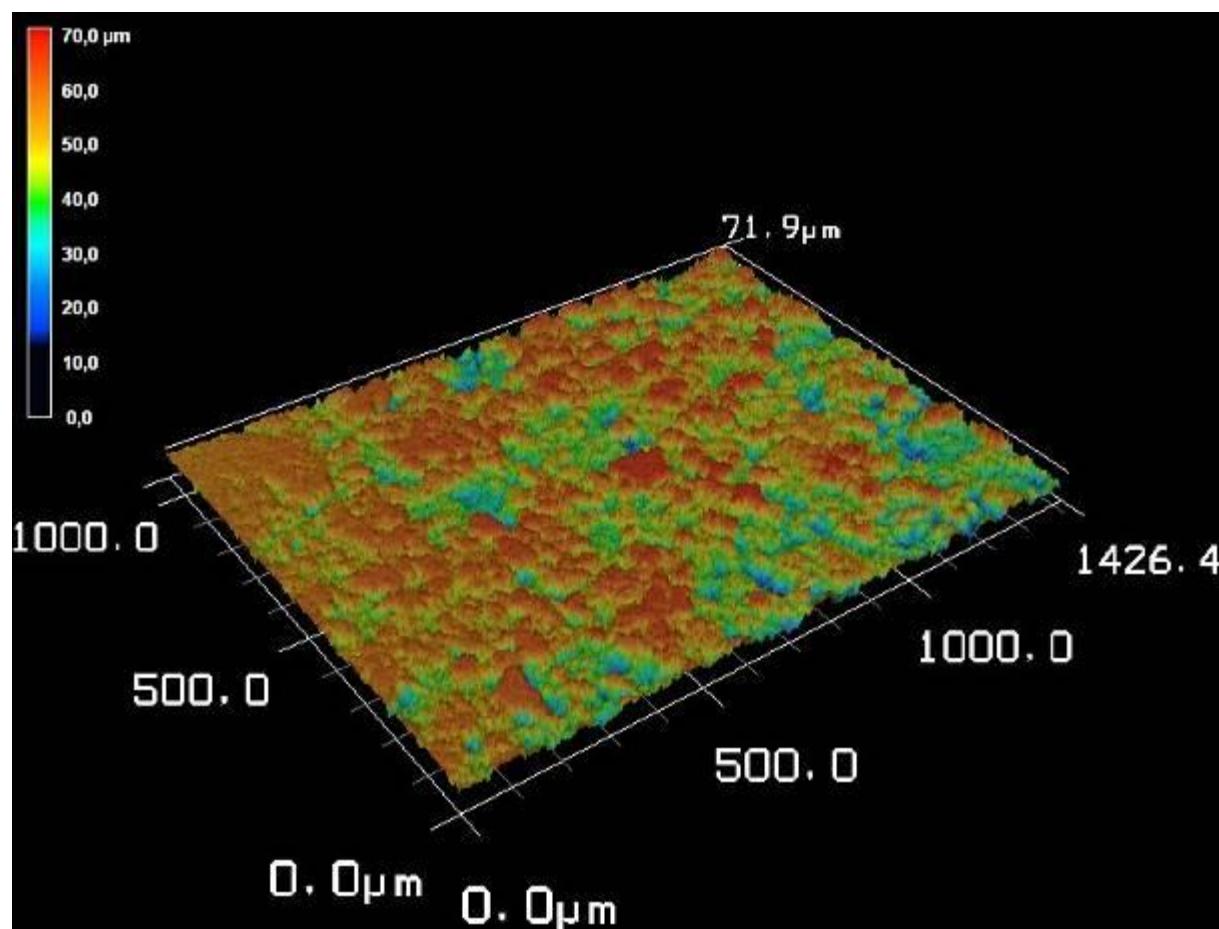


Abb. 2



P41

Prüfung der Eignung von elektrogesponnenen Gelatinevliese zur Deckung osteochondraler Defekte

*D. J. Krüll¹, A. Bernstein¹, S. Beck¹, S. Meskath¹

¹Universität Freiburg, Departement Orthopädie und Traumatologie, Freiburg, Deutschland

Einleitung

Die Behandlung osteochondraler Defekte hat einen hohen Anspruch an Art und Beschaffenheit des Materials. Ziel ist die Nachahmung der Extrazellulären Matrix des Gewebes. Das Material soll neben der primären Deckung des Defekts dem Körper als Gerüst dienen, anhand dessen neues Knochengewebe entstehen kann. Für dieses Vorhaben ist die Eignung elektrogesponnener Gelatinevliese von großem Interesse, da durch die Herstellung ein strapazierfähiges dreidimensionales Maschenwerk entsteht. Gelatine stellt als denaturiertes Kollagen eine kostengünstige und natürliche Grundlage dar. Zudem können die Vliese bei dem Herstellungsverfahren durch beispielsweise Hydroxyapatit mineralisiert werden und somit den Eigenschaften der Knochenmatrix angenähert werden.

Es wurden vier verschiedene elektrogespinnene Gelatinevliese auf die biologische Verträglichkeit und Eignung als Knochentransplantat in Zellkultur mit humanen Osteoblasten (hOB) untersucht.

Material und Methoden

Die Gelatinevliese wurden aus einem Polymer mit 16% Gelatine am Nanospinner24 von Inovenso gesponnen. Zwei Vliese wurden mit 50% Polyethylenglycol (PEG) hergestellt, das zur Porenvergrößerung ausgewaschen wurde. Jeweils ein Vlies mit und ohne PEG wurde mit 5% Hydroxyapatit versetzt. Die Gelatinevliese wurden durch Aufnahmen mit dem Laserscanning-Mikroskop und Elektronenrastermikroskop physikalisch charakterisiert. Die hOBs wurden aus Tibia-Plateaus, die wir aus OPs von Knie-Endoprothesen erhielten, gewonnen. Die Gelatinevliese wurden mit 7 mm Durchmesser auf den Boden von Membraneinsätzen einer 24-Well-Platte gelegt. Es wurden Bewuchsversuche mit hOBs durchgeführt, die nach drei, sieben und vierzehn Tagen auf Proliferation und Biokompatibilität untersucht wurden. Dabei wurden WST-Assays, Dead/Live-Assays und LDH-Messungen durchgeführt. Die hOBs wurden auf die Expression Osteoblasten typischer Marker (AP, Kollagen I) untersucht. Das Wachstum der hOBs auf und in die Vliese wurde durch Paraffin- und Kryoschnitte in Standard Giemsa- und HE-Färbung histologisch dargestellt.

Abbildung 1: Aufnahme vom Gelatinevlies #81 am Laserscanning-Mikroskop Keyence VK-X200 in 1000 facher Vergrößerung.

Abbildung 2: Aufnahme vom Gelatinevlies #81 am Laserscanning-Mikroskop Keyence VK-X200 in 3000 facher Vergrößerung.

Ergebnisse

Es konnte zu allen Zeitpunkten eine gute Stoffwechselaktivität sowie ein positives Verhältnis von lebenden zu toten Zellen nachgewiesen werden. In den histologischen Schnitten zeigte sich eine durchgehende Zellschicht auf der Vliesoberfläche ohne Penetranz in die Tiefe der Vliesschichten

Schlussfolgerung

Es konnte eine gute Bioverträglichkeit der untersuchten Gelatinevliese anhand der hOB-Zellkultur nachgewiesen werden. Die hOBs haben einen Multilayer auf der Oberfläche der Gelatinevliese ausgebildet. Eine Einwanderung der hOBs in die Vliese hat nicht stattgefunden.

Diese Arbeit wurde durch das Forschungskonsortium ProTissueMat an der medizinischen Fakultät der Universität Freiburg unterstützt.

Abb. 1

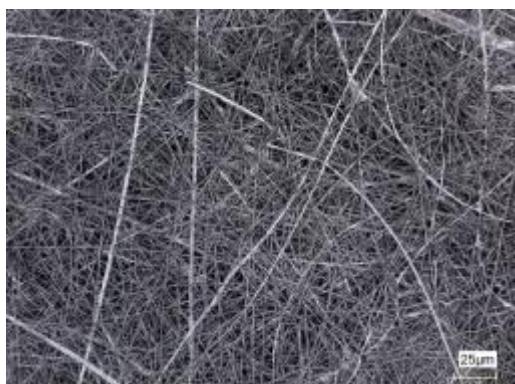
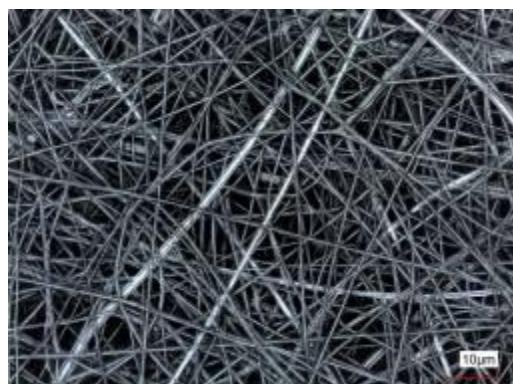


Abb. 2



P43

Duale Freisetzung von Antibiotika und Wachstumsfaktoren aus Alginatbeads

*M. Seidenstücker¹, N. P. Südkamp¹, A. Bernstein¹, H. O. Mayr¹

¹Universitätsklinikum Freiburg, Freiburg, Deutschland

Einleitung

Hydrogele werden für die verzögerte Freisetzung von Wirkstoffen schon eine lange Zeit eingesetzt. Alginat hat sich als geeignetes Trägermaterial für längerfristige Freisetzung von Antibiotika erwiesen. Es ist ein günstiges Hydrogel und besitzt zudem die Zulassung der FDA für die Anwendung am Menschen. Ziel dieser Studie war es eine duale Freisetzung von Wachstumsfaktoren, bzw. einer Modellsubstanz (FITC gelabeltes Protein A) und Antibiotika über einen längeren Zeitraum von mindestens 4 Wochen zu realisieren.

Material und Methoden

Es wurden Alginatbeads (Durchmesser ca. 1-2 mm) mit 50 mg/ml Antibiotika sowie 50 µg/ml BMP-2 bzw. FITC gelabeltem Protein-A als Modellsubstanz durch Eintropfen der des Wirkstoffhaltigen Alginatsols ins 30 mM CaCl₂ Lösung erzeugt. Die Vernetzungsdauer in der CaCl₂ Lösung betrug 1h. Anschließend wurden die Beads aus der Lösung entnommen, abgetrocknet und 10 Proben zu jeweils 1g eingewogen. Danach erfolgte die Inkubation in 10 ml bidest Wasser über 4 Wochen bei 37°C. Zu definierten Zeiten (1, 2, 3, 6, 9, 14, 20 und 28 Tagen) wurde die Flüssigkeit vollständig ausgetauscht und mittels CZE und Fluoreszenzmessung am Tecan Reader analysiert. Die Daten wurden als Mittelwert und Standardabweichung ausgedrückt und mittels ANOVA analysiert ($p=0,05$).

Ergebnisse

Über den gesamten Zeitraum von 28 Tagen konnte eine Freisetzung der Modellsubstanz FITC-gelabeltes Protein A ermittelt werden. Die Konzentrationen lagen $820,6 \pm 156,9$ ng/ml nach 24h und erreichten am Ende des Untersuchungszeitraums immerhin noch $401,3 \pm 34,6$ ng/ml. Betrachtet man die kumulative Freisetzung so zeigt sich eine diffusionsbasierte Freisetzung aus den Alginatbeads (d=1-2 mm) mit Diffusionsexponenten, nach dem semi-empirischen Modell nach Ritger/Peppas, von $n=0,42$ (Fick'sche Diffusion).

Abbildung 1: Releasekinetiken des FITC gelabelten Protein A (Modellsubstanz für BMP-2) - absolute Freisetzung des FITC gelabelten Protein A

Abbildung 2: Kummulative Freisetzung des Protein A-FITC mit exponentiellem Fit zur Ermittlung des Diffusionsexponenten nach Ritger/Peppas

Schlussfolgerungen

Mit Hilfe des Alginats konnte eine längerfristige Freisetzung über 4 Wochen erreicht werden. Es konnte sogar eine relative konstante Freisetzung über den Untersuchungszeitraum beobachtet werden, dem eine Fick'sche Diffusion zugrunde lag.

Abb. 1

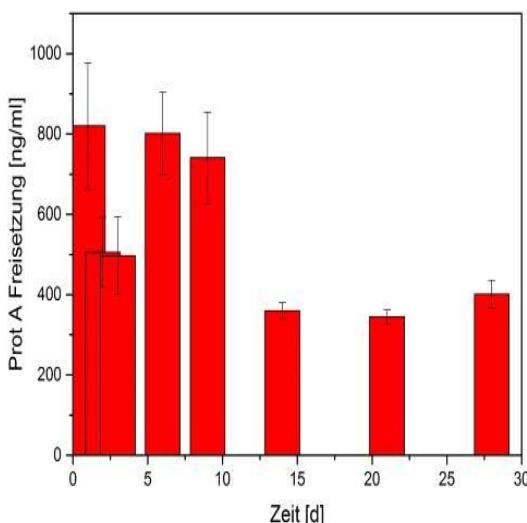
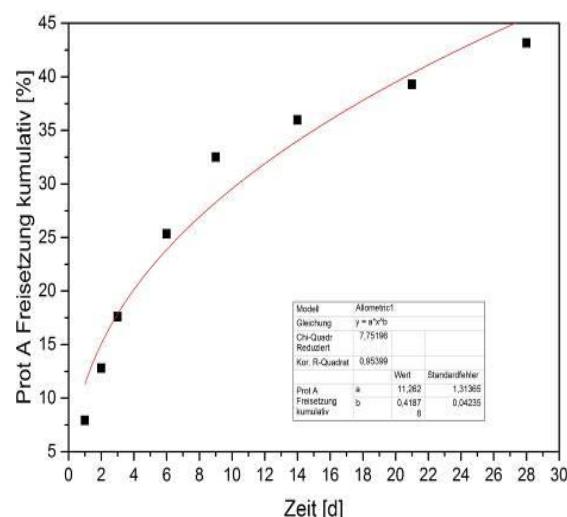


Abb. 2



Charge-modified oligomer/gelatin hydrogels - physicochemical properties and *in vitro* biocompatibility

*C. Kohn¹, A. Starke¹, K. Schwabe¹, A. H. Springwald¹, T. Meyer², I. Estrela-Lopis², M. Schulz-Siegmund¹, M. Hacker¹

¹Universität Leipzig, Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Technologie, Leipzig, Deutschland

²Universität Leipzig, Institut für medizinische Physik und Biophysik, Leipzig, Deutschland

Introduction

The focus of cell-biomaterial interactions has shifted from two to three dimensional cultures to better mimic living tissue environments.[1] In that regard, gelatin-based hydrogels are promising materials as they mimic the extracellular matrix, offer inherent bioactivity, and, in appropriate formulations, are processable by advanced technologies, such as 3D-printing.[2] Based upon our recently described platform of cross-linked hydrogels (cGEL) from hydrolyzed collagen (COL) and a maleic anhydride (MA)-containing macromer (oPNMA), formulations were identified and modified for injection molding and prospective 3D-printing of complex 3D structures.[3] Therefore, the physicochemical characteristics of cGEL matrices (i.a. gelation speed, stiffness) were tailored by oPNMA chemistry, ratio of gelation components, and processing steps. In addition, cationic moieties were introduced into the hydrogel system by chemical modification of oPNMA as cationic substrates (i.a. poly-L-lysine) are known to interfere with anionic sites on cells supporting cell adhesion, growth, and spreading.[4,5] Therefore, the aim of this study was to investigate the physicochemical properties, cytocompatibility, and biological performance of charge-modified sterile cGEL compositions suitable for 3D-printing applications.

Materials and Methods

For hydrogel formation, reactive MA groups in oPNMA covalently conjugate with free amines in COL under base-mediated amide formation.[3,6] For the synthesis of modified cGEL, *N,N*-diethylethylenediamine (DEED) was covalently grafted to oPNMA in defined ratios relative to MA prior to gelation. Thus, the terminal primary amine in DEED reacted with MA and remaining MA was used for subsequent cross-linking of COL to cGEL^{+DEED}. To obtain sterile cGEL/cGEL^{+DEED} matrices, hydrogels were fabricated either under aseptic conditions or by treatment with dry heat, steam, or gamma radiation. For evaluation of oPNMA derivatization, ATR-FTIR, HPLC/SEC, and colorimetric assays were performed. Accordingly, the storage modulus, static contact angle, water content, cross-linking degree, and *in vitro* degradation were assessed for cGEL and cGEL^{+DEED} materials. Cytocompatibility testing on cGEL and cGEL^{+DEED} extracts was performed with human-derived adipose stem cells (hASCs). hASCs were also directly cultured on cGEL and cGEL^{+DEED} for 21 days. Cell spreading and proliferation was evaluated by confocal laser scanning microscopy and PicoGreen® assay, respectively.

Results

The macromer oPNMA was successfully modified by DEED as confirmed by ATR-FTIR spectra, HPLC/SEC chromatograms, and colorimetric staining of residual DEED. It was indicated that the DEED functionalization was successful and efficient. The remaining MA groups were sufficient to yield cGEL^{+DEED} composites of equivalent stiffness and high cross-linking degree as compared to cGEL. Under physiological conditions, DEED-derived residues of tertiary amines were protonated attenuating the negative surface charge of cGEL^{+DEED}. Exemplarily, this was confirmed by a significant increase in water contact angle as compared to cGEL. With regard to cytocompatibility, the unreacted residuals or fractionally released components did neither yield cytotoxic effects nor significant differences between the sterilization groups or hydrogel compositions. The direct biological performance of cGEL^{+DEED} confirmed our hypothesis on cGEL^{+DEED}-derived cellular support, thus cellular spreading, morphology, and number of cells was mainly dependent on DEED derivatization rather than physicomechanical properties. In conclusion, efficient DEED-grafting yielded cationic moieties in cGEL^{+DEED} with decreased negativity on a cytocompatible surface that promoted cell attachment, spreading, and proliferation. Thereby, our material holds promise as cell supportive, bioactive, and printable composites in regenerative medicine.

- [1] F. Pampaloni, E. G. Reynaud and E. H. K. Stelzer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007, 8, 839.
- [2] B. J. Klotz, D. Gawlitza, A. J. W. P. Rosenberg, J. Malda and F. P. W. Melchels, *Trends in Biotechnology*, 2016, 34, 394.
- [3] T. Loth, R. Hötszel, C. Kascholke, U. Anderegg, M. Schulz-Siegmund and M. C. Hacker, *Biomacromolecules*, 2014, 15, 2104.
- [4] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Rumpl and V. Svorcik, *Biotechnol Adv*, 2011, 29, 739.
- [5] Y.-X. Wang, J. L. Robertson, W. B. Spillman Jr and R. O. Claus, *Pharm Res*, 2004, 21, 1362.
- [6] T. Loth, R. Hennig, C. Kascholke, R. Hötszel and M. C. Hacker, *React Funct Polym*, 2013, 73, 1480.

P45

Hydrogels based on collagen I and low-sulfated hyaluronan promote osteogenic lineage commitment of human bone marrow stromal cells

*S. Vogel¹, L. Kalbitzer², T. Pompe², U. Hempel¹

¹Institut für Physiologische Chemie, Dresden, Deutschland

²Institut für Biochemie, Leipzig, Deutschland

Background

In the bone marrow niche, human bone marrow stromal cells (hBMSC) are surrounded by extracellular matrix rich in collagen type I (col) and sulfated glycosaminoglycans as heparan sulfate. Synthetically sulfated hyaluronan derivatives (sHA) have been shown to support osteogenic differentiation of osteoblast precursor cells [1]. In this study we describe the pro-osteogenic effect of hydrogels composed of col and low-sulfated hyaluronan (sHA1) on hBMSC *in vitro* and give new insights into underlying cellular mechanisms.

Materials and Methods

Col hydrogels crosslinked with *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide* (EDC) to increase stiffness [2] were used as a substrate for hBMSC. The functionalization with sHA1 derivative (degree of sulfation 1, molecular weight 28 kDa) was performed by physisorption or EDC-based crosslinking.

hBMSC were seeded onto the hydrogels and cultured from day 4 after seeding with osteogenic supplements. For characterization, TNAP (tissue non-specific alkaline phosphatase) activity and CaP mineralization were determined at day 11 respectively day 22. Immunofluorescence staining followed by confocal microscopy was performed to further describe the cellular morphology within the 3D hydrogel networks.

Results and Discussion

hBMSC adhered and spread on all substrates (Fig. 1). The cells penetrated through hydrogel pores up to 40 µm depth.

Figure 1: hBMSC in col(edc)-sHA1(edc) hydrogel at day 11. **col, actin, nuclei**

Soluble and physisorbed sHA1 significantly increased TNAP activity and CaP accumulation of hBMSC in comparison to col. Crosslinking of col further promoted CaP mineralization. Covalently linked sHA1 had only small effects suggesting a cellular mechanism based on cellular uptake of sHA1 and intracellular binding targets.

Conclusion

The osteoinductive effect of the hydrogels based on collagen I functionalized with sHA1 makes them to promising candidates for bone tissue engineering approaches.

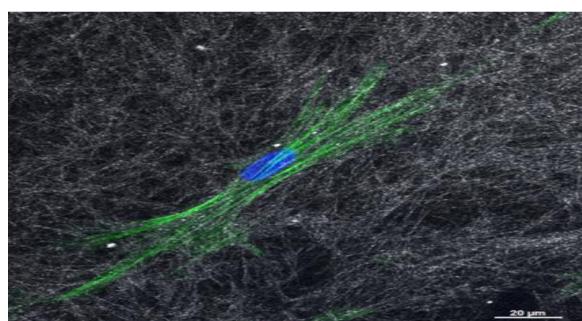
Acknowledgement

This study was supported by DFG grant Trr67 to projects B1 and B10. The authors acknowledge Silke Tulok and Anja Walther from Core Facility Cellular Imaging (CFCI, TU Dresden) for technical support.

References

- [1] Hempel et al, *BioMed Res Int*, 2014.
- [2] Kalbitzer et al., *J Mater Chem B*, 2015.

Abb 1.



Genetically engineered *potato virus X* nanoparticles can stimulate cell adhesion and hydroxyapatite nucleation

*I. Lauria¹, C. Dickmeis², J. Röder², M. Beckers², S. Rütten³, U. Commandeur², H. Fischer¹

¹Universitätsklinikum RWTH Aachen, Zahnärztliche Werkstoffkunde und Biomaterialforschung, Aachen, Deutschland

²RWTH Aachen, Institut für Molekulare Biotechnologie, Aachen, Deutschland

³Universitätsklinikum RWTH Aachen, Institut für Pathologie, Elektronenmikroskopische Einrichtung (EME), Aachen, Deutschland

Introduction

Biomaterials for replacement and regeneration of bone defects aim to mimic the natural bone structure that is built up by collagen and hydroxyapatite nanocrystals which are embedded in the collagen fibers. Crystal nucleation *in vitro* is predicted to occur when the concentration of dissolved constituents reaches a critical point. Various molecules are able to affect the stages of crystal growth. In particular certain ions and matrix macromolecules can interact with a crystal growing in a saturated solution, inhibiting its growth in specific directions and consequently changing the crystal's shape. Proteins influencing the biominerization process are rich in acidic regions composed of poly-glutamate or poly-aspartate sequences being discovered as mineralization inducing peptide (MIP) sequences. Plant viral nanoparticle systems can act as templates for building complex structures exhibiting a wide range of biological and chemical properties, which allow the accumulation of virus particles or the genetically engineered coat protein (CP) subunits in large amounts throughout the plant, displaying a tailor-made outer surface. Plant viral particles are therefore useful tools in biomedical applications also due to their biocompatible features. Additionally, by presenting on their surface they allow for a high local availability of functional peptides compared to peptides in solution. The flexible rod-shaped *potato virus X* (PVX) forms a virus particle being 515 nm in length, 13.5 nm in width and is composed of 1270 identical subunit proteins. We hypothesized that by MIP presentation on the viral surface, a virus able to stimulate hydroxyapatite nucleation *in vitro* and also in a cell culture model can be generated. A peptide fusion of CP with integrin binding motifs (RGD) also addresses cell adhesion which is potentially crucial for tissue engineering.

Material and Methods

Recombinant PVX vectors were constructed presenting different peptides on their surface by fusing the desired sequence to the CP gene thereby producing intact viral particles presenting RGD, MIP, or a combination of both peptides on the outer surface. The integrity and purity of the viral coat protein subunits was verified by western blot and the particle formation by transmission electron microscopy. A supersaturated solution of hydroxyapatite was used to test the mineralization ability of the purified recombinant PVX particles. Bone marrow derived human mesenchymal stromal cells (MSC) served as a cell culture model to monitor the influence of RGD coated particles in cell adhesion assays, cell spreading and morphology was quantified by scanning electron microscopy (SEM), and focal adhesion complex formation was visualized by F-actin and vinculin immunofluorescence staining. For tissue engineering applications PVX nanoparticles were embedded into agarose hydrogels together with MSC and cultivated for up to 14 days. The ability of the virus to affect osteogenic differentiation and matrix calcium deposition of MSC was tested by Alizarin Red S.

Results and Discussion

Various combinations of peptide fusions were produced in plants which yielded intact viral particles capable of being assembled and purified in high amounts. Incubation of the peptide presenting viral particles in supersaturated solution of hydroxyapatite revealed that in contrast to wild type particles modified particles allowed the nucleation of hydroxyapatite on the surface. The MIP3 sequence showed fastest mineralization and even the RGD-modified particles allowed for mineralization. The viral particles could be adsorbed to tissue culture polystyrene and glass coverslip surfaces, which were used in subsequent cell culture analyses. Nanoparticles were visualized by SEM on TCPS, and also embedded within cell-laden hydrogels. TCPS coated with all RGD-presenting virus particles promoted cell adhesion and cell viability. The cell area was significantly increased and cell solidity decreased onto RGD-PVX coated surfaces indicating integrin specific changes on cell morphology and spreading. Focal adhesion complex formation could be enhanced on RGD-PVX coated glass surfaces as shown by vinculin immunofluorescence microscopic analysis. In addition, PVX particles presenting MIP on the surface was able to enhance matrix mineralization quantified by Alizarin Red S absorbance. It can be concluded that PVX nanoparticles are able to mediate hydroxyapatite nucleation *in vitro*, and dependent on the presence of RGD sequence, they are able to stimulate cell adhesion and matrix mineralization of MSC.

Mechanical properties and chemical stability of anisotropic alginate-based capillary hydrogels

*R. Müller¹, M. Schrottenbaum¹, B. Schmid¹

¹Universität Regensburg, Institut für Physikalische Chemie, Regensburg, Deutschland

Introduction

Hydrogels with linearly aligned capillaries are formed by an ionotropic self-organisation process in aqueous solution during the complexation of sodium alginate with divalent cations. By the choice of the divalent cation used for gel formation the macroscopic pore structure of the anisotropic hydrogels can be varied. We have previously shown that the anisotropic hydrogel structures can be used as biomaterial scaffolds for the directed regrowth of injured nerve axons [1-4]. In the present study we investigated the mechanical properties of the hydrogels in a macroscopic and a microscopic fashion and also determined their stability against degradation and dissolution in physiological environment. We hypothesize that strength and stability of the gels are influenced by the type of divalent cation used for gel formation and the concentration of a chemical crosslinking agent.

Materials and Methods

Anisotropic alginate gels were prepared by superimposing an aqueous alginate sol with electrolyte solutions containing divalent cations resulting in capillary structures with following average diameters (Fig. 1A): 10-12 µm (Ba^{2+}), 22-28 µm (Sr^{2+}), 53-59 µm (Zn^{2+}), or 112-121 µm (Ni^{2+}). Gel structures were chemically crosslinked with hexamethylene diisocyanate (HDI) in concentrations varying between 1 and 100 mmol L⁻¹. Divalent cations were removed by ion exchange without destroying the macroscopic and microscopic hydrogel structure. Physicochemical hydrogel properties were determined by swelling experiments in water and phosphate-based saline solution (PBS), oscillatory shear measurements using a plate-plate rheometer and microindentation analysis using a CellHesion® 200 atomic force microscope. Mechanical strength was monitored during incubation in PBS solution at 37°C for up to three months.

Results and Discussion

The mechanical strength generally decreases with increasing macroscopic porosity and capillary diameter, which was shown by an increase in the degree of swelling (Fig. 1B) and a decrease of the elastic modulus (Fig. 1C). A clear relationship was also found for the concentration of the crosslinking agent in that the degree of swelling decreased (Fig. 1B) and the elastic modulus increased (Fig. 1C) with rising concentration. Biodegradability of the alginate hydrogels was also strongly influenced by the concentration of the crosslinking agent: almost no degradation was found for 100 mmol L⁻¹ of crosslinker, while quick degradation was observed for 1 mmol L⁻¹. Furthermore, scanning electron microscopy analysis and microindentation experiments revealed anisotropy of the hydrogel structure and mechanical properties also on a microscopic level. Alginate polymer fibres seemed to be oriented in a perpendicular fashion relative to the capillary axis.

Outlook

In future experiments the mechanical properties of the anisotropic alginate hydrogels will be correlated with their efficiency to promote axon regeneration.

Acknowledgement

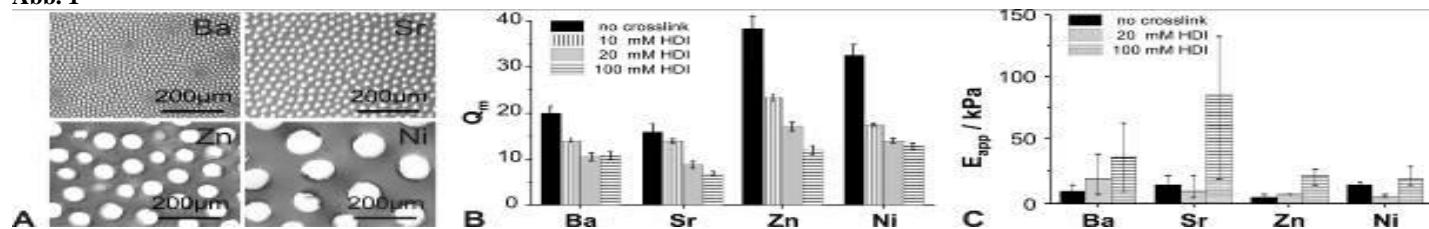
We thank Elmar Hartmann and Torsten Müller of JPK Instruments AG, Berlin for providing the microindentation technology and fruitful discussions. The German Research Foundation (DFG) is greatly acknowledged for financial support (MU 2978/3-1).

References

- [1] Prang P, Müller R, et al. Biomaterials 2006;27:3560-9
- [2] Pawar K, Müller R, et al. Acta Biomaterialia 2011;7:2826-34
- [3] Pawar K, Prang P, et al. Acta Biomaterialia 2015;27:131-9
- [4] Günther M.I., Weidner N, et al. Acta Biomaterialia 2015;27:140-50.

Figure 1: Capillary structure of alginate hydrogels (A), equilibrium swelling constant (B) and apparent elastic modulus (microindentation) of differently crosslinked hydrogels (C).

Abb. 1



Antimikrobielle Copolymeren zur Beschichtung von Zahnimplantaten

*S. Stelljes¹, M. Waßmann¹, A. Winkel², M. Stiesch², H. Menzel¹

¹Institut für Technische Chemie TU Braunschweig, Makromolekulare Chemie, Braunschweig, Deutschland

²Klinik für Zahnärztliche Prothetik und Biomedizinische Werkstoffkunde Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland

Einleitung

Die Verwendung von dentalen Implantaten gehört aktuell zu den Standardbehandlungen von Patienten mit Zahnverlust. Der Mundraum stellt allerdings eine ideale Umgebung für das Wachstum von Bakterien und anderen Mikroorganismen dar. Dadurch kann es zu einer Biofilmbildung auf den Implantaten kommen, was bei ca. 8-10% aller Implantate die Ausbildung einer Periimplantitis zur Folge hat [1] und weitere Operationen und Behandlungen bedingt. Ein möglicher Ansatzpunkt, um eine Periimplantitis zu verhindern, ist die Modifizierung der Implantatoberfläche zur Inhibition der Biofilmformation. Dabei sollten gleichzeitig körpereigene Zellen, wie etwa die der Gingiva, nicht negativ beeinflusst werden, damit das Implantat gut einheilen kann. Einen vielversprechenden Ansatz stellt hierbei die Verwendung von Copolymeren dar, die sowohl über antimikrobielle, als auch über oberflächenaktive Gruppen zur Anbindung an das Implantatmaterial Titan verfügen. Als antimikrobielle Komponente sind polykationische, quartäre Ammonium-Verbindungen von Interesse.[2] Zur Anbindung an Titan wurden bereits Copolymeren mit Phosphonat-haltigen Comonomeren untersucht.[3]

Material und Methoden

Für die Beschichtung und anschließende Anbindung an Titan wurden die beiden Copolymeren Poly(dimethylaminoethylmeth-acrylat)-co-dimethyl(2-methacryloyloxy-ethyl)phosphonat (P(DMAEMA-co-DMMEP)) und Poly(1-vinylimidazol)-co-dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)phosphonat (P(VI-co-DMMEP)) in freien radikalischen Copolymerisationen synthetisiert und anschließend an den Amino-Funktionen mit Alkyl-Resten quaternisiert. Die Polymere wurden über Spin- und Spray-Coating Prozesse auf Titanplättchen aufgebracht und durch Temvern kovalent angebunden. Die Beschichtungen wurden mittels Wasser-Kontaktwinkelmessungen und Ellipsometrie charakterisiert. Die Analyse von antimikrobiellen Eigenschaften und Zelladhäsion der beschichteten Titan-Oberflächen erfolgte durch Kultivierung von *S. aureus* und *S. oralis* sowie von humanen Gingiva-Fibroblasten (HGFib) auf beschichteten und unbeschichteten Proben. Zusätzlich wurde die Zytotoxizität der Polymere gegenüber HGFib mittels LDH- und CellTiter Blue-Essays untersucht.

Resultate und Diskussion

Die angestrebten Zusammensetzungen und Alkylierungsgrade der beiden Copolymeren P(DMAEMA-co-DMMEP) und P(VI-co-DMMEP) konnten bestätigt werden. Zudem konnte auch die erfolgreiche Beschichtung von Titan-Proben mit den beiden Copolymeren mit den genannten Methoden nachgewiesen werden. Bei beiden Beschichtungen zeigte sich sowohl für *S. aureus* als auch für *S. oralis* eine gute antimikrobielle Wirksamkeit bei einer jedoch geringen *In-vitro*-Adhäsion von HGFib. Gleichzeitig haben weder der LDH-Essay noch der CellTiter Blue-Essay Hinweise auf eine vorhandene zytotoxische Wirksamkeit gegenüber HGFib gezeigt. Trotz der geringen Adhäsion von HGFib *in vitro* sind die untersuchten Oberflächen daher interessant für weitergehende *In-vivo*-Untersuchungen mit beschichteten Implantaten und könnten potenziell das Risiko für eine Periimplantitis minimieren.

[1] Pjetursson, B.E., et al; *Clin Oral Implan Res*; 23; 2012; 22-38.

[2] Tiller, J.C., et al; *PNAS*; 98(11); 2001; 5981-5985.

[3] Callies, T., et al; *Mater Sci Eng C*; 61; 2016; 712-719.

P49

Mechanobiological effects of 3D hydrogel-calcium phosphate composite materials on the osteogenic behavior of mesenchymal stromal cells

*K. S. Sen¹, D. F. Duarte Campos¹, J. Abert¹, I. Lauria¹, H. Fischer¹

¹Uniklinik RWTH Aachen, Dental Materials and Biomaterials Research, Aachen, Deutschland

The influence of mechanical effects such as stiffness has been proved to be significant on the biological cell response. Various previous studies have shown that the stiffness has major effect on multipotent differentiation of cells towards a specific fate (durotaxis). However, the mechanobiological aspects of 3D scaffolds, up to now, have not been sufficiently addressed and studied. By combining different hydrogels with calcium phosphate particles at different ratios, we evaluated the in vitro effect of calcium phosphate particles and hydrogel based 3D composite materials on the behavior of human mesenchymal stromal cells (hMSCs). We hypothesized that hydrogel-calcium phosphate composite promote the osteogenic differentiation of hMSCs in a stiffness dependent manner. Osteoconductive beta-tricalcium phosphate (β -TCP, Ca₃(PO₄)₂) particles, were incorporated into various concentration of agarose and agarose/collagen blends. The concentration of 0.5 mg/ml of β -TCP was mixed with 2 g/ml % and 1 g/ml % of agarose and 0.5 g/ml % of agarose/collagen (A0.5COL0.215) blend. The composite materials were characterized with respect to the mechanical stiffness and viscosity, the swelling and degradation behavior, and the distribution of the ceramic particles in the cross-linked samples. The cellular response of hMSCs cells embedded in the 3D composite materials with varying elasticity was studied with respect to morphology, cell viability, and osteogenesis.

The obtained results indicate that stiffness and viscosity increases with the increase in the concentration of agarose. Human MSCs show good cell viability, cell spreading, and differentiation capacities in less stiff composites. Based on the alkaline phosphatase (ALP) activity, osteogenic hMSCs in less stiff composites of A0.5COL0.215 showed the highest ALP expression compared to other composite samples. The quantitative Alizarin Red staining analysis showed increased average formation of calcium accumulations in osteogenic A0.5COL0.215 compared to 1 g/ml % and 2 g/ml % of agarose, respectively. The results obtained from semi-quantitative polymerase chain reaction (qPCR) conducted with different MSC differentiation markers showed higher expression of runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and collagen type I (COL 1) by osteogenic MSCs in A0.5COL0.215 than in 1 g/ml % and 2 g/ml % of agarose, respectively.

The significance of mechanobiological effects on hMSCs in 3D hydrogels-calcium phosphates composite materials has been proved by the study.

P50

Decoration of a titanium nanostructured surface with silver and copper for enhanced antibacterial activity

*P. Bellova¹, Y. Motemani², C. Khare², K. Tschulik³, C. Sengstock¹, A. Ludwig², M. Köller¹

¹BG University Hospital Bergmannsheil Bochum, Surgical Research, 44789 Bochum, Deutschland

²Ruhr-University Bochum, Faculty of Mechanical Engineering, Institute for Materials, 44801 Bochum, Deutschland

³Ruhr-Universität Bochum, Faculty of Chemistry and Biochemistry, Micro- & Nano-Electrochemistry and Center for Electrochemical Sciences (CES), 44801 Bochum, Deutschland

The development of biomaterials with bacteriophobic surfaces which hinder or prevent bacterial colonization and proliferation is still an important challenge in biomaterial research. Recently an example for an antibacterial effect based solely on a special physical surface structure has been found in locust-like insects [1]. The wings of the Clanger cicada (*Psaltoda claripennis*) are covered by a nanopillar topography which are able to destroy gram-negative bacteria by a physico-mechanical effect solely due to the presence of these nanostructures. We were able to generate comparable nanostructures of titanium (Ti) by glancing angle sputter deposition (GLAD) and subsequently demonstrated the antibacterial effect of these surfaces on gram-negative *E.coli* [2]. However, the adherence and viability of gram-positive *S. aureus* was not affected by this nanocolumnar surface. Therefore, in the present study the titanium nanocolumns have been decorated with either silver or copper to extend the antibacterial effects against gram-positive bacteria by releasing of Ag- or Cu-ions.

The Ti nanostructured surfaces were fabricated by the GLAD technique. In this method, an obliquely incident particle facilitates the growth of sharp-edged columnar structures as a result of strong influence of the self-shadowing mechanism. Nanocolumnar height was about 100 nm with an average peak to peak distance of about 160 nm. Subsequently, silver and copper layers with thicknesses of 30 and 60 nm were deposited on the Ti GLAD nanostructured surfaces. Bacterial tests were performed with *E.coli* and *S.aureus*. After aspiration of supernatants (planktonic bacteria) quantitative bacterial analysis was performed using serial dilution and conventional plating. Bacterial adherence on the samples was analyzed by fluorescence microscopy (BacLight™). Tissue cell compatibility was assessed by culturing human mesenchymal stem cells (hMSCs) for a period of 2 and 7 days on the samples. Metal ion release was assessed by atomic absorption spectroscopy (AAS) after immersion in water (1 or 7 d).

The bacterial adherence of *E. coli* was significantly decreased on the non-decorated nanostructured film compared to a dense Ti control sample after 3 h of incubation. The antibacterial effect was not observed using *S.aureus*. In contrast, the Ti GLAD films decorated with silver or copper exhibited a significant antibacterial effect against *S.aureus* and *E.coli*. The copper decorated thin films demonstrated a remarkable higher antibacterial effect compared to the silver decorated films. The amount of copper ion release was approximately 100 times higher than that of Ag. Adherence of human MSCs on the non-decorated nanostructured surface was reduced after short term incubations (24 h) in contrast to the long-term incubations (7 d). The silver and especially copper decorated thin films led also to impairments of MSC adherence and viability.

Here we have been able to produce antibacterial effects with Cu- and Ag-decorated Ti nanostructured surface against the gram-negative and gram-positive bacteria. The thickness of Ag and Cu decorating layers can be modified to achieve better tissue compatibility.

[1] Pogodin et al. Biophys J 2013; 104: 835-40.

[2] Sengstock et al. Nanotechnology 2014; 25: 195101.

P51

Magnetic nanoparticles for tissue engineering applications on hydrogel matrices for cell adhesion

*R. Singh¹, A. Wieser¹, S. Reakasame², B. Dietel³, R. Detsch², A. Boccaccini², C. Alexiou¹, I. Cicha¹

¹University Hospital Erlangen, ENT-Department, Section of Experimental Oncology and Nanomedicine (SEON), Erlangen, Deutschland

²University of Erlangen-Nuremberg, Institute of Biomaterials (WW7), Department of Materials Science and Engineering, Erlangen, Deutschland

³University Hospital Erlangen, Med 2, Translational Research Center, Erlangen, Deutschland

Introduction

Hydrogels are material of choice for the tissue engineering. However, for clinical applications tissue engineered hydrogel scaffolds need fast adhesion and proliferation of cells. Magnetic nanoparticles are subject of study for various biomedical applications. In this study the versatile nature of magnetic nanoparticles was used for development of hydrogel based scaffold applications. In this study, we have investigated the viability, proliferation, morphology and apoptosis of fibroblast cells (NHDF, normal human dermal fibroblast cells) on different sodium alginate (Alg) based hydrogels to evaluate their potential for tissue-engineering suitable scaffolds.

Materials and Methods

Alginate di-aldehyde (ADA) was covalently cross linked with gelatin (Gel) to from ADA-Gel hydrogel formulation. In another formulation, silk fibroin (SF) was blended with sodium alginate (Alg). The weight ratio of ADA and Gel or Alg and SF in the final hydrogels was 50:50 and were prepared in the form of hydrogels and placed within 24-well plates. Fibroblast cells were grown in the DMEM media supplemented with 10% (v/v) FCS and 1% (v/v) antibiotic-antimycotic, at 37°C, with a controlled atmosphere of 5% CO₂ and 95% relative humidity. Cells with and without magnetic nanoparticles, were grown on hydrogels for 7 days in presence or absence of magnetic field for 24 hours (compression purpose). Cell viability and morphology on the different hydrogels were compared by fluorescent staining (calcein and phalloidin, respectively). WST-8 assay served to analyse the metabolic activity of the cells.

Results

Hydrogel with Alg-SF with cells and magnetic nanoparticles has constant increase in cell attachment and growth as compared to hydrogels with cells containing no magnetic nanoparticles and magnetic field. Whereas, ADA-Gel hydrogel with cells containing magnetic nanoparticles and magnetic field (for initial 24 hours) provided better attachment growth and spreading of the cells. Although by day 7 metabolic activity of fibroblast without magnetic particles was similar to that of cells with magnetic particles, but for the clinical applications and success of the scaffold, initial growth and attachment of cells plays major role in success and failure. Results from WST-8 assay were confirmed by microscopic observations.

Conclusions

Biomaterials based hydrogels are widely used for various tissue engineering based applications. Hydrogels provide environment to cells which is similar to the native extra cellular matrix (ECM) in body, such as an aqueous environment which improves cell viability. But lack of initial attachment of cells on/in the hydrogels and non-uniform spreading of cells are main cause of failure. Magnetic nanoparticles based approach is able to overcome these limitations of the conventional tissue engineering approaches. Our results demonstrate that magnetic nanoparticle based approach can play major role for tissue engineering applications. But further studies are needed to evaluate these results with other types of cells and *in vivo*.

Thermoplastic Polyurethane Elastomers for Potential Biomedical Use: Synthesis of α,ω -Di(hydroxy)polyisobutylene as Macrodiol for the Preparation of Polyurethanes

*M. A. Maurus^{1,2}, L. Kitaeva², C. Liu², T. Maier², W. Schramm², G. Lorenz^{1,2}

¹Hochschule Reutlingen, Fakultät Angewandte Chemie, Reutlingen, Deutschland

²Reutlingen Research Institute, Reutlingen, Deutschland

Keywords: polyurethane, cationic polymerization, polyisobutylene, ¹H-NMR

Polyurethane biomaterials have a wide range of applications as medical implants^{1b-d} due to their excellent mechanical properties [1a,c] such as high tensile strength, good tear and abrasion resistance as well as relatively good stability in biological environments.[1d,b] In conventional polyurethane elastomers the soft segments are long-chained polyols usually polyether, polyester or polycarbonate. Due to the fact that, in general, polycarbonate diol based polyurethanes have improved resistances to hydrolysis relative to those based on polyethers and polyesters[1c,2a], it was interesting for us to study the synthesis and mechanical properties of polycarbonate based polyurethanes. A small amount of a second macrodiol (comacrodiol), polydimethylsiloxane, was added as part of the soft segment in order to increase the biostability of the polyurethanes.[2b]

As the polyisobutylene (PIB) moiety exhibits hydrolytic and oxidative stability [3], it is to be expected that polyurethanes incorporating this soft segment should also show increased resistance against hydrolysis and oxidation. For that reason and because HO-PIB-OH is not commercially available, two methods for the synthesis of α,ω -Di(hydroxy)polyisobutylene (HO-PIB-OH) as soft segment for the polyurethane synthesis have been developed. The first method allows the synthesis of HO-PIB-OH via cationic polymerization of isobutylene (IB) to difunctional *exo*-olefin-terminated polyisobutylene (PIB), followed by regioselective hydroboration/alkaline hydrogen peroxide oxidation (Fig. 1). The cationic polymerization of IB co-initiated by a AlCl₃:nBu₂O 1:1 complex has been reexamined and explored in great detail. Experiments with AlCl₃:nBu₂O/DiCumOH/H₂O as an initiating system in dichloromethane at -60°C to -30°C gave highly reactive PIB, with up to 90% *exo*-olefin end group content in agreement with the results reported before in the literature [4]. The suppression of *endo*-olefin-terminated PIB and coupled PIB formation during polymerization was studied. AlCl₃:nBu₂O complex formation and the IB consumption during polymerization have been evidenced using real time ATR-FTIR spectroscopy.

Functionalization of *exo*-olefin PIB via thiol-ene click chemistry [5] as an alternative rapid economical method for the synthesis of HO-PIB-OH has been developed (Fig. 1). The chemical structures of HO-PIB-OH and olefin-terminated PIBs and their molecular weights have been elucidated unambiguously by ¹H-NMR spectroscopy.

In this study several thermoplastic polyurethane elastomers based on 4,4'-diphenylmethane-diisocyanate have been synthetized by a two-step polymerization procedure varying soft segment composition, chemical structure and hard segment content. The preliminary mechanical test results, including tensile tests, compression tests and Shore Hardness measurements, obtained in our study are showed in Fig. 2.

Figure 1: Synthetic strategy for the preparation of HO-PIB-OH.

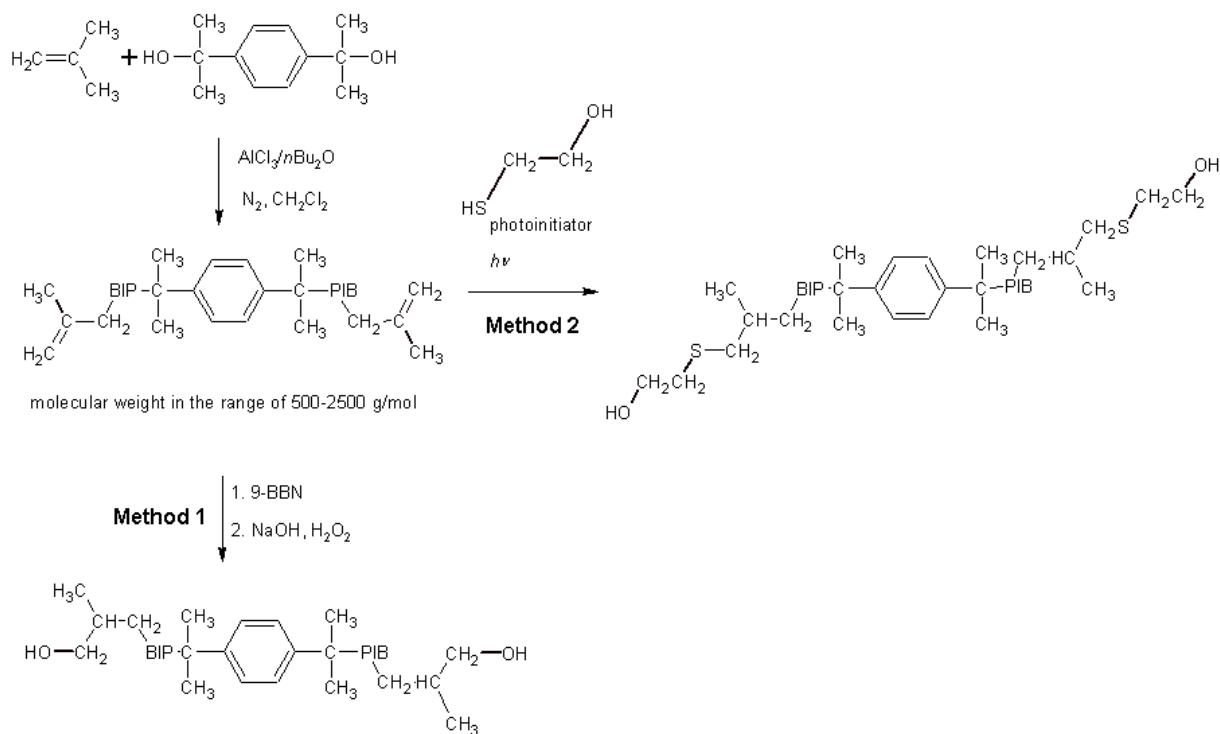
Figure 2: Mechanical characterization of synthesized polyurethanes.

Acknowledgement

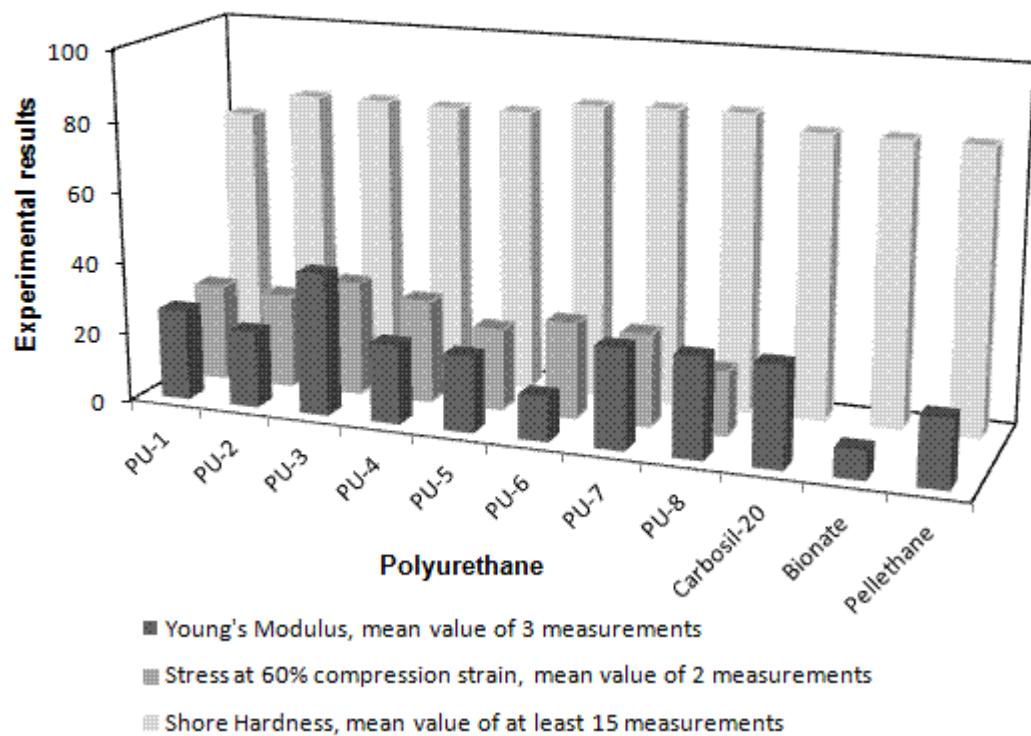
Financial support from BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung) under grant number 03FH032I3 is gratefully acknowledged.

References

- [1] (a) V. Kanyanta, A. Ivankovic, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2010, 3, 51; (b) L. Pinchuk, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 1994, 6, 225; (c) R. J. Zdrahalova, I. J. Zdrahalova, *J. Biomater. Appl.* 1999, 14, 67; (d) S. Gogolevski, *Colloid Polym. Sci.* 1989, 267, 757.
- [2] (a) A. Eceiza, M. D. Martin, K. de la Caba, G. Kortaberria, N. Gabilondo, M. A. Corcuera, I. Mondragon, *Polym. Eng. Sci.* 2008, 297; (b) D. J. Martin, L. A. Poole Warren, P. A. Gunatillake, S. J. McCarthy, G. F. Meijis, K. Schindhelm, *Biomaterials* 2000, 21, 1021.
- [3] G. Erdodi, J. Kang, J. P. Kennedy, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 2010, 48, 2361.
- [4] (a) D. I. Shiman, I. V. Vasilenko, S. V. Kostjuk, *Polymer* 2013, 54, 2235; (b) P. Dimitrov, J. Emert, R. Faust, *Macromolecules* 2012, 45, 3318; (c) I. V. Vasilenko, A. N. Frolov, S. V. Kostjuk, *Macromolecules* 2010, 43, 5503.
- [5] K. Toth, N. C. Kekec, N. Nugay, J. P. Kennedy, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 2016, 54, 1119.

Abb. 1**Abb. 2**

Mechanical properties of synthesized polyurethanes



P56

Effect of magnesium-degradation products on mesenchymal stem cell osteogenesis

*L. Xu¹, R. Willumeit-Römer¹, B. Lüthringer¹

¹Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Geesthacht, Deutschland

Introduction

Biodegradable implants have attracted increasing interest in the last few years. In addition, Mg is increasingly recognized as an important contributor to activate osteogenic cells like stimulating the formation and mineralization of new bone (increased bone turnover) when they are implanted as bone fixtures [1]. To reveal the mechanisms of the effect of Mg degradation products on bone formation, human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells were selected as model for osteogenesis and cultured with different concentrations of Mg degradation products for up to 21 days.

Material and Methods

HUCPV were isolated from human umbilical cords and characterised according to the expression of specific markers by flow cytometry (cluster of differentiation (CD) 31 (platelet endothelial cell adhesion molecule), CD54 (intercellular adhesion molecule), CD90 (Thy-1 cell surface antigen) and CD105 (endoglin)). Osteoblastogenesis of HUCPV was induced by conditional medium (in (Eagle's minimum essential medium, Alpha modification (α -MEM); Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany) supplemented with 15% stem cell foetal bovine serum (FBS) and 10nM Dexamethasone, 10nM Vitamin D3, 0.284mM L-ascorbic acid, and 5mM β glycerophosphate) for 21 days. Mg-degradation products were obtained according to EN ISO standards I. 10993-5:2009 and I. 10993-12:2012 (0.2 g material/mL extraction medium). Mg, calcium (Ca), and phosphorous (P) contents were measured via inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS; Agilent 7700x ICP-MS, Waldbronn, Germany). The effects of Mg-degradation products (0 (control), 3.6, 7.2 and 14.4mM Mg) on HUCPV osteoblastogenesis was followed by monitoring metabolic activity (by WST-1 colorimetric assay based on the cleavage of a tetrazolium salt (Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System; Takara, Japan), lactate dehydrogenase released from the cytosol of damaged cells (Cytotoxicity Detection Kit, Roche, USA), alkaline phosphatase (ALP) activity (QuantichromTM Alkaline Phosphatase Assay Kit; BioAssay Systems, USA), DNA content, and mineralization (by alizarin red S staining (Alizarin Red S; Sigma Aldrich, USA)) at day 7, 14, and 21. All results were normalized by DNA content. All data represent results from three independent experiments with three replicates. Statistical analysis with SPSS 16.0 was performed using one-way ANOVA. The following post hoc multiple comparisons were based on SNK test when variance is assumed or Dunnett T3 when equal variance is not assumed ($\alpha=0.05$).

Results

Positive ratios of CD31+, CD54+, CD90+, and CD105+ in isolated HUCPV were 3.57%, 3.09%, 95.96%, 91.07%, respectively, confirming the mesenchymal origin of isolated HUCPV.

At day 14, a decreased metabolic activity was observed with 3.6mM Mg (compared to the control) while an increased was measured at day 21 with 7.2mM Mg. LDH release was significantly reduced at day 7 for all Mg concentrations while an increase at day 14 and 21 was observed for 3.6mM and 7.2mM, respectively. ALP measurements highlighted a decreased ALP activity with Mg-degradation products at day 7 while at days 14 and 21 an increase was observed. However, with ARS staining, from day 14 on, a decreased mineralisation was observed for all concentrations compared to the control.

Conclusion

We conclude that, based on the high positive ratios of CD105 and CD90, the isolation from human umbilical cords vein was efficient and without endothelial contamination (CD31-).

Mg-degradation products may have a protective effect on day 7 (based on LDH results) while reducing the ALP and mineralization of the bone formation. However, on day 14 and 21, the increased ALP activity and metabolic activity indicate a stimulation effect of Mg-degradation products on osteoblastogenesis. An increased LDH release (for 3.6 mM) and a decreased ARS on day 14, reveal a possible cytotoxic effect and an inhibitory effect of Mg-degradation products on mineralization.

Future studies will focus on genes and proteins expression involved in osteoblastogenesis.

Tailoring the mechanical properties of the implantable polyurethanes by variation in the chain structures

*L. Kutuzova^{1,2}, Y. Shu², R. Koslik², C. Zhang², *G. Lorenz^{1,2}

¹Hochschule Reutlingen, Angewandte Chemie, Reutlingen, Deutschland

²Reutlingen Research Institute (RRI), Reutlingen, Deutschland

The fatigue performance of biocompatible elastomers tested in physiological conditions is the main criterium to optimize efficiently the composition design of new materials as well as to evaluate commercial biomaterials for orthopedic applications [1,2]. Soft polyurethane elastomers, primarily polycarbonate-urethanes (PCU), have significant advantages as a basis to fabricate biostable soft orthopedic devices of a new generation [3-5]. On the one hand softer materials mimics the natural tissue properties, on the other hand they should be elastic enough to avoid irreversible mechanical deformations under long-term physiological loadings. A combination of MDI-based polycarbonate urethane core surrounded with long polydimethylsiloxane (PDMS) chains could be promising to solve this problem and simultaneously reduce the fluid adsorption of a core material.

The sensitivity of the urethane-based polymers to their environment has been tested on two commercially available as well as on ten novel thermoplastic elastomeric biomaterials synthesized in our laboratory. The chain structure of these PU-based biomaterials is shown in Fig.1. To provide a wide array of mechanical properties (elastic moduli, stress-strain behavior), soft segment (SS) chemistry, structural variations in multiblock PDMS-polycarbonate copolymer chains via regulated distance between SS-blocks as well as hard segment content have been systematically varied. The structure and molecular weight of the synthesized samples before and after specimen processing (i.e. drying, annealing, cleaning) were controlled using FTIR, DSC, GPC and viscometric methods.

To examine stress-life behavior of potential polyurethane-based meniscus implants, several sets of viscoelastic test specimens were molded in a cylindrical or disk geometry of 13 or 40 mm diameter and 6 or 4 mm thickness correspondently (Fig.2). The fatigue resistance of the test specimens have been studied using tensile as well as compression cyclic loading. In addition to these studies, several specialized tests on the new urethane elastomers have been conducted under simulated physiological compressive loading (1200 N), temperature (37 °C) and liquid environment for knee spacer applications. Elastic moduli for all materials range from 8 MPa to 16 MPa (Hardness 70-80 A Shore). A lack of thermo-mechanical transitions near the body temperature was confirmed using dynamic mechanical analysis (DMA). All materials were in a viscoelastic state over the temperature range tested up to 45 °C and demonstrated the modulus softening at the body temperature.

Dynamic compression screening up to 80% deformation of the specimens was utilized to evaluate an elastic range and define a compressive deformation at 1200N. The fatigue behavior of each material was investigated under cyclic compression in a linear elastic range (at 20% of deformation) as well as under physiological loading (1200N) with corresponding compressive deformation 40-50%. The comparison of fatigue responses between novel synthetic meniscal analogs with systematically varied structure improves the understanding of the structure-mechanical response relationship to develop the most promising materials.

Figure 1: Components and chain structure of thermoplastic PCU-PDMS-based biomaterials. Conditions: multistep synthesis over the catalyst-free condition using in-line FTIR-control.

Figure 2: From synthesis to test specimens. Extrusion and injection molding techniques are used for processing

Acknowledgement

Financial support of this project by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) under grant number 01EC1406C (TOKMIS) is gratefully acknowledged

References

- [1] Shemesh, M., et al. Viscoelastic properties of a synthetic meniscus implant, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2014, 29: 42-55.
- [2] Miller, A.T., et al. Compressive cyclic ratcheting and fatigue of synthetic, soft biomedical polymers in solution, *Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2016, 54: 268-82.
- [3] Treharne, R.W., Greene, A., The case for the use of polycarbonate-urethane in orthopedic implants, *1. Med-Tech*, Spring 2008, 18-22.
- [4] John, K.R.S. The use of polyurethane materials in the surgery of the spine: a review. *Spine J.* 2014, 14(12): 3038-47.
- [5] Hsu S.H., Lin Z.C. Biocompatibility and biostability of a series of poly(carbonate)urethanes. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2004, 36(1):1-12.

Abb. 1

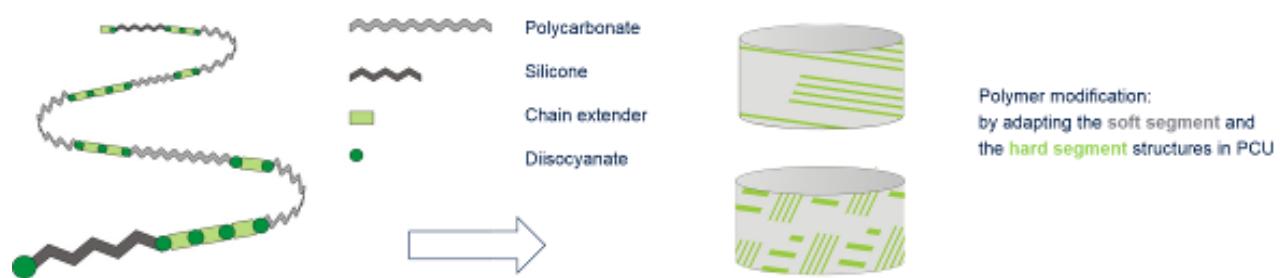
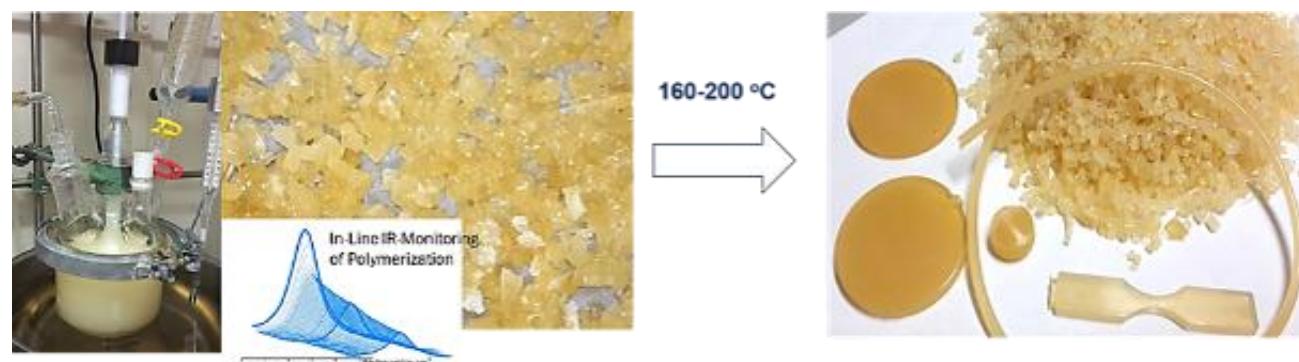


Abb. 2



Bioanorganic coatings combining pro-angiogenic and bone cell stimulating properties

R. Beutner¹, S. Urbanek¹, R. Heß¹, C. Moseke², D. Scharnweber¹, *C. Wolf-Brandstetter¹

¹TU Dresden, Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien, Dresden, Deutschland

²Universität Würzburg, Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, Würzburg, Deutschland

Introduction

The aim of this study is to combine the activities of the trace elements copper, zinc and strontium with inorganic surface modification techniques already successful in bone applications. In this combination chemotactic signals from released Cu ions are intended to provoke enhanced vascularization (demonstrated *in vivo* for amounts in the ng scale [1]) while released Zn ions recruit circulating bone forming cells to the site of surgery. The incorporation of strontium is intended for shifting the balance between bone forming and bone degrading cells in bone tissue. Calcium phosphate phases (CPP) are utilized as a carrier for the selected trace elements in order to i) provide crystalline osteoconductive surfaces and ii) to allow fine tuning of immobilized amounts and release behavior of the deposited trace elements.

Experimental Methods

Depositions of brushite onto c.p.Ti discs were performed by means of electrochemically assisted deposition (ECAD) using electrolytes containing $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ with additives of copper, zinc or strontium ions.

The coatings were characterized by i) scanning electron microscopy (SEM) combined with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX), ii) chemical analysis of calcium, phosphate and trace element content in the coatings. Ion release from coated surfaces was analyzed after incubation in simulated body fluid with or without additional serum proteins. The pro-angiogenic stimulation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) by copper ions was studied with a 3D angiogenic assay.

Results and Discussion

The deposition of the trace elements into brushite layers depended mainly on the concentration of the respective ions in the electrolyte as well as on total charge density. Depositions of CPP in presence of Cu or Zn resulted in separate phases of brushite plates and Cu and Zn containing species (SEM see Fig. 1 and EDX-mapping) in contrast to depositions within hydroxyapatite (HAp) layers, where the copper is homogeneously distributed throughout the coating [2]. For strontium a completely different behaviour was observed as it was included into the brushite phase and is probably able to displace calcium in the mineral phase. While zinc release in general showed a small initial burst followed by a slow steady release irrespective of the presence of proteins, 65 - 85% (depending on initial amount) of the copper was delivered in presence of proteins within 24 h. However, in combination with high Zn concentrations (0.5 mM within electrolyte) the initial copper release could be markedly decreased. The pro-angiogenic impact of copper ions could be verified *in vitro* for low concentrations (5 μM). Strontium release was strongly influenced by its initial content in the deposited layer with nearly no burst release behaviour in presence of proteins.

Conclusions

It was shown that copper, zinc and strontium can be co-deposited together with calcium phosphate onto metallic implant materials by means of electrochemically assisted deposition with only minor changes in general structure and amount of the deposited calcium phosphate. The relative amounts of the respective trace elements to calcium are tunable in a wide range allowing for adjustment of release behavior based on clinical needs.

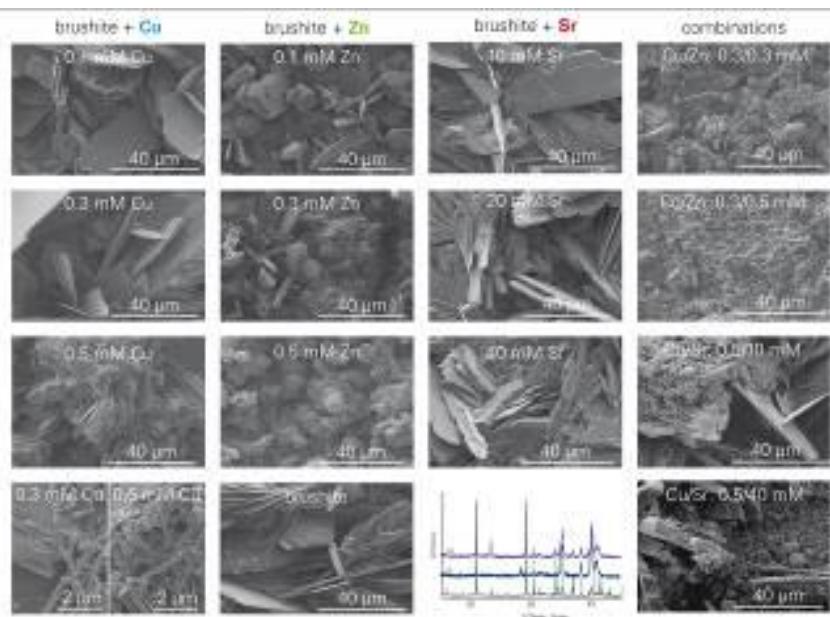
References

- [1] Barralet J. et al., *Tissue Engineering* 15: 1601-1609, 2009
- [2] Wolf-Brandstetter C. et al., *JBMR B* 102: 160-172, 2014

Acknowledgments

The authors would like to thank the German Research Foundation (Grant no: WO 1903/2-1) for providing financial support to this project.

Figure 1: SEM pictures of obtained coatings for co-deposition of zinc, copper and strontium with brushite in comparison to pure brushite coatings (all depositions at 1.5 mA/cm² for 3200 s); XRD spectra for brushite (I), brushite + 0.3 mM Cu + 0.5 mM Zn (II), brushite + 40 mM Sr (III), green markers: brushite, purple markers: titanium

Abb. 1

P59

Composites with a system of interconnected pores based on hydroxyapatite and lactide-co-glycolide

*D. Lytkina¹, A. Berezovskaya¹, I. Kurzina¹, A. Filimoshkin¹, V. Kozik¹

¹National Research Tomsk State University, Tomsk, Russische Föderation

The need for research and development of materials that can qualitatively replace and repair the broken bone is growing every year. Open porosity is the one of the main parameters for the bone implants. The porous structure contains a number of cavities and thereby create favorable conditions for the circulation of fluids and invasion of bone tissue. Such parameters as hydrophilicity and surface roughness are important as well [1]. Therefore, the aim of our work is providing a composite material based on hydroxyapatite and biodegradable polymers with a network of interconnected macropores.

Composites were obtained in several stages. Firstly, ceramic scaffold were obtained of HA and pore forming agent. As the pore forming agent the sodium chloride was used. Being harmless to the organism it has sufficient solubility. Hydroxyapatite and sodium chloride were mixed to form a homogeneous mixture, then press-molded and sintered. Various containing of is necessary to obtain composites with different porosity. Further outwashed the NaCl from scaffolds to obtain porous structure. The tablets were soaked by distilled water for three days with water renewal. After that porous hydroxyapatite scaffolds were dried. As a result, range of scaffolds with different porosity (table¹) was obtained.

The next step was the impregnation of the polymer scaffold by PLGA. For that solution of PLGA (80% lactide with a MW = 21000 g/mol) in chloroform was made. The tablets were dipped into solution and ultrasonicated for 20 min. Ultrasonication is necessary to remove air bubbles out of the scaffolds and to obtain homogeneous coating. The ratio of components in the final composites is shown in Table². The mass fraction of the copolymer in the composite increases with the increase of the number of cavities (macropores) formed as a result of outwashing of sodium chloride. It indicates that the penetration of PLGA solution in scaffold increases.

Micrographs (pic. 1) of the surface and the cut obtained by SEM show that the composites have a porous structure. The pore size varies from 10 to 100 microns. On a cut, we can see both HA particles (oblong) and PLGA (spherical), which confirms the penetration of PLGA in the scaffold.

Picture 1: SEM micrographs: a) the surface of the composite, magnif. $\times 1000$

b) the cut of composite, magnif. $\times 4500$

By the method of low-temperature nitrogen adsorption the values of the specific surface area (S_{sp}) of composites and HA were determined (Table³). We can see that the specific surface area in the range of composites decreases from C1 to C3, it is connected with a more uniform coating of the scaffolds and filling most of the micro- and mesopores. For all the components and composites the contact angle θ was measured by sessile drop method (water). All materials and components have a hydrophilic nature, $\theta < 90^\circ$, C3 is least hydrophilic (Table⁴). Measurement of surface roughness by the contact method showed that the arithmetic average roughness profile (R_a) increases from C1 to C3 with the porosity of the surface and the amount of the copolymer increasing (Table⁵).

Table: Some characteristics of the composites and original components

Symbols of composites	HA	PLGA	C1	C2	C3
1NaCl content, wt%	-	-	10	25	50
2PLGA content in composites, wt%	-	100	5	7	17
3Ssp. $\pm 10\%$, m ² /g	106	-	12,7	0,5	0,2
40,°	14,1	65,2	54,0	33,0	85,0
5Ra, μm	1,25	7,24	1,22	2,16	6,34

For composites and components the cytotoxicity test using Alamar Blue was carried out. The samples were seeded with monocytes separated from human blood, then incubated at 37 degrees for 6 days. After that Alamar Blue was added, and samples were incubated for three hours. Then the fluorescence was measured (pic. 2). It is evident that cell viability in samples with copolymer and C1 and C2 are comparable to the control. The cells in the samples with HA have low viability due to the high surface area and high surface energy. Cells in samples with C3 also show low viability. It may be caused by the low hydrophilicity of C3. Therefore, C3 is unacceptable for the further work. In the case of the first donor whose cells show low viability in all samples, we assume that it is the individual response of the body.

Picture 2: Cytotoxicity test of the composites and original components

Thus it was developed the method of obtaining of composite materials with open-porosity based on hydroxyapatite and a copolymer of lactide and glycolide. It has been established that all materials are hydrophilic, the surface roughness of the composites increased with polymer mass fraction increasing. C1 and C2 were selected for further investigation because of low cytotoxicity.

Abb. 1

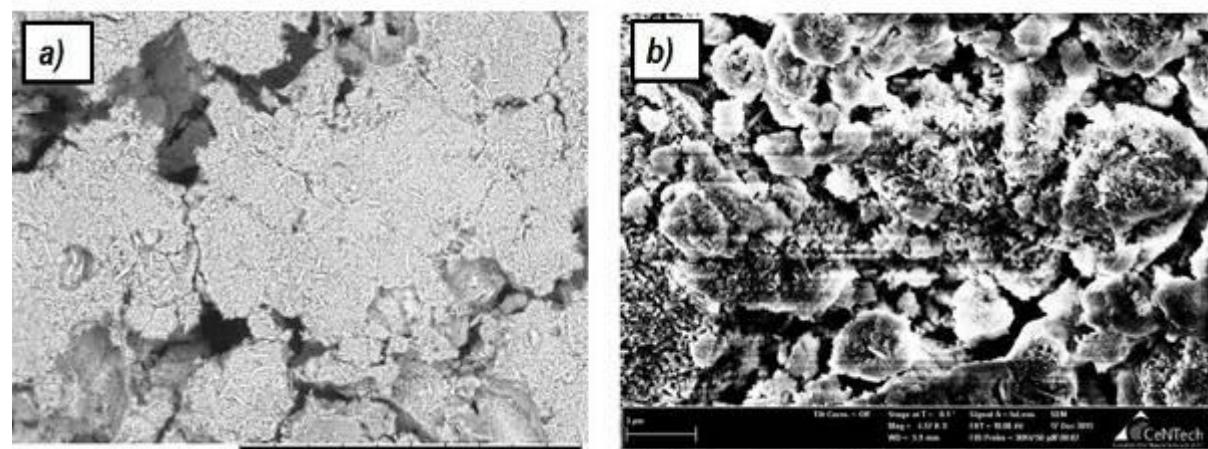
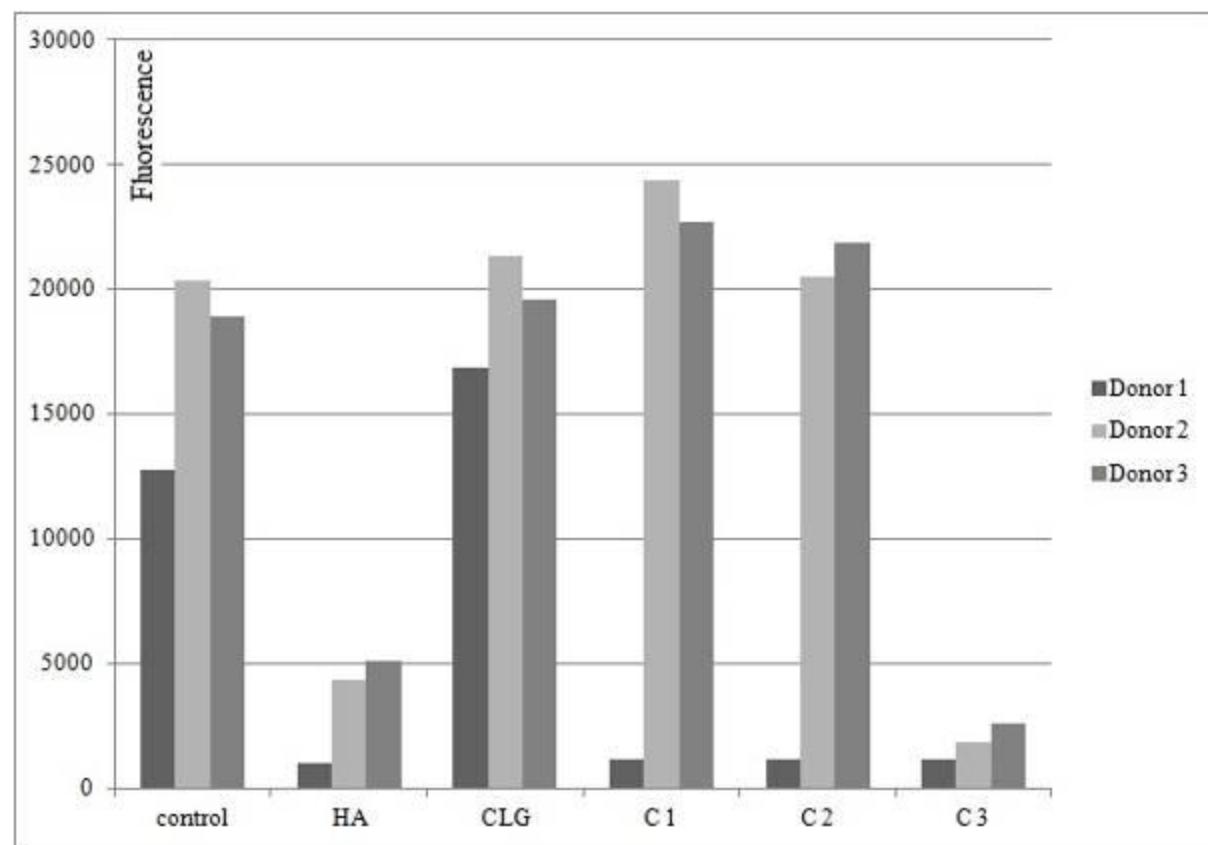


Abb. 2



Copolymerization of ionic liquids with NIPAAm to thermoresponsive hybrid hydrogels

*S. Illner¹, S. Pfensig², T. Eickner¹, D. Arbeiter¹, K.- P. Schmitz², N. Grabow¹

¹Universitätsmedizin Rostock, Institut für Biomedizinische Technik, Rostock, Deutschland

²Institut für ImplantatTechnologie und Biomaterialien e.V., Rostock, Deutschland

Introduction

Hydrophilic or swellable polymeric materials, especially hydrogels and next generation stimuli-responsive hydrogels, are focused in research as their improvement offers great potential for biomedical applications [1].

Due to their similarity to human tissue and usually very good biocompatibility [2], such responsive bioelastomeric 3D-crosslinked networks are of great interest as drug delivery systems, e.g. for controlled drug release [3]. The weak mechanical properties, in particular toughness and fatigue resistance, can be improved enormously by crosslinking copolymerization [4].

In this study, we report the copolymerization of the ionic liquid [ViPrIm] [Br] with NIPAAm as innovative thermoresponsive hybrid hydrogels. The aim was to generate coatings with varied swelling properties and a defined shape by polymerizing two different monomers in the presence of a crosslinking and a strong oxidizing agent.

Material and Methods

The polymerizable ionic liquid 1-vinyl-3-isopropylimidazolium bromide [ViPrIm][Br] (IL) and N-isopropylacrylamide (NIPAAm) were used to synthesize hybrid hydrogels in ratios of 70/30, 50/50, 30/70, 15/85 and 5/95 (wt%/wt%) as well as the parental hydrogels by radical emulsion polymerization. MBAA, APS and TEMED were added subsequently as crosslinker, initiator and catalyst, respectively, into optional shapes.

Thermal properties of the hydrogels and the endothermic process of water delivery (LCST - lower critical solution temperature) have been investigated on a DSC1 STAR^e System (Mettler-Toledo, Gießen, Germany) in a default temperature range at a heating rate of 10 K min⁻¹. Mechanical characteristics were examined by tensile and compression tests using a universal testing machine Zwick/Roell BT1-FR2.5TN.D14 (Zwick, Ulm, Germany). As key parameter for biomedical application the adhesive strength on implant surfaces was investigated on a dedicated test setup. Finally, to investigate the drug release behavior, with an enhanced swelling responding to a change in environmental variables, such as temperature or pH, acetylsalicylic acid has been incorporated into the formed hydrogels.

Results and Discussion

In conclusion, hybrid hydrogels of NIPAAm and [ViPrIm][Br] have been synthesized successfully in different mass ratios with new deviating material properties. They exhibit a higher stretchability and better mechanical behavior compared to the parental PIL or pNIPAAm hydrogels. In order to simulate the connection of hydrogels to the surface of cardiovascular implants, the adhesive strength of hydrogels to a stainless steel substrate was tested. PIL and PIL/pNIPAAm 70/30 are appearing more adhesive than tensile. Hence, they could not be removed without multiple cracks. In contrast, pNIPAAm, PIL/pNIPAAm 50/50 and PIL/pNIPAAm 30/70 can be peeled off completely without cracking. The peel off strength (σ_A) of those hydrogels was lower than the tensile strength.

All hybrid hydrogels revealed a thermosensitive swelling behavior and an increasing swelling with raised concentration of PIL in several solvents, as result of rising amount of ionic groups.

The presence of PIL in the polymer matrix leads to a shift of LCST to a higher temperature range. While pNIPAAm exhibits a LCST at 33.9 ± 0.3 °C, PIL/pNIPAAm 5/95 and PIL/pNIPAAm 15/85 were found to have LCST transition at 37.6 ± 0.9 °C and 52 ± 2 °C.

Using temperatures of 22 ± 2 °C and 40 °C, as external stimuli, different hydrogels responded with a varying drug release. This might be useful for controlled drug release to treat infection after medical implantation that goes along with increasing body temperature.

Acknowledgment

Partial financial support by the European Regional Development Fund (ERDF) and the European Social Fund (ESF) within the collaborative research between economy and science of the state Mecklenburg-Vorpommern and by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) within RESPONSE "Partnership for Innovation in Implant Technology" is gratefully acknowledged.

References

- [1] Caló E et al. *Biomedical applications of hydrogels. A review of patents and commercial products.* Eur. Polym. J. (2015); 65: 252-67.
- [2] Buwalda, SJ et al. *Hydrogels in a historical perspective: from simple networks to smart materials.* J. Control. Release 190 (2014); 254 - 73.
- [3] Chung J et al. *Effect of molecular architecture of hydrophobically modified poly(N-isopropylacrylamide) on the formation of thermoresponsive core-shell micellar drug carriers.* J. Control. Release 53 (1998); 1-3: 119-30.
- [4] Sun J-Y et al. *Highly stretchable and tough hydrogels.* Nature 489 (2012); 7414: 133-36.

P61

Antibakterielle Layer-by-Layer Beschichtung für Medizintextilien

*H. Hartmann¹, X. Xiong¹, E. Arefaine¹, A. Gerhardt², D. Höfer², R. Krastev¹

¹NMI, Reutlingen, Deutschland

²Hohenstein Institut für Textilinnovation gGmbH, Boennigheim, Deutschland

Einleitung

Die Verbreitung von Bakterien und multiresistenten Keimen steigt weltweit und antimikrobielle Beschichtungen erlangen zunehmend an Bedeutung. Bei aktuellen Systemen werden meist Wirkstoffe abgegeben, die mit einer zeitlich begrenzten Wirkung und der Problematik von Resistenzbildungen verbunden sind (z.B. Silber-Ionen, Antibiotika).

Unser Ansatz verzichtet bewusst auf solche Wirkstoffe und nutzt stattdessen Beschichtungen mit den Biopolymeren Chitosan und Hyaluronsäure. Die Eignung und Anwendung von Chitosan zur keimtötenden Oberflächenfunktionalisierung wurde in der Vergangenheit bereits gezeigt (Ferreira *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2000) und kann entsprechend für medizintechnische Anwendungen genutzt werden.

Material und Methoden

Die angestrebte Beschichtung wurde mit Hilfe der Layer-by-Layer-Technik hergestellt. Der Aufbau der Schichten mittels Quarz-Mikrowaage kontrolliert und die resultierenden Oberflächeneigenschaften physikalisch charakterisiert bezüglich ihrer Benetzbarkeit (Kontaktwinkel-Messung).

Biokompatibilitäts-Tests wurden durchgeführt, um zytotoxische Effekte auf Säugerzellen auszuschließen.

Die etablierte Beschichtung wurde anschließend auf Textilproben aufgebracht und die resultierende anti-mikrobielle Wirkung getestet. Hierbei wurden sowohl etablierte Modell-Bakterien (*E. coli*, gramnegativ), als auch relevante Humanpathogene (*S. aureus*, grampositiv) untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

Die Untersuchungen zeigten eine erfolgreiche Aufbringung der Polymerbeschichtung im Layer-by-Layer Verfahren. In den Zellkultur-Tests erwiesen sich die Beschichtungen als biokompatibel. Und die antibakterielle Funktionalität beschichteter Textilien konnte mit Hilfe der Bakterientests erfolgreich gezeigt werden.

Dieser Ansatz könnte damit zur Beschichtung verschiedener Textilien genutzt werden, um Erreger abzutöten und deren Übertragung im Krankenhaus zu minimieren. Mögliche Anwendungen wären z.B. beschichtete Wundauflagen, Kompressen, Patienten- und OP-Bekleidung, Bettwäsche und Handtücher.

P64

Functionalization of PU-based materials for orthopedic applications

K. Athanasopulu¹, *R. Kemkemer^{2,1}, G. Lorenz¹, L. Kutuzova¹

¹Hochschule Reutlingen, Reutlingen, Deutschland

²Max-Planck-Institut für Intelligente Systeme, Stuttgart, Deutschland

Knee osteoarthritis is a common complication and can lead to total loss of joint function in patients. Treatment by either partial or total knee replacement with appropriate UHMWPE based implants is highly invasive, may cause complications and may show unsatisfying results. Alternatively, treatment may be done by insertion of an elastic interpositional knee spacer with optimized material characteristics.

We report the development of high performance polyurethane-based polymers modified with bioactive molecules for fabrication of such knee spacers. In order to tailor mechanical and tribological properties and to improve resistance to enzymatic degradation we propose a core-shell model for the spacer with specifically adapted properties.

The shell material modification has been developed with two different strategies (Fig.1) by incorporating native and sulfated hyaluronic acid into the core model via bulk polymerization or covalent surface tethering. The surface structure and morphology was analyzed by electron microscopy (SEM), contact angle measurements and other methods.

The proposed construct has a core material based on polycarbonate urethane surrounded with long polydimethylsiloxane (PDMS) chains with low water uptake and high mechanical stability. The shell is modified with hydrophilic hyaluronic acid components to provide bioactivity. First in-vitro tests with chondrocytes demonstrate the biocompatibility.

Figure 1: Strategy to modify polyurethane-based shell material with hyaluronic acid

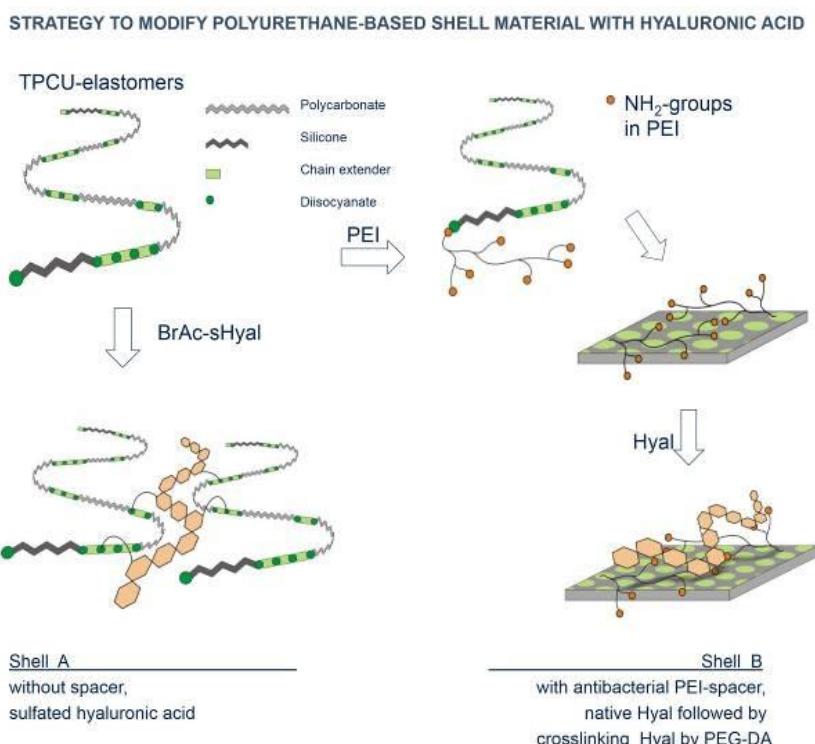
Acknowledgement

Financial support of this project by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) under grant number 01EC1406C (TOKMIS) is gratefully acknowledged

References

- [1] Makris E.A. et al. (2011), Biomaterials 32(30):7411-7431
- [2] Gong F. et al. (2010), International Journal of Polymer Science , 8p
- [3] Magnani A. et al. (1999), J. Mater. Chem., 9:2393-2398

Abb. 1



P66

Biocompatible polymers for biodegradable micro-structured scaffolds

*C. Hege^{1,2}, J. Dolderer³, D. Siegel-Axel⁴, S. Schiller²

¹Fraunhofer IOSB, Ettlingen, Deutschland

²Freiburg Institute for Advanced Studies (FRIAS), Freiburg, Deutschland

³Universitätsklinikum Regensburg, Regensburg, Deutschland

⁴Universitätsklinikum Tübingen, Vaskuläre Grundlagen, Tübingen, Deutschland

For producing scaffolds for tissue engineering, it is important to use biocompatible polymers. Sn(octanoate)₂ is the standard catalyst for synthesizing biodegradable polymers by ring-opening polymerization, but it is in discussion to be cytotoxic.[1] So we tested iron salts as catalysts for ϵ -caprolactone, DL-lactide, their copolymers and copolymers with glycolide. Especially iron(III)perchlorate is a good catalyst for ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone [2]. For this catalyst, the influence of different initiators to the molecular weight was examined. The result was that coordinating initiators lead to higher molecular weight than non-coordinating initiators. The cell compatibility of the iron and tin catalysts were compared by cell counting using a hemocytometer.

Porous scaffolds were made of the biocompatible polymers by combining a porogen-leaching approach with a phase separation approach. The scaffolds were analyzed with SEM and light microscopy. The porogen leaching approach enables pores from 125 - 1250 μm . The phase separation leads to small pores in the struts of porogen-pores which leads to additional interconnection and micro-structured scaffolds. The preference of preadipocytes concerning the pore size were examined. The preadipocytes liked both the scaffolds with the 125-150 μm and the scaffold with 800 - 1250 μm .

[1] M. C. Tanzi, P. Verderio, M. G. Lampugnani, M. Resnati, E. Dejana, and E. Sturani, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1994, 5, 393-396.

[2] C. S. Hege and S. M. Schiller, *Green Chem.*, 2014, 16, 1410-1416.

P67

Immobilization of Drugs for Photodynamic Therapy on Hydrogels

*S. Glaß¹, A. Schulze¹, B. Abel¹

¹Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung e.V., Chemie, Leipzig, Deutschland

Hydrogels are water-swollen polymer networks that can be loaded with bioactive substances and drugs very easily. They are absorbent and have a high degree of flexibility [1].

Polyethylenglycol (PEG) hydrogels are a new and useful tool for drug delivery systems [2]. Therefore, they are on high interest for regenerative medicine applications [3]. The here produced hydrogels should be used as wound patches for the regeneration of poorly healing lesions or the treatment of skin tumors. Drugs, used for photodynamic therapy, should be immobilized and irradiated to produce singlet oxygen.

Abb. 1

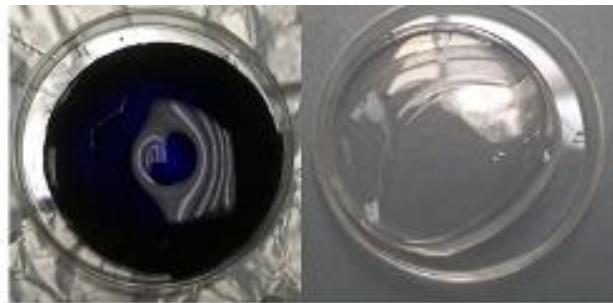


Fig. 1: Photograph of PEGDA Hydrogel
with and without methylenblue encapsulated

The polyethylenglycol diacrylate (PEGDA) hydrogels were prepared by photopolymerization. Therefore, a former preparation strategy was improved and methylene blue was encapsulated as photosensitizer for photodynamic therapy [4]. The prepared hydrogels were analyzed by scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy (IR), UV/VIS spectroscopy and dynamic mechanical analysis. Furthermore, material properties like swelling ratio, mesh size, and dye release were determined.

In Figure 1 two of the produced PEGDA hydrogels are shown. The diameter of the samples is 3.5 cm and the thickness is about 1 mm. The picture on the right side shows a hydrogel directly after preparation, the photograph on the left side one with immobilized methylene blue. The pure hydrogels are transparent in nearly the whole range of visible light, so they are an excellent carrier for dyes.

The method shown here could be a simple and effective preparation strategy for wound gels, where different drugs can be incorporated, and which can be used for future medical applications.

References

- [1] E. M. Ahmed, *Journal of Advanced Research*, 6, 105 (2015).
- [2] C.-C. Lin and K. S. Anseth, *Pharmaceutical Research* 26, 631 (2009).
- [3] H.Zhang, R. Shi, A. Xie, J. Li, L. Chen, P. Chen, S. Li, F. Huang, and Y. Shen, *Appl. Mater. Interfaces*, 5, 12317 (2013).
- [4] S. Menezes, M.A.M. Capella and L.R. Caldas, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 5, 505 (1990).

Modifikation und Sterilisation von Perikardgewebe durch nichtthermische Elektronenstrahlbehandlung

*S. Walker¹, J. Schönenfelder¹, C. Wetzel¹, C. Dittfeld², M. C. Hacker³, M. Schulz-Siegmund³, R. H. Funk⁴

¹Fraunhofer FEP, Dresden, Deutschland

²Forschungsabteilung der Herzchirurgie, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Herzzentrum Dresden, Dresden, Deutschland

³Institut für Pharmazie, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Universität Leipzig, Leipzig, Deutschland

⁴Institut für Anatomie, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Dresden, Deutschland

Biologische Herzkappenprothesen bestehen oftmals aus Perikardgewebe. Perikardien sind zum Großteil aus Kollagenfasern aufgebaut. Da xenogene Perikardien *in vivo* beschleunigt abgebaut werden, ist eine Vernetzung mit Glutaraldehyd weit verbreitet. Zusätzlich zu einer Kollagenvernetzung soll Glutaraldehyd die mechanische Stabilität erhöhen sowie desinfizierend wirken. Allerdings führen toxische Rückstände im Gewebe zu einer verminderten Integration in den Empfängerorganismus. Die Vernetzung mittels Glutaraldehyd soll die Kalzifizierung biologischer Herzkappenprothesen begünstigen wodurch es zu einem beschleunigten Funktionsverlust kommt. Es wird von einer Haltbarkeit von etwa 10 bis 15 Jahren ausgegangen. Trotz der Entwicklung zahlreicher alternativer Vernetzungsmethoden konnte bisher kein Material identifiziert werden, das keine Nachteile in Bezug auf Bioverträglichkeit und mechanische Eigenschaften aufweist.

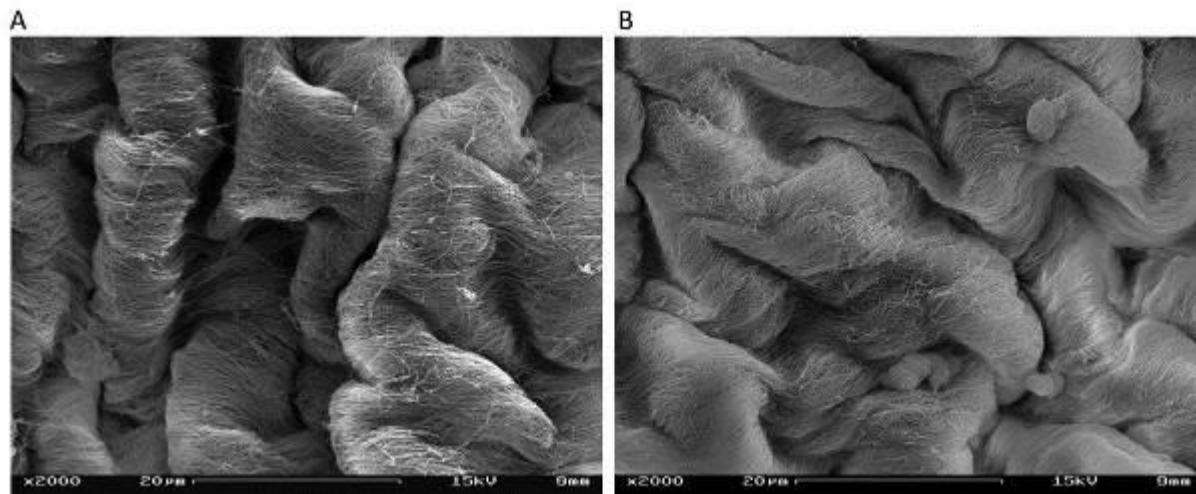
Elektronenstrahlbehandlungen können vernetzend oder degradierend auf biologische Moleküle wie zum Beispiel Kollagen wirken. Vernetzung und Degradation treten hierbei parallel auf. In Abhängigkeit der Dosis kann das Verhältnis von Vernetzung zu Degradation beeinflusst werden. Zusätzlich wird die Elektronenstrahlbehandlung für die Sterilisation unterschiedlicher (Implantat-) Oberflächen angewandt.

Um die Kollagenvernetzung zu untersuchen wurden präparierte Schweineperikardien einer nichtthermischen Elektronenstrahlbehandlung unterzogen. Die Kollagenmatrix wurde dadurch modifiziert und sterilisiert. Durch die Behandlung wurde die Geschwindigkeit des enzymatischen Abbaus *in vitro* im Vergleich zur nicht elektronenstrahlbehandelten Kontrolle nicht beeinträchtigt. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen ergaben keinen Hinweis auf Kollagendegradation durch die Behandlung (Abb. 1). Mittels Trübungsmessung eines mikrobiologischen Kulturmediums wurde eine sichere Sterilisation bei einer Dosis von 25 kGy gezeigt.

Durch diese neuartige Behandlung des Ausgangsgewebes steht ein alternatives Material für die Anwendung als biologische Herzkappenprothese zur Verfügung. Da auf die Verwendung des toxischen Glutaraldehyds verzichtet wird ist eine erhöhte Bioverträglichkeit zu erwarten. Dies könnte sich positiv auf die Funktionsdauer der Herzkappenprothese auswirken.

Abb. 1. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von A) nativem und B) 25 kGy Elektronenstrahl-behandeltem Schweineperikard. 2000-fache Vergrößerung.

Abb. 1



P69

StarPEG-GAG hydrogels as chemokine scavenger to promote wound healing

N. Lohmann^{1,2}, L. Schirmer^{3,2}, E. Wandel^{1,2}, P. Atallah^{3,2}, I. Forstreuter^{1,2}, U. Freudenberg^{3,2}, C. Werner^{3,2}, J. C. Simon^{1,2}, *S. Franz^{1,2}

¹Leipzig University, Department of Dermatology, Venerology and Allergology, Leipzig, Deutschland

²Collaborative Research Center (SFB-TRR67) Matrixengineering, Leipzig and Dresden, Deutschland

³Leibnitz Institute of Polymer Research Dresden, Max Bergmann Center of Biomaterials Dresden, Center for Regenerative Therapies Dresden, Dresden, Deutschland

Incidences of non-healing wounds are constantly rising and significantly contribute to morbidity and mortality worldwide. Non-healing wounds do not progress the phases of normal wound repair but are stuck in a chronic inflammatory response that is driven by uncontrolled infiltration and activation of immune cell leading to excessive tissue breakdown. Resolution of this unrestrained inflammation loop represents an unmet challenge in the treatment of non-healing wounds and calls for the development of advanced therapeutic wound dressings which intervene in the aberrant wound healing process [1]. In our approach, we test biohybrid hydrogels composed of poly(ethylene glycol) (starPEG) and heparin derivates varying in their sulfation pattern as such candidate wound dressing. Heparin acts as multifunctional cross-linker allowing functionalization of the hydrogels e.g. through biomimetic presentation of growth factors as shown for FGF-2 and VEGF promoting angiogenesis [2]. Importantly, heparin is also known for its high binding affinity for chemokines which mediate infiltration of immune cells to inflammation sites. Our concept of utilizing heparin in wound dressing hydrogels is to form an efficient local sink for chemokines through their scavenging and inactivation in huge amounts and with a high affinity within these hydrogels. In consequence, we hypothesize that chemokines are depleted from the local source (the inflammatory wound) and recruitment of further immune cells is stopped which may eventually end the inflammatory process.

Hydrogels were prepared by reacting the carbodiimide/N-hydroxysulfosuccinimide (EDC/s-NHS)-activated carboxylic acid group of heparin with amine-functionalized starPEG. Different heparin derivatives were utilized: standard heparin (SH), N-desulfated heparin (N-DSH) and 6-O/N-desulfated heparin (6ON-DSH) while a PEG/PEG hydrogel system served as control. To determine the hydrogels' scavenging activity for chemokines binding assays with recombinant mediators and supernatants (SN) from activated dermal fibroblast (dFb) or inflammatory macrophages were performed. In all conditions only the heparin-based hydrogels but not the PEG/PEG control displayed an unmatched high capacity for binding of the major inflammatory chemokines MCP-1 and IL-8 whereas other inflammatory mediators like IL-1b, TNF and IL-6 were not targeted by the hydrogels. Capacity for chemokine binding of the hydrogels is dependent on the sulfation level of the heparin component (SH>N-DSH≥6ON-DSH). Scavenging of the chemokines resulted in their functional inactivation as demonstrated in a transmigration assay with primary human monocytes and PMN which present a reduced migratory activity in the presence of dFb-derived SN that are treated with the heparin hydrogels and consequently depleted for MCP-1 and IL-8. Applying these hydrogels in a complex *in vivo* situation using a wound healing model of full thickness excisional wounds in mice confirmed their abundant chemokine scavenging activity. High amounts of MCP-1 are found entrapped within heparin-based hydrogels recovered from wounds. Infiltration of immune cells was quantified in digested wound biopsies by flow cytometry. Of note, in wounds treated with heparin-based hydrogels but not with PEG/PEG-control gels influx of PMN and monocytes is significantly decreased 5 days post wounding (dpw). Additionally the overall expression of inflammatory cytokines and chemokines is downregulated in these wounds indicating a reduced inflammatory response. To further prove our working hypothesis under conditions of impaired wound healing the hydrogels have been applied in the delayed wound healing model of db/db mice. Strikingly, 10 dpw wounds treated with the heparin-based hydrogels showed faster reepithelialization and presented larger and more mature granulation tissue compared to untreated wounds.

Collectively, these findings demonstrate that starPEG-heparin hydrogels reduce immune cells invasion and inflammation in wound sites by chemokine scavenging and in consequence promote soft tissue growth in impaired healing conditions. In summary, we prove that starPEG-heparin hydrogels are efficient for the modulation of chemokine gradients in the body and thus may be used as effective efficient wound dressing materials in the treatment of chronic, highly inflamed wounds without delivering any bioactives.

References

- [1] Franz S. *et al.*, Biomaterials. 32:6692-709, 2011
- [2] Zieris A. *et al.*, J. Control Release 156:28-36, 2011

Hydrogel-Mikrostrukturen zur Quantifizierung der Adhäsions-unabhängigen Koloniebildung durch Tumorzellen

*A. R. Thomsen¹, C. Aldrian¹, Y. Thomann², M. Henke¹, P. Lund¹

¹University Medical Center Freiburg, Radiation Oncology, Freiburg, Deutschland

²University of Freiburg, Centre for Interactive Materials and Bioinspired Technologies, Freiburg, Deutschland

Fragestellung

Normalgewebs-Zellen sind typischerweise von der Adhäsion an ein Substrat abhängig. Bei Fehlen von adäquaten Molekülen der extrazellulären Matrix absolvieren Einzelzellen eine Sonderform der Apoptose namens Anoikis. Bei Tumorzellen geht diese Abhängigkeit häufig verloren, so dass Adhäsions-unabhängige Proliferation ein wichtiges Kriterium für Malignität darstellt. Anoikis-resistente Tumorzellen sind in der Lage, Metastasen zu bilden.

Die etablierten Koloniebildungs-Assays besitzen verschiedene Einschränkungen, u.a. sind sie mit einer hohen Interobserver-Variabilität behaftet und ermöglichen nur eine Flächenbestimmung der Kolonien, nicht aber des Volumens.

Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung und Validierung eines Koloniebildungsassay auf der Basis von mikrostrukturierten Agarose-Gelen. Agarose zeichnet sich durch eine gute Zellverträglichkeit aus, ohne dabei eine Zelladhäsion zu erlauben. Gleichzeitig lässt sich Agarose-Gel mit hoher Präzision abformen und ist für Nährstoffe und Licht gleichermaßen durchlässig.

Methoden

Mit einem hochpräzisen Abform-Verfahren wurden mikrostrukturierte Agarose-Gele mit multiplen, konischen Vertiefungen hergestellt. In diese Strukturen wurden die Koloniebildung von 6 verschiedenen humanen Tumorzell-Linien untersucht. Als Kontrollen wurden die Zellen in etablierten Verfahren getestet:

I. Koloniebildung auf Zellkultur-Polystyrol (2D, Standard für Adhärenz-abhängige Zellen) II. Koloniebildung in Weichagar (3D, Standard für Adhärenz-unabhängige Zellen)

Die innerhalb von 12-16 Tagen gewachsenen Kolonien wurden mittels elektronischer Bildanalyse (imageJ) ausgezählt und im Falle der Agarose-Gele auch das Volumen der Kolonien vermessen. Soweit die konventionellen Assays keine elektronische Bildanalyse erlaubten, erfolgte eine manuelle Auszählung der Kolonien.

Abbildung 1: 3D-Rekonstruktion der Mikrostrukturen aus µCT-Aufnahmen

Ergebnisse

Die Agarose-Strukturen erlaubten in allen Fällen eine eindeutige Abgrenzung der Kolonien untereinander und konnten mittels elektronischer Bildanalyse ausgewertet werden. Dies war im Fall der etablierten Assays überwiegend nicht möglich und brachte eine wesentlich höhere Variation der Ergebnisse mit sich. Der Zeitaufwand für die manuelle Auwertung betrug ein 4-faches gegenüber der elektronischen Bildanalyse. Der Anteil der Kolonie-bildenden Zellen war unter nichtadhärenten Bedingungen grundsätzlich niedriger als nach Adhäsion auf Zellkultur-Polystyrol.

Abbildung 2: Ablauf der elektronischen Bildanalyse zur Auszählung und Vermessung der Kolonien

Schlussfolgerungen

Mit Hilfe der mikrostrukturierten Agarose-Gele ist eine präzise und außerdem Volumen-basierte Auswertung möglich. Anders als bei den konventionellen Assays war auch die Berechnung des absoluten Volumens jeder einzelnen Kolonie möglich. Die hier vorgestellte Methode erzielt eine deutlich höhere Präzision als die etablierten Kolonie-Assays und ist gleichzeitig effizienter als die manuelle Auswertung.

Abb. 1

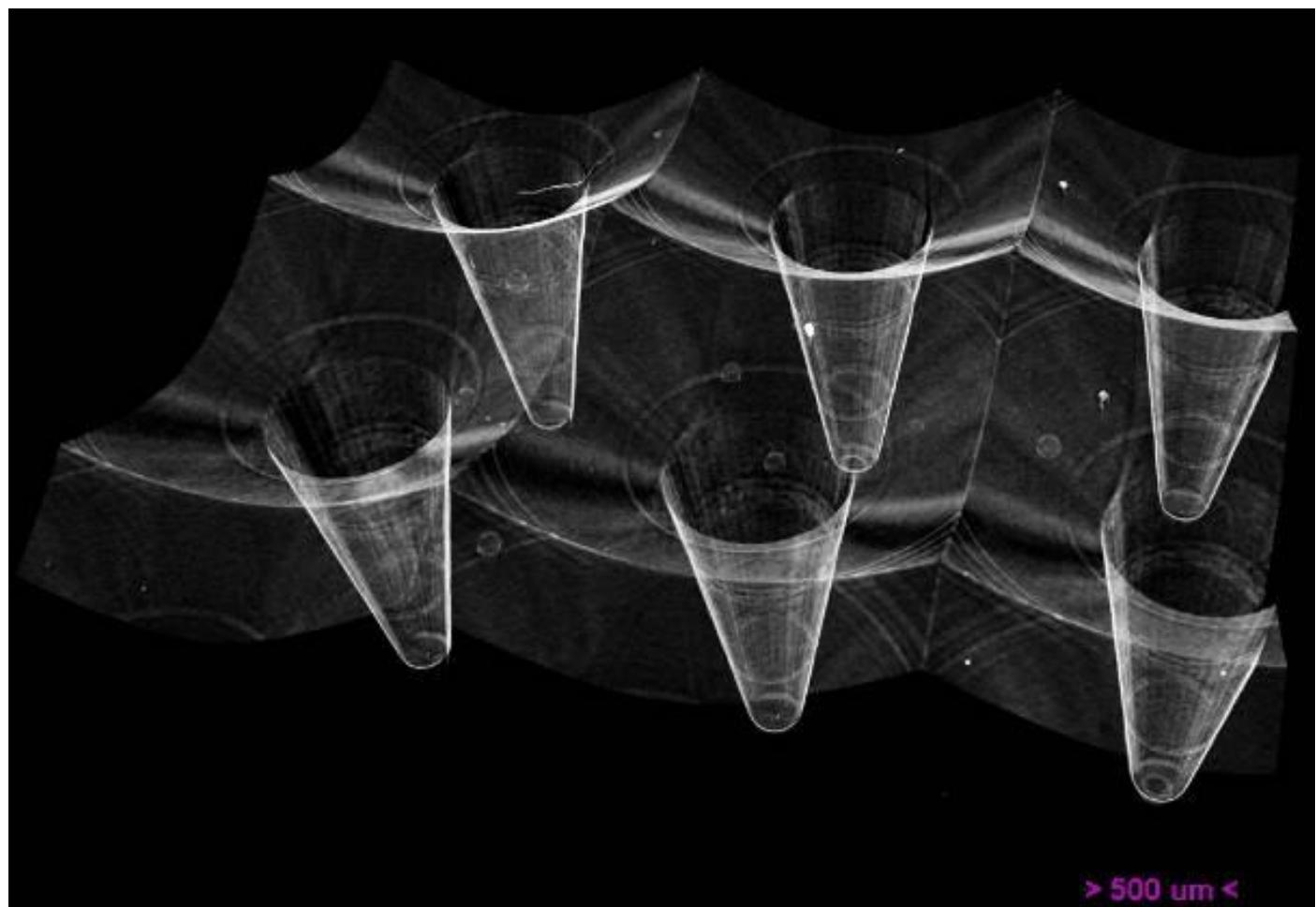
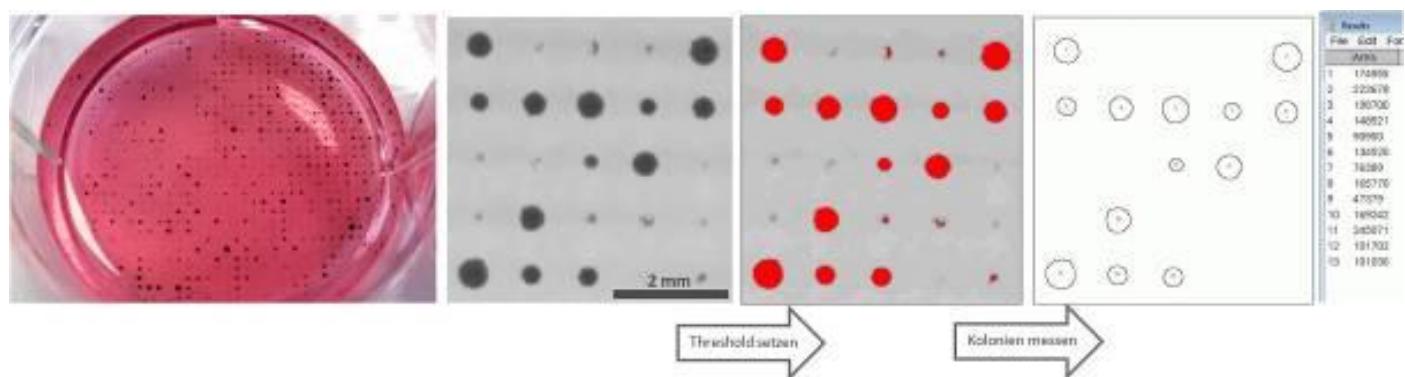


Abb. 2



MSC-geprägte Makrophagen als potentielle Zelltherapie in der periprothetischen Osteolyse

*H. Jablonski¹, D. Creuzberg¹, M. Muny¹, H. Rekasi¹, M. Haversath¹, M. D. Kauther¹, M. Jäger¹

¹Universitätsklinikum Essen, Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, Essen, Deutschland

Fragestellung

Makrophagen als Zellen des Immunsystems sind für die Reaktion auf Fremdkörper und die Beseitigung von Pathogenen verantwortlich. Man unterscheidet zwischen klassisch aktivierte, proinflammatorischen (M1) und alternativ aktivierte, antiinflammatorischen (M2) Makrophagen (Martinez *et al.* 2014, Ka *et al.* 2014). Kürzlich wurde eine neuartige Spezies von M2-Makrophagen beschrieben, welche durch den Kontakt zu mesenchymalen Stammzellen (MSC) entsteht (Eggenhofer & Hoogduijn 2012, Kim & Hematti 2009). Diese MSC-geprägten Makrophagen (MGM) sind unter anderem gekennzeichnet durch eine verminderte Reaktion auf bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) (Yaoqin *et al.* 2014).

In der hier vorgestellten Studie wurde die Reaktion von MGM auf Abriebpartikel, welche bei Patienten mit Totalendoprothesen Auslöser periprothetischer Entzündungen mit anschließendem Knochenverlust sein können (Bauer 2002, Hallab & Jacobs 2009), analysiert. Die bisher beschriebenen antiinflammatorischen Eigenschaften der MGM könnten von potentieller therapeutischer Bedeutung für die Behandlung von Prothesenlockerungen sein.

Methoden

Humane MSC wurden aus der Spongiosa des Hüftkopfes freiwilliger Spender mit primärem Hütersatz isoliert. Primäre humane Makrophagen wurden als Monozyten aus dem Blut gesunder Probanden gewonnen. Beide Zelltypen wurden jeweils aus der mononukleären Fraktion isoliert. Dabei wurden die MSC über Adhärenz purifiziert und ihre Identität nach Expansion der Zellen über 2-3 Passagen mittels durchflusszytometrischer Charakterisierung typischer Oberflächenmarker bestätigt (nach Thomas *et al.* 2014). CD14⁺ Monozyten wurden mit Hilfe magnetisch aktiverter Zellseparation isoliert und in Insulin-haltigem Medium über 10 Tage zu Makrophagen differenziert (modifiziert nach Kim & Hematti 2009).

Anschließend wurden MSC entweder in direktem oder, mit Hilfe eines Transwell-Systems, indirektem Kontakt für 4 Tage mit den Makrophagen kokultiviert (Kim & Hematti 2009) und danach mit LPS oder Partikeln (Titan bzw. ultrahochmolekulares Polyethylen (UHMWPE)) für 6-24 Stunden stimuliert. Zunächst wurde die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-6 sowie der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und CCL-18 mittels kommerziell erhältlicher ELISAs im Zellkulturüberstand quantifiziert. Die Bestimmung der Expression des M1-Markers CD86 sowie des M2-Markers CD206 ist auf Proteinebene im Western Blot bzw. durchflusszytometrisch geplant.

Ergebnisse

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass sowohl LPS als auch - in geringerem Ausmaß - Titan- oder UHMWPE-Partikel die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-6 durch Makrophagen induzierten. Die TNF-α Sekretion bei MGM war in Partikel-stimulierten Zellen nach 6 Stunden inhibiert. In LPS-stimulierten MGM führte nur der indirekte Zellkontakt zu einer verminderten TNF-α Produktion.

Die IL-6 Sekretion nach 6 Stunden hingegen wurde in allen MGM sowohl bei LPS- als auch bei Partikel-Stimulation gesteigert. Die Produktion der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und CCL-18 war in LPS- und Partikel-aktivierten MGM, generiert sowohl durch direkten als auch durch indirekten MSC-Kontakt, ebenfalls erhöht. Für CCL-18 bildeten lediglich UHMWPE-stimulierte Zellen eine Ausnahme.

Das hier beobachtete Zytokinprofil (6h: TNF-α ↓, IL-6 ↑; 24h: IL-10 ↑) ist typisch für MGM (Kim & Hematti 2009).

Schlussfolgerungen

MSC sind aufgrund ihres pluripotenten Differenzierungspotentials von großer Bedeutung in der Geweberegeneration, beispielsweise in der Frakturheilung und der Therapie großflächiger Knochendefekte (Granero-Molto *et al.* 2009, Dimarino *et al.* 2013, Watanabe *et al.* 2016). Außerdem sind auch immunregulatorische Eigenschaften von MSC bekannt (Nair & Saxena 2013, Kehoe *et al.* 2014). Makrophagen als autologes therapeutisches Material sind aus Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut allerdings deutlich einfacher zu gewinnen als MSCs, die standardisiert aus Knochenmark oder Nabelschnurblut gewonnen werden.

MGM könnten durch ihr antiinflammatorisches Profil gegebenenfalls auch *in-vivo* die inflammatorische Reaktion auf Implantatabrieb unterdrücken und somit die Bildung von Osteolysen unterbinden. Somit könnten diese Zellen möglicherweise als Alternative zu einer konventionellen bzw. Stammzelltherapie in der Behandlung oder Prävention der aseptischen Prothesenlockerung sowie von bakteriell induziertem Knochenverlust eingesetzt werden.

P73

Defined adipocyte differentiation and long term stability through a cellulose-based culture matrix

*A.- C. Volz¹, S. Nellinger², P. J. Kluger^{1,3}

¹Hochschule Reutlingen, Reutlingen, Deutschland

²Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland

³Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart, Deutschland

White adipose tissue (WAT) comprises about one fourth of the human body, interacts with many other organs via paracrine and endocrine signals and sequesters lipophilic substances. Thereby it impacts distribution and levels of drugs [1]. Additionally WAT is the origin of different diseases and thus target of several drugs addressing those [2]. Therefore an adipose tissue testsystem is highly needed to analyze fundamental biological issues in physiological or diseased state, screen for potential drugs or create affiliated safety profiles. Additionally adipose tissue substitutes are highly desired to treat lost, deformed or burned subcutaneous fatty tissue [3]. In several promising attempts substantial progress was achieved e.g. by the encapsulation of adipocytes in a 3D environment with native matrix components like gelatine [4] or the optimization of media composition [5]. However, regardless of its potential in vivo or in vitro application, an adipose tissue model has to fulfill two main requirements which could not be implemented so far. First, the model has to show in vitro stability for a period of several weeks to enable its maturation and time-dependent investigations. Second, culture conditions have to be free of animal derived components or preferably completely defined to exclude possible impairments through unknown constituents and allow for GMP-compliant production.

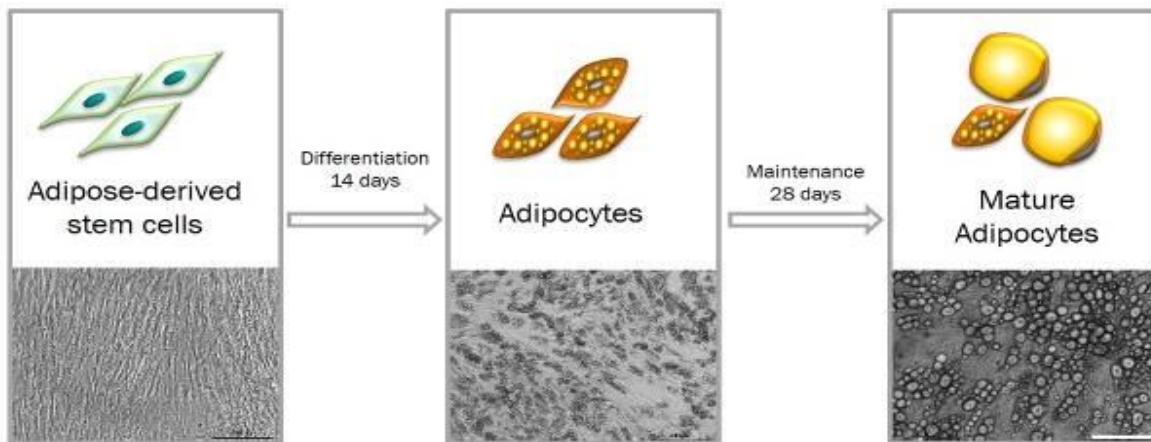
In this approach a novel cellulose based matrix and a specific media supplementation are combined to achieve defined adipocyte differentiation and long term maintenance. Human primary adipose-derived stem cells (ASCs) were isolated, characterized and expanded xenofree. ASCs were next to tissue culture polystyrol applied to a collagen coated surface and the cellulose-based matrix. Adipogenic differentiation of ASCs was induced by addition of a composed defined differentiation medium and continued for 14 days. On day 14 medium was switched to a composed defined adipocyte maintenance medium. Obtained adipocytes were subsequently cultured for additional 28 days. Preservation of adipocyte characteristics were evaluated by immunofluorescence staining of specific markers like perilipin A and the quantitative analysis of stored lipids. Retained adipocyte metabolism was determined by released leptin, lipolysis by released glycerol levels.

Our results classify the cellulose-based matrix as a useful tool to realize and optimize defined adipogenic differentiation of ASCs and the subsequent adipocyte maintenance. The matrix constitution enables strong cell matrix interaction and thereby strengthens cell adherence which is often diminished under defined culture conditions. Due to matrix-induced cell quiescence adipocytes' long-term stability was enhanced. Based on matrix-derived support successful differentiation and maintenance were confirmed via the composed media under completely defined conditions. Therefore the cellulose-based matrix is a promising biomaterial for stable long-term culture of quiescent cells with preservation of cell specific functions and characteristics which could as well be applied in other setups. Consecutive defined adipose tissue models could be further expanded e.g. to co-culture models and used as testsystems or tissue substitutes.

Figure 1: Process of adipogenic differentiation of Adipose-derived stem cells and maintenance of obtained adipocytes, scale bar: 200µm.

- [1] Bickel MH. The role of adipose tissue in the distribution and storage of drugs. In: Jucker E, editor. Progress in Drug Research / Fortschritte der Arzneimittelforschung / Progrès des recherches pharmaceutiques. Basel: Birkhäuser Basel; 1984. p. 273-303.
- [2] Nawrocki AR, Scherer PE. Keynote review: the adipocyte as a drug discovery target. Drug discovery today 2005;10:1219-30.
- [3] Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. Stem Cells 2012;30:804-10.
- [4] Huber B, Borchers K, Tovar GE, Kluger PJ. Methacrylated gelatin and mature adipocytes are promising components for adipose tissue engineering. J Biomater Appl 2015.
- [5] Huber B, Kluger PJ. Decelerating Mature Adipocyte Dedifferentiation by Media Composition. Tissue Eng Part C Methods 2015.

Abb. 1



Peptid-modifizierte Kollagen/Hydroxylapatit-Komposite für das Knochen Tissue Engineering

*L. Schuster¹, C. Klein², T. Graeve³, S. Reinert¹, D. Alexander¹

¹Universitätsklinikum Tübingen, Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Tübingen, Deutschland

²Zahnarztpraxis Zahngesundheit, Waiblingen, Deutschland

³Amedrix GmbH, Esslingen, Deutschland

Einleitung

Weltweit ist Knochen das zweithäufigste implantierte Material. Dieser Bedarf kann nicht allein durch autologe Knochentransplantationen gedeckt werden. Eine attraktive Alternative bietet das Tissue Engineering. Ziel dieser Studie ist die Entwicklung eines Kollagen/Hydroxylapatit-Kompositmaterials, welches sich als Matrix zur Besiedelung von Stammzellen aus dem Kieferperiost eignet. Durch die Biofunktionalisierung dieser Matrix mittels BMP2- und VEGF-Mimikry Peptiden sollen die osteogene Differenzierung und Vaskularisierung gefördert werden. Die Einbindung der Peptide in die Matrix erfolgt dabei durch Interaktion eines Poly-Glutaminsäure-Tags an den Peptiden mit Hydroxylapatit.

Methoden

Die Bioaktivität der Peptide wurde zunächst in löslicher Form in einer 2D Kultur untersucht. Die osteogene Stimulation von humanen Kieferperiostzellen durch das BMP2-Mimikry Peptid wurde mit Hilfe der alkalischen Phosphatase Aktivität untersucht. Darüber hinaus wurde die Aktivierung weiterer osteogener Marker mittels qRT-PCR analysiert. Die Effekte des VEGF-Mimikry Peptides auf Endothelzellen wurden mit Hilfe eines Transwell-Assays, sowie mittels Impedanz-Messungen mit dem x-CELLelligence (OMNI Life Science GmbH (Deutschland) getestet.

Die Binde-Effizienz der Peptide an das Hydroxylapatit (Fluidinova, Portugal) wurde im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll-Peptiden ohne Tag-Sequenz quantifiziert. Das mit Peptiden funktionalisierte Hydroxylapatit wurde anschließend in die Kollagenmatrix eingebracht, ebenso wie humane Kieferperiostzellen. Die Zellvitalität innerhalb der 3D-Konstrukte wurde mittels eines Proliferationsassays untersucht, sowie die Zellen im Konstrukt fluoreszenz-mikroskopisch visualisiert.

Ergebnisse

Es zeigte sich, dass das BMP-2 Mimikry Peptid in der Lage ist die Expression bzw. die Aktivität der alkalischen Phosphatase zu steigern, jedoch variieren das Ausmaß und die Stärke der Induktion Patienten-abhängig.

Das VEGF-Mimikry Peptid zeigte einen Migrations-fördernden Effekt auf humane Endothelzellen. Durch die Interaktion des Peptid-Tags mit dem Hydroxylapatit konnte die Kopplungseffizienz beider Mimikry Peptide deutlich gesteigert werden.

Die mikroskopische Analyse und die Bestimmung der Zellvitalität zeigten, dass die Konstrukte das Einwachsen und die Proliferation von Kieferperiostzellen ermöglichen.

Schlussfolgerung

Eine gesteigerte Expression und Aktivität der alkalischen Phosphatase sind essentielle Voraussetzungen für die Mineralisierung während der Knochenbildung. Eine Induktion der alkalischen Phosphatase durch die BMP-2 Mimikry Peptide in Kieferperiostzellen konnte in dieser Studie gezeigt werden. Die Migration von Endothelzellen, welche eine wichtige Grundvoraussetzung für die Angiogenese und Neovaskularisierung ist, konnte durch die VEGF-Mimikry Peptide effektiv stimuliert werden. Die in der vorliegenden Studie entwickelten Kollagen/Hydroxylapatit-Kompositmaterialen in Kombination mit den verwendeten Peptiden stellen eine vielversprechende Matrix für Knochen-Konstrukte im Tissue Engineering Bereich dar.

P75

Thrombozyten-Mediatorenkonzentrat (TMK): Protektiver Effekt in der Sehnenheilung?

*E. Arslan¹, T. Nellesen², A. Bayer³, A. Prescher⁴, S. Lippross⁵, S. Nebelung⁶, H. Jahr⁶, C. Jäger⁷, W.-D. Huebner⁷, F. Horst⁸, M. Stoffel⁹, M. Shakibaei¹⁰, T. Pufe², M. Tohidnezhad²

¹Uniklinik Aachen, Zahnärztliche Prothetik, Aachen, Deutschland

²RWTH Aachen, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Aachen, Deutschland

³Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Herz- und Gefäßchirurgie, Kiel, Deutschland

⁴RWTH Aachen, Institut für zelluläre und molekulare Anatomie, Aachen, Deutschland

⁵Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Klinik für Unfallchirurgie, Kiel, Deutschland

⁶Uniklinik Aachen, Klinik für Unfallchirurgie, Aachen, Deutschland

⁷Curasan AG; Kleinostheim, Germany, Deutschland

⁸Uniklinik Aachen, Zahnärztliche Werkstoffkunde und Biomaterialforschung, Aachen, Deutschland

⁹RWTH Aachen, Institut für allgemeine Mechanik, Aachen, Deutschland

¹⁰Ludwig-Maximilians Universität, Institut für Anatomie, München, Deutschland

Einleitung

Die Behandlung einer Sehnenruptur verläuft oft langwierig und kompliziert mit hoher Rezidiv Gefahr. Die Verwendung vom Plättchenreichen-Plasma (PRP) hat sich trotz kontroversen in vitro und in vivo Studienergebnissen in der Therapie von Sehnenrupturen bewährt. Das autogene Thrombozyten-Mediatorenkonzentrat (TMK) wird chair-side durch das standardisierte Advanced Tissue Regeneration System (ATR® System) gewonnen. Das primäre Ziel dieser Arbeit ist die Erforschung der Wirkung des TMKs auf humane Tenozyten.

Methode

TMK wurde mittels des ATR® Systems von freiwilligen und gesunden Probanden gewonnen. Mittels ELISA wurden zunächst diverse Wachstumsfaktoren und Zytokine in TMK, Serum und Plasma quantifiziert. Die Tenozyten wurden von Achillessehnenbiopsien von Mensch und Maus isoliert und kultiviert. Der Nachweis der Tenozyten erfolgte immunhistochemisch durch die Detektion der Tenozytenmarker Tenomodulin (TNMD) und Scleraxis (SCX). Die Tenozyten wurden mit verschiedenen TMK-Konzentrationen behandelt. Zur Untersuchung der Zellviabilität und

-proliferation wurde der CellTiter-Blue® Cell Viability Assay und der CYQuant® Cell Proliferation Assay verwendet. Mit Hilfe der semiquantitativen real-time RT-PCR wurde die Expression von SCX, Typ I Kollagen (COL1A1) und TNMD untersucht.

Resultate

Diverse Wachstumsfaktoren (VEGF, PDGF-BB, TGF-β), BMP2, BMP4, BMP7 und Zytokinen (IL-6, TNF-alfa und IL-10) wurden im TMK quantifiziert. Es konnten positive Effekte von TMK auf die Viabilität der Tenozyten bis zu 60% und auf die Proliferation der Tenozyten bis zu 70% gemessen werden. Ferner konnte eine erhöhte Gen-Expression von COL1A1, SCX und TNMD in Tenozyten nach Behandlung mit TMK ermittelt werden. Eine signifikante Steigerung der SCX-Expression konnte bei der immunhistochemischen Färbung nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung

Diese Arbeit konnte zeigen, dass TMK wichtige Wachstumsfaktoren enthält, die im Heilungsprozess der Sehnenrupturen eine wichtige Rolle spielen. Die erhöhte Expression von COL1A1 sowie des Scx-Gens nach TMK-Zugabe weisen auf eine persistierende tenogene Eigenschaft der Zellen hin. In vivo Versuche müssen zeigen, ob die Behandlung mit TMK tatsächlich auch zu einer Reduktion der Rezidivrate führen kann.

Biomimetic scaffolds as model systems for diseased bone marrow niches

*A. Raic¹, K. Bieback², N. Bodenberger³, F. Rosenau³, J. Gacanin³, T. Weil³, C. Lee-Thedieck¹

¹KIT Karlsruhe, Institute of Functional Interfaces, Karlsruhe, Deutschland

²Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Mannheim, Deutschland

³Universität Ulm, Institute of Organic Chemistry II and Advanced Materials, Ulm, Deutschland

The bone marrow represents a closely intertwined area of stromal cells and extracellular matrix (ECM) components that assemble to niches for the blood forming - hematopoietic - stem and progenitor cells (HSPCs). In this shelter HSPCs are regulated in their stem cell maintenance, differentiation and proliferation. Thereby, blood production is ensured during the entire life time. This vital process can be disturbed by malignant or infectious diseases. In the current study we aim to engineer artificial niche models for the investigation of alterations that occur in the niche and disturb the interactions of HSPCs with their microenvironment e.g. during leukemia or bacterial infection. In order to mimic the protein-rich ECM, which provides anchoring points for cells, cationized bovine serum albumin (cBSA) was used as scaffold substrate as it is cost-effective and available in sufficiently large quantities. Furthermore, the cationized BSA (cBSA) promotes the adhesion of the HSC model cell line KG1a. With this cell-adhesive protein two different scaffold assembly strategies were pursued. In the first strategy, a macroporous scaffold, mimicking the spongy architecture of trabecular bone - harbouring the red bone marrow - was build up by cross linking the cationized protein via cryogelation. Using this approach, an elastic, highly porous structure was formed. By varying the concentration of cBSA, the pore size, porosity (86-97%) and stiffness (30-200 kPa) of the cryogel could be adjusted. With purpose of mimicking the fibrous ECM architecture of the bone marrow a second protein reprocessing method was used. By electrospinning of the cBSA, a new fibrous scaffold with fiber diameters of ~1 µm could be constructed. HSPCs isolated from human umbilical cord blood were co-cultivated with supportive mesenchymal stroma cells (MSCs) in the different scaffold materials. We found out that both scaffolds were not cytotoxic and were able to maintain HSPCs cells to a similar or even better extent than tissue culture plates. In conclusion, the developed scaffolds are suitable to mimic different features of the 3D architecture of HSC niches. Furthermore, the modified BSA represents to be an attractive alternative to adhesive ligands. We could show that both materials meet the minimum requirements to support a physiological cell behavior of HSCs in terms of their differentiation potential. Therefore, these artificial niches are currently further developed to *in vitro* models of diseased HSC niches to study pathological alterations of the bone marrow during bacterial infection (Osteomyelitis model) or leukemia (leukemic niche model).

Cardiomyocyte-specific differentiation of murine embryonic stem cells to cardiomyocytes: Roles of transcription factors and microRNAs

*L. Gan¹, B. Denecke¹

¹RWTH Aachen, Genomics Facility IZKF, Aachen, Deutschland

Stem cell-based therapeutics brings hope for many incurable diseases like heart infarction. A prerequisite for the application of stem cell-based treatments is a better understanding of the key regulatory mechanisms in respect of the specific stem cell differentiation. In the current project using a mouse model, we studied the cardiomyocyte specific differentiation process of murine embryonic stem cells by the simultaneous genome-wide transcriptome analysis of mRNA and microRNA at four different time points. Differentially expressed mRNA transcripts (1342) and microRNAs (50) were identified during the differentiation process. Among the 1342 regulated genes, 150 regulated transcription factors were defined according to Gene Ontology molecular function term, Riken transcription factor or FANTOM database. Regulatory networks composed of transcription factors, microRNAs and genes were constructed based on their expression profiles. We considered predicted target information of transcription factors and microRNAs, validated microRNA target information, as well as tissue specific transcription factor binding information in constructing the primary network. In the secondary network, in contrast, only validated microRNA target information and tissue specific transcription factor binding information were included. Subsequent analyses of the secondary network detected three-node regulatory patterns during the cardiomyocyte specific differentiation. The overlap of regulatory networks and functional pathways (Wiki and KEGG) revealed the effects of regulatory patterns in biological pathways. Regulative patterns, like miR21 - Zic3 - Mycn in the Plurinetnetwork pathway; or Meis1 - Gata6 in the striated muscle contraction pathway, were identified from our result. The procedure used in our study enables new insights into the regulatory network involved in cardiomyocyte specific differentiation of embryonic stem cells. This preselection of potential regulatory networks is also applicable to other differentiation mechanisms without cost and time-intensive experimental processes. Our results will benefit the understanding of the differentiation process, which is necessary for a precise and effective production of cardiomyocytes from stem cells.

Mechanical stimulation of human mesenchymal stem cells using a uniaxial cell stretcher

*T. Schleypen^{1,2}, M. Hoss^{3,2}, U. Schnakenberg⁴, S. Stiefel⁵, B. Hoffmann⁵, S. Neuss^{6,2}

¹University of Applied Sciences Aachen, Aachen, Deutschland

²University RWTH Aachen, Institute of Pathology, Aachen, Deutschland

³University Hospital RWTH, Electron Microscopy Facility, Aachen, Deutschland

⁴RWTH Aachen University, Institute of Materials in Electrical Engineering 1, Aachen, Deutschland

⁵Forschungszentrum Jülich GmbH, Institute of Complex Systems, Jülich, Deutschland

⁶University RWTH Aachen, Helmholtz Institute for Biomedical Engineering, Aachen, Deutschland

Introduction

Human multipotent adult mesenchymal stem cells (MSC) are a promising and well-characterized cell source for tissue engineering. The differentiation fate of MSC can be controlled by various factors like substrates (e.g. coatings/biomaterials), growth factors, as well as chemical and physical stimulation. It is well known that osteogenic differentiation of MSC can be induced *in vitro* by osteogenic induction medium (OIM). In this project, we investigate the influence of physical stimulation in form of mechanical treatment in combination with a biomaterial coating supporting osteogenic fate. Mechanical treatment is defined by various parameters (amplitude, frequency, duration of stretching per day). The best combination of these parameters for osteogenic differentiation needs to be identified.

Materials and Methods

Mechanical stimulation is applied to MSC using a uniaxial cell stretcher which provides linear cyclic stretching of up to 6 polydimethylsiloxane (PDMS) chambers. Cell adhesion to PDMS surface is ensured by coating with collagen, fibronectin or fibrin, which are known to support osteogenic differentiation.

Cells were cultured on biomaterial-coated PDMS chambers in growth media in presence and absence (negative control) of uniaxial cyclic tensile strain for 21 days. In parallel, MSC were cultured in osteogenic induction medium containing dexamethasone, beta-glycerophosphate and L-ascorbic acid-2-phosphate as a positive control.

Human MSC were analyzed based on their responses to mechanical stimulation using real-time PCR to quantify expression of osteogenic marker genes, such as CBF α 1, RUNX2, osteopontin and alkaline phosphatase. Alizarin Red staining and EDX analysis were performed to visualize and quantify calcium and phosphate accumulations indicating osteogenic differentiation.

Results and Discussion

First results showed that MSC on collagen-coated PDMS chambers with a uniaxial 10% stretch (2 mm amplitude) does not support osteogenic differentiation. However, a 2.3% stretch (0.5 mm amplitude) with a frequency of 0.5 Hz showed differentiation towards osteoblasts after 21 days without induction medium. Alizarin Red staining and EDX analysis showed calcium phosphate accumulations, while PCR results showed upregulation of osteogenic marker genes.

In vitro elastogenesis in tissue-engineered constructs

*D.- K. Kaloulis¹, R. Moreira¹, V. Gesche², S. Jockenhoevel^{1,2}, P. Mela¹

¹Institut für Angewandte Medizintechnik, RWTH Aachen University , Tissue Engineering and Textile Implants, Aachen, Deutschland

²Institut für Textiltechnik, RWTH Aachen University , Aachen, Deutschland

A network of elastic fibers, which consists mainly of fibrillin rich microfibrils and elastin, provides cardiovascular tissues with the property of elasticity. In cardiovascular tissue-engineering (TE) it is absolutely necessary to induce elastogenesis *in vitro* in order to obtain functional constructs able to stretch and recoil with each cardiac cycle. However, the formation of elastic fibers in tissue-engineered heart valves (TEHVs) *in vitro* does not occur, although the used cells are capable of producing elastin. Therefore, we hypothesize that the correct mechanobiological stimuli are not present during the *in vitro* dynamic conditioning of the TECs.

For this reason, bioreactor systems were developed to investigate the role of mechanobiology on elastogenesis in tissue-engineered constructs (TECs) *in vitro*, and especially the effect of cyclic stretching. Two different types of bioreactor systems were produced to stimulate the TECs by cyclic stretching. The bioreactors consisted of a chamber and a motor with its control unit. Two types of motors were identified and used: a linear motor providing a defined stretching throughout the width of the TECs and a rotational motor providing a stretching varying along the width of the TECs. The TECs were fabricated with the same scaffold materials and cells as the TEHVs: fibrin gels reinforced with a textile polyethylene terephthalate mesh and seeded with human umbilical cord venous smooth muscle cells/fibroblasts. The TECs were conditioned with different protocols (e.g. with different stretch amplitudes, frequencies, durations and medium composition). The tissues were analyzed by immunohistochemical stainings against fibrillin-1 and elastin.

The sterile function of the bioreactors for the total duration of the experiment and the accurate control of the stretching range and frequency were achieved. The stimulation of elastogenesis by cyclic stretching was demonstrated by the detection of fibrillin-1 and elastin with both bioreactor types. Systematic studies on the parameters that effect elastogenesis were conducted and the optimal mechanobiological conditions were implemented in the conditioning protocol of TEHVs for the successful formation of elastin.

Neuartige dentale Glaskeramik für die laserbasierte Herstellung von Dünnschichten zur Karies- und Erosionsprävention

*M. Bilandzic¹, M. Esteves Oliveira², S. Klein², S. Wollgarten³, J. Stollenwerk⁴, H. Fischer¹

¹Universitätsklinikum RWTH Aachen, Zahnärztliche Werkstoffkunde und Biomaterialforschung (ZWBF), Aachen, Deutschland

²Universitätsklinikum RWTH Aachen, Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde, Aachen, Deutschland

³Lehrstuhl für Lasertechnik, Aachen, Deutschland

⁴Fraunhofer-Institut für Lasertechnik, Aachen, Deutschland

Einleitung

Zahnerhaltende Präventivmaßnahmen, wie z. B. die Fissurenversiegelung mit Kunststoffmaterialien, sind langfristig nur mäßig zielführend. Die Misserfolgsrate liegt hier bei 30 bis 55 % nach 5 Jahren. Grund für das Versagen ist meist ein nicht ausreichender adhäsiver Verbund zwischen Versiegelungsmaterial und Zahnoberfläche. Zusätzlich zur Kariesproblematik wird ein Anstieg einer anderen Art des Zahnsubstanzverlustes beobachtet. Die auf Säureangriffe zurückzuführende Erosion des Zahnschmelzes (Demineralisation) kann eine ausgeprägte Zerstörung der Zähne verursachen, welche durch mechanische Einflüsse (z. B. Zahneputzen) noch verstärkt wird. In einem von der DFG geförderten Verbundvorhaben wird eine neuartige, mittels Laser applizierbare Zahnversiegelung erforscht. Bei dem hier präsentierten Teilaспект des Vorhabens war die Arbeitshypothese, dass bei maßgeschneiderter Zusammensetzung eines glaskeramischen Beschichtungswerkstoffes Dünnschichten mittels CO₂-Laser auf Zahnhartsubstanz rissfrei und haftfest aufgebracht werden können.

Material und Methoden

Der neuartige glaskeramische Beschichtungswerkstoff wurde hinsichtlich der chemischen Ausgangszusammensetzung auf dem Patent von Weinstein weiterentwickelt und hatte folgende Zusammensetzung: 65 Gew.-% SiO₂, 19,25 Gew.-% Na₂O, 5,75 Gew.-% K₂O, 5 Gew.-% CaO, 4,5Gew.-% Al₂O₃ und 0,5 Gew.-% MgO. Unter Verwendung eines CO₂-Lasers wurde das chemisch modifizierte glaskeramische Pulver, (i) im Pulverbettverfahren, (ii) als aufgesprühte Dünnschicht auf Hydroxylapatit-Substraten und (iii) auf extrahierten Rinderzähnen mittels Lasersintern bearbeitet, um diese in dichte Schutzschichten zu überführen. Zur Rohmaterialcharakterisierung und zur Untersuchung der erzeugten Grünschichten sowie der Schichten nach der thermischen Behandlung, wurden die Untersuchungsmethoden RFA, FTIR, XRD, REM, EDX, DSC und die Erhitzungsmikroskopie genutzt.

Ergebnisse und Diskussion

Die pulverisierten glaskeramischen Ausgangswerkstoffe konnten in rissfreie und dicht gesinterte Schutzschichten (bis 200 µm Dicke) überführt werden. Wesentlich hierbei war die Materialeinstellung hinsichtlich der Korngrößenverteilung, die chemische Zusammensetzung der Glaskeramik, die Absorptionseigenschaften des Materials im Wellenlängenbereich des verwendeten Laserlichtes sowie die Einstellung der Bestrahlungsparameter des ausgewählten CO₂-Lasersystems. Um unerwünschten Rissbildungen gezielt entgegenzuwirken, wurde die Wärmedehnung des Beschichtungsmaterials angepasst. Die REM-Untersuchungen haben gezeigt, dass eine ausreichende Anbindung der lasergesinterten Schutzschichten sowohl auf Hydroxylapatit als auch auf den bovinen Zahnpräparaten möglich ist. Die vorgestellte Methode hat großes Potenzial, im klinischen Einsatz zur Karies- und Erosionsprävention nutzbar gemacht zu werden.

P81

Additive Manufacturing of Biodegradable Magnesium Implants

*L. Jauer¹, C. Gayer¹, W. Meiners¹, M. Voshage², N. Zumdicke³, D. Zander³

¹Fraunhofer ILT, Aachen, Deutschland

²RWTH Aachen University, Chair for Laser Technology, Aachen, Deutschland

³RWTH Aachen University, Chair of Corrosion and Corrosion Protection, Aachen, Deutschland

Additive Manufacturing technologies, well-known as 3D-Printing, such as laser powder bed fusion (Selective Laser Melting, SLM) enable cost-efficient production of individualized and complex parts. SLM is already being used for manufacturing patient specific implants designed from medical image data or implants with enhanced functionality by the use of designed, interconnected pore structures. These commercially available implants are typically made of non-degradable titanium alloys. However, for many indications a biodegradable solution is desirable. Biodegradable implants are designed to dissolve in the human body and are subsequently replaced by autologous bone tissue. A promising material class for such implants are magnesium alloys. In contrast to polylactic acid, magnesium alloys offer significantly higher strength, inherent osteoconductive stimulation and non-acidic degradation. However, its physical and chemical properties (e.g. high reactivity, low evaporation temperature, low density) render magnesium alloys one of the most challenging material classes for SLM processing. Despite these challenges as of recently it is possible to process biodegradable magnesium alloys such as MgYRE alloys via SLM. Due to their fine microstructure SLM specimens out of MgYRE exhibit excellent mechanical properties. A mean ultimate tensile strength of more than 300 MPa with a respective mean elongation at break of 12% can be achieved. Hydrogen evolution measurements were conducted in Hanks' balanced salt solution to evaluate the degradation behavior. The degradation rate of SLM specimens out of MgYRE is increased compared to cast material but it is similar to powder extruded material. The microstructure of the powder extruded material is similarly fine to the microstructure to the SLM specimens. Finally, complex scaffolds with strut sizes of approx. 350 µm and high detail resolution can be realized via SLM due to intensive process study and process optimization. This work illustrates that SLM is suitable for manufacturing biodegradable magnesium implants with designed, interconnected pore structures.

Automatisierte Herstellung und Charakterisierung eines vaskulären Gefäßes mit einschichtiger Endothelzellbesiedlung *in vitro*

*J. Schöneberg¹, B. Theek², V. Pathak², A. Blaeser¹, F. Kießling², H. Fischer¹

¹Universitätsklinikum Aachen, Zahnärztliche Werkstoffkunde und Biomaterialforschung, Aachen, Deutschland

²Helmholtz Institut für Biomedizinische Technik, Lehrstuhl für Experimentelle Molekulare Bildgebung, Aachen, Deutschland

Einleitung

Bei der Angiogenese kommt es zur Ausbildung neuer Gefäßstrukturen ausgehend von bereits vorhandenen Gefäßen. Dieser Prozess spielt nicht nur für die Wundheilung und ausreichende Durchblutung von neuen Gewebestrukturen eine Rolle, sondern ist auch entscheidend bei der Nährstoffversorgung von Tumoren. Um den Prozess der Tumor-Angiogenese besser zu verstehen, wird ein Modell benötigt, das mit den im Organismus vorkommenden Strukturen vergleichbar ist. Mit heutigen Methoden zur Rekonstruktion solcher Gefäßstrukturen ist es bereits möglich, einfache Angiogenesemodelle zu erstellen. Jedoch fehlt es an automatisierten Lösungen, um die komplexen Vorgänge systematisch untersuchen zu können. Dies liegt daran, dass die für die Angiogenese am besten geeigneten Materialien meist nicht oder nur schwer zu verarbeiten sind und Biomaterialien mit ausreichenden Festigkeiten und guter Verarbeitbarkeit meist keine Angiogenese unterstützen. In der vorgestellten durch das BMBF geförderten Studie wurde deshalb eine Methode entwickelt, Gefäßstrukturen automatisiert, *in vitro* herzustellen.

Materialien und Methoden

Da Angiogenese vorzugsweise in natürlichen Hydrogelen wie Kollagen und Fibrinogen stattfindet, wurde eine Druckstrategie auf einem am ZWBF entwickelten Biodrucker entwickelt, welche es ermöglicht, einen Gefäßkanal auch aus weniger steifen Materialien in komplexeren Geometrien anzufertigen. Dazu wurde das thermoreversible Hydrogel Gelatine genutzt. Mit Gelatine konnte ein Kanal mit einem Durchmesser von einem Millimeter und einer Länge von 16 mm geformt werden. Die Wandung des freigelegten Kanals wurde durch andere Hydrogele (Kollagen und Fibrin-Kollagen-Gemisch) beschichtet. Anschließend wurde das Formmaterial wieder aufgelöst, um den Durchfluss zu ermöglichen. Im Falle des Gemisches wurde der Gelantine zusätzlich Thrombin hinzugefügt, um ein Vernetzen des Fibrinogens herbeizuführen. Zusätzliche stabilisierende Strukturen konnten mittels Agarose erzeugt werden. Diese Konstrukte wurden direkt in einen am ZWBF entwickelten Bioreaktor gedruckt und konnten in diesem dynamisch kultiviert werden. Dabei wurden verschiedene automatisierte Methoden zur Endothelzellbeschichtung des Inneren der Kanäle sowie die Herstellung eines umgebenden Kanals aus glatten Muskelzellen untersucht. So war es möglich, Endothelzellen direkt im Druckvorgang innerhalb der Gelatine in den Kanal zu bringen, welche sich beim Auflösen des Kanals auf dessen Wandungen niedergelassen haben. Des Weiteren konnten Zellen nachträglich mittels Medium in den Kanal gepumpt werden und ebenfalls über Segmentation die Kanalwandungen besiedeln. Als dritte Anwendung wurden die Zellen bereits in die umgebenden Kanalwandungen eingebracht. Die so entstandenen Gefäßstrukturen wurden auf dauerhafte Stabilität *in vitro* sowie auf die Möglichkeit zur Vaskularisation im umgebenden Gewebe hin untersucht.

Ergebnisse, Diskussion und Ausblick

Es konnten verschiedene Methoden zur Herstellung von Gefäßstrukturen und unterschiedliche Vorgehensweisen zur Ausbildung der gleichmäßigen, einschichtigen Endothelzellbesiedlung sowie der umliegenden glatten Muskelzellschicht aufgezeigt und untersucht werden. Für eine automatisierte Lösung bieten sich dabei insbesondere diejenigen Prozesse an, in welchen die Zellen direkt verdrückt werden und kein zweiter Schritt zur Beschichtung der Kanäle notwendig ist. Die mechanisch stabilsten Kanäle wurden durch eine Fibrinbeschichtung erzeugt. Diese wiesen gegenüber den von reinem Kollagen umgebenden Kanälen eine geringere Ausfallwahrscheinlichkeit auf. Die angegebenen Verfahren ermöglichen es, trotz der fehlenden Stabilität der Hydrogele, diese in die gewünschte Form eines vaskulären Kanals zu bringen und diesen über eine Inkubationszeit von mehreren Wochen zu erhalten. In einem weiteren Entwicklungsschritt sollen die speziell dazu entwickelten Bioreaktoren nun zur *In-Vitro*-Untersuchung von Tumoren und deren Angiogenese genutzt werden.

P83

Laser-Induced-Forward Transfer - a tool for cell sorting and printing

*N. Nottrodt¹, N. Khalil¹, D. Riester¹, A. Gillner¹, M. Wehner¹

¹Fraunhofer ILT, Biofabrikation und Laser Therapie, Aachen, Deutschland

Motivation

Printing of living cells enables the development of new concepts in cell biology, tissue engineering and cell based *in vitro* assays. Today several technologies, which allow multi-cell printing are under investigation. Within this study, we developed a process, which allows single cell printing. Single-cell resolution printing may become a key technology towards understanding the fundamental interactions between different cell types and their stoichiometry.

Methodology

A highly automated single cell printing system, using Laser Induced Forward Transfer (LIFT) technology has been developed. Besides cell printing transferring of biomolecules and hydrogels over distances up to 2 mm is possible. The LIFTSYS™ cell printing system uses a transfer slide consisting of three layers. The first layer is a support layer (glass) which is transparent for laser irradiation, followed by an irradiation absorbing layer (e.g. 80 nm titanium) and a transfer layer laden with cells or proteins. By applying a laser pulse from a UV-laser source on the absorption layer, a vapor bubble is generated in the transfer layer. Its expansion and collapse propels the transfer layer with forward. Hence, the embedded cell is transferred onto a receiver slide within a fluid jet in a well-defined volume. The developed machine offers the capability to analyze the cells on the transfer slide before transferring. Optical methods are used for single cell selection. Parameters for cell sorting could be proliferation activity.

Results

With LIFTSYS™ we show a tool design, which enables us to localize single cells before the transfer process. By using an automated positioning system defined cell patterns can be generated. By using various hydrogels or proteins, we demonstrated that we could vary the surrounding ECM conditions. Single cell printing with an accuracy of less than 50 µm is possible. For higher cell viability we established a two-layered transfer layer and printed different cells like BHK, 3T3, K562 and HUVEC-Cells. With this approach the transfer volume is minimized and the cell survival rate of single cell transfer is more than 90%. Further investigations have been carried out to study the behavior of printed single pericytes in a colony of HUVECS and the subsequent behavior and proliferation of the cells.

Discussion

With our results we show that our technology allows for new insight in the optimization of cell-cell positioning. The technology allows us to investigate their interactions, the influence of cell stoichiometry as well as the selection of specific cells in large cell colonies. In future developments we will include analytical tools into our LIFTSYS™ machine for improving the automated cell selection.

Einfluss von Kollagenbeschichtung und HAP-Mineralisierung von NSN-Chitosanscaffolds auf die Osteoblastogenese und Osteoklastogenese

C. Heinemann¹, R. Brüner², C. Kreschel¹, *J. Farack¹, D. Aibibu², C. Cherif², H. P. Wiesmann³, T. Hanke¹

¹TU Dresden, Institut für Werkstoffwissenschaft, Professur für Biomaterialien, Gruppe Biomimetische Materialien und Biomaterialanalytik, Dresden, Deutschland

²TU Dresden, Institut für Textilmaschinen und Textile Hochleistungswerkstofftechnik, Professur für Textiltechnik, Forschungsgruppe "Bio-und Medizintextilien", Dresden, Deutschland

³TU Dresden, Institut für Werkstoffwissenschaft, Professur für Biomaterialien, Dresden, Deutschland

Einleitung

Das Tissue Engineering von Knochen ist ein sich beständig weiter entwickelndes Wissenschaftsgebiet, was in jüngster Zeit insbesondere an der Einführung neuer Fertigungstechnologien und Modifizierungsmethoden sowie deren Anwendung auf Materialien verschiedener Stoffgruppen liegt. Diese Arbeit kombiniert mehrere solcher Aspekte, indem als Grundgerüst Chitosanfasern mittels Net-Shape-Nonwoven (NSN)-Technik zu Scaffolds mit definierter Porenstruktur verarbeitet werden [1]. Deren Beschichtung mit Kollagen stellt ein bekanntes Verfahren zur Biologisierung und der Annäherung an die natürliche extrazelluläre Matrix dar, wobei zunächst nur die organische Komponente des Knochens berücksichtigt wird [2]. Der Einfluss anorganischer Modifizierung wird untersucht, indem ein neues Verfahren - die Doppelmigration im Gelatinegel - zur Erzeugung von Calciumphosphatphasen auf der Oberfläche der NSN-Scaffolds zur Anwendung kommt [3]. Die durchgeführten biochemischen, molekularbiologischen und mikroskopischen Analysen stellen die jeweilige Zellentwicklung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) sowie humanen Monozyten (hMz) hinsichtlich Proliferation, Differenzierung und Aktivität in den Vordergrund.

Material und Methoden

Chitosanfasern (Durchmesser 40µm, Länge 2mm) werden mittels NSN-Technik zu Scaffolds (Durchmesser 8µm, Höhe 3mm) verarbeitet. Für die Beschichtung werden die Scaffolds in einer Suspension von Kollagenfibrillen in Tris-Puffer getränkt und durch Vernetzung mittels EDC/NHS fixiert. Zur Mineralisierung werden die NSN-Scaffolds in ein Gelatinegel eingebettet, durch das Calcium- und Phosphationen in gegengesetzter Richtung unterstützt von einem elektrischen Feld migrieren und sich auf der Scaffoldoberfläche als organisch modifizierter Hydroxylapatit (omHAP) präzipitieren.

HMSC, isoliert aus Knochenmark, und hMz, isoliert aus Buffycoat, werden jeweils in Monokultur auf den verschiedenen Scaffoldmodifikationen ausgesetzt und in Alpha-MEM für 28 Tage bzw. für 16 Tage kultiviert. Die osteoblastäre Differenzierung wird ab Tag 3 durch die Zugabe von Ascorbat, β-Glycerophosphate und Dexamethason induziert, die osteoklastäre Differenzierung durch die Zusätze M-CSF und RANK-L.

Ergebnisse

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen belegen die offenporöse Struktur der unmodifizierten NSN-Scaffolds, die sich durch die Kollagenbeschichtung verändert, indem durch das Kollagen jeweils mehrere beieinander liegende Fasern überbrückt werden. Dadurch stehen ausgedehntere Flächen für die spätere Zelladhäsion zur Verfügung stehen. Im Gegensatz dazu resultiert aus der Mineralisierung mittels Doppelmigration die Formierung gleichmäßig verteilter omHAP-Kristallinseln auf den einzelnen Chitosanfasern, ohne jedoch die Porenstruktur zu beeinflussen.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie wird für alle Scaffoldvarianten eine etwa gleich gute Adhäsion der HMSC nachgewiesen. Biochemisch hingegen, zeigt sich ein bemerkenswerter Effekt der Mineralisierung, indem die Proliferation dreifach erhöht ist gegenüber dem unmodifizierten NSN-Scaffold und dem mit Kollagenbeschichtung. Dieser Unterschied wird auch fluoreszenzmikroskopisch darin deutlich, dass sich nach 28 Tagen ein dichter Zellrasen ausbildet, der auch mehrere Fasern überspannt, während sich bei unmodifizierten NSN-Scaffolds die Zellen hauptsächlich entlang der Fasern ausspreiten. Die ALP-Aktivität der HMSC auf kollagenbeschichteten Scaffolds steigt im Vergleich zu unmodifizierten und mineralisierten Scaffolds am Tag 14 auf den doppelten Wert. Dass die Kollagenbeschichtung zu einer besseren Differenzierung führt, belegt auch die gestiegerte BSP2- und Osteocalcin-Expression sowie der Nachweis der zellbasierten Mineralisierung.

Die Kultivierung von hMz auf den Scaffolds führte bei allen Modifikationen nach 14 Tagen zur Bildung von osteoklastenähnlichen, TRAP-positiven Zellen mit einer Größe von 20-40µm. Die Abbildung zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme der unmodifizierten NSN-Scaffolds aus Chitosanfasern. Die Pfeile weisen auf die auf den Fasern adhärenten osteoklastenähnlichen Zellen.

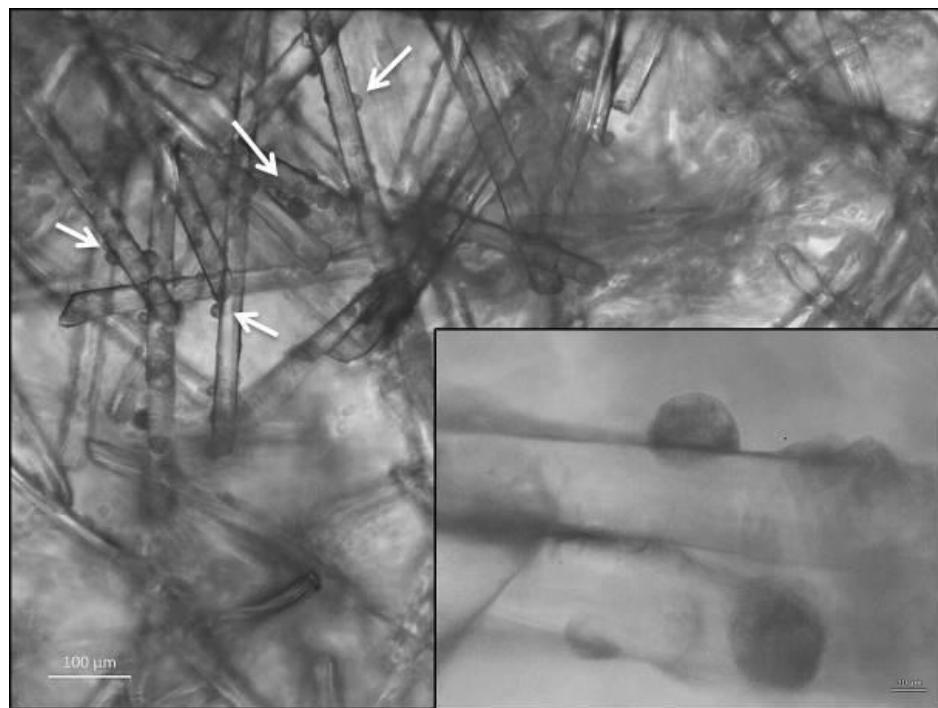
Referenzen

- [1] M. Hild et al., Textile Research Journal 2014, Vol. 84(10), 1084-1094
- [2] C. Heinemann et al., Biomacromolecules 10 (2009), 1305-10
- [3] C. Heinemann et al., Acta Biomaterialia, under review

Acknowledgements

Die Autoren danken der DFG (HA 5284/4-2) für die finanzielle Unterstützung.

Abb. 1



3D Powder Printing of Alkali-doped Calcium Phosphate Bone Cements

*S. Meininger¹, C. Kreilein¹, J. Groll¹, U. Gbureck¹

¹Universitätsklinikum Würzburg, Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, Würzburg, Deutschland

Introduction

Calcium phosphates (CaPs) such as hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) or tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) are established materials for bone replacement and regeneration. The modification of pure CaPs can improve their properties in terms of mechanical and biological behaviour [1]. Doping of CPC with K^+ and Na^+ ions leads to highly resorbable compounds that match the formation of new bone [2] by promoting cell proliferation and differentiation [3]. Usually, such compounds were applied as injectable or mouldable pastes or prefabricated granules. The aim of our study was to transfer these alkali-doped CaPs to the 3D powder printing (3DP) technique for the free-form fabrication of bone implants. This was achieved either by using a polymeric binder followed by sintering or by using an inorganic binder (H_3PO_4) which simultaneously reacts during printing to avoid a final thermal treatment.

Materials & Methods

Cements were prepared by mixing CaHPO_4 with appropriate amounts of Na_2CO_3 (for CaNaPO_4), with K_2CO_3 (for CaKPO_4) or both for $\text{Ca}_2\text{KNaPO}_4$. Subsequently, the powders were sintered for 5 h at 1050 °C in a furnace and afterwards milled and sieved to a particle size < 125 µm. 3DP was performed on a spectrum Z310 printer (Z-Corporation, Burlington, USA) with $\text{Ca}_2\text{KNaPO}_4$, CaKPO_4 and CaNaPO_4 . The ceramic powders were supplemented with 5 % (hydroxypropyl)methylcellulose (HPMC) and printed with 20 % H_3PO_4 as binder. Following printing, samples were sintered with a maximum temperature of 1125 °C avoiding deformation. $\text{Ca}_2\text{KNaPO}_4$ without HPMC was printed in addition with 20 % H_3PO_4 to avoid sintering by applying a cementitious setting reaction during printing. The cement samples were investigated regarding material and biological behaviour *in vitro*. Weibull statistics were performed for n = 30 samples to determine reliability during compression test. X-ray diffraction and scanning electron microscopy was applied to characterize phase composition and microstructural parameters of the printed samples.

Results & Discussion

Mechanical behaviour of printed cement samples was tested for compression, bending and tension. Independent of doping element strengths were in the range of 9 - 13 MPa (compression), which is comparable to traditional processing techniques [4]. Direct printing resulted in higher reliability regarding mechanical strength according to Weibull statistics (see Figure 1). Direct printing could have led to a more uniform structure improving sample reliability. A huge advantage of alkali-doping is the release of K^+ and Na^+ ions into surrounding media. Such ions can influence cellular behaviour in terms of proliferation and differentiation into osteoblasts. Biocompatibility of printed samples was basically investigated in cell culture tests using an osteoblastic cell line.

Conclusion

In this study, the transfer of alkali-doped CaPs could compete with hand-casted samples regarding their mechanical performance. The reliability for sintered samples was lower than for directly printed ones, but was still in an acceptable range for bone cements. Furthermore, the cell proliferating influence of released K^+ and Na^+ ions was tested *in vitro*.

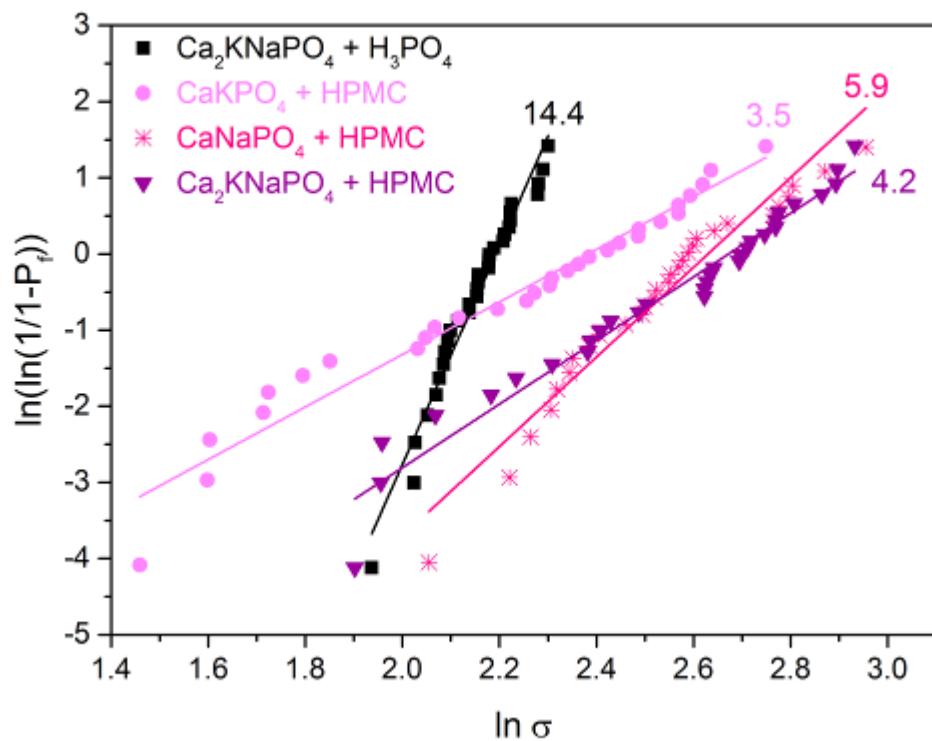
References

- [1] Symietz, C. *et al.* Fixation of bioactive calcium alkali phosphate on Ti6Al4V implant material with femtosecond laser pulses. *Appl. Surf. Sci.* 257, 5208-5212 (2011).
- [2] Knabe, C. *et al.* Effect of rapidly resorbable calcium phosphates and a calcium phosphate bone cement on the expression of bone-related genes and proteins *in vitro*. *J. Biomed. Mater. Res. A* 69A, 145-154 (2004).
- [3] Knabe, C. *et al.* The functional expression of human bone-derived cells grown on rapidly resorbable calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 25, 335-344 (2004).
- [4] Driessens, F. C. M. *et al.* The Ca/P range of nanoapatitic calcium phosphate cements. *Biomaterials* 23, 4011-4017 (2002).

Acknowledgements

We gratefully acknowledge financial support by DFG State Major Instrumentation Programme, funding the crossbeam scanning electron microscope Zeiss CB 340 (INST 105022/58-1 FUGG).

Figure 1: Weibull modulus of alkali-doped CPCs after compression test.



Development of a biofabrication process for the manufacture of vessel like structures

F. Ruther¹, R. Singh², T. Zehnder¹, I. Cicha², A. R. Boccaccini¹, *R. Detsch¹

¹Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Lehrstuhl Biomaterialien, Erlangen, Deutschland

²University Hospital Erlangen, , Department of Cardiology and Angiology, Erlangen, Deutschland

Introduction

The use of additive manufacturing such as *BioPlotting* enables the fabrication of cell-loaded soft matrices for biomedical research. In this context, novel hybrid hydrogels based on alginate di-aldehyde-gelatin (ADA-GEL) and gelatin were successfully applied for biofabrication approaches [1,2]. However, one big issue in this area is the vascularisation of hard and soft tissue defects during wound healing. In order to closely reproduce the native vessel-like properties, ideal vascular constructs should contain matrix-producing fibroblasts covered by a confluent monolayer of endothelial cells. Fabrication of a functional vascular structure is thus an extremely challenging task. The combination of the bioplotting technique and suitable hydrogels could be an interesting approach to overcome these challenges and difficulties. Therefore, aim of this study was the development of the bioplotting process for the generation of tubular structures for the application of blood vessels.

Materials and Methods

The tubular structures were realised by combining a precision needle and a cone-shaped needle in the bioplotter system. The hydrogel-based structures were fabricated by extrusion technique using gelatin solution (3 wt/vol %) and ADA-GEL (3.75 wt/vol %) hydrogels as core-shell matrix followed by ionic gelation with calcium chloride solution. After gelation the gelatin core was removed at 37 °C and subsequent rinsing in HBSS. Processing parameters, like plotting speed, pressure and nozzle diameters were optimised for the manufacturing of vessel structures. Beside the perfusion of the tubular structures, stiffness and degradation of the hydrogels were also studied. Finally, first *in vitro* studies with embedded human fibroblasts (NHDF, in ADA-GEL) and endothelial cells (HUVEC, in gelatin) in a co-culture were carried out.

Results and Discussion

It could be shown that vessel-like hollow struts composed of ADA-GEL hydrogel were successfully fabricated using a double needle strategy. By adjusting external and internal needle pressure hollow fibres were achieved. Radial and axial perfusion were determined by a dye injection test. Furthermore, cross sections of a hollow strut confirmed that the inner gelatin core was completely removed after 48 h incubation in 37 °C warm HBSS.

The measured stiffness of the ADA-GEL matrix was approx. 16 kPa, which mimics the value of the natural extracellular matrix. Therefore, this hydrogel ideally supports cell attachment of the embedded NHDF cells. Additionally, the cell viability of the HUVEC, embedded in the gelatin core, was proven. Overall, the fabricated hollow struts showed a dense and interconnected structure which was suitable for both NHDF and HUVEC cell proliferation and migration.

Conclusion

Recently, we could show that ADA-GEL formulations could be tuned for optimised blood vessel forming cell growth [3]. The results of this study show that ADA-GEL hydrogel used in biofabrication are able to build 3D structures that closely reflect the cell-microenvironment mimicking the ECM with precise control of the microarchitecture.

Acknowledgments

The authors acknowledge the support from the “Emerging Fields Initiative” of the University of Erlangen-Nuremberg (Germany) (Project: TOPbiomat).

Literature

- [1] T. Zehnder, B. Sarker, A.R. Boccaccini, R. Detsch, Evaluation of an alginate-gelatine crosslinked hydrogel for bioplotting, *Biofabrication*. 7 (2015) 1-12.
- [2] R. Detsch, B. Sarker, T. Zehnder, G. Frank, A.R. Boccaccini, Advanced alginate-based hydrogels, *Mater. Today*. 18 (2015) 590-591.
- [3] R. Singh, B. Sarker, R. Silva, R. Detsch, B. Dietel, C. Alexiou, et al., Evaluation of hydrogel matrices for vessel bioplotting: Vascular cell growth and viability, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 104 (2016) 577-585.

Cross-linked Hyaluronic Acid Hydrogels for 3D printing

*J. Shan¹, M. Weis¹, E. Wirth¹, M. Kuhlmann¹, J. Groll¹

¹Universitätsklinikum Würzburg, Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde, Würzburg, Deutschland

Introduction

Due to fast development of biofabrication, printable hydrogels have become promising materials as bioinks for 3D printers in medical applications. Therefore, rheological and mechanical issues during and after printing process as well as swelling behavior, cytocompatibility and biodegradation have to be considered when designing new hydrogels [1]. Hyaluronic acid (HA) as natural biopolymer already fulfill the biological prerequisites. Aldehydes as functional groups in hyaluronic acid chains enable formation of hydrogels via cross-linking with dihydrazides or polyamines. This work focusses on the synthesis of aldehyde modified HA derivatives and cross-linking reactions for hydrogel formation as well as the investigation of rheological and mechanical properties and cytocompatibility of the hydrogels.

Materials and Methods

HA was dissolved in water (1 % (w/v)) at room temperature. A sodium periodate (NaIO_4) solution was added slowly under stirring. The molar ratio of NaIO_4 to HA varied between 0.5:1, 1:1, 2:1 and 4:1. After 2 h the reaction was stopped by the addition of excess amount of ethylene glycol. To separate byproducts from the oxidized HA, the reaction mixture was transferred to dialysis tubing (MWCO = 3500 Da), dialyzed against H_2O for 72 h and lyophilized.

The formation of hydrogels was performed with various amounts of oxidized HA, adipic acid dihydrazide (ADH) and gelatin in aqueous solution.

Rheological rotational measurements were executed at a rheometer with a cone-plate setting and shear rates between 0.1 s^{-1} and 100 s^{-1} . Mechanical tests were performed at a Universal Testing Machine with a 100-N-capsule and maximum penetration depth of 2 mm. The ADH cross-linked gels were measured at 37 °C and the gelatin cross-linked at 30 °C.

Results and Discussions

Rheological and mechanical issues of the hydrogels depended on the experiential oxidation degree of HA, the ratio of cross-linkers to HA and the method of sample preparation. In general, HA with higher experiential oxidation degree led to decreasing viscosity as well as mechanical firmer hydrogels. Gels prepared with the vortex mixer were also more stable than shaken and heated samples. The shear thinning behavior decreased with increasing rigidity of the gels.

Tests with the 3D-printer showed that the mixture with 3.50 wt.-% high-molecular HA, oxidized with the molar ratio of 1:2 to NaIO_4 , and 0.075 wt.-% ADH provided the best printing results. The pressure of the 3D-printer was 2.0 bar and the gel was pressed through a cone with a diameter of 0.25 mm.

References

[1] T. Jungst, W. Smolan, K. Schacht, T. Scheibel, J. Groll, *Chem. Rev.* 2016, 116, 1496-1539.

Figure 1: Printing with mixture 3.50 wt.-% oxidized HA and 0.075 wt.-% ADH, 8 layers; **A:** 2 mm between each strand; **B:** 3 mm between each strand

Abb. 1

