

Schlussbericht

für das Teilvorhaben

Entwicklung und Funktionsnachweis von Strukturierungsverfahren auf der Basis der Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP) zur Generierung von biphasischen Systemen für Knochen-Knorpelimplantate

Förderkennzeichen: 13N10035

im Verbundprojekt

Biofunktionale und mittels 2-Photonen-Polymerisation (2PP) nanostrukturierte Implantate zur Stimulation der Osteo- und Chondrogenese bei der Behandlung von skeletalen Defekten (BioNanoPlant)

Laufzeit: 01.09.2008 – 29.02.2012

Autoren: Silke Fiedler
Ronald Schade
Klaus Liefeith

Heiligenstadt, 29.08.2012

Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V.
Heilbad Heiligenstadt



Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Kurze Darstellung	
1. Aufgabenstellung	3
2. Voraussetzungen, unter denen das Projekt durchgeführt wurde	4
3. Planung und Ablauf des Vorhabens	4
4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	6
5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen	9
II. Eingehende Darstellung	
1. Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse	10
1.1 Entwicklung eines 2-Photonen-Polymerisationsverfahrens für die Mikrostrukturierung von Hydrogelsystemen	10
1.2. Testung von Materialien zur Herstellung von Trägerstrukturen für die Osteo- und Chondrophase von biphasischen Implantaten	10
1.3 Zytokompatibilitätsprüfungen der Scaffoldmaterialien	23
1.4 Testung und Bereitstellung bioaktiver Oligopeptide zur Förderung der Zelladhäsion und Zelldifferenzierung	27
1.5 Bereitstellung biofunktionaler Leitstrukturen zur Optimierung der zellulären Adhäsion, Migration und Differenzierung	29
1.6 Degradationskinetik der Scaffoldmaterialien unter simulierten klinischen Bedingungen in Kombination mit der Freisetzung von bioaktiven Molekülen von der Scaffoldoberfläche	31
1.7 <i>In vitro</i> -Stimulation der Zelldifferenzierung autologer Zellen des skeletalen Systems mittels zyklischer mechanischer/hydrostatischer Kraffteinleitung	35
1.8 Analyse zelldifferenzierender Effekte 3D-mikrostrukturierter bioaktiver Oberflächen	37
1.9 Zusammenfassung und Wertung	41
2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	42
3. Notwendigkeit und Angemessenheit der Arbeit	43
4. Voraussichtlicher Nutzen und Ergebnisverwertung	44
5. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordene Fortschritte anderer Stellen	45
6. Veröffentlichung der Ergebnisse	46
7. Literaturverzeichnis	47

I. Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Das Gesamtziel des Forschungsverbundvorhabens BioNanoPlant besteht in der Entwicklung von biofunktional modifizierten, biphasischen Knochen-/Knorpelimplantaten zur Behandlung von großflächigen osteochondralen Defekten wie sie z.B. bei fortgeschrittener Arthrose auftreten. Die Implantate sollen das Remodelling der defekten Osteo- und Chondrophase der Gelenke unterstützen, so dass nach Abbau des Implantats eine vollständige Regeneration des nativen Gewebes erreicht wird. Die unterschiedlichen Phasen des Implantats sollen dabei die Ausbildung des Knochengewebes (Osteophase) sowie des Knorpelgewebes mit seiner ausgeprägten extrazellulären Matrix (Chondrophase) fördern. Durch die Auswahl des Materials für die jeweilige Phase des Implantats, die Geometrie sowie durch biofunktionale Modifikation der jeweiligen Phase soll die Zelldifferenzierung im nachwachsenden Gewebe in die jeweilige Richtung, also in der Osteophase in Richtung Osteoblasten, in der Chondrophase in Richtung Chondrozyten induziert werden.

Die Zielsetzung des Teilprojektes am iba Heiligenstadt e.V. besteht in der Entwicklung eines 2-Photonen-Polymerisationsverfahrens zur Herstellung von Implantaten auf der Basis von biokompatiblen Polymeren zur Behandlung von Knochen-/Knorpeldefekten. Die Aufgabenstellung in diesem Teilprojekt enthält sowohl materialwissenschaftliche als auch zellbiologische Aspekte. Zum materialwissenschaftlichen Arbeitskomplex zählen die Erarbeitung von Techniken zur Herstellung von Scaffoldstrukturen mittels 2PP, Evaluierung der 2PP-Prozessparameter, Auswahl von mittels 2PP prozessierbaren Materialien und der (chemischen) Biofunktionalisierung der Scaffoldoberflächen. Die zellbiologischen Arbeiten umfassen die Beurteilung der Biokompatibilität der ausgewählten Materialien und Scaffoldgeometrien in Zellkultur, Untersuchungen zur Zelladhäsion, -proliferation und -differenzierung, Vergleich der Zelldifferenzierung im dreidimensionalen Scaffold zur 2D-Kultur, sowie der Einfluss der Applikation von mechanischer Stimulation mittels hydrostatischem Druck und biochemischer Stimulation durch die vom Scaffold freigesetzter Wirkstoffmoleküle auf die Zelldifferenzierung.

Im Rahmen eines „Proof-of-concept“ sollten folgende Aufgaben bearbeitet werden:

- A) Die Grundlagen sollten geschaffen werden, um biofunktional vorkonditionierte Knochenimplantate als biodegradierbare Osteophase mit interkonnektierenden Poren für die Behandlung von Knochengewebedefekten unterschiedlicher Größe mit Hilfe der 2-Photonen-Polymerisation herzustellen.
- B) Mit Hilfe der 2PP-Technik sollten biodegradierbare Chondrophasen mit offener, interkonnektierender Hydrogelstruktur synthetisiert und als bioaktive Scaffoldmaterialien mit der Osteophase kombiniert werden.
- C) Testung der Degradation der einzelnen Phasen unter klinisch simulierten Bedingungen
- D) Testung der Degradation der biphasischen Scaffoldmaterialien
- E) Testung der Zytokompatibilität sowie der Effekte auf die Zelldifferenzierung

2. Voraussetzungen, unter denen das Projekt durchgeführt wurde

Das Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. (iba) ist eine vom Freistaat Thüringen als außeruniversitäre Forschungseinrichtung institutionell geförderte Landesforschungseinrichtung. Der Fachbereich Biowerkstoffe hat eine ausgewiesene Expertise in der anwendungsorientierten Charakterisierung und Funktionalisierung von Biomaterialien bis hin zur normgerechten Medizinprodukteprüfung entsprechend DIN EN ISO 10993. Das Institut verfügt über die notwendigen methodischen und technischen Voraussetzungen für die Untersuchung von topographischen, oberflächenchemischen und -physikalischen Materialeigenschaften und die durch den Zell-Materialkontakt induzierten molekularbiologischen, mikrobiologischen und zellbiologischen Reaktionen.

Am iba ist seit Anfang 2008 eine 2-Photonen-Polymerisationsanlage M3DL verfügbar. Zur 2PP-Anlage gehört ein Präzisionsachsensystem der Firma Aerotech, Nürnberg. Die Steuersoftware der 2PP-Anlage wurde vom Laser-Zentrum Hannover entwickelt. Die 2PP-Anlage wird mit einem Ti:Sa-Femtosekundenlaser (Tsunami, Spectra Physics) betrieben, der gepulstes Laserlicht im Wellenlängenbereich von 690 - 1080 nm (Nahes IR) mit einer Pulsfrequenz von 82 MHz und einer Pulslänge von 80 -130 fs emittiert. Die Grundlagen für die Herstellung von 2PP generierten Teststrukturen basierend auf den Standardfunktionen der vorliegenden Steuersoftware, der Verwendung des Photoresists Ormocer® (micro resist technology GmbH) sowie methacrylierter Hydrogelmonomere waren etabliert.

Im Rahmen der BMBF-Förderinitiative „Biophotonic I“ wurden am iba umfangreiche Arbeiten zum Knorpel-Tissue Engineering durchgeführt (Projekt MEMO, FKZ 13N8435) und wesentliche Grundlagen zur Detektion und Auswertung von Autofluoreszenzsignalen dreidimensionaler Zellverbände mittels 2-Photonen-Mikroskopie (2PLSM) erarbeitet. Ferner bestanden methodische Erfahrungen im Knorpel-Tissue Engineering mit bovinen Chondrozyten unter Verwendung von kollagenen Trägermaterialien sowie Erfahrungen mit der Kultur von Osteoblasten-Zelllinien. Protokolle für die Zelldifferenzierungsanalyse auf der Basis von RT-PCR und immuno-histologischen Färbungen standen ebenfalls zur Verfügung. Des Weiteren wurde im Rahmen des Projektes MEMO ein Fließkammersystem zur Applikation von hydrostatischem Druck auf 3D-Zellaggregate mit Kopplung an das 2PLSM zur online-Detektion der Zellantwort entwickelt. Die Ergebnisse bildeten eine solide Basis für weiterführende Arbeiten zur mechanischen Zellstimulation. Insgesamt waren die infrastrukturellen und methodischen Voraussetzungen zur erfolgreichen Entwicklung von bioaktiven, biphasischen Implantaten auf der Basis der 2-Photonen-Polymerisation gegeben.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Im Gesamtprojektvorhaben werden zwei Entwicklungslinien des Projektes verfolgt. Die erste Entwicklungslinie beinhaltet die Herstellung, Charakterisierung und den Wirksamkeitsnachweis von biologisch funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel (CaP-NP), das Ziel dieser Linie ist der Proof-of-concept für die mit rhBMP2 bzw. siRNA biologisierten CaP-Partikel und der Nachweis der biologischen Aktivität *in vitro* und *in vivo* im Rahmen der geplanten Tierversuche.

Für die zweite Entwicklungslinie mit der Zielsetzung der Entwicklung eines auf der 2PP basierenden Verfahrens zur Herstellung von Implantaten wurde ein Proof-of-Principle hinsichtlich der Prozessierung einer nanostrukturierten künstlichen 3D-ECM mittels 2PP-Prozess einschließlich des Nachweises der gewünschten Zelldifferenzierung innerhalb der hergestellten Scaffoldstruktur festgelegt.

Das Teilvorhaben am iba ordnet sich in die zweite Entwicklungslinie ein und besteht aus neun Arbeitspaketen, die die materialwissenschaftlichen und die zellbiologischen Aufgabenstellungen innerhalb des Teilvorhabens abdecken. Diese Arbeitspakete sind in der aufgeführten Tabelle (s.u.) mit der geplanten Zeitschiene dargestellt. Neben den Arbeitspaketen wurden für das Midterm-Meeting nach 18 Monaten zur Evaluierung des Projektstandes Meilensteine im Gesamtprojektantrag formuliert, deren Erfüllung als Kriterium für die Fortsetzung des Projektes festgesetzt wurde. In Bezug auf das Teilvorhaben am iba waren folgende Meilensteine durch dieses Teilvorhaben zu erfüllen:

Meilenstein 3 (Gesamtprojektantrag):

„Es soll eine arbeitsfähige photochemische 2PP-Methode für die Nanostrukturierung IR-transparenter Materialien etabliert werden. Um diesen Meilenstein zu erreichen wird mindestens ein optimiertes nanostrukturierbares Material für die Osteophase und ein nanostrukturierbares Chondrophasenmaterial auf Hydrogelbasis zur Verfügung gestellt.“

Meilenstein 4 (Gesamtprojektantrag):

„Die Arbeiten zur Materialauswahl im Hinblick auf Strukturierbarkeit und Biokompatibilität sollen abgeschlossen sein. Es wird die Bereitstellung von 2PP generierten Trägern der Osteo- und Chondrophase (jeweils getrennt nach Phase) für die zellbiologische Testung sichergestellt.“

Die Zusammenarbeit der Projektpartner während der Projektlaufzeit wurde durch den Netzplan incl. der Übergabepunkte und Meilensteine im Gesamtprojektantrag geregelt. Für das Teilprojekt am iba ergaben sich daraus folgende Interaktionen mit den Projektpartnern:

INNOVENT Technologieentwicklung e.V.:

- Zusammenarbeit bei der Entwicklung polymerisierbarer Materialien für die Osteo- und Chondrophase einschließlich der Entwicklung geeigneter Photoinitiatorsysteme
- Testung der 2PP-Prozessierung und Feedback an INNOVENT
- Bereitstellung geeigneter RGD-Motive zur Kopplung an die Osteophase

co.don® AG

- Bereitstellung von Trägern der Chondrophase für Untersuchungen bei co.don® AG zur Migration
- von Chondrozyten aus Sphäroiden und der Besiedlung der Chondrophase
- Bereitstellung von Trägern der Chondrophase für mechanische Druck- und Belastungsversuche bei der co.don® AG
- Bezug autologer Chondrozyten und Osteoblasten sowie von Sphäroiden für zellbiologische Applikationsstudien im iba
- Bereitstellung mechanisch stimulierter zellbesiedelter biphasischer Konstrukte für die immunhistologische Analyse bei der co.don® AG

aap Biomaterials GmbH (incl. Universität Duisburg-Essen als Unterauftragnehmer)

- Degradationsstudien an mehrschaligen CaP-Nanopartikeln unter klinisch simulierten Testbedingungen im iba und Feedback zur Optimierung der CaP-Komposite
- Herstellung von implantierbaren 2PP-Konstrukten zur Durchführung von *in vivo* Tierversuchen

In der Abbildung 1 ist der Zeitplan für das Teilvorhaben des iba im Verbund BioNanoPlant aufgeführt. Im Laufe der Projektarbeiten im Gesamtverbund erforderten die Arbeiten rund um den *in vivo*-Tierversuch einschließlich einer geschlossenen Auswertung durch alle Verbundpartner sowie der Studien zur 3D-induzierten Differenzierung von Stammzellen eine kostenneutrale Verlängerung aller Teilvorhaben um 6 Monate bis zum 28.02.2012, der vom Projektträger uneingeschränkt entsprochen wurde.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Durch die Methoden des Tissue Engineering ist in den letzten Jahren die Basis für die Behandlung von Knochen- und Knorpeldefekten mittels implantierbarer Konstrukte geschaffen worden. Zur Induktion der Osteosynthese knöcherner Defekte existieren verschiedene Trägermaterialien für die *in vitro*-Anzucht von Osteoblasten (Hydroxylapatit (HA), Polylactide, etc.). Die Behandlung defekter Knorpelanteile erfolgt häufig durch Transplantation autologer Chondrozyten (ACT) [1]. Die Therapie osteochondraler Defekte mit Hilfe gekoppelter Knorpel-Knochen-Konstrukte bietet Vorteile insbesondere bei der passgenauen Verankerung von Knorpelimplantaten, hat jedoch aufgrund von Problemen der Zelldifferenzierung autologer Chondrozyten, der für die einzelnen Gewebeanteile sehr unterschiedlichen Anforderungen an Zellscaffolds sowie ihrer stabilen funktionalen Verbindung noch nicht zur breiten Einführung in die orthopädische Praxis geführt.

Als synthetische knöcherne Ersatzmaterialien werden heute neben Hydroxylapatit (HA) insbesondere α - und β -Tricalciumphosphat (TCP) eingesetzt [2]. Mit Hilfe unterschiedlicher Techniken wurden in den letzten Jahren Calciumphosphate mit porösen Strukturen hergestellt, die als Scaffoldmaterialien für das Hartgewebe-Tissue Engineering geeignet sind. In Abhängigkeit von der Löslichkeit des eingesetzten Calciumphosphat-Typs sowie der Morphologie und Oberflächentopologie der Implantatmaterialien, kann dabei eine allmähliche Resorption des Implantats erfolgen. Während HA unter *in vivo*-Bedingungen nur in sehr geringem Maße resorbiert wird, zeigen α -TCP oder β -TCP *in vivo* deutliche Resorptionserscheinungen [3]. Gegenwärtig sind Calciumphosphat-Materialien als kompakte Blöcke, Granulate oder im Falle von Knochenzementen als aushärtbare Pasten erhältlich. Poröse Strukturen in Formkörpern können durch diverse Leaching- oder Ausbrennverfahren sowie in eingeschränktem Umfang auch durch mechanische Nachbearbeitung (z.B. Bohren) erzeugt werden. Der erforderliche technologische Aufwand ist oft beträchtlich und ein entscheidender Nachteil der aufgezählten Verfahren besteht darin, dass in der Regel nur Scaffolds mit einfachen Geometrien erhältlich sind.

Im Bereich des Rapid Prototypings wurden in den letzten Jahren generative Verfahren wie z.B. Stereolithographie [4], Lasersintern [5] und dreidimensionales Drucken (3D-Printing) [6, 7] zur Herstellung von Implantaten mit komplexer Geometrie eingesetzt. Der Vorteil der Rapid Prototyping Methoden liegt darin, dass sie die Möglichkeit bieten, für den einzelnen Patienten maßgeschneiderte Implantate herzustellen. Denn basierend auf den Patientendaten, die mittels bildgebender Diagnostik wie CT und MRT generiert werden, können entsprechende 3D-CAD-Modelle erstellt werden, mit denen dann die Anlage für das Rapid Prototyping der Implantate gesteuert werden kann [8, 9]. Zu den neueren Techniken im Bereich des Rapid Prototypings zählt die Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP). Der Prozess der 2-Photonenabsorption wurde 1931 von Göppert-Mayer [10] vorhergesagt und erstmals von Kawata et al. [11] und Cumpston et al. [12] eingesetzt. Grundsätzlich basiert die 2PP auf der durch 2-Photonenabsorption des Photoinitiators ausgelösten radikalischen oder kationischen Photopolymerisation von Photolacken, welche aus einer Polymervorstufe, einem Photoinitiators sowie einem

Meilenstein →

Zeitplan

Inhalte der verschiedenen Arbeitspakete	1. Bearbeitungsjahr				2. Bearbeitungsjahr				3. Bearbeitungsjahr			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
AP 1 Entwicklung 2PP- Verfahren												
AP 2 Entwicklung des 2PP-Prozessierungsverfahren für α -Hydroxycarbonsäuren (Osteophase)												
AP 3 Entwicklung des 2PP-Prozessierungsverfahren für Polysaccharide (Hyaluronsäure/Chitosan [Chondrophase])												
AP 4 Biofunktionale Leitstrukturen zur Optimierung der zellulären Adhäsion, Migration und Differenzierung												
AP 5 Bioaktive Oligopeptide zur Förderung der Adhäsion und Differenzierung osteogener Zellen in der Osteophase												
AP 6 Degradationskinetik der Scaffoldmaterialien unter simulierten klinischen Bedingungen												
AP 7 Zytokompatibilitätsprüfung der Scaffoldmaterialien												
AP 8 Mechanische Stimulation während der <i>in vitro</i> -Kultivierung mittels zyklischem hydrostatischem Druck												
AP 9 Zelldifferenzierungsanalyse												
	08-10/08	11/08-01/09	02-04/09	05-07/09	08-10/09	11/09-01/10	02-04/10	05-07/10	08-10/10	11/10-01/11	02-04/11	05-07/11

Abb. 1: Zeitplan des Teilvorhabens des iba im Verbund BioNanoPlant

Lösungsmittel und eventuell noch weiteren Zusätzen bestehen [13]. Diese Photolacke werden während des Polymerisationsvorgangs auf Präzisionsachsen mit einstellbaren Schreibgeschwindigkeiten bewegt, sodass Strukturen aus den Photolacken auspolymerisiert werden. Die Herstellung von Trägerstrukturen mit frei gewählter Geometrie erfolgt durch eine Steuerung der 2PP-Anlage mittels CAD-generierter STL-Files. Der Vorteil dieses Verfahrens gegenüber anderen photolithographischen Techniken besteht darin, dass echte 3D-Strukturen mit Auflösungen bis zu 200 nm in einem Schritt hergestellt werden können [13]. Bislang war diese Technologie jedoch auf die Verwendung spezieller Polymere (z.B. ORMOCER®, SU8) beschränkt, deren Eignung als bioabbaubares Implantatmaterial bislang nicht oder nur eingeschränkt gegeben war. Erste Studien zur Verwendung anderer Werkstoffe, wie z.B. Hydrogele zeigten, dass diese Materialien für photochemische 2PP-Strukturierungen geeignet sind, aber detaillierte Studien hinsichtlich der Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit noch ausstehen [14]. Ein entsprechendes Materialscreening bezüglich der Polymerisierbarkeit mittels 2PP für Applikationen im Bereich des Tissue Engineerings war dann auch Gegenstand des beantragten Projektes.

Die Kultivierung von transplantierbarem Knorpelgewebe wurde in den letzten Jahren auf verschiedenen resorbierbaren Scaffoldmaterialien unter *in vitro* Bedingungen demonstriert [15, 16]. Als Trägermaterialien wurden z.B. Vliese aus Polylactid und Polyglycolid [4], Kollagen- [5], Fibrin- [6], Chitosan- [7] oder Alginat-Hydrogelen [8] sowie hyaluronsäurehaltige Matrices eingesetzt. Bei der Transplantation der erzeugten matrix-unterstützten Knorpelkonstrukte traten jedoch in der Regel Probleme bezüglich der Fixierung im Knorpeldefekt und der mechanischen Stabilität des Implantats auf. Eine Antwort darauf ist die Rekonstruktion von großflächigen Knorpeldefekten durch osteochondrale Implantate [17], die aus einer Knochenphase zur Verankerung im subchondralen Knochen mittels Press-Fit-Technik und der eigentlichen knorpelrekonstruierenden Phase bestehen. Bislang wurden einige ausgewählte Materialkombinationen für osteochondrale Implantate untersucht: z.B. Konstrukte aus Calciumcarbonat/Polyglycolid-co-L-Lactid (90:10) (Nonwovens, [18], Polyglycolid-faserverstärktem Poly-L-Lactid-co-glycolid (75:25)/Poly-L-Lactid-co-glycolid-Bioglass bzw. Calciumsulfat-Komposit [19], Polyglycolid (Nonwoven)/Poly-lactid-co-glycolid-polyethylenglycol-Schaum [17] oder Poly-D,L-lactid-co-glycolid (50:50)-poly-L-lactid/Poly-L-lactid-co-glycolid (85:15)-Tricalciumphosphat-Komposit [20]. Nur in wenigen Beispielen wurden Methoden des Rapid Prototyping zur Herstellung osteochondraler Implantate beschrieben, die sich auf das 3D-Drucken von Polymergemischen mit toxischen Lösungsmitteln wie CHCl_3 beschränken [20].

Am iba Heiligenstadt wurden im Rahmen eines vom Freistaat Thüringen geförderten Forschungsschwerpunktes („Grenzflächenfunktionalisierung und Biointerfaces“ mit dem iba-Teilvorhaben „Entwicklung von ECM-analogen 3D-Biointerfaces für die Biologie und Medizin durch Lasermikro- und Nanostrukturierung mittels Zwei-Photonen-Polymerisation [2PP], FKZ: B514-06016) die Grundlagen der 2PP-basierten Generierung von 3D-Scaffolds aus Hydrogelmonomeren geschaffen. Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeiten ist die Schlussfolgerung, dass je nach Hydrogelmonomer sowie der Art und des Grades der Substitution mit photoaktiven Gruppen (üblicherweise Methacryl-Gruppen) die Parameter der 2PP-Mikrostrukturierung angepasst und optimiert werden müssen, um eine ausreichende Polymerisation und damit eine genügend hohe Festigkeit der 3D-Struktur zu erhalten. Dies gilt insbesondere auch für die in diesem Forschungsprojekt angestrebten 2PP-Scaffoldstrukturen mit implantierfähigen Dimensionen bis in den Zentimeter-Bereich. Die grundlegenden Erkenntnisse für eine erfolgreiche Mikrostrukturierung bioverträglicher Monomere fanden

direkten Input in dieses Forschungsprojekt. Sie wurden durch spezifische Weiterentwicklungen zur 2PP-Mikrostrukturierung von Monomeren mit ausgesprochen hohem Hydrogelcharakter (PEG, Hyaluronsäure, Alginat) sowie Materialien für die Knochenphase (z.B. Polyglycolid/Polylactid-Copolymere, α -Hydroxycarbonsäuren) für die Entwicklung biphasischer implantierfähiger 3D-Konstrukte ergänzt. Insofern stellt das Verbundvorhaben BioNanoPlant eine konsequente Weiterführung einer umfassenden Strategie zum gezielten Design gewebeanaloger Biointerfaces dar.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Projektkonsortium

Die Zusammenarbeit im Projektkonsortium incl. der Übergabepunkte und Meilensteine wurde durch den Netzplan des Verbundvorhabens geregelt. Die Ergebnisse und das Fortschreiten der jeweiligen Teilprojekte aller Partner wurden jährlich auf zwei Meetings vorgestellt, diskutiert und Schlussfolgerungen für die jeweils weitere Projektphase gezogen. Im Rahmen des Verbundvorhabens BioNanoPlant hat das iba Heiligenstadt mit folgenden Institutionen als Projektpartner zusammengearbeitet:

- co.don® AG, Dr. J. Libera-Körner, Warthestraße 21, 14513 Teltow
- INNOVENT Technologieentwicklung e.V., Dr. M. Schnabelrauch, Prüssingstraße 27B, 07745 Jena
- aap Biomaterials GmbH, Dr. L. Heimann, Lagerstraße 11-15, 64807 Dieburg, mit den Unterauftragnehmern:
Universität Duisburg-Essen, Institut für Anorganische Chemie (Prof. Dr. M. Epple)
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie (Prof. Dr. Dr. R. Schnettler)

Zusammenarbeit mit Dritten

Versuche zur Differenzierung von ovinen Stammzellen auf 3D-Scaffolds im Vergleich zur 2D-Kultur wurden in Kooperation mit der Universität Leipzig (Translationszentrum für Regenerative Medizin [TRM]) bearbeitet.

Vom Laser Zentrum Hannover e.V. (LZH) wurden für die 2PP-Anlage des iba Softwareupdates bereitgestellt.

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse

1.1 Entwicklung eines 2-Photonen-Polymerisationsverfahrens für die Mikrostrukturierung von Hydrogelsystemen (AP1)

Eine wesentliche Voraussetzung für die Generierung von 3D-Scaffolds mit Eigenschaften, die sowohl der Knochen- wie auch Knorpelmatrix angepasst sind, stellte die Anpassung der Steuerungssoftware der 2PP-Anlage an die Erfordernisse großer 3D-Scaffolds dar. Mit entsprechender Erweiterung, die in Zusammenarbeit mit dem LZH Hannover vorgenommen wurden, wurde es möglich, mittels dem Modul „STL-Files“ auch Felder in der x, y und z-Ebene von auf STL-File basierenden Strukturen herzustellen, bei denen die eingestrahlte Energie von einer Struktur zur nächsten variiert wird. Damit sind Strukturen generierbar, welche als „Elementarzelle“ fungieren. Die Vervielfältigung in x-, y-, und z-Richtung erlaubt dann die Herstellung großer mikrostrukturierter Scaffoldstrukturen in praktikablen Bearbeitungszeiten und File-Formaten. In Kombination mit den Arbeiten und Ergebnissen aus AP2 sind damit die Voraussetzungen für die 2PP-Herstellung implantierbarer 3D-Scaffolds erarbeitet worden.

1.2 Testung von Materialien zur Herstellung von Trägerstrukturen für die Osteo- und Chondrophase von biphasischen Implantaten (AP2, AP3)

Die Auswahl und der Testung von Materialien für die Herstellung von Trägerstrukturen der Osteo- und Chondrophase erfolgte nach folgendem Testkonzept:

- **Evaluierung der 2PP-Prozessparameter für das jeweilige Material (Parameter Search)** in Hinblick auf die Zusammensetzung der Photolacke (Polymervorstufe, Photoinitiator, Lösungsmittel), Energie, Wellenlänge, Schreibgeschwindigkeit und Schreibwiederholungen
- **Schreiben von Teststrukturen mittels 2-Photonen-Polymerisation** z.B. Voxelfeld, Holzstapelstrukturen (engl. Woodpile) und geometrisch frei wählbare STL-Files (Test auf Strukturierbarkeit mittels Rasterelektronenmikroskopie bzw. Lichtmikroskopie)
- **Analyse der Materialbioverträglichkeit im direktem Zellkontakt**
Testung der Biokompatibilität nach dem Zielzellenkonzept (Einsatz von Chondrozyten und Osteoblasten für Materialien im Knorpel- und Knochengewebe), Biokompatibilitätsanalyse anhand mikroskopischer, biochemischer und molekularbiologischer Methoden

Die bioabbaubaren Polymervorstufen für die Trägerstrukturen wurden vom Projektpartner INNOVENT e.V., Jena, zur Verfügung gestellt. Die 2-Photonen-Polymerisationen wurden basierend auf dem oben genannten Testkonzept bei 790 nm mit einem 40-fach Objektiv (0,6 NA, Olympus) oder einem 63-fach Objektiv (0,75 NA, Zeiss) durchgeführt. Als „Polymerisierbarkeit“ wird die Eigenschaft eines Photolacks, eine durch Laserlichteinstrahlung induzierte Polymerisationsreaktion zu zeigen, bezeichnet, was durch die Bildung einzelner Polymervoxel oder -balken erkennbar wird. Die Eigenschaft des Photolacks, dass er die Polymerisation komplexerer Strukturen, wie z.B. Woodpiles, ermöglicht, wird als „Strukturierbarkeit“ definiert. Schreibgeschwindigkeiten von $\geq 1.000 \mu\text{m/s}$ werden als „hoch“ eingeschätzt, zwischen $500 \mu\text{m/s}$ und $1.000 \mu\text{m/s}$ als „mittel“, $< 500 \mu\text{m/s}$ als „niedrig“ bei maximal verfügbarer Energie.

1.2.1 Untersuchungen zur erreichbaren Auflösung, Strukturqualität, Reproduzierbarkeit bei der 2PP-Strukturierung von α -Hydroxycarbonsäuren (Osteophase, AP2)

Insgesamt 16 Polymervorstufen wurden als Ausgangsmaterialien für die Osteophase getestet, welche den Stoffklassen der Laktide, Caprolactone, Polyglycerine, (Laktid-co-Caprolacton)-Copolymere sowie Dioxanone, (Laktid-co-Dioxanon)-Copolymere und (Caprolacton-co-Dioxanon)-Copolymere zugeordnet werden. Standardmäßig wurde der Photoinitiator Irgacure[®] 369 (0,5 - 2% (m/m), Ciba) eingesetzt. Als Teststrukturen wurden „Woodpile“-Strukturen mittels 2PP hergestellt, deren Abmessungen in den folgenden Bereichen lagen: Kantenlänge zwischen 100 und 500 μm , Höhe zwischen 20 und 100 μm , Balkenabstände zwischen 1 und 25 μm (Abb. 2). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Polyglycerynglycidylmethacrylat (AB3) und ϵ -Caprolacton-urethanmethacrylat (RK1005) wurden als gut strukturierbare Verbindungen für die Herstellung von auf STL-Files basierenden, komplexen Teststrukturen ausgewählt.

Tab. 1: Materialtestungen für die Osteophase (790 nm)

Substrat	Photo-initiator	Lösungs-mittel	Geschwin-digkeit	Polymeri-sierbarkeit	Strukturier-barkeit
Laktide					
DL-Laktid 15 urethanmethacrylat 3-Glycerin (RK1002)	Irgacure [®] 369	DMSO	niedrig	+	-
DL-Laktid 12 urethanmethacrylat 3-Glycerin (RK1003)	Irgacure [®] 369	DMSO	niedrig	+	-
Caprolactone					
Caprolacton 15-urethanmethacrylat 3-Glycerin (RK1004)	Irgacure [®] 369	DMSO	niedrig	+	-
Caprolacton 6-urethanmethacrylat 3-Glycerin (RK1005)	Irgacure [®] 369	kein	hoch	+	+
(Laktid-co-Caprolacton)					
Oligolaktid - Caprolacton Octandiol-methacrylat (AB1)	Irgacure [®] 369	DMSO	niedrig	+	-
Oligolaktid -Caprolacton - Tris-(hydroxymethyl)ethan-methacrylat (AB2)	Irgacure [®] 369	DMSO	niedrig	+	-
DL-Laktid 12 Caprolacton 6-methacrylat (AB5)	Irgacure [®] 369	DMSO	niedrig	+	-

DL-Laktid 12 - Caprolacton 6- urethanmethacrylat (AB6)	Irgacure® 369	DMSO	niedrig	+	-
DL-Laktid 12 - Caprolacton 6- urethanmethacrylat (AB7)	Irgacure® 651	DMSO	niedrig	+	-
Caprolacton 6-DL-Laktid 12 - urethanmethacrylat 3- Glycerin (RK1006)	Irgacure® 369	DMSO	niedrig	+	-
L-Laktid 12 Caprolacton 6- Octandiol-methacrylat (HV11)	Irgacure® 369	DMSO	niedrig	+	-
L-Laktid 12 Caprolacton 6- Glycerin-methacrylat (HV12)	Irgacure® 369	DMSO	niedrig	+	-
Dioxanon					
Dioxanon 6- urethan- methacrylat 3 -Glycerin (RK 1007)*	Irgacure® 369	DMSO, THF oder N-Vinyl-2- pyrrolidinon	nb	nb	nb
(Laktid-co-Dioxanon)					
DL-Laktid 15 -Dioxanon 12- Urethanmethacrylat 3- Glycerin (RK1009)	Irgacure® 369	DMSO	niedrig	+	-
(Caprolacton-co- Dioxanon)					
Caprolacton-15- Dioxanon 12 urethanmethacrylat 3 - Glycerin (RK1010)	Irgacure® 369	N-Vinyl-2- pyrrolidinon	niedrig	+	-
Polyglycerin					
Polyglyceringlycidyl- methacrylat (AB3)	Irgacure® 369	kein	hoch	+	+

* Löslichkeitsprobleme, nb: nicht bestimmt, DMSO: Dimethylsulfoxid, THF: Tetrahydrofuran, Irgacure®651(Ciba)

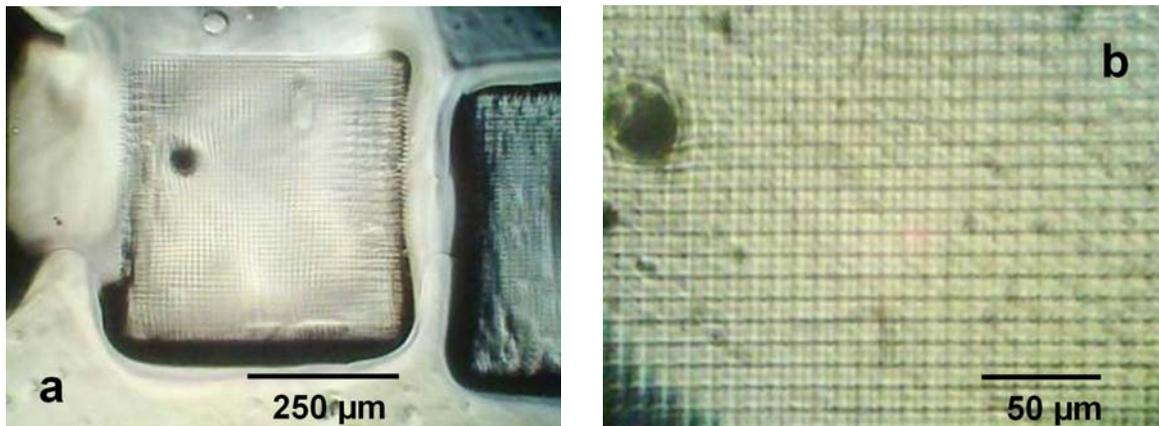


Abb. 2: a) Woodpile-Struktur, Material: Polyglyceringlycidylmethacrylat (AB3), 0,5 mm x 0,5 mm x 0,05 mm, b) Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 2a (Lichtmikroskopische Aufnahmen)

1.2.1.1 Einpolymerisation von Calciumphosphat-Nanopartikeln in die Osteophasen (AP2)

Die Modifizierung der Osteophasen mit bioaktiven Calciumphosphat-Nanopartikeln (CaP-NP) wurde anhand dreier prinzipiell anwendbarer Herstellungsverfahren geprüft (siehe Schema Abb. 3). Die Arbeiten und Ergebnisse sind im Folgenden in den Unterpunkten 1.2.1.1 - 1.2.1.3 dargestellt.

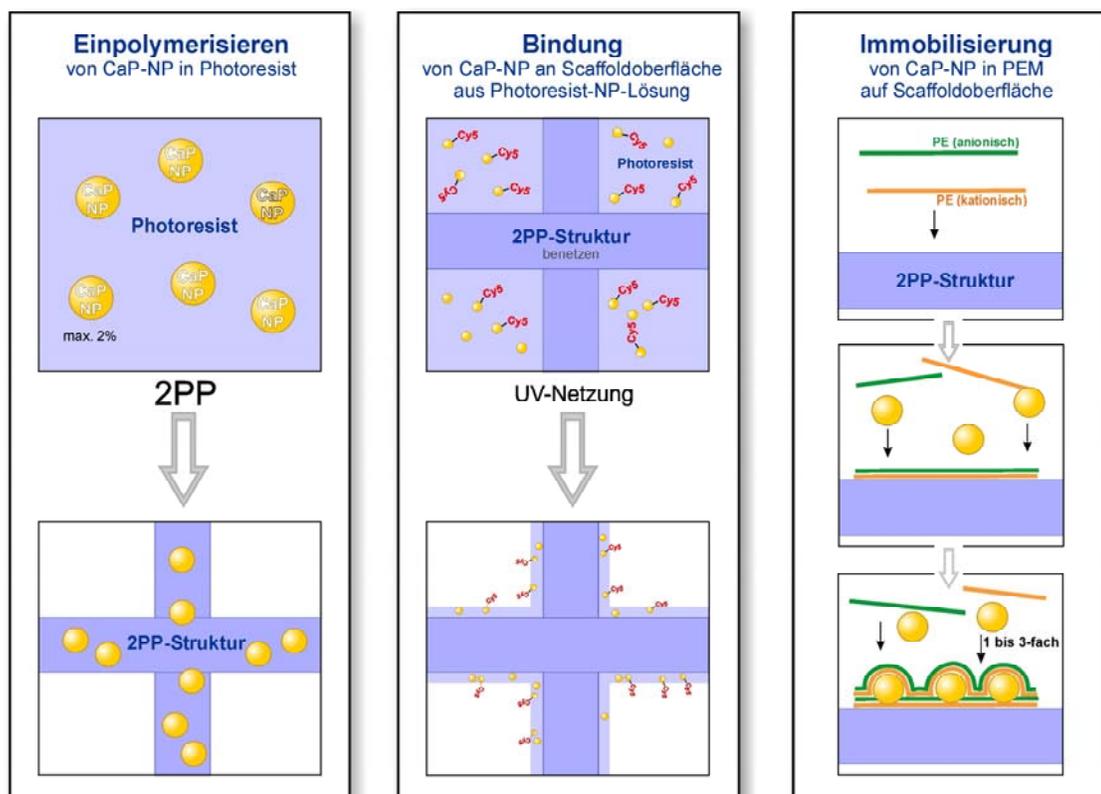


Abb. 3: Schema zur Modifizierung von 2PP-3D-mikrostrukturierten Oberflächen mit Calciumphosphat-Nanopartikeln (CaP-NP).

Mit der Einpolymerisation von siRNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln (CaP-NP) in die Scaffolds für die Osteophase sollte die Zelldifferenzierung in Richtung der Osteoblasten sowie die Mineralisierung der neu entstehenden Knochenphase unterstützt werden. Eine Modifikation der Scaffolds mit biofunktionalisierten CaP-NP ist auch zur Bearbeitung des Arbeitspakets 6 von Bedeutung, da durch die Freisetzung der biofunktionalisierten CaP-NP vom Scaffold und deren Aufnahme in die Zellen die Zelldifferenzierung in Richtung von Osteoblasten unterstützt werden soll.

Zur Testung der Einpolymerisation von CaP-NP mittels 2-Photonen-Polymerisation (2PP) stellte uns der Projektpartner Prof. Epple, Universität Duisburg-Essen, in Ethanol vorliegende, mit DNA beschichtete CaP-NP zur Verfügung. In Ethanol suspendierte CaP-NP wurden in das Osteophasen-Material Caprolactonurethanmethacrylat (RK1005) eingebracht, indem eine bestimmte Masse der Suspension in eine bestimmten Masse Polymervorstufe (RK1005) eingerührt und das Lösungsmittel Ethanol bei Raumtemperatur abgedampft wurde. Alternativ wurde das Lösungsmittel aus dem Polymervorstufen-CaP-NP/EtOH-Gemisch auch nach Einfrieren mit flüssigem Stickstoff in einer Gefriertrocknungsanlage entfernt. Durch wiederholtes Zugabe des Nanopartikel-haltigen EtOH und Abziehen des EtOH konnte der Gehalt an Nanopartikeln auf ca. 2% (m/m) erhöht werden. Es wurde festgestellt, dass die Nanopartikel bei dieser Prozedur teilweise zu größeren Aggregaten konglomerierten, so dass eine inhomogene Verteilung entstand.

In das Polymervorstufen-CaP-NP-Gemisch wurde der Photoinitiator Irgacure[®]369 (Ciba) zu 2% (m/m) gemischt, so dass ein Photoresist entstand. Die inhomogene Verteilung der CaP-NP im Photoresist beeinträchtigte dessen optische Transparenz für NIR-Licht, weshalb der Masseanteil an CaP-NP im Photoresist in Bezug auf die Durchführung einer 2-Photonen-Polymerisation begrenzt war. Es konnten Photoresiste mit bis zu 2% (m/m) CaP-NP mittels 2PP polymerisiert werden.

Eine Analysemethode für CaP-NP stellte der Nachweis von fluoreszenzmarkierten CaP-NP in den entsprechenden 2PP generierten Probekörpern mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) dar. Zur Auswahl eines geeigneten Fluoreszenzfarbstoffs wurde zunächst ein Eigenfluoreszenzspektrum der 2PP-Probekörper bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm mit dem CLSM aufgenommen. Es wurde ein breiteres Minimum im Bereich von 650 - 700 nm detektiert, welches für die Anregung und Emission einer Fluoreszenzfarbstoffmarkierung der CaP-NP genutzt werden konnte. Gemäß dem Spektrum wurde der rote Fluoreszenzfarbstoff Cy5 (Anregungsmaximum 648 nm, Emissionsmaximum 666 nm) ausgewählt. Dieser konnte in einer polymergebundenen Form durch den Projektpartner Uni-Duisburg-Essen, Arbeitskreis Prof. Epple, an der Oberfläche der CaP-NP immobilisiert werden. Diese Cy5-markierten CaP-NP in EtOH wurden wie oben beschrieben sukzessive in der Polymervorstufe RK1005 bis zu einer Konzentration von 2% (m/m) angereichert, wobei das Lösungsmittel in der Gefriertrocknungsanlage abgezogen wurde.

Nach Zusatz des Photoinitiators Irgacure[®]369 (2% (m/m)) konnte der entstandene Photoresist mit Cy5-markierten CaP-NP mittels 2PP strukturiert werden, jedoch konnte nur mit ca. 1/10 der Geschwindigkeit im Vergleich zum Nanopartikel-freien Photoresisten gleichen Materials polymerisiert werden. Folglich ist es möglich, kleinere Teststrukturen (ca. 500 µm x 500 µm x 500 µm) mit nanopartikelhaltigen Photoresisten zu schreiben, während 3D-Strukturen im mm³-Bereich oder Implantatteile eine zu lange Bearbeitungszeit benötigen würden. Die Analyse der Scaffolds mittels EDX (energy dispersive x-ray-spectroscopy) ergab, dass im Falle der Einpolymerisation von Cy5-markierten CaP-NP in den RK1005-Scaffolds Calcium zu 2% (m/m) und Phosphor zu 0,63% (m/m) nachgewiesen werden konnte (Abb. 4), während bei der

Negativkontrolle (RK1005-Scaffold ohne Zusatz von CaP-NP) diese beiden Elemente nicht detektiert wurden. Der Nachweis der einpolymerisierten Cy5-CaP-NP im Scaffold konnte mittels CLSM bei gleichzeitiger Anregung mit 488 nm und 633 nm sowie Detektion der emittierten Fluoreszenz in den Wellenlängenbereichen 500 - 580 nm und 643 - 734 nm nicht eindeutig geführt werden.

Da die Einpolymerisation von Cy5-CaP-NP mittels 2PP aufgrund optischer Störeinflüsse (Streuung, mangelnde IR-Transparenz) eingeschränkt war, wurde ein Vorversuch zur nachträglichen Beschichtung von Scaffolds mit Cy5-CaP-NP-haltigen Polymerlösungen unternommen. Dazu wurden getrocknete AB8 (PEG400-urethan-methacrylat)-Scaffolds in 50% (m/m) Polymerlösung (RK1005) in EtOH mit 2% (m/m) Irgacure® 369 und mit wahlweise A) ohne CaP-NP B) mit DNA-CaP-NP C) mit Cy5-markierten CaP-NP getaucht und mit UV Licht bestrahlt, wobei das Lösungsmittel EtOH abdampfte. Die Konzentration an Nanopartikeln in der Beschichtungslösung wurde so eingestellt, dass sie ca. 0,6 mg CaP-NP / g Lösung betrug. Da die aufgebrauchte Lösung 50% (m/m) EtOH enthielt, verdoppelte sich der CaP-NP Massenanteil nach dem Aufbringen der Lösung auf das Scaffold infolge der Verdampfung des EtOHs.

Die Analyse der beschichteten Scaffolds mittels CLSM erfolgte durch eine gleichzeitige Anregung bei 488 nm und 633 nm, wobei die emittierte Fluoreszenz in den Wellenlängenbereichen von 570-590 nm und 650-700 nm detektiert wurde. Die Scaffolds erschienen aufgrund ihrer sich überlagernden Fluoreszenz im grünen und roten Bereich als

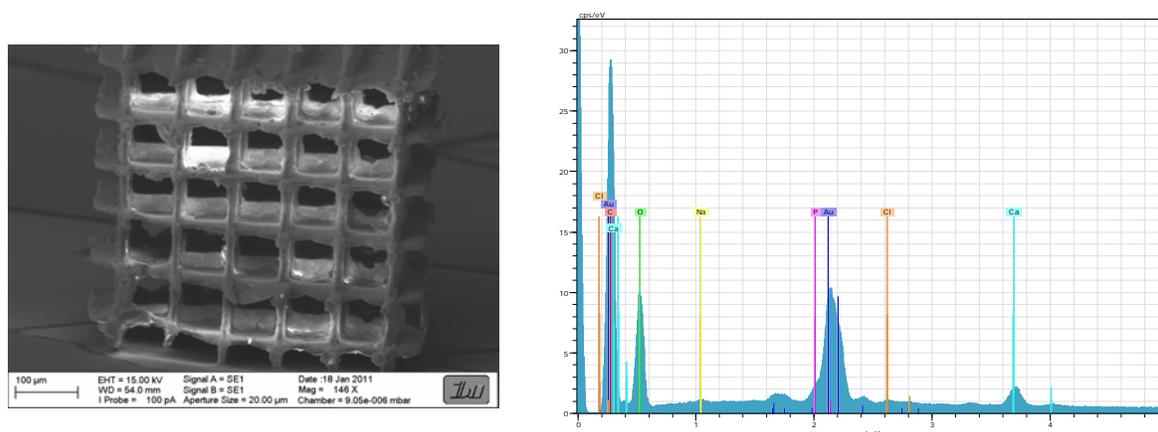


Abb. 4: Links: REM-Analyse; Rechts: EDX-Analyse des Scaffold aus RK1005 mit 2% (m/m) Cy5-CaP-NP

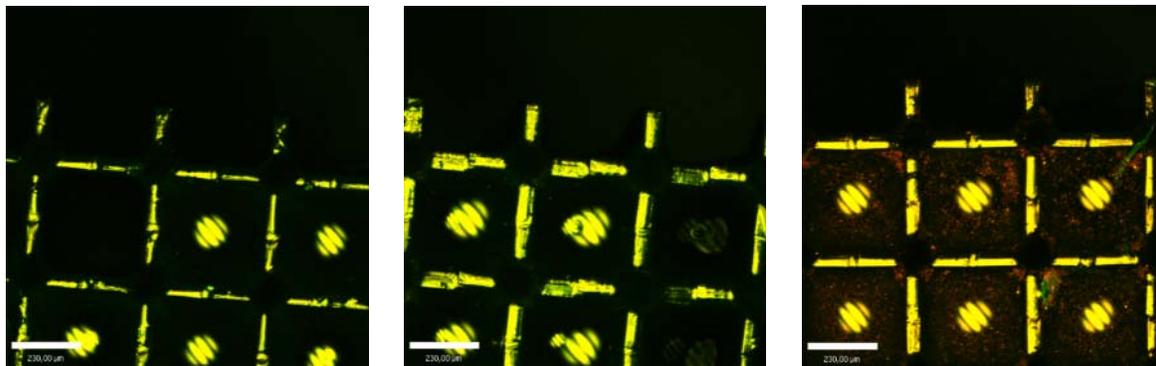


Abb. 5: Coating von AB8-Scaffolds mit 50% (m/m) RK1005 in EtOH mit (Links) ohne CaP-NP, (Mitte) mit DNA-CaP-NP, (Rechts) mit Cy5-markierten CaP-NP; überlagerte CLSM-Aufnahmen bei 488 nm und 633 nm. Der Abstandsbalken entspricht 230 µm.

gelbe Gerüststrukturen. Nur im Fall C) mit Cy5-markierten CaP-NP konnten rot leuchtende Partikel detektiert werden (Abb. 5). Diese rot leuchtenden Partikel waren in dem Polymerfilm enthalten, der die Poren in der Gerüststruktur überspannte. Vermutlich enthielt die Beschichtungslösung mit 50% (m/m) einen zu hohen Anteil an Polymervorstufe, so dass sich ein Poren überspannender Film bildete und nicht nur die Balken- der Gerüststrukturen beschichtet wurden. Mit einer geringer konzentrierten Beschichtungslösung (weniger RK1005) könnte dem entgegen gewirkt werden. Die gelb leuchtenden Stellen in der Porenmitte der Scaffolds sind wahrscheinlich Artefakte, da in der REM-Analyse keine entsprechenden Strukturen gefunden werden konnten. Neben dem Nachweis der Cy5-markierten CaP-NP mittels CLSM konnte an der Oberfläche des mit Cy5-CaP-NP beschichteten Scaffolds das Vorhandensein von Calcium in geringen Mengen qualitativ mittels EDX nachgewiesen werden. Beim Scaffold ohne CaP-NP in der Beschichtung konnte kein Calcium mittels EDX detektiert werden.

1.2.1.2 Coating von Scaffolds aus RK1005 mit CaP-NP/ RK1005 Gemisch (AP2)

Für Coatingversuche mit Scaffolds aus dem Osteophasen-Material RK1005 wurden zunächst Teststrukturen mit ca. $0,5 \times 0,5 \times 0,25 \text{ mm}^3$ Volumen und $70 \text{ }\mu\text{m}$ Poren hergestellt. Es wurde eine Stammlösung von 10% (m/m) CaP-NP in RK1005 durch sukzessive Zugabe von in EtOH suspendierten CaP-NP mit einer Konzentration von 3,5 mg/ml und Entfernung des Lösungsmittels in der Lyophile hergestellt. Diese Stammlösung wurde für Beschichtungsversuche mit EtOH im Verhältnis 1:10, 1:5 und 3:10 verdünnt, sodass Lösungen mit 1% (m/m), 2% (m/m) und 3% (m/m) CaP-NP für die Beschichtungen eingesetzt wurden, denen 2% (m/m) an Photoinitiator (IC 369, Ciba) zugesetzt wurde. Nach Inkubation von Scaffolds in diesen Coating-Lösungen wurde das Lösungsmittel von den Scaffolds im schwachen Vakuum abgezogen, und die Scaffolds wurden für 60 Sec mit UV Licht bestrahlt zur Vernetzung des CaP-haltigen RK1005 an der Oberfläche. Nachfolgend wurde mittels EDX Analyse die Oberflächenkonzentration an CaP-NP der Scaffolds ermittelt (Abb. 6). Die REM-Aufnahmen der beschichteten Scaffolds und einer unbeschichteten Kontrolle ergaben, dass bei einer Verdünnung von 3:10 einige Poren mit einer RK1005 Schicht zupolymerisiert wurden. Die EDX Analyse ergab, dass für die Kontrolle ohne Beschichtung eine Konzentration von 0,37% (m/m) an Calcium gemessen wurde, während für die Verdünnung 1:10 1% (m/m) Ca, für eine Verdünnung von 1:5 ca. 1,5% (m/m) Ca und für die Verdünnung 3:10 ca. 1,1% (m/m) gemessen wurde. Diese Werte liegen an der Nachweisgrenze dieser Methode für Ca und spiegeln eher ein qualitatives Ergebnis wieder. Eine Aussage über eine homogene Beschichtung kann nicht getroffen werden.

1.2.1.3 Coating von Scaffolds aus RK1005 mit Polyelektrolytschichten (AP2)

Durch die unter 1.2.1.2. beschriebenen Coatingverfahren konnten CaP-Nanopartikel in einer Konzentration von bis zu 2% (m/m) auf die Oberfläche von 2PP generierten Scaffolds aufgebracht werden. Da die CaP-Nanopartikel bei diesem Verfahren in eine Polymerschicht von RK1005 eingebettet sind, sind sie für die Zellen nur bei Degradation des Polymers verfügbar. Ferner könnten bioaktive Moleküle wie siRNA, DNA oder Proteine (z.B. Wachstumsfaktoren) während der radikalischen Polymerisation kovalent gebunden werden, wodurch sie ihre Funktion/Aktivität verlieren können. Um eine bessere Verfügbarkeit der CaP-NP gebundenen, bioaktiven Moleküle zu erreichen, wurde die Immobilisierung von CaP-NP an die Scaffoldoberfläche mittels Einbau in Polyelektrolyt-Multilayer (PEM) untersucht.

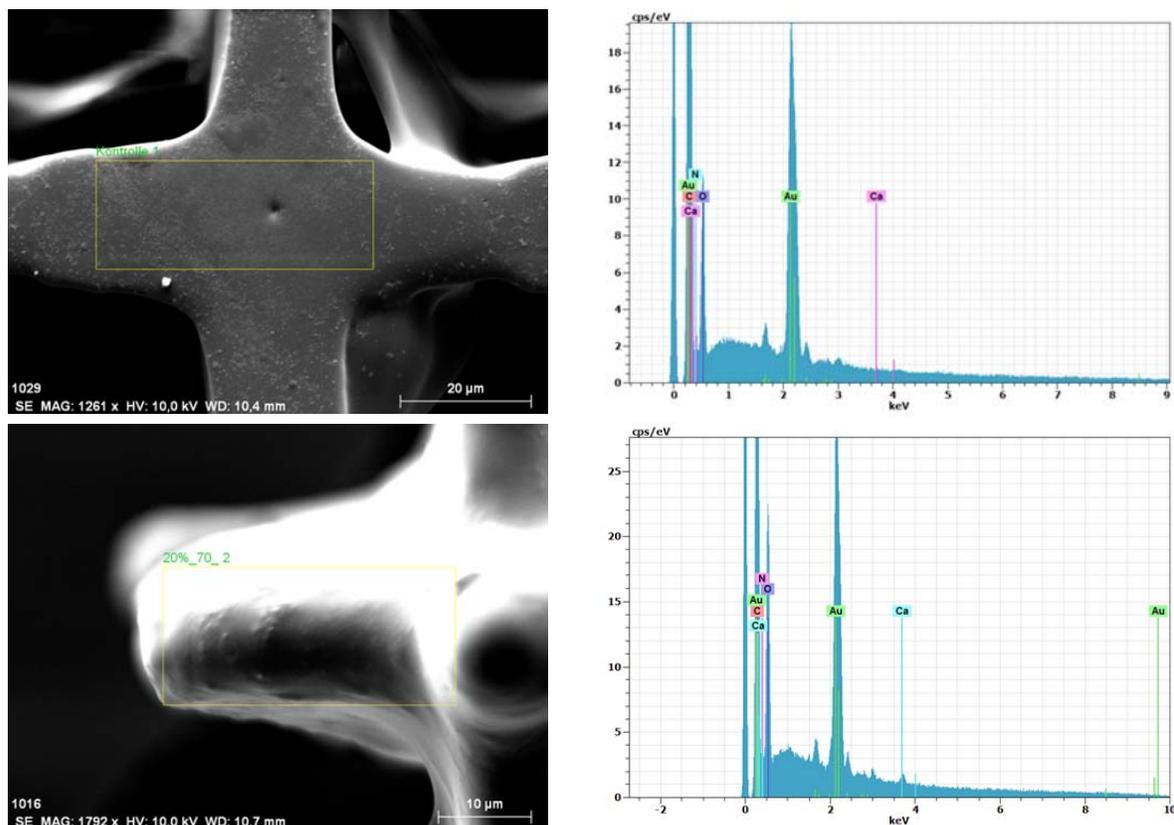


Abb. 6: EDX-Analyse von unbeschichtetem RK1005 Scaffold (oben) mit 0,36% (m/m) Ca sowie nach Beschichtung mit 2% (m/m) CaP-NP/ RK1005 Lsg. (unten): gemessen 1,27% (m/m) Ca

Die Vorversuche zur Beschichtung von photopolymerisierten RK1005 Konstrukten wurden mit zwei Zielstellungen durchgeführt. Zum einen sollte der *Proof of Principle* erbracht werden, dass 2PP generierte RK1005 Strukturen mit Polyelektrolyt-Multilayern biofunktionalisiert werden können. Hierzu wurden Scaffolds im Durchfluss *Layer by Layer* mit den folgenden biomimetischen Polyelektrolyten beschichtet: Poly-L-Glutaminsäure (PGA), Poly-L-Lysin (PLL) und Chondroitinsulfat (CS). Der Nachweis der erfolgreichen Beschichtung wurde mit konfokaler Laser Scanning Mikroskopie erbracht. Hierfür wurde die letzte PLL-Beschichtung mit fluoreszenzmarkiertem PLL (PLL^{FITC}) durchgeführt. Abbildung 7A (links) zeigt vergleichende Fluoreszenzaufnahmen von PEM beschichteten (oben) und unbeschichteten (unten) RK1005 Scaffolds. Trotz einer starken Autofluoreszenz der RK1005 Scaffolds im Wellenlängenbereich der FITC Emission ist durch die Beschichtung mit fluoreszenzmarkierten PEM eine deutliche Steigerung der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen. Um nachzuweisen, dass nicht nur die äußeren Flächen der 3D Struktur beschichtet sind, wurde der Scaffold halbiert. Die mikroskopische Untersuchung der Schnittfläche belegt eine erfolgreiche Beschichtung aller drei Ebenen des Scaffolds (Abb. 7A, rechts). Daher kann geschlussfolgert werden, dass die gesamte Oberfläche der dreidimensionalen RK1005 Struktur mit PEM biofunktionalisiert werden kann.

Als Alternative zur Einbettung von Calciumphosphat-Nanopartikel für die Transfektion im Volumen der 2PP Struktur (also im Polymermaterial), wurde eine nachträgliche Beschichtung der Strukturen zum *delivery* der Partikel analysiert. Hierzu wurden RK1005 Vollkörper (Durchmesser ca. 5 mm, 2 mm hoch) verschiedenen Beschichtungsprozeduren unterzogen. Eine adsorptive Bindung der Partikel an die Polymeroberfläche resultierte in einer geringen

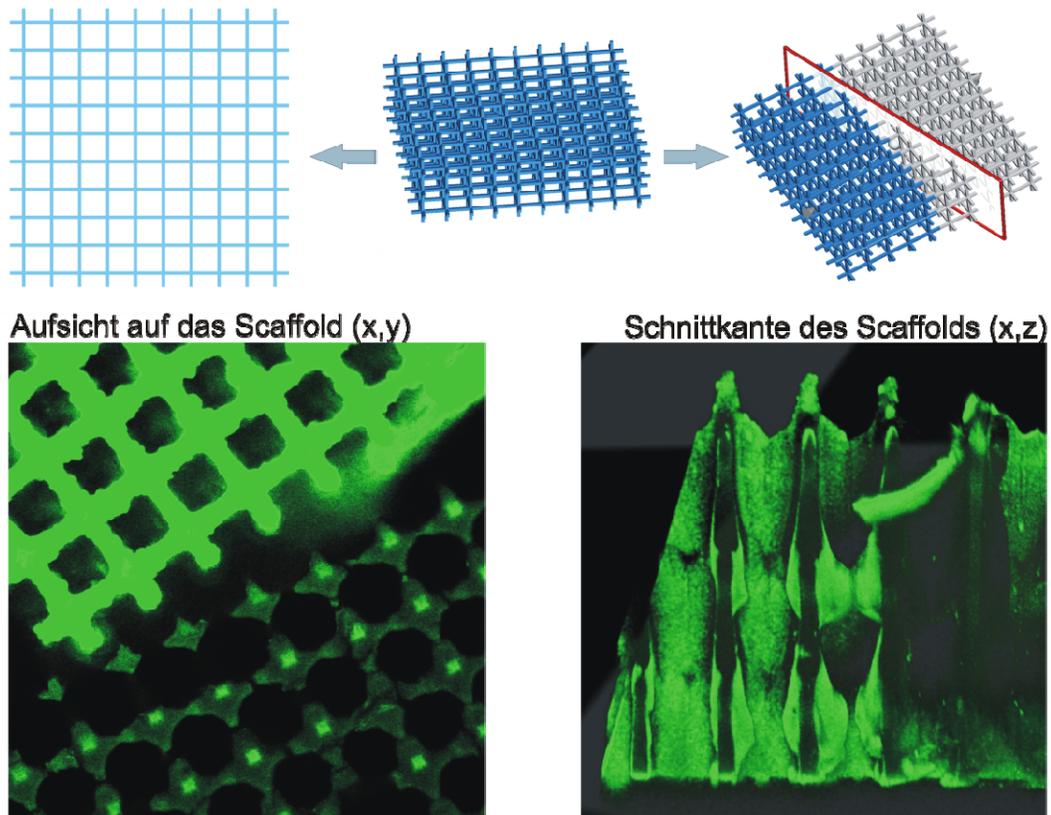


Abb. 7A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der PEM beschichteten Scaffolds (ca. $800\ \mu\text{m} \times 800\ \mu\text{m} \times 240\ \mu\text{m}$). Links: Vergleich von beschichtetem (oben) zu unbeschichtetem Scaffold (unten, Vergrößerung 20 x, Bildgröße: $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$). Rechts: Aufsicht auf eine Schnittkante des beschichteten Scaffolds, nachdem dieses etwa mittig zerteilt wurde. Schichtsystem: $(\text{PLL-PGA})_4\text{-PLL}^{\text{FITC}}\text{-CS}$.

Menge von transfizierenden Nanopartikeln an der Oberfläche. Wurden die Nanopartikel hingegen im *Layer by Layer* Verfahren abgeschieden, konnte eine deutliche Steigerung der Oberflächenkonzentration an CaP-Partikeln erzielt werden (Abb. 7B). Eine Abscheidung von 5 Lagen Calciumphosphatpartikel resultierte in einem Calciumanteil von 2,88% an der RK1005 Oberfläche (EDX, normiert auf die Kohlenstoffkonzentration an der Oberfläche).

Die elementare Komposition der Nanopartikel-beschichteten Probekörper wurde hierbei in einem Kippwinkel von 80° per EDX charakterisiert, um die Sensitivität der Messung zu steigern. Quantitative Aussagen mittels EDX sind erst ab einem Massenanteil von 1% valide, dieser Grenzwert wird jedoch mit nanoskaligen Beschichtungen zumeist deutlich unterschritten. Im Vergleich zur konventionellen EDX Spektroskopie werden bei einem Kippwinkel von 80° durch die räumliche Ausbreitung des Elektronenstrahls im Material mehr Atome der nanoskaligen Beschichtung angeregt (ohne Kippung werden hier hauptsächlich Atome des unterliegenden Substratmaterials angeregt). Die hierdurch erzielte Steigerung der Sensitivität erlaubt die quantitative Untersuchung der elementaren Komposition von nanoskaligen Beschichtungen. Durch die erzielten Resultate konnte eindeutig belegt werden, dass die Einbettung von CaP Nanopartikeln in PEM Filme ein oberflächengekoppeltes *delivery* von transfizierenden Partikeln ermöglicht. Nachfolgende Untersuchungen werden auf die Einbettung DNA-beladener Partikel und anschließende Transfektionsexperimente (AP6) fokussieren.

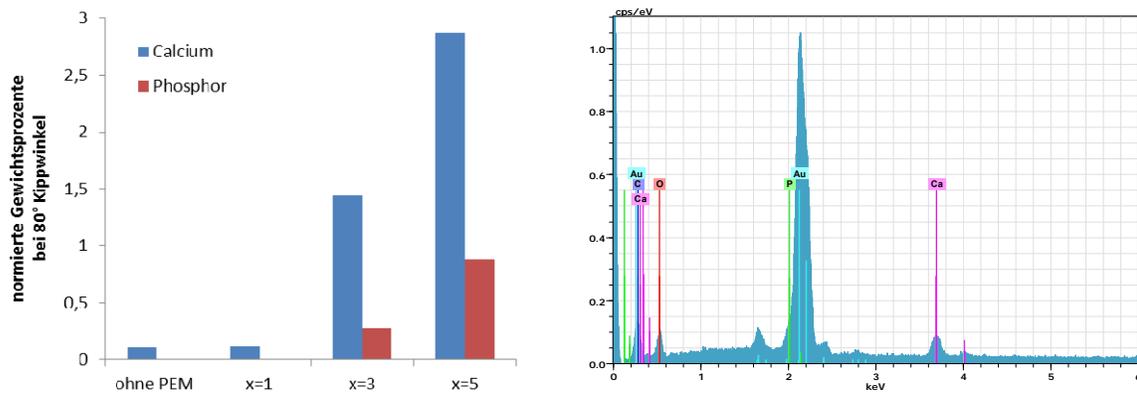


Abb. 7B: EDX Untersuchungen zur Charakterisierung der elementaren Komposition CaP-PEM beschichteter RK1005 Vollkörper. Links: normierte Oberflächenkonzentration von Calcium und Phosphor in Abhängigkeit von der Beschichtung für $(\text{PLL-PGA})_5\text{-PLL}^{\text{FITC}}\text{-(CS-Nanopartikel)}_x\text{-CS-PLL-PGA-PLL}^{\text{FITC}}$. Rechts: EDX Spektrum für einen RK1005 Vollkörper mit 5 Lagen CaP Nanopartikel. Zur Steigerung der Sensitivität wurden alle EDX Spektren bei einem Kippwinkel von 80° aufgenommen und ausgewertet.

1.2.2 Untersuchungen zur erreichbaren Auflösung, Strukturqualität, Reproduzierbarkeit bei der 2PP-Strukturierung von Hydrogelen (Chondrophase, AP3)

Zur Herstellung von Trägermaterialien für die Chondrophase wurden als Polymervorstufen hydrogelbildende Biopolymere in derivatisierter Form wie die Polysaccharide Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Aminodextran, Alginat und Gelatine (Protein) getestet. Als Photoinitiatoren in wässriger Lösung wurde das Photoinitiatorsystem Bengalrosa/Triethanolamin (TEA, Sigma) beziehungsweise der von INNOVENT in ein Hydrochlorid überführte Photoinitiator Irgacure® 369 (Ciba) (kurz: Irgacure® 369/HCl) verwendet, da die Photolacke mit Bengalrosa/TEA bei längerer Lasereinstrahlung (>1h) zur kompletten Aushärtung neigten. Die Polysaccharide ließen sich in wässriger Lösung unter Verwendung von Bengalrosa / TEA beziehungsweise Irgacure® 369/HCl nicht mittels 2PP polymerisieren. Dieser Effekt ist vermutlich auf eine zu geringe Zahl an reaktiven Gruppen im Photolack zurückzuführen, da einige der untersuchten Polymere (Alginat, Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat) nur bis maximal ca. 10% (m/m) in Wasser löslich waren. Deshalb wurden die Biopolymere in verschiedenen Konzentrationen (1-5% (m/m)) mit wässrigem 20% (m/m) Polyethylenglycoldiacrylat (PEG-DA, Mn 800 Da, Aldrich) gemischt. Des Weiteren wurde Polyethylenglycol (PEG400)-urethandimethacrylat (INNOVENT) als Trägermaterial für die Chondrophase verwendet. Die Materialtestungen wurden analog zu denen für die Osteophase durchgeführt. Eine Übersicht der Ergebnisse zeigt Tabelle 2. PEG400-urethandimethacrylat und Gelatine/PEG-DA in DMSO als Lösungsmittel sind aufgrund der guten Strukturierbarkeit bei hoher Geschwindigkeit und der Möglichkeit zu langer Laserlichtexposition ohne Aushärtung des Photolacks für die Herstellung komplexer Trägerstrukturen geeignet. Aminodextranmethacrylat konnte als 30% (m/m)-ige Lösung in DMSO mit 2% (m/m) Irgacure® 369 abweichend bei 740 nm mit hoher Geschwindigkeit polymerisiert und strukturiert werden, so dass auch diese Substanz für die Herstellung komplexer Strukturen geeignet scheint.

Tab. 2: Materialtestungen für die Chondrophase (790 nm)

Substrat	Photo-initiator	Lösungsmittel	Geschwindigkeit	Polymerisierbarkeit	Strukturierbarkeit
Alginat					
Alginatmethacrylat (RK 897)	Bengalros a/ TEA	Wasser	-	-	-
Chondroitinsulfat					
Chondroitinsulfat-methacrylat (RK874 oder RK918) + 20% (m/m) PEG-DA	Bengalros a/ TEA oder Irgacure® 369/HCl	Wasser	hoch	+	+
		Wasser	niedrig	+	-
Hyaluronsäure					
Hyaluronsäure-methacrylat (oxidiert) (RK906) + 20% (m/m) PEG-DA	Bengalros a/ TEA oder Irgacure® 369/HCl	Wasser	niedrig	+	+
		Wasser	niedrig	+	-
Aminodextran					
Aminodextran-methacrylat (RK807)	Irgacure® 369	DMSO	mittel	+	+
Gelatine					
Gelatinemethacrylat [17kDa] (RK935) oder [2kDa] (RK936)	Bengalros a/ TEA oder Irgacure® 369	Wasser	niedrig	+	-
		DMSO	niedrig	+	+
Gelatinemethacrylat ([17kDa] (RK935) oder [2kDa] (RK936) jeweils + 20% (m/m) PEG-DA	Irgacure® 369	DMSO	hoch	+	+
PEG					
PEG400-urethan-methacrylat (AB8)	Irgacure® 369	kein	hoch	+	+

DMSO: Dimethylsulfoxid

1.2.2.2 Testung von Photoinitiatoren für die 2PP in wässriger Phase (AP3)

Der stark wasserbindende Charakter von Polysacchariden wie Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat erfordert eine Durchführung der 2PP in wässriger Lösung. Eine wichtige Fragestellung für 2PP in wässrigen Lösungen ist daher der Einsatz eines geeigneten wasserlöslichen Photoinitiators, der durch 2-Photonenabsorption angeregt werden kann.

1.2.2.2.1 Bengalrosa / TEA

Das von Basu et al. [21] beschriebene Photoinitatorsystem Bengalrosa/TEA für die 2PP kam mit für unser System (20% (m/m) PEG-DA) angepassten Konzentrationen (0,03% (m/m) Bengalrosa/0,5% (m/m) TEA) zur Anwendung. Es wurde gezeigt, dass 3-5% (m/m) Hyaluronsäuremethacrylat (RK908) in wässriger 20% (m/m) PEG-DA-Lösung mit dieser Photoinitiatorkonzentration bei 790 nm polymerisiert und strukturiert (Woodpiles) werden konnte. Analog wurden 3-5% (m/m) Chondroitinsulfatmethacrylat (RK874) mit 0,05% (m/m) Bengalrosa/1% (m/m) TEA in 20% (m/m) PEG-DA sowohl polymerisiert als auch strukturiert. Allerdings kam es in beiden Fällen zur Aushärtung der gesamten Probe während des 2PP Vorgangs durch die Einstrahlung des Laserlichtes. Das Zeitfenster bis zur Aushärtung der Probe, welches für Strukturierungen genutzt werden kann, beträgt ca. 1h. Diese ermöglicht die Herstellung von Woodpiles, ist aber für die Herstellung von komplexeren 3D-Strukturen basierend auf STL-Files noch nicht ausreichend.

1.2.2.2.2 Irgacure® 369/HCl

Der in organischen Lösungsmitteln verwendbare Photoinitiator Irgacure®369 (Ciba) wurde vom Projektpartner INNOVENT in ein Hydrochlorid überführt (Irgacure® 369/ HCl), so dass er in sauren wässrigen Lösungen (pH=1) gelöst werden kann. Dieser Photoinitiator wurde bezüglich der Polymerisationsinitiation durch 2-Photonenabsorption in wässriger 20% (m/m) PEG-DA mit 1 bis 5% (m/m) Chondroitinsulfatmethacrylat (RK918) oder Hyaluronsäuremethacrylat (RK906) bei 790 nm getestet. Ferner wurde die Polymerisation von 2% (m/m) Irgacure® 369/HCl in wässriger 30% (m/m) PEG-DA mit 3% (m/m) Chondroitinsulfatmethacrylat und 1% (m/m) TEA bei 740 nm getestet. Eine Polymerisation dieser Lösungen mit Irgacure® 369/HCl (2% (m/m)) ist prinzipiell möglich, jedoch verläuft die Polymerisation unkontrolliert, so dass eine Strukturierung nur sehr bedingt möglich ist. Durch eine Variation der Prozessparameter (Energie, Geschwindigkeit) lässt sich die Polymerisationsreaktion nicht kontrollieren. Eine weitere Einschränkung der Verwendbarkeit von Irgacure® 369/ HCl besteht darin, dass er nur bei sauren pH-Werten verwendbar ist, so dass er nicht für basische Alginate-Lösungen eingesetzt werden kann (Photoinitiator zeigt im basischen Bereich Ausfällungsreaktionen!). Alginate-Lösungen verfestigen sich jedoch bei sauren pH-Werten.

1.2.2.2.3 QTX / TEA

Das Photoinitatorsystem [3-(3,4-Dimethyl-9-oxo-9H-thioxanthen-2-yloxy)-2-hydroxypropyl]-trimethylammoniumchlorid (QTX, Sigma) und TEA wurde bezüglich der 2-Photonen-Polymerisation von wässrigen PEG-DA Lösungen getestet. In einer Lösung von 30% (m/m) PEG-DA mit 2% (m/m) QTX konnten bei 790 nm nur einzelne Polymervoxel erzeugt werden, deshalb wurde der Coinitiator TEA der Mischung zugesetzt.

30% (m/m) PEG-DA mit 2% (m/m) QTX + 1% (m/m) TEA Lösung konnte bei 790 nm polymerisiert aber nicht strukturiert werden. Gleiches gilt für 20% (m/m) PEG-DA mit 1% (m/m) QTX + 1% (m/m) TEA bei 790 nm. Außerdem wurde 30% (m/m) PEG-DA mit 2% (m/m) QTX + 1% (m/m) TEA Lösung bei 740 nm getestet. Die zuletzt genannte Lösung konnte polymerisiert

und strukturiert (Woodpiles) werden, allerdings mit der Einschränkung, dass die Polymerisation leicht außer Kontrolle geriet (Verbrennen der Probe). Eine Optimierung des Verhältnisses QTX zu TEA könnte die Polymerisationseigenschaften weiter verbessern. Allerdings nimmt die Löslichkeit des Photoinitiatorsystems in wässriger PEG-DA Lösung stark ab, wenn Chondroitinsulfat zugefügt wird, welches in die PEG-DA Matrix einpolymerisiert werden soll. Die Zugabe von 1% (m/m) Chondroitinsulfatmethacrylat (RK918) zu 30% (m/m) PEG-DA mit 0,5% (m/m) QTX führte zum Ausfallen des Photoinitiators. Es war hingegen möglich, 1% (m/m) Chondroitinsulfatmethacrylat (RK918) in 30% (m/m) PEG-DA mit 0,1% (m/m) QTX + 0,05% (m/m) TEA zu lösen. Allerdings ließ sich diese Lösung nicht bei 740 nm mittels 2PP strukturieren (unkontrollierte Polymerisation), da vermutlich zu wenig Photoinitiator vorhanden war.

1.2.2.2.4 Ahns-PPD

Der vom Projektpartner INNOVENT bereitgestellte Photoinitiator „Ahns-PPD“ wurde bezüglich der 2PP von wässrigem 30% (m/m) PEG-DA bei einer Wellenlänge von 740 nm und maximaler Energie getestet. Dabei wurde der Photoinitiator Ahns-PPD in einer Konzentration von 1% (m/m), 2% (m/m) sowie 2% (m/m) + 1% (m/m) TEA eingesetzt. Es wurde beobachtet, dass diese Lösungen bei Lasereinstrahlung aufkochten und dass sich vereinzelnde Polymervoxel bildeten, aber weder eine kontrollierte Polymerisation noch eine Strukturierung der Proben möglich war. Unter den genannten Bedingungen ist der Photoinitiator „Ahns-PPD“ nicht zur 2PP wässriger PEG-DA Lösungen geeignet.

1.2.2.2.5 TH90 (Thioxanton)

Der vom Projektpartner INNOVENT e.V. synthetisierte Photoinitiator TH90 wurde auf seine Tauglichkeit als Photoinitiator für die laserinduzierte 2-Photonen-Polymerisation (2PP) getestet. Der getestete Photoresist setzte sich aus wässrigem 50% (m/m) PEG-DA und 2% (m/m) TH90 zusammen. Der Polymerisationsversuch wurde bei 770 nm und maximaler Energie unternommen. Es wurde beobachtet, dass eine Polymerisation prinzipiell möglich ist, aber der energetische Schwellenwert der Polymerisation sehr hoch lag. Deshalb wurde dem Photoresist der Coinitiator Triethanolamin (TEA) zugesetzt. Ein Photoresist aus einer wässrigen 50% (m/m) PEG-DA mit 2% (m/m) TH90 und 1% (m/m) TEA konnte bei 770 nm polymerisiert und bedingt strukturiert werden (Woodpile), da sich die 2PP nur schwer kontrollieren ließ. Infolgedessen war es nicht möglich, STL-File basierende, komplexere Strukturen herzustellen. Ferner wurde eine Aushärtung der gesamten Probe festgestellt. Unter den getesteten Bedingungen konnten keine komplexeren Strukturen mit längerer Laufzeit hergestellt werden.

1.2.2.2.6 FDA (Flavinadenindinucleotid-dinatriumsalz)

Der Photoinitiator FDA wurde vom Projektpartner INNOVENT e.V. für Testungen zum Einsatz in der 2PP zur Verfügung gestellt. Eine Exposition des Photoresisten bestehend aus wässriger 50% (m/m) PEG-DA und 2% (m/m) FDA mit gepulstem Laserlicht bei 770 nm führte nicht zu einer strukturierten 2-Photonen-Polymerisation des Photoresisten, stattdessen kam es zu einer Aushärtung der gesamten Probe infolge von Streulicht.

1.2.2.2.7 PI 1, PI 13, PI 35

Die Photoinitiatoren PI 1, PI 13, PI 35 wurde vom Projektpartner INNOVENT e.V. zur Testung ihrer Verwendbarkeit als wasserlösliche Photoinitiatoren für die 2PP zur Verfügung gestellt. Als Testlösungen wurde eine Mischung aus den gesättigten wässrigen Lösungen der jeweiligen Photoinitiatoren und PEG-DA mit einem Massenverhältnis von 1:1 hergestellt. Diesen

Gemischen wurde a) kein TEA, b) 1% (m/m) TEA und c) 2% (m/m) TEA zugesetzt. Basierend auf den mit gelieferten Absorptionsspektren der Photoinitiatoren wurde eine Exposition dieser Gemische mit gepulstem Laserlicht bei 790 nm durchgeführt. In keinem Fall konnte eine kontrollierte 2PP-Reaktion ausgelöst werden. Im Falle des Photoinitiators PI 1 kam es bei Einstrahlung mit maximaler Leistung zu unkontrollierter Polymerisation, bei den weiteren Photoinitiatoren konnte keine laserinduzierte Polymerisation festgestellt werden.

Die Testungen zeigen, dass die bisher getesteten wasserlöslichen Photoinitiatoren nicht zur Herstellung von komplexen, auf STL-Files basierenden Trägerstrukturen mittels 2PP in wässriger Lösung eingesetzt werden können.

Im Ergebnis der Arbeitsschwerpunkte 1 bis 3 des Teilvorhabens, die auf die Entwicklung der prozesstechnischen Aspekte der 2PP-Prozessierung von Polymeren für die Herstellung großer, implantierbarer 3D-Scaffolds im Knorpel- und Knochengewebe fokussiert waren, liegen photopolymerisierbare Polymere vor, die mittels 2-Photonen-Technik zu 3D-Trägerstrukturen mit bisher nicht erreichten Dimensionen polymerisiert werden können und dabei die notwendigen Stabilitäten für die Implantation aufweisen (siehe auch Punkt 1.7 dieses Berichtes). Für den gewebespezifischen Einsatz sind aufgrund ihrer Polymerisierungs- sowie Materialeigenschaften die zwei Materialien ϵ -Caprolacton-6-urethan-methacrylat-3-Glycerin (Osteophase) und PEG400-urethan-methacrylat (Chondrophase) besonders geeignet. Ergebnisse zur Prozessierung zeigen, dass die Osteophase gezielt modifiziert werden kann (CaP-NP-Anbindung bzw. Polyelektrolytbeschichtung z.B. für die gezielte Freisetzung bioaktiver Komponenten). Entsprechende Entwicklungsarbeiten für die Chondrophase werden in den nachfolgenden Kapiteln näher erläutert.

1.3 Zytokompatibilitätsprüfungen der Scaffoldmaterialien (AP7)

Die unter 1.2 ausgewählten Materialien wurden gemäß dem formulierten Testkonzept einer Zytokompatibilitätsprüfung unterzogen.

1.3.1 Herstellung von Teststrukturen für die Zytokompatibilitätsprüfung (AP7)

Zur Analyse der Material- und Strukturverträglichkeit werden auf einem STL-File basierende Teststrukturen durch 2PP hergestellt, die aus einer 50 μm hohem Bodenplatte mit einer Fläche von 2 mm x 2 mm bestehen, auf die 9 Felder von Gitterstrukturen mit variierenden Porengrößen (0 bis 167 μm) und 100 μm Höhe aufgesetzt sind. Diese Teststrukturen („Setzkästen“) wurden mit den ausgewählten Materialien (gute Polymerisier- und Strukturierbarkeit bei hoher Geschwindigkeit) wie Polyglyceringlycidylmethacrylat und ϵ -Caprolactonurethan-methacrylat sowie PEG400-urethandimethacrylat (siehe Abb. 8) für Biokompatibilitätstests gemäß dem festgelegten Testkonzept hergestellt. Die Analyse der Abmessungen mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) ergab eine gute Übereinstimmung mit den durch den STL-File vorgegebenen Parametern in der x,y- Ebene, während insbesondere bei Gittern mit großen Poren Abweichungen in z-Richtung auftreten können. Dieses deutet möglicherweise auf eine Instabilität der Gitterstruktur bei großen Poren (>100 μm) hin.

Für das Material 50% (m/m) PEG-DA/ 1% (m/m) Gelatine/DMSO versetzt mit 2% (m/m) Irgacure 369 wurde abweichend eine entsprechende Bodenplatten mit den oben genannten Ausmaßen sowie Scaffolds mit der Struktur kubischer Gitter (ca. 2 mm x 2 mm x 0,3 mm) und ca. 76 μm Porengröße als Teststruktur eingesetzt (vgl. 1.5.1). Die Herstellung komplexer STL-Files mit dem Material PEG-DA/Gelatine/DMSO gestaltete sich aufgrund der geringeren Viskosität des Photoresisten und des daraus resultierenden „Fließens“ des Materials während

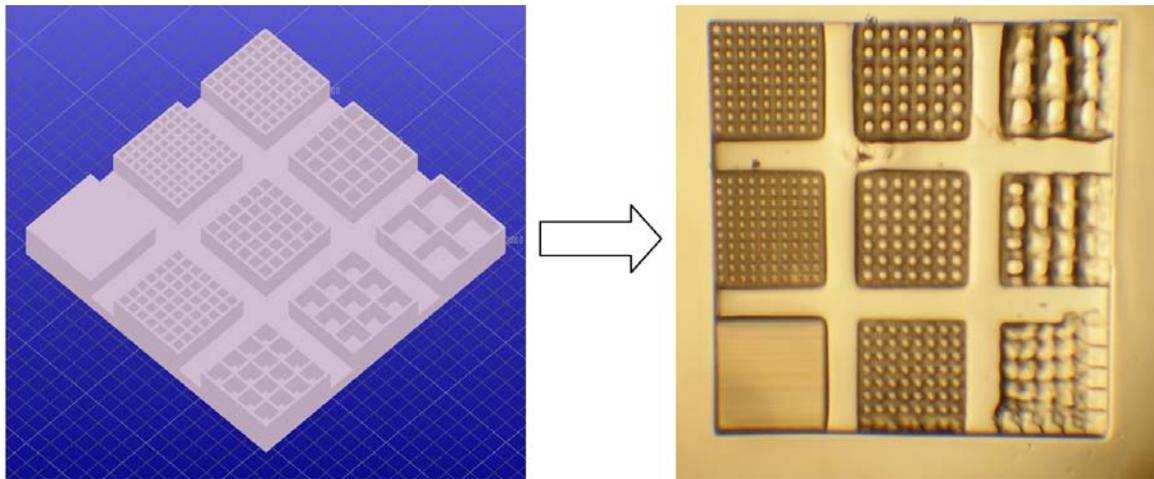


Abb. 8: STL-Struktur für Biokompatibilitätsuntersuchungen, Material: PEG400-urethandimethacrylat (AB8), 2 mm x 2 mm x 0,15 mm

der Prozessierung im Vergleich zu den anderen ausgewählten Materialien nachteilig, es traten vermehrt fehlerhafte Teststrukturen auf.

1.3.2 Zytokompatibilitätsuntersuchungen (AP7)

Die unter 1.2.1 und 1.2.2 ausgewählten Materialien für die Osteo- und Chondrophase (Polyglyceringlycidylmethacrylat (AB3), ϵ -Caprolactonurethanmethacrylat (RK1005) sowie PEG400-urethandimethacrylat (AB8)) wurden einer Biokompatibilitätsprüfung unterzogen, wobei die unter 1.3.1 mittels 2PP hergestellten Teststrukturen zum Einsatz kamen. Für das Material PEG-DA/Gelatine/DMSO wurden abweichend entsprechende Bodenplatten mit den oben genannten Ausmaßen 2 mm x 2 mm x 0,05 mm sowie Scaffolds mit der Struktur kubischer Gitter (ca. 2 mm x 2mm x 0,3 mm) und ca. 76 μ m Porengröße als Teststruktur eingesetzt (vgl. 1.5.1). Als Besiedlungskontrolle dienten B33-Glasronden (15 mm Durchmesser). Die Teststrukturen wurden mit 70% (m/m) Ethanol sterilisiert und vor der Besiedlung über Nacht in sterilem Medium inkubiert, um eventuell toxisch wirkende Monomer- oder Photoiniatorreste zu entfernen.

Die Untersuchungen der Bioverträglichkeit wurden mit primären bovinen Chondrozyten aus einer Rinderknie-Biopsie durchgeführt. Die Teststrukturen wurden mit Chondrozyten besiedelt (1×10^5 Zellen pro cm^2) und in Zellkulturmedium bei 37°C, 5% CO_2 und 80% Luftfeuchtigkeit für 3 bzw. 7 Tage inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS Puffer gewaschen, mit Paraformaldehyd fixiert und mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Dabei wurden das Zytoskelett (zelluläres Aktin) mit AlexaFluor®532-Phalloidin-Konjugat und der Zellkern mit Propidiumjodid gefärbt. Die Analyse erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) bei 488 nm Anregungswellenlänge. Typische Beispiele der fluoreszenzoptischen Analysen sind im Weiteren in Abbildung 9 zusammengefasst. Dargestellt wird jeweils die Besiedlung einer ebenen Fläche (links) und einer Gitterstruktur mit ca. 80 μ m Porengröße (rechts).

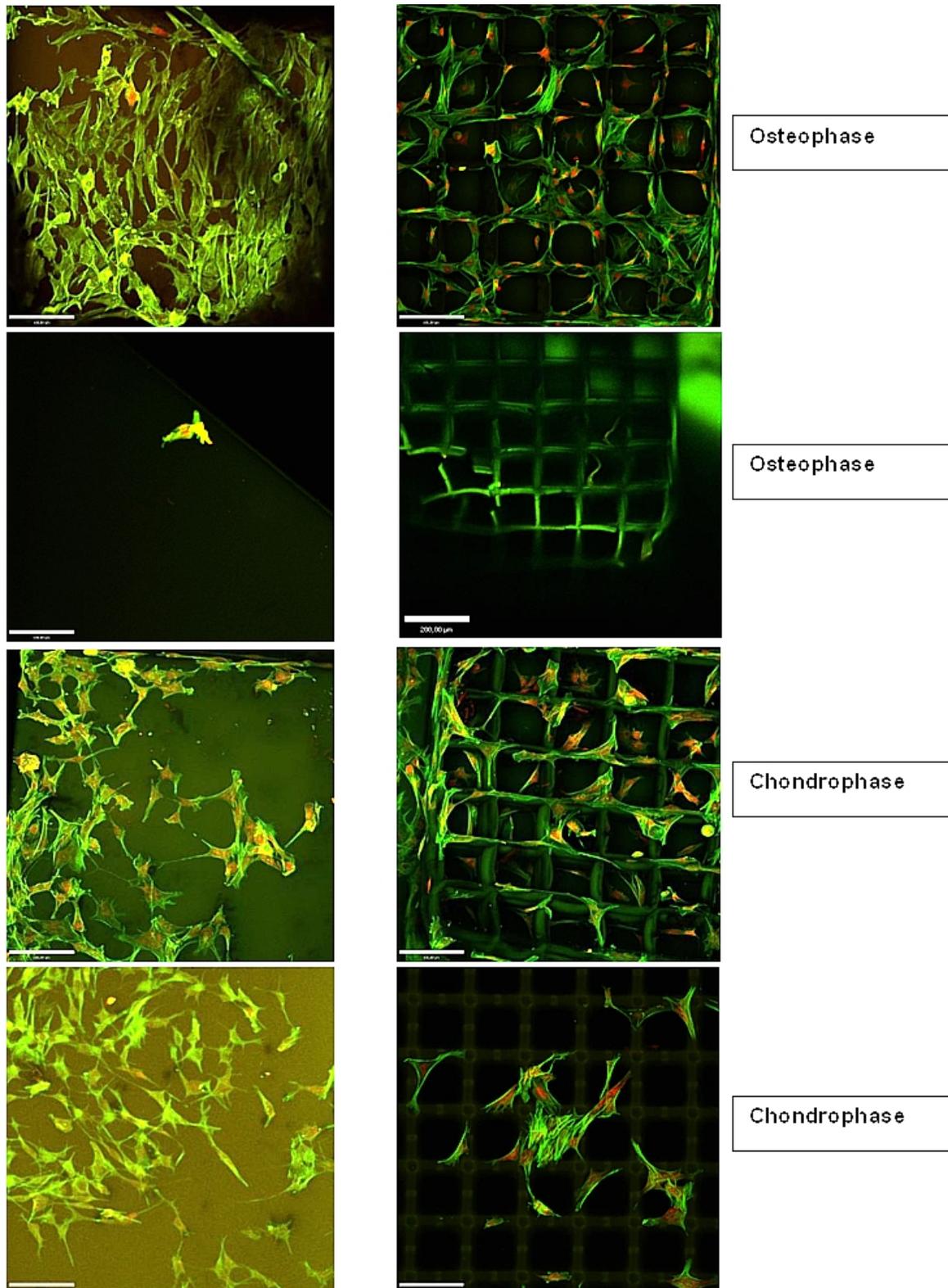


Abb. 9: Primäre bovine Chondrozyten auf 2PP-generierten Trägerstrukturen mit variabler Gitterweite (Fluoreszenzmarkiert: Actin mittels AlexaFluor® 532-Phalloidin [grün], Zellkern mittels Propidiumjodid [rot], CLSM, der Größenbalken entspricht 100 µm, linke Spalte : ebene Fläche, rechte Spalte: ca. 80 µm Poren), oben: Caprolactonurethanmethacrylat (RK1005); 2. Zeile: Polyglyceringlycidylmethacrylat (AB3); 3. Zeile: PEG400-urethandimethacrylat (AB8); unten: PEG-DA/Gelatine (RK936)/DMSO

Die qualitative Auswertung der Biokompatibilitätstests erfolgte mittels CLSM. Ausgehend von der Zellmorphologie der Chondrozyten im direkten Materialkontakt sowie der Zellzahl wurden für die verschiedenen Scaffoldmaterialien unterschiedliche Reaktionen der Zellen detektiert. Während Strukturen aus dem Material Polyglyceringlycidylmethacrylat (AB3) nur sehr dünn besiedelt wurden und die Zellen im Materialkontakt eher eine kugelförmige Morphologie aufweisen, wurde das Caprolactonurethan-methacrylat (RK1005) relativ dicht mit Zellen besiedelt unter Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien, welche auf eine aktive Besiedelung der Oberflächen und eine gute Zelladhäsion mit Ausbildung von Fokalkontakten hindeuten. RK1005 weist somit eine gute Bioverträglichkeit auf.

Für die Chondrophase wurden die Materialien PEG400-urethandimethacrylat (AB8) und PEG-DA/Gelatine (RK936)/DMSO auf ihre Biokompatibilität hin getestet. Bei beiden Materialien wurde an ebenen Flächen eine gute Besiedlung mit Chondrozyten festgestellt, wobei die Zellen unter Ausbildung von Zellfortsätzen adhärten. Bei den Teststrukturen aus AB8 wurden die Gitter mit mittlerer Porengröße (78 μm) von Zellen überspannt, während die kubischen Gitter aus PEG-DA/Gelatine (RK936)/DMSO mit einer vergleichbaren Porengröße von 76 μm nur an der Oberfläche besiedelt wurden. Deshalb wurde beim PEG-DA/Gelatine (RK936)/DMSO die Besiedlung als „mittel“ eingestuft. Das Chondrophasematerial AB8 zeigte in den Zytokompatibilitätstests die typischen Eigenschaften eines Hydrogelmaterials: hohe Bioverträglichkeit im Kontakt mit Zellkulturen bei gleichzeitig verringerter Zelladhäsion an der Hydrogeloberfläche aufgrund des ausgeprägten hydrophilen Charakters. Tabelle 3 bietet eine Übersicht der Bewertung der Biokompatibilität.

Die Porengrößen der 9 Gitterstrukturen der „Setzkästen“ wurden zwischen 0 und 167 μm variiert, um einen Hinweis auf eine Strukturkompatibilität bezüglich dieses Parameters zu erhalten. Eine qualitative Analyse der Zelladhäsion anhand der CLSM-Aufnahmen ergab, dass im Bereich von 167 μm bis 96 μm die Zellen sich tendenziell entweder an den Gitterbalken oder an der Bodenplatte zwischen den Balken adhärten. Gitterweiten über 100 μm ermöglichten es offensichtlich nicht mehr, eine Verankerung und Ausrichtung der Zellen im Raum (3D) zu gewährleisten, so dass quasi eine 2D-Kultivierung vorlag. Im Bereich von 56 bis 78 μm Porengröße wurde festgestellt, dass die Zellen die Poren von der Gitteroberfläche ausgehend überspannten oder sich an der Bodenplatte zwischen den Gitterbalken anlagerten. Ein Aufspannen der Zellen im Raum (3D) war tendenziell zu erkennen. Bei Porengrößen kleiner als 50 μm überwog ein Überspannen der Poren an der Gitteroberfläche, während die Zellen nicht in die Poren inserierten. Hinsichtlich einer Präferenz für Gitterweiten erwies sich folglich der Bereich von 56-78 μm als am besten geeignet, um ein Überspannen der Poren und ein Einwachsen der Zellen in den Raum des Gitters (3D-Kultivierung) zu erreichen.

Tab. 3: Biokompatibilitätstest

Phase	Substrat	Biokompatibilität	Auswahl
Referenz	B33 Glas	sehr gut	
Osteophase	Caprolactonurethanmethacrylat (RK1005)	gut	+
Osteophase	Polyglyceringlycidylmethacrylat (AB3)	gering	-
Chondrophase	PEG400-urethandimethacrylat (AB8)	gut	+
Chondrophase	PEG-DA/Gelatine (RK936)/DMSO	mittel	(-)

1.4 Testung und Bereitstellung bioaktiver Oligopeptide zur Förderung der Zelladhäsion und Zelldifferenzierung (AP5)

2D-Oberflächen bzw. 3D-Scaffolds der Chondrophase aus PEG400-urethandimethacrylat (AB 8) zeigen aufgrund der Hydrogeleigenschaften des Materials eine verringerte Zelladhäsion. Die Hydrogeleigenschaften, die für die Verträglichkeit der Materialien sowie Gewebeanalogie gut geeignet sind, sind jedoch für die initialen Prozesse der Zellbesiedelung im Rahmen der präimplantativen Kultivierung während des Tissue Engineerings nachteilig (vgl. 1.8.1). Mittels RGD-Modifizierung sollte gezeigt werden, dass die Zelladhäsion gezielt gefördert werden kann. Durch die Immobilisierung von Oligopeptiden (RGDs) als Analoga zum ECM-Protein Fibrinogen an der Scaffoldoberfläche kann die Adhäsion von Osteoblasten und Chondrozyten am Scaffold durch Bindung der Integrinrezeptoren der Zellen an die Peptidsequenz gefördert werden. Dafür wurden zwei Verfahren der RGD-Modifizierung eingesetzt: die Michael-Addition sowie der Einsatz eines Diamino-PEG-Linkers für die RGD-Kopplung.

1.4.1 Vortests zur Bindung von RGDC an PEG-Polymere (AP5)

Als Vortest wurde das Oligopeptid RGDC ohne Linker in PEG-Polymere einpolymerisiert bzw. an PEG-Polymere nachträglich gebunden. Diese Bindung kann entweder adhäsiv oder kovalent durch die Addition der Sulfhydrylgruppe an die Acrylatgruppe (Michael-Addition) erfolgen [22]. Dazu wurde 50% (m/m) PEG-DA in DMSO mit 2% (m/m) Irgacure 369 durch Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) polymerisiert. Nach Inkubation mit PBS-Puffer wurden Polymerproben mit Konzentrationen von 0 bis 5 mg/ml RGDC in PBS-Puffer für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert [22] und anschließend mit PBS gewaschen und über Nacht in PBS zur Entfernung nicht gebundener Oligopeptide inkubiert. Alternativ wurde RGDC direkt in das PEG-Polymer mit einpolymerisiert, das Polymer mit PBS gewaschen und 1 h in PBS inkubiert. Der qualitative Nachweis der polymerassoziierten RGDC erfolgte durch Färbung mit 1M Ninhydrin/Ethanol anhand der auftretenden Blaufärbung der Proben nach 30 min Inkubation bei 60°C. Im Falle der einpolymerisierten RGDC's war eine Zunahme der Blaufärbung mit steigender Konzentration der RGDC-Lösung festzustellen, bei nachträglicher Bindung an die verfestigten Polymere trat eine Blaufärbung bei den beiden höchsten Konzentrationen (4 und 5 mg/ml) auf. Diese Blaufärbung gibt einen qualitativen Hinweis auf eine Bindung (adhäsiv oder kovalent) von RGDC an die PEG-Polymere.

1.4.2 Inkubation von Teststrukturen („Setzkästen“) mit RGDC (AP5)

Ausgehend von dem unter 1.4.1 beschriebenen Vortest wurden aus PEG400-urethandimethacrylat (AB8) mittels 2PP hergestellte Teststrukturen („Setzkästen“) mit 5 mg/ml RGDC/PBS über Nacht bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen inkubiert und anschließend mit PBS-Puffer gewaschen. Diese RGDC-behandelten Setzkästen wurden wie unter 1.3.2 beschreiben mit nicht behandelten Teststrukturen aus demselben Material in Kultur genommen. Die Analyse der Zellbesiedelung erfolgte nach der Zellfärbung mittels CLSM (Anregungswellenlänge 488 nm). Ferner wurden nach einer anschließenden Glutaraldehydfixierung der Zellen die bewachsenen Scaffolds in superkritischen CO₂ getrocknet, mit Gold besputtert und einer REM-Analyse (Abb. 11) unterzogen.

Die Analyse der Zellbesiedelung mittels CLSM jeweils dreier Setzkästen mit und ohne RGDC ergab qualitativ eine dichtere Besiedelung der RGDC behandelten Teststrukturen (Abb. 10). Die REM-Analyse bestätigte den positiven Effekt einer Behandlung mit RGDC auf die Zelladhäsion. Ein positiver Einfluss einer RGDC-Modifikation bei 2PP-generierten PEG-Scaffolds auf die Biokompatibilität wurde ebenfalls von Mapili et al. berichtet, wobei allerdings abweichend die

RGDC-Oligopeptide über einen PEG-Acrylat-Linker direkt in die Scaffolds einpolymerisiert wurden [23]. Dieses Verfahren der RGD-Bindung an Oberflächen über einen Diamino-PEG-Linker wurde an Oberflächen von 2PP-3D-mikrostrukturierten Scaffolds aus AB8 erfolgreich getestet (Abb. 12). Der Einsatz eines Diamino-PEG-Linkers weist eine chemisch stabile Bindung der RGD-Peptide an der Scaffoldoberfläche auf und besitzt damit Vorteile für den klinischen Einsatz.

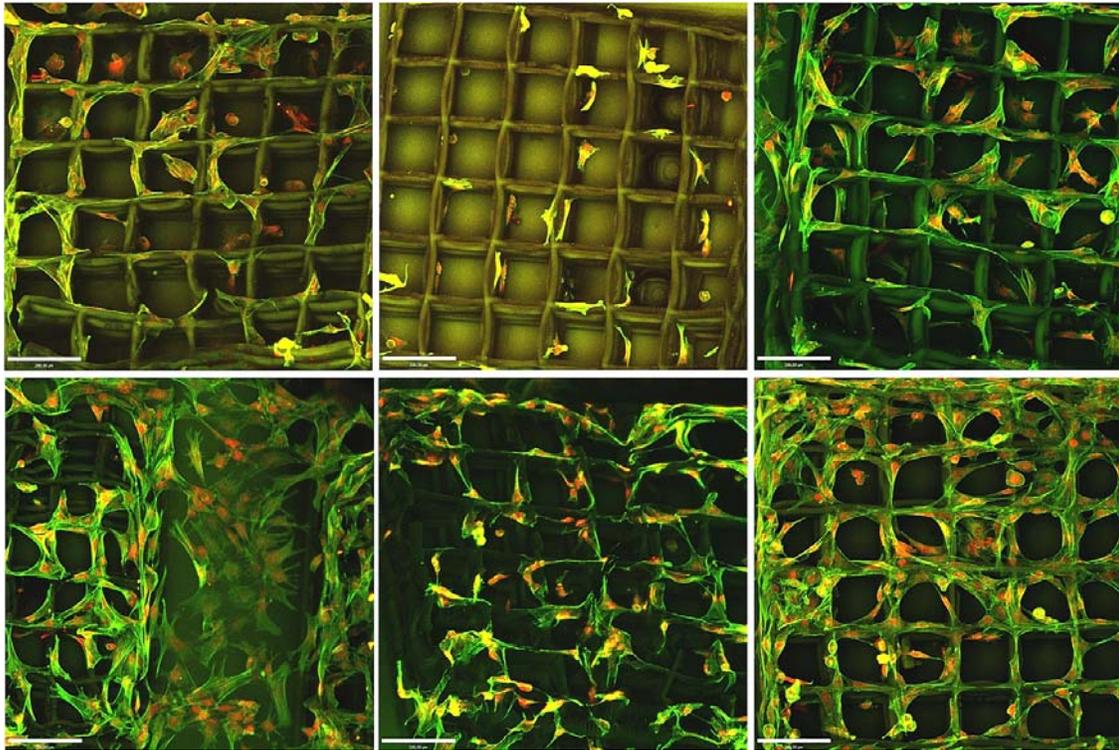


Abb. 10: Qualitativer Vergleich der Chondrozytenbesiedlung von 78 µm Gitterstrukturen ohne und mit RGDC (Michael-Addition, Fluoreszenzmarkierung: Actin mittels AlexaFluor®532-Phalloidin [grün], Zellkern mittels Propidiumjodid [rot], CLSM, der Größenbalken entspricht 100 µm); Material: PEG400-urethandimethacrylat (AB8); obere Reihe: ohne RGDC, untere Reihe: mit RGDC. In der Abbildung unten links wird auf der linken Seite das 78 µm Gitter als Teilstruktur gezeigt.

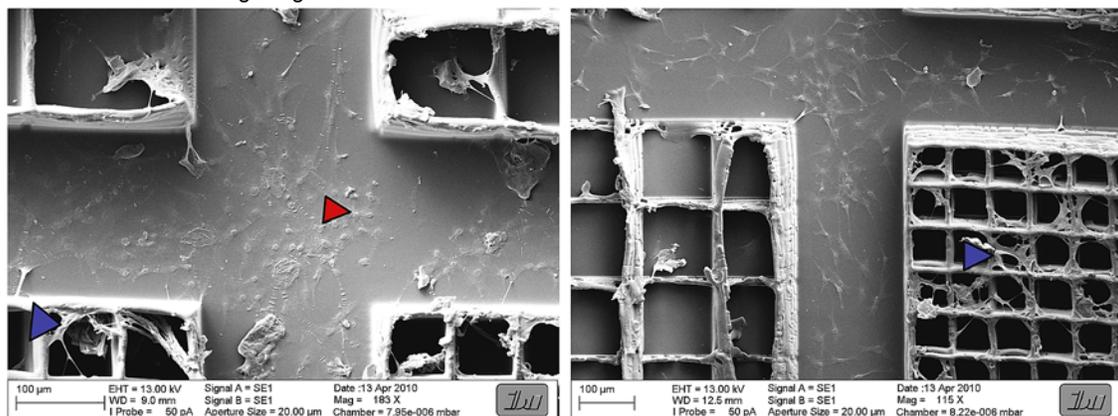


Abb. 11: REM-Aufnahmen der mit Chondrozyten besiedelten „Setz Kästen“ nach 7 tägiger Kultur, Material: PEG400-urethandimethacrylat (AB8); links: ohne RGDC; rechts: mit RGDC, Roter Pfeil: am Boden gespreitete Zellen, Blauer Pfeil: Poren überspannende Zellen.

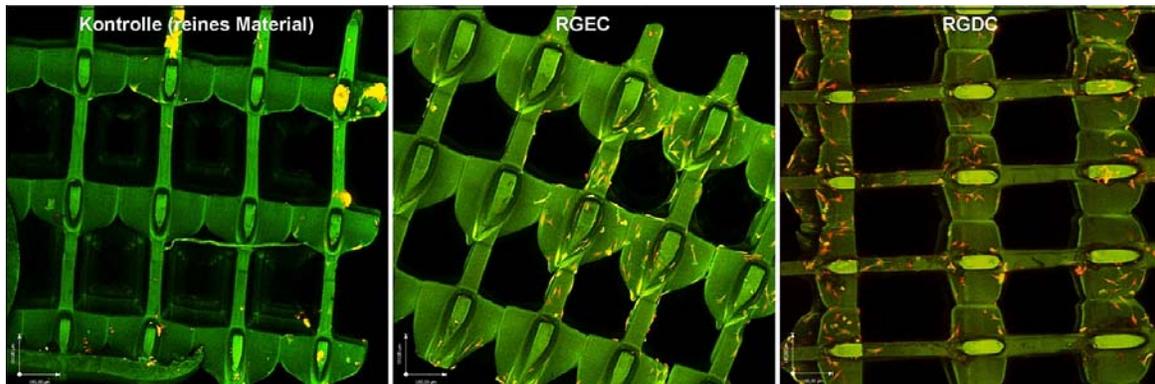


Abb. 12: RGD-Modifizierung von 3D-Scaffoldoberflächen mit primären Chondrozyten: RGD-Anbindung über Diamino-PEG-Linker (Material: PEG400-urethandimethacrylat (AB8), Gitterabstand: 400 μm ; Fluoreszenzmarkierung: Actin mittels AlexaFluor[®]532-Phalloidin [grün], Zellkern mittels Propidiumjodid [rot], CLSM).

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Ankopplung von Adhäsionsmolekülen zwei wesentliche Aspekte von Zellträgerstrukturen erzielt werden können: 2PP-Mikrostrukturierung von Materialien mit ausgeprägtem Hydrogelcharakter und Bereitstellung von zelladhäsionsfördernden Eigenschaften auf Oberflächen mit stark hydrophilem Charakter. Hierfür stehen unterschiedliche chemische Verfahren zur Verfügung. Die Ergebnisse dieser Entwicklungsarbeiten stellen einen weiteren Meilenstein für die Generierung gewebeanaloger Biointerfaces, die im Tissue Engineering eine hohe Bedeutung besitzen, dar.

1.5 Bereitstellung biofunktionaler Leitstrukturen zur Optimierung der zellulären Adhäsion, Migration und Differenzierung (AP4)

Das Arbeitspaket 4 fokussiert auf die Entwicklung von biofunktionalen Leitstrukturen der Scaffolds zur Optimierung der zellulären Adhäsion, Zellmigration und Differenzierung. Neben der Bioverträglichkeit bilden dabei die geometrischen Eigenschaften der dreidimensionalen Scaffolds bezüglich des Porendurchmesser, der Interkonnektivität und der mechanischen Stabilität einen Schwerpunkt. Eine wichtige Zielsetzung ist in diesem Kontext die Untersuchung des positiven Einflusses einer dreidimensionalen Trägerstruktur auf die Zelldifferenzierung gegenüber einer zweidimensionalen Umgebung.

1.5.1 Herstellung von Scaffolds mit einer kubischen 3D-Gitterstruktur (AP4)

Basierend auf den Ergebnissen aus den Biokompatibilitätsversuchen (1.3.2) wurden dreidimensionale Scaffolds mit einer Porengröße von 75 - 80 μm und den Abmessungen von ca. 2 mm x 2 mm x 0,5 mm mittels 2PP hergestellt. Als geometrische Struktur wurde ein kubisches Gitter ausgewählt, welches aus einem „3D-Achsenkreuz“ als Elementarzelle aufgebaut wird, wobei die Elementarzelle in x-, y- und z- Richtung wiederholt geschrieben und so positioniert wird, dass es durch Überlappungen der Kreuzenden zu Bildung eines 3D-Gitters kommt (siehe Abb. 13). Dieser Prozessierungsansatz hat gegenüber dem Aufbau des kubischen Gitters aus einem „Gestell“ als Elementarzelle den Vorteil, dass der Laserstrahl nur die zu polymerisierenden Bereiche (Gitterbalken) abfährt, jedoch nicht die Hohlräume, wodurch eine deutliche Zeitersparnis bei der Scaffold-Herstellung sowie eine höhere Stabilität des Gitters erreicht werden.

Jeweils 6 dieser Scaffolds wurden aus dem Material Caprolactonurethanmethacrylat (RK1005) und PEG400-urethandimethacrylat (AB8) für zellbiologische Testungen zur Besiedelung mit Osteoblasten (Material RK1005) bzw. mit Chondrozyten (Material AB8) hergestellt. Die Analyse

der Gitterstrukturen erfolgte mittels Rasterelektronenmikroskop (REM, Abb. 14) oder mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen. Die REM-Analyse der 2 mm x 2 mm x 0,5 mm Scaffolds aus PEG400-urethandimethacrylat (AB8) und Caprolacton-urethanmethacrylat (RK1005) ergab eine sehr gute Übereinstimmung der Porengröße, der Balkenbreite und der Gesamtabmessung des Scaffolds in der x-y-Ebene mit den durch den STL-File vorgegebenen Parametern. Deutliche Abweichungen hingegen traten in der z-Richtung hinsichtlich der Höhe des Scaffolds (ca. 700 μm statt vorgegebener 500 μm), der Balkenbreite und der Porengröße im Vergleich zum STL-File auf. Diese kann unter anderem darauf zurückgeführt werden, dass im Fokuspunkt kein kugelförmiger sondern ein sphäroider Voxel mit z-Ausdehnung polymerisiert wird, so dass es zu einer Zunahme der Balkenbreite und der Gitterhöhe in z-Richtung kommt. Abweichungen in der Porengröße resultieren zum Teil daraus, dass eine neue Lage gegenüber der darunter liegenden in der x-y-Ebene verschoben ist, so dass die Kreuzenden der neuen Lage in z-Richtung nicht auf die der darunter liegenden treffen. Folglich kommt es zu einem „Absacken“ der neuen Lage. Ein weiterer Grund ist eine Verlängerung des Voxels mit zunehmender Höhe der Gitterstruktur, wenn beim Arbeiten im Auflichtverfahren der Fokuspunkt aus den Photoresisten nach oben herausgefahren wird (Änderung der optischen Eigenschaften des durchstrahlten Systems Luftweg-Photoresisten in z-Richtung).

Sätze von jeweils 6 Scaffolds aus dem Material Caprolacton-urethanmethacrylat (RK1005) und PEG400-urethandimethacrylat (AB8) wurden dem Projektpartner co.don[®] AG für zellbiologische Testungen zur Besiedelung mit Osteoblasten (Material RK1005) bzw. mit Chondrozyten (Material AB8) zu Verfügung gestellt. Diese Übergabe an Scaffolds erfolgte gemäß dem im Gesamtverbundantrag aufgeführten Arbeitskomplex 2 (Bereitstellung von Templates für zellbiologische Testungen und Scaffoldentwicklung) zum Milestone (Midterm-Meeting) und erfüllt damit die Anforderungen des Meilenstein 4 des Gesamtverbundantrags.

1.5.2 Herstellung von Scaffolds für die Besiedelung mit Chondrozyten-Sphäroiden (AP4)

Mit der unter 1.5.1. beschriebenen Methode wurden 8 kubische Gitterstrukturen als Scaffolds zur Besiedelung mit Chondrozyten-Sphäroiden beim Projektpartner co.don[®] AG hergestellt. Als Elementarzelle wurde ein 3D-Achsenkreuz mit einer Seitenlänge von 400 μm und einer Balkenbreite von 40 μm ausgewählt. Bei einer Überlappung der Balkenenden von 6 μm ergab sich eine theoretische Porengröße von 354 μm . Es wurden Teststrukturen basierend auf einem 6 x 6 x 3 Array an Elementarzellen aus dem Material PEG400-urethandimethacrylat (AB8) hergestellt, woraus theoretische Abmessungen von ca. 2 mm (Länge) x 2 mm (Breite) x 1,2 mm (Höhe) erwartet wurden. Die REM-Analyse ergab, dass der Abstand zwischen zwei Balken

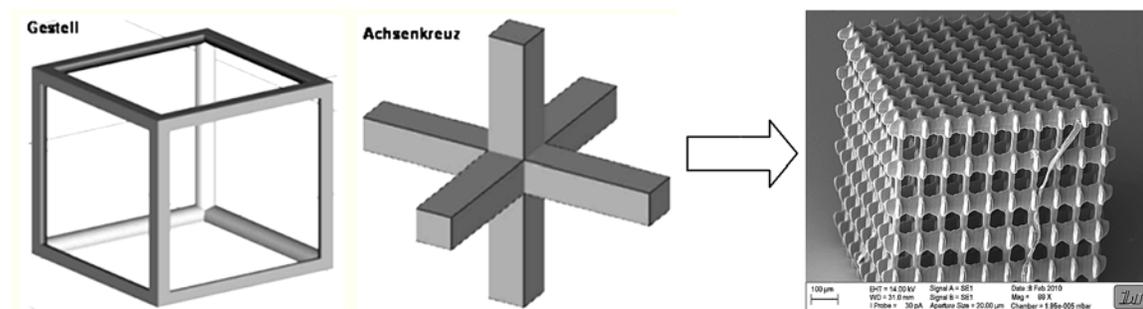


Abb. 13: Elementarzellen zur Herstellung von 3D-kubischer Gitter Links: Gestell, Mitte: 3D-Achsenkreuz, Rechts: REM-Aufnahme eines kubischen Gitters basierend auf dem Achsenkreuz als Elementarzelle (Material: PEG400-urethandimethacrylat AB8).

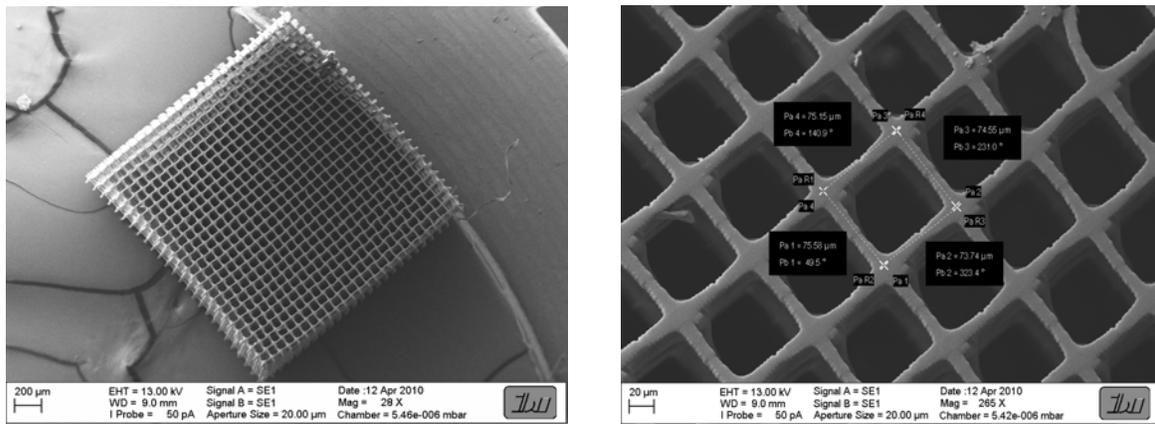


Abb. 14: Links: REM-Aufnahme der x,y-Ebene des 2 mm x 2 mm x 0,5 mm Scaffolds aus PEG400-urethan-methacrylat (AB8), Rechts: Porenvermessung.

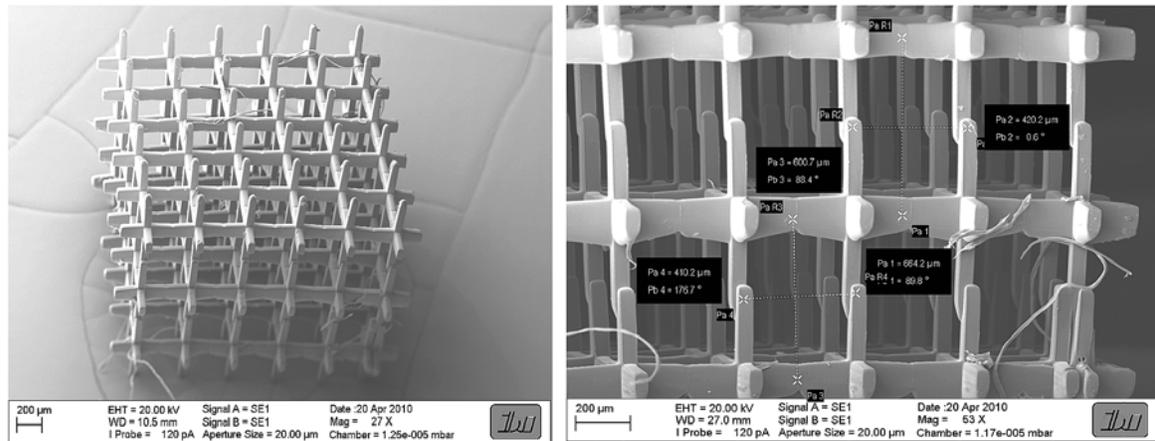


Abb. 15: REM-Analyse der Scaffolds für Chondrozyten-Sphäroide. Links: Gesamtansicht des Scaffolds; Rechts: Porenvermessung.

in x-y-Richtung ca. 415 µm betrug und somit eine gute Übereinstimmung der Teststrukturen mit den vorgegebenen Parametern in x-y-Richtung bestand. Jedoch war mit ca. 1,9 mm Höhe eine deutliche Abweichung in z-Richtung festzustellen, deren Ursachen bereits unter 1.5.1 diskutiert wurden. Abbildung 15 zeigt die REM-Analyse eines Scaffolds. Der Versatz der Achsenkreuzlagen bei der Verbindung der Balken in z-Richtung (siehe Abb. 15 Rechts) ist auf die Steuersoftware zurückzuführen.

1.6 Degradationskinetik der Scaffoldmaterialien unter simulierten klinischen Bedingungen in Kombination mit der Freisetzung von bioaktiven Molekülen von der Scaffoldoberfläche (AP6)

Im Arbeitspaket 6 waren Untersuchungen zur Degradationskinetik unter simulierten klinischen Bedingungen in Kombination mit der Freisetzung bioaktiver Komponenten von den Scaffolds für die Osteophase vorgesehen. Da Degradationsuntersuchungen des Osteophasenmaterials RK1005 in „simulated body fluid (SBF)“ beim Projektpartner INNOVENT e.V. durchgeführt wurden, war bekannt, dass das Material RK1005 mit einer langsamen Degradationskinetik (unter 10% Massenabnahme in 4 Monaten bei 37°C in Abwesenheit von Zellen) abgebaut wird. Infolgedessen wurden am iba Untersuchungen zur Freisetzung von bioaktiven Molekülen vom Scaffold, deren Aufnahme in die Zellen sowie die Zellantwort in den Fokus gerückt. Als Modellsystem wurde die Transfektion der Osteoblasten-Sarcoma-Zelllinie SAOS-2 mittels von

der Scaffoldoberfläche immobilisierten, Plasmid-DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln ausgewählt. Als Plasmid-DNA wurde das Plasmid pcDNA3-EGFP (Fa. Addgene, Cambridge, MA) gewählt, welches für das „Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)“ codiert und nach Transfektion der Zellen und erfolgreicher Genexpression eine Grünfärbung der Zellen bei Fluoreszenzanregung bewirkt. Die negativ geladene Plasmid-DNA bindet über ionische Wechselwirkungen an die mit einem kationischen Polymer beschichteten CaP-Nanopartikel. Die einschaligen, kationischen Ca-P Nanopartikel und das Plasmid pcDNA3-EGFP werden von der Arbeitsgruppe Prof. Epple, Universität Duisburg-Essen (im Unterauftrag des Projektpartners aap) zur Verfügung gestellt. Die Immobilisierung der Plasmid beladenen CaP-NP an der Scaffoldoberfläche erfolgte durch den Einbau der Nanopartikel in einen Polyelektrolyt-Multilayer auf der Oberfläche der mittels 2PP hergestellten Scaffolds (siehe AP2, Coating mit PEM-Schichten). Die Polyelektrolyt-Multilayer aus mehreren Lagen an Poly-L-Lysin (Polykation) und Poly-L-Glutamat (Anion)-Doppelschichten sind biokompatibel und durch extrazelluläre Proteasen der Zellen abbaubar, so dass sie sich zur Freisetzung der CaP-NP eignen. Die Transfektion der Zellen erfolgte durch Aufnahme der Plasmid beladenen CaP-NP in die Zellen über Endocytose [24]. Das Auftreten von grün-fluoreszierenden Zellen am Scaffold ist damit ein Indikator, dass die Zellen Plasmid-DNA beladene CaP-Nanopartikel von der Scaffoldoberfläche aufnehmen und dass eine funktionale Genexpression in den Zellen stattfindet. Das Prinzip der Transfektion mittels plasmidbeladener CaP-NP, welche auf der Scaffoldoberfläche immobilisiert werden, kann auch auf weitere Plasmide, die z.B. Gene für die Expression von Wachstumsfaktoren enthalten, ausgeweitet werden. Auf diese Weise können Gene in die Zellen eingebracht werden, deren codierte Proteine direkt die Zelldifferenzierung beeinflussen.

1.6.1 Transformation von *E. coli* mit pcDNA3-EGFP und Präparation des Plasmids (AP6)

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden zunächst superkompetente *E. coli*-DH5 α mit dem im TE-Puffer vorliegenden Plasmid pcDNA3-EGFP gemäß des Standardprotokolls New England Biolabs, Brunswick, transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf Luria Bertani (LB)-Agar mit 100 μ g/ml Ampicillin entsprechend der Plasmid codierten Antibiotikaresistenz selektiert (Inkubation bei 37°C, 24 h). Einzelne Kolonien wurden in LB-Medium angezogen und in einer Kryokultur mit Glycerin bei -80°C zur Konservierung eingefroren. Zur Präparation von Plasmid-DNA erfolgte die Anzucht in LB Medium bei 37°C über Nacht. Die Plasmidpräparation wurde entsprechend der Anleitung mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit und dem EndoFreePlasmid Maxi Kit von Qiagen, Hilden, durchgeführt. Die DNA-Sequenzierung (Seqlab, Göttingen) des Plasmidinserts bestätigte die DNA-Sequenz des EGFP codierenden Gens.

1.6.2 Transfektion mit Plasmid beladenen kationischen CaP-Nanopartikeln (AP6)

Zunächst wurde die Transfektion von Zellen der Osteoblasten-Sarcomazelllinie SAOS-2 untersucht, wobei die Plasmid beladenen, kationischen CaP-NP im Zellmedium suspendiert wurden. Zielsetzung ist es zu testen, ob diese Zelllinie mit den kationischen CaP-NP als Plasmidcarrier transfiziert werden kann. Es wurden in den Transfektionsversuchen die SAOS-2-Zellen zunächst für 7 Tage in McCoy's Medium mit 15% (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum), Antibiotikum und 5% CO₂ bei 37°C kultiviert, konfluente Zellen wurden durch Trypsinierung vom Kulturgefäß abgelöst und in einer 24er-Well-Platte vorgelegt. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit Plasmid-beladenen CaP-NP, wobei die Zellen für 6 h mit im antibiotikafreiem Medium suspendierten EGFP/CaP-NP inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen mit frischem Zellkulturmedium mit FBS und Antibiotikum für weiter 48 h unter den genannten

Bedingungen kultiviert. Der Erfolg der Transfektion wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Zur Etablierung der Transfektionsbedingungen wurden folgende Parameter variiert:

- Verwendung von Medium mit und ohne FBS während der Transfektionsphase
- Variation der vorgelegten Zellzahl
- Variation der zu der CaP-NP-Suspension zugegebenen Plasmidmenge
- Variation der in der Transfektion eingesetzten Konzentration an EGFP/CaP-NP

Als Positivkontrolle wurde die Transfektion der SAOS-2-Zellen mit dem Transfektionsreagenz „Attractene“ der Fa. Qiagen, Hilden, mit der gleichen Plasmid-DNA entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden Versuche mit a) nur Plasmid-Zugabe und b) Zugabe von kationischen CaP-NP ohne Plasmid parallel durchgeführt. Das beste Transfektionsergebnis mit den Plasmid beladenen kationischen CaP-NP wurde bei einer Zellzahl von 40.000/ml, mit FBS haltigem Medium während der Transfektionsphase und einer Plasmid-Konzentration von 6,2 µg Plasmid pro ml Mischung aus CaP-NP-Suspension + Medium erhalten. Die Endkonzentration an CaP-NP in der Transfektionsmischung betrug 0,03 mg/ml. In den Negativkontrollen konnte keine Transfektion festgestellt werden. Die Positivkontrolle mit Attractene als Plasmidcarrier mit FBS-freiem Medium zeigte die zu erwartende gute Transfektionseffizienz. Im Fazit der Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die CaP-NP mit entsprechender DNA-Beladung als Transfektionsvektoren geeignet sind.

Die Studien zur Transfektion von Osteoblasten im direkten Kontakt mit 2PP-generierten Oberflächen wurden im Rahmen einer Praktikumsarbeit durchgeführt. Die EGFP-beladenen einschaligen CaP-NP wurden mittels PEM-Beschichtung auf der Oberfläche der Osteophasse (ϵ -Caprolacton-urethanmethacrylat [RK1005]) immobilisiert (vgl. auch AP2). Folgende Oberflächenvarianten wurden getestet:

- RK1005 mit [(PLL-PGA)₂-PLL-(CaP-NP-DNA)-]₃-PLL-CS-PLL-(CaP-NP-DNA)
- RK1005 mit [(PLL-PGA)₂-PLL-DNA]₃-PLL-CS-PLL-DNA
- RK1005 mit (PLL-PGA)₉-PLL-CS-PLL

Die Transfektion der SAOS-2-Osteoblasten wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (CLSM) nach maximal 3 Tage Kultivierung getestet. Für den Nachweis EGFP-transfizierter Zellen wurde eine simultane Mehrfachfluoreszenzfärbung eingesetzt: Zellgegenfärbung_1 mit Hoechst 33258 mit simultaner Detektion EGFP-exprimierender Zellen sowie anschließender Zellgegenfärbung_2 mit Propidiumjodid.

In Abbildung 16 ist ein Überblick über die wesentlichsten Ergebnisse aufgeführt. Die Positivkontrolle (Transfektion mit Qiagen Attractene) zeigt eine erfolgreiche Zelltransfektion (Transfektionseffizienz ca. 20%). Mit CaP-NP-DNA in Suspension wurden ebenfalls Zellen transfiziert, wobei jedoch die Transfektionseffizienz deutlich geringer ist (ca. 1-3%). Dieser geringen Transfektionseffizienz mit CaP-NP-DNA stehen Daten der AG Epple entgegen, die mit Hilfe von CaP-NP eine höhere Transfektionseffizienz beschrieben haben [24]. Allerdings wurden diese Daten mit mehrschaligen CaP-NP erzielt, die eine höhere DNA-Menge beinhalten. Die von der AG Epple (Unterauftragnehmer von aap Biomaterials GmbH) für die hier vorliegenden Untersuchungen zur Verfügung gestellten Nanopartikel waren dagegen nur einschalig, was die geringere Transfektionseffizienz erklärt. Zellen auf reinem RK1005 in Kultur mit freiem EGFP-Plasmid (= ohne Transfektionsvektor) zeigten erwartungsgemäß keine

Transfektion. Der Ansatz mit DNA-beladenen (einschaligen) CaP-NPs, die mittels PEM auf der RK1005-Oberfläche immobilisiert wurden, zeigte verglichen mit dem Kontrollansatz eine sehr geringe Transfektionseffizienz. Mit Hilfe einer spektralen CLSM-Analyse mit anschließendem „spectral unmixing“ konnte jedoch die prinzipielle Eignung oberflächengebundener CaP-NP-DNA für die Zelltransfektion nachgewiesen werden (Abb. 16 unten, Mitte: grau: RK1005, rot: Osteoblasten, grün: EGFP-transfizierte Osteoblasten).

Im Kontext mit den Daten aus 1.2. zeigen diese Ergebnisse, dass mit Hilfe der PEM-Modifizierung CaP-NP stabil an der Scaffoldoberfläche immobilisiert werden können. Mit steigender PEM-Filmdicke (Anzahl der Doppellagen) ist die Menge an CaP-NP an der Oberfläche und somit auch die Menge an oberflächenassoziiierter DNA steuerbar (siehe auch 1.2.1.3). Die Transfektion von Zellen bei Kontakt mit den Scaffoldoberflächen ist prinzipiell möglich, jedoch abhängig von der Bioverfügbarkeit der CaP-NP-DNA. Durch die PEM-Oberflächenmodifizierung werden die CaP-NP offensichtlich sehr stabil an der Scaffoldoberfläche immobilisiert. Erst wenn die CaP-NP freigesetzt werden, was z.B. durch den zellulären/proteolytischen Abbau der PEM-Schichten erfolgen kann, können sie von den Zellen über den Transmembrantransport aufgenommen werden und stehen für die transiente bzw. stabile Transfektion zur Verfügung. Die Daten lassen den Schluss zu, dass die Freisetzung der CaP-NP-DNA offenbar verzögert stattfindet.

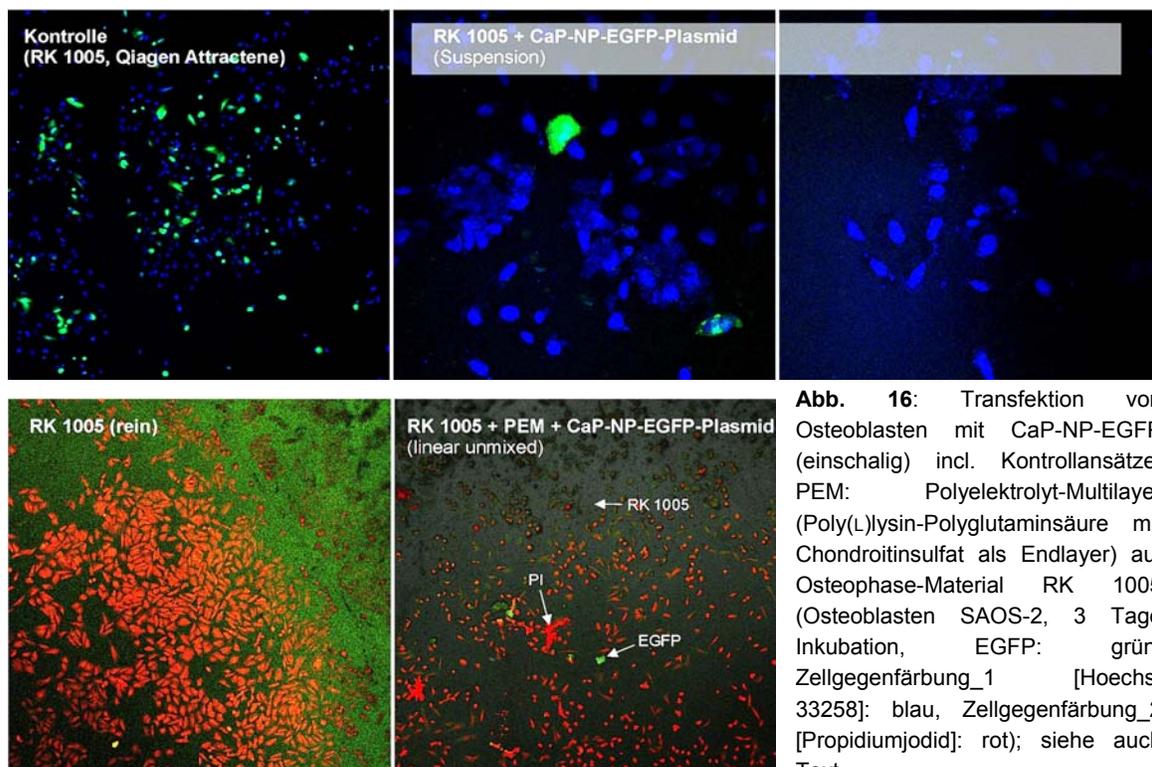


Abb. 16: Transfektion von Osteoblasten mit CaP-NP-EGFP (einschalig) incl. Kontrollansätze. PEM: Polyelektrolyt-Multilayer (Poly(L)ysin-Polyglutaminsäure mit Chondroitinsulfat als Endlayer) auf Osteophase-Material RK 1005 (Osteoblasten SAOS-2, 3 Tage Inkubation, EGFP: grün, Zellgegenfärbung_1 [Hoechst 33258]: blau, Zellgegenfärbung_2 [Propidiumjodid]: rot); siehe auch Text.

1.7 *In vitro*-Stimulation der Zelldifferenzierung autologer Zellen des skeletalen Systems mittels zyklischer mechanischer/hydrostatischer Krafteinleitung (AP8)

Biomaterialkonstrukte zur Therapie von Knorpel-Knochendefekten unterliegen im Körper naturgemäß einer erheblichen mechanischen Belastung. Die Anforderungen an die mechanische Stabilität von 3D-Konstrukten, die sowohl durch die Materialkennwerte, die 3D-Systemparameter wie auch Gewebeeigenschaften bestimmt und beeinflusst werden, sind dementsprechend sehr hoch. Die labortechnische Analyse der Material- und Strukturkennwerte der in diesem Forschungsvorhaben entwickelten mikrostrukturierten 3D-Trägerstrukturen erforderte ein entsprechend geeignetes Messsystem. Das biodynamische Testsystem ElectroForce® 5200 Biodynamic der Firma Bose (ElectroForce Systems Group) bietet durch Integration von Linearmotoren einerseits die Möglichkeit der Dynamisch-Mechanischen Analyse (DMA) zur Bestimmung komplexer E-Moduli und Systemsteifigkeiten sowie andererseits eine zyklische mechanische Stimulation natürlicher wie auch artifizierender Gewebe und zellbeladener 3D-Scaffoldkonstrukte in einem Größenbereich im oberen Mikrometer- bis unteren Zentimetermaßstab (Abb. 17). Auch wenn konstruktsspezifische mechanische Belastungszyklen zur gezielten Zellstimulation im Rahmen dieses Forschungsvorhabens noch nicht durchgeführt werden konnten, stellen die umfangreichen Materialcharakterisierungen einschließlich biomechanischer Analysen der 3D-Scaffoldstrukturen grundlegende Daten hinsichtlich eines gezielten klinischen Einsatzes biphasischer Knorpel-Knochenkonstrukte bereit.

Für die Materialien PEG400-urethandimethacrylat (AB8, Chondrophase) und ϵ -Caprolacton-urethanmethacrylat (RK1005, Osteophase) wurden folgende Materialparameter bestimmt:

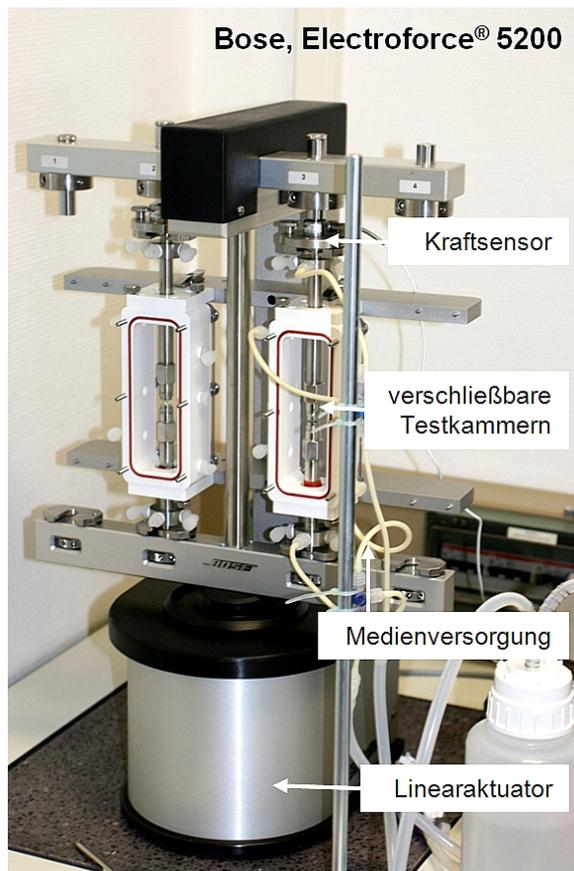


Abb. 17: BOSE ElectroForce® 5200 Biodynamic Test Instrument.

- Gleichgewichtsquellungsgrad
- Elastizitätsmodul
- Systemsteifigkeit von 3D-Scaffolds

Zusätzlich wurden durch die Untersuchung des Relaxations- und Kriechverhaltens der verwendeten Polymere Grundlagen zur Erstellung eines Stoffgesetzes erarbeitet, welches zukünftig für den Entwurf zellspezifischer Designer-Scaffolds herangezogen werden kann.

Die detaillierte Darstellung der Methodik der biomechanischen Charakterisierung ist in einer Diplomarbeit, die im Rahmen dieses Forschungsprojektes entstand, aufgeführt (bibliografische Angaben siehe Punkt 6.).

Die Bestimmung des Quellungsverhaltens der Polymere dient der Charakterisierung und Einteilung für den zukünftigen Einsatz. Dabei gilt: Das Wasserbindevermögen eines Polymeres lässt sich problemlos mit der Steifigkeit des Materials korrelieren. Das Osteophasematerial RK1005 weist kaum eine Quellung auf, was mit den typischen Eigenschaften der mineralisierten

Knochensubstanz korreliert. Das Chondrophasematerial AB8 wiederum weist ein starkes Quellungsverhalten auf und entspricht damit den Eigenschaften der Knorpelmatrix. Eine Verringerung der PEG-Polymerkonzentration geht hierbei mit einer Steigerung der Wasseraufnahmekapazität einher. Dieser Anstieg verläuft etwa linear, wobei eine Halbierung der Konzentration zu einer Erhöhung des Quellungsgrades in Wasser um etwa 20% führt.

Die E-Moduln PEG-basierter Vollkörper bestätigten die Abhängigkeit des Quellungsverhaltens von der Polymerkonzentration. Der E-Modul eines 2D-Vollkörpers aus PEG geringer Konzentration ist sehr gering, verglichen mit jenen aus reinem PEG und weist somit eine geringe Steifigkeit auf.

Die für das 3D-Chondrophasekonstrukt aus AB8 bestimmte Systemsteifigkeit liegt bei ca. 0,68 MPa, was der Steifigkeit eines natürlichen Gelenkknorpels entspricht (0,24 – 0,85 MPa [25]). Die 2PP-generierte Chondrophase wies somit auch aus biomechanischen Gründen hervorragende Eigenschaften als Chondrozyten-Trägerstruktur der biphasischen Konstrukte auf, die für den *in vivo*-Tierversuch vorgesehen waren (Abb. 18). Das 3D-Osteophase-Konstrukt aus RK1005 konnte ebenfalls die im Knochengewebe vorherrschenden Systemsteifigkeiten erreichen und weist Werte auf, die denen eines natürlichen Osteoids entsprechen.

Die Ergebnisse der biomechanischen Charakterisierung zeigen, dass sich die Materialparameter für 3D-Scaffolds sowohl durch die Wahl des Polymers für die 2PP wie auch durch die geometrische Architektur eines mittels 2PP-Technik zu generierenden 3D-Scaffolds an die Gewebeeigenschaften des vorgesehenen Implantationsortes anpassen lassen. Die für die untersuchten Polymere ermittelten Stoffgesetze ermöglichen darüber hinaus, mittels Computersimulation Systemsteifigkeiten eines 3D-Scaffolds durch Approximation von Höhe, Breite und Form einer 2PP-Einheitszelle an die im Zielgewebe herrschenden mechanischen Erfordernisse anzupassen und ersparen somit das "learning-by-doing"-Prinzip bei der gezielten Scaffold-Entwicklung.

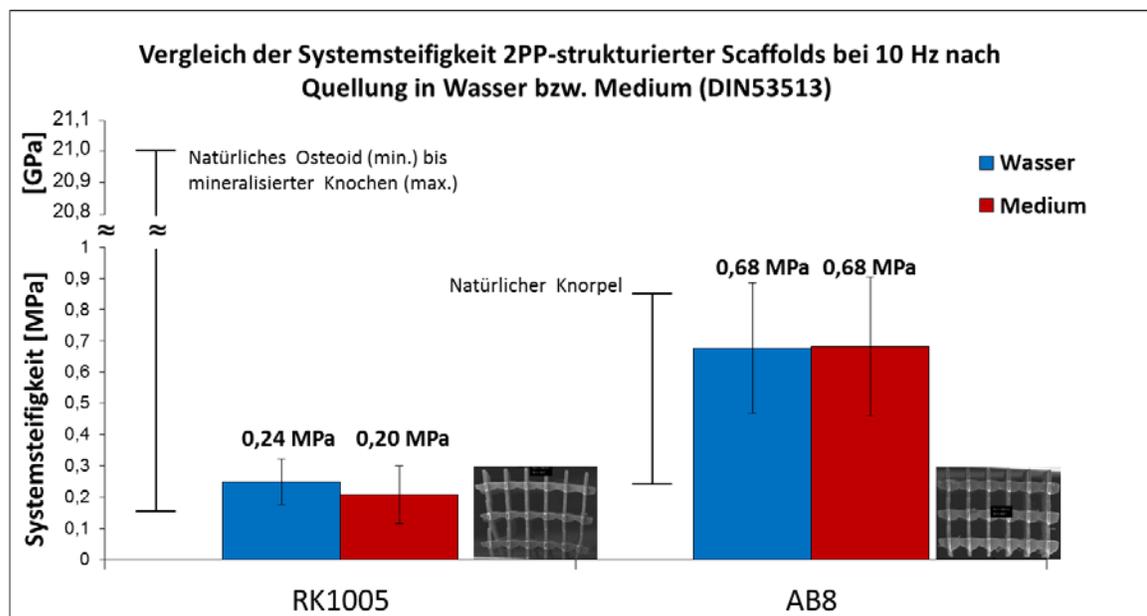


Abb. 18: Dynamisch-mechanische Analyse an 3D-Scaffolds (PEG400-UDMA = AB8; Caprolacton-UMA = RK1005). Die Scaffolds für die Osteophase (RK1005) besitzen durch die filigranere Scaffoldarchitektur die Systemsteifigkeit eines natürlichen Osteoids. Die Scaffolds für die Chondrophase (AB8) erreichen Systemsteifigkeiten, die denen von hyalinem Knorpel entsprechen.

1.8 Analyse zelldifferenzierender Effekte 3D-mikrostrukturierter bioaktiver Oberflächen (AP9)

1.8.1 *In vitro*-Zelldifferenzierungsstudie mit ovinen Zellen des skeletalen Systems (AP9)

Es wurden wie unter 1.5.1 beschrieben 45 Scaffolds der Abmessungen ca. 2 mm x 2mm x 0,5 mm mit einer Porengröße von ca. 70 µm und einer Stegbreite von 10 µm aus dem Material AB8 mit 2% (m/m) Irgacure 369 (Ciba) als Photoinitiator mittels 2PP hergestellt. Aus demselben Material wurden 45 Pellets mit 1,4 mm Durchmesser und ca. 0,5 mm Höhe aus demselben Material als 2D-Kontrollen zur Anwendung in 24 er Well-Platten mit UV-Licht polymerisiert. Die Scaffolds und die Pellets wurden in 70% (v/v) EtOH zur Entfernung von toxischen Komponenten (Photoinitiator, Monomerreste) und zur Sterilisation aufbewahrt. Die Inokulation und *in vitro*-Kultivierung der Materialien mit ovinen skelettalen Zellen sowie die zellbiologische Analytik erfolgte durch das Translationszentrum für Regenerative Medizin (TRM) der Universität Leipzig.

Die Ergebnisse dieser Studien belegen sowohl die gute Bioverträglichkeit der 3D-Konstrukte (Lebend-/Tod-Färbungen mit Calcein AM und Ethidiumhomodimer) wie auch den ausgesprochen starken Hydrogelcharakter sowohl der 2D-Kontrollen wie auch der 3D-Scaffolds. Die Zellträgerstrukturen besitzen somit dem Knorpelgewebe ähnliche Hydrogeleigenschaften. Die Zellen (ovine artikuläre Chondrozyten) wiesen in der frühen Phase der Kultivierung auf den Materialien ein Adhäsionsverhalten auf, dass typisch für hydrophile Materialoberflächen ist. Die Zellen zeigten eine sehr geringe Affinität zum Oberflächenmaterial. In diesem Zusammenhang wird auf die Ergebnisse zur Oberflächenmodifizierung (siehe Punkte 1.4 und 1.6 dieses Berichtes) verwiesen, die je nach geforderter Interaktion von Zellen und Oberfläche eine Optimierung/Steuerung der initialen Zelladhäsion ermöglichen können.

Während der Kultivierung auf den 2D-Oberflächen wurde dagegen die Bildung von chondrosphärenartigen Zellaggregaten beobachtet. Dies erschwert zwar eine homogene Besiedelung in 3D-Konstrukten, bestätigt jedoch die gute Bioverträglichkeit der Oberflächen und lässt vermuten, dass Zelldifferenzierungsprozesse im Zuge der Kultivierung denen in 3D-Zellsphäroiden ähneln. Die Methode der Sphäroidkultivierung entspricht der von der co.don AG verfolgten Strategie zur Generierung implantierfähiger Knorpelersatzgewebe. Eine Kultivierung von Chondrozytensphäroiden im dreidimensionalen Maßstab würde hierbei eine neue Stufe des Tissue Engineering-Verfahrens darstellen. Voraussetzung hierfür ist die Bereitstellung ausreichend großer Dimensionen eines 3D-Hydrogelkonstruktes. In den vorliegenden Arbeiten wurde dies durch die Generierung von Gitterstrukturen mit Gitterweiten von 400 µm teilweise bereits berücksichtigt. Die präimplantative Differenzierung der sphäroidähnlichen Zellaggregate durch histologische Studien und Genexpressionsanalytik konnte innerhalb eines 10-tägigen Kultivationszeitraumes noch nicht direkt bestätigt werden, da die hierfür benötigte Quantität an Zellen/Zellaggregaten nicht erreicht werden konnte. Das Potential der scaffoldimmobilisierten Zellpopulationen zur Ausbildung knorpelanaloger Ersatzgewebe in Defekten konnte jedoch durch die *in vivo*-Tierstudien eindrucksvoll belegt werden (siehe Abschlussbericht aap Biomaterials GmbH).

1.8.2 Herstellung von Scaffolds (Chondrophase) für biphasische Implantate (AP9)

1.8.2.1 Herstellung von Scaffolds (Chondrophase) für Klebeversuche zur Verbindung mit der Osteophase (AP9)

Mit der unter 1.5.2 beschriebenen Methode wurden kubische Gitterstrukturen als Scaffolds (Chondrophase) für Klebeversuche zur Verbindung mit der von aap Biomaterials hergestellten, auf einer Komposition von Hydroxylapatit und Kollagen I basierenden Osteophase hergestellt. Zur Herstellung der Scaffolds mittels 2PP wurde das Material PEG400-urethandimethacrylat (AB8) eingesetzt. Als Elementarzelle wurde ein 3D-Achsenkreuz mit einer Seitenlänge von 400 μm und einer Balkenbreite von 60 μm ausgewählt, da sich eine Balkenbreite von 40 μm bei der geforderten Größe der Klebestrukturen von 4,5 mm x 4,5 mm und 3 Lagen als instabil (Strangbrüche) erwies. Es wurden zunächst Teststrukturen mit den gleichen Parametern (400 μm Balkenlänge, 60 μm Balkenbreite, 3-lagig, Wellenlänge 770 nm) aber kürzerer Seitenlänge (2 mm) als die Strukturen für die Klebeversuche geschrieben, wobei die Überlappung der Balkenenden 6 μm betrug. Daraus ergab sich eine theoretische Porengröße von 334 μm . Die REM-Analyse dieser Teststrukturen ergab mit ca. 407 μm Porengröße eine recht gute Übereinstimmung mit den vorgegebenen Parametern in x, y-Richtung, jedoch mit ca. 1,9 mm Höhe eine deutliche Abweichung in z-Richtung, deren Ursachen bereits unter 1.5.1 diskutiert wurden.

Für die Klebeversuche wurden 4 quadratische Scaffolds basierend auf einem 12 x 12 x 3 Array an Elementarzellen (400 μm Balkenlänge, 60 μm Balkenbreite) aus dem Material AB8 hergestellt (Abb. 19). Diese Chondrophasen-Scaffolds wurden dem Projektpartner INNOVENT e.V. für Versuche zur Verklebung zum biphasischen Implantat mit der genannten Osteophase aus Hydroxylapatit/ Kollagen zur Verfügung gestellt.

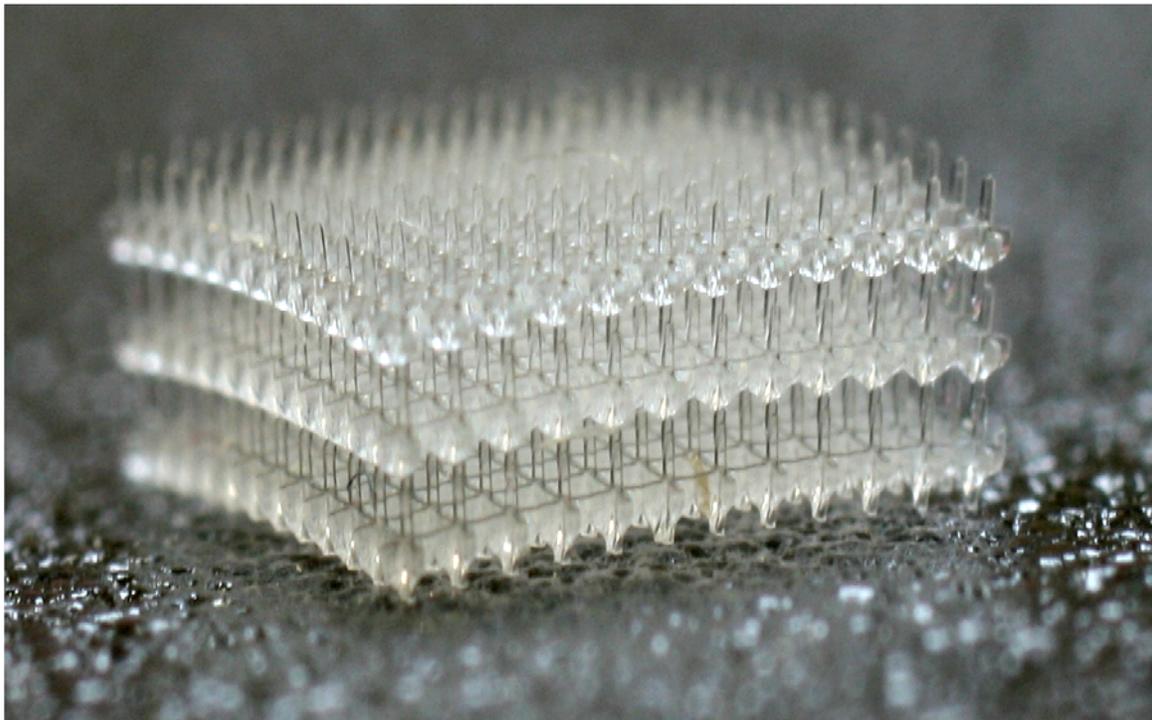


Abb. 19: Scaffold (ca. 4,5 mm x 4,5 mm x 1,9 mm) für die Chondrophase aus AB8 (3-lagig) für Verklebungsversuche zum biphasischen Implantat.

1.8.2.2 Herstellung von Scaffolds mit zylindrischer Geometrie (AP9)

Für die Implantate zum geplanten Tierversuch sind Scaffolds mit zylindrischer Geometrie erforderlich entsprechend der Geometrie der bei der Operation mittels Bohrer erzeugten zylindrischen Defektstruktur. Es wurde ein Vorversuch zur Herstellung von Scaffolds mit zylindrischer Geometrie unternommen, da mit der unter 1.8.2.1 beschriebenen Methode rechteckige Scaffolds resultieren. Da kein Softwaremodul zur Herstellung zylindrischer Überstrukturen, in die dann die Elementarzellen hineingeschrieben werden, vorhanden war, wurde mit einer Silikonmatrize gearbeitet, welche ein kreisrundes Loch (7 mm Durchmesser) enthielt. Dieser Raum wurde mit Photoresist (AB8 + 2% (m/m) Irgacure[®]369) blasenfrei gefüllt und mit einem Deckgläschen (1,5 mm Durchmesser) abgedeckt. Als Elementarzelle wurde ein 3D-Achsenkreuz mit 400 µm Seitenlänge und 60 µm Balkenbreite gewählt. Die Probe wurde so in der 2PP-Anlage positioniert, dass ein rechteckiges 3D-Array aus Elementarzellen (3D-Kreuze) über die Aussparung der Matrize geschrieben wurde. Da nur an den Positionen, an denen Photoresist vorhanden war, eine Polymerisation stattfinden konnte, resultierte ein Scaffold mit zylindrischer Struktur (Abb. 20).

1.8.2.3 Herstellung von Scaffolds für die Chondrophase des biphasischen Implantats (AP9)

Ausgehend von den unter 1.8.2.2 aufgeführten Untersuchungen wurden für die geplanten Tierversuche (Schaf-Modell) Scaffolds für die Chondrophase des biphasischen Implantats mittels 2PP hergestellt. Dazu wurde aus einer Matrize aus Silikon ein kreisrundes Loch mit 5,4 mm Durchmesser ausgestanzt. Diese Matrize wurde wie unter 1.6.2 beschrieben mit entgastem Photoresisten (AB8 + 2% (m/m) Irgacure[®]369) möglichst luftblasenfrei befüllt und mit einem Deckgläschen (1,5 mm Durchmesser) abgedeckt. Als Elementarzelle wurde ein 3D-Achsenkreuz mit 400 µm Seitenlänge und 60 µm Balkenbreite gewählt. Basierend auf dem unter 1.5 beschriebenen Verfahren wurde mit der Herstellung von zweilagigen Scaffolds als Chondrophase für biphasische Implantate begonnen. Insgesamt wurden 14 Scaffolds (12 + 2 Ersatz) hergestellt. Die Vermessung eines Implantats (Abb. 21) mittels REM ergab einen Durchmesser von 6 mm, eine Höhe von ca. 1,2 mm, eine Porengröße von ca. 370 µm und eine Balkendicke von ca. 70 µm.

Die Herstellung von Implantaten mittels 2-Photonen-Polymerisation konnte damit als Proof-of-Principle gezeigt werden.

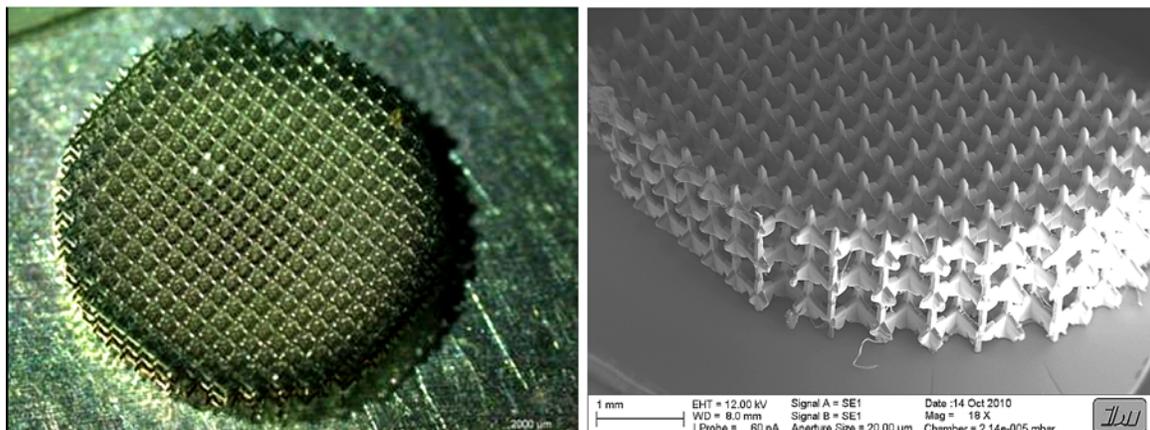


Abb. 20: Zylindrisches Scaffold (3-lagig) aus AB8. Links: Lichtmikroskopische Aufnahme der Gesamtansicht (Das Scaffold wurde für die REM-Analyse mit Gold besputtert.). Rechts: REM-Analyse.

Für die *in vivo*-Implantationstests (klinische Details, Ergebnisse) wird auf den Abschlussbericht des Projektpartners aap Biomaterials GmbH verwiesen. Die für die Implantation vorgesehenen biphasischen Konstrukte (Osteophase: Hydroxylapatit-Kollagen-Konstrukt [aap], Chondrophase: PEG400-urethandimethacrylat [iba]) wurden mit Hilfe eines vom Projektpartner INNOVENT umgesetzten Klebverfahrens auf Basis der UV-vermittelten Vernetzung von Ackerpunkten zwischen Osteo- und Chondrophase hergestellt. Details dazu sind im Abschlussbericht des Projektpartners INNOVENT aufgeführt. Ein Schema eines biphasischen Konstruktes sowie ein Beispiel eines Konstruktes vor Implantation ist in Abbildung 22 gezeigt.

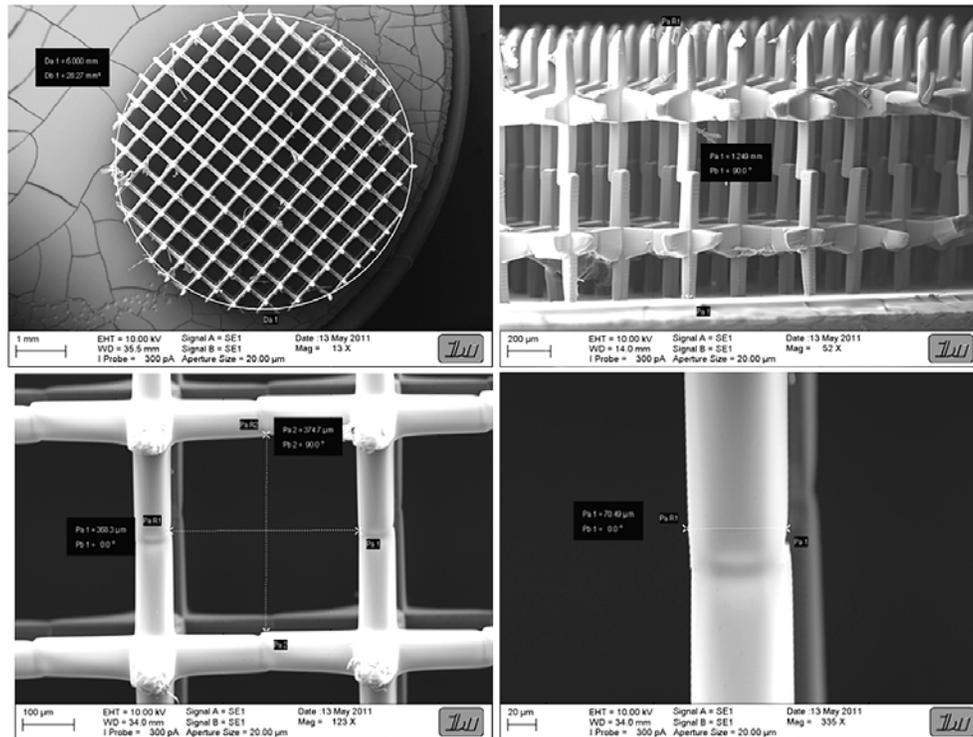


Abb. 21: REM-Analyse der Scaffold aus AB8 für die Chondrophase der biphasischen Implantate. Links oben: Bestimmung des Durchmessers, Rechts oben: Bestimmung der Höhe, Links unten: Porenvermessung, Links oben: Balkendicke.

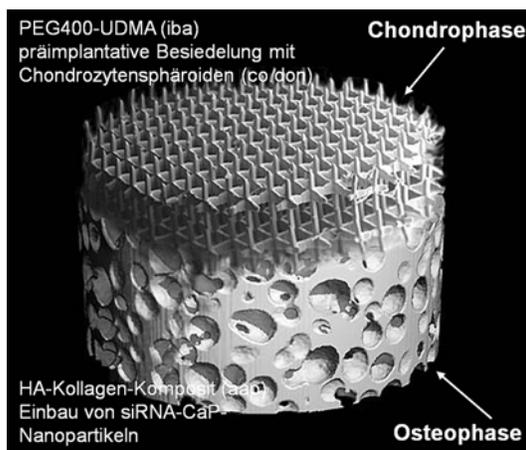


Abb. 22: Konstrukt aus Knorpel- und Knochenphase für die Implantation im Schafmodell. Links: Schema (Geometrie: Chondrophase: Durchmesser: 6,0 mm, Höhe: 1,2 mm, Porengröße: ca. 370 μ m, Balkenbreite: ca. 70 μ m; Rechts: Biphasisches Konstrukt vor Implantation (Gesamtdéfektgröße: 5,4 mm Durchmesser, 8 mm Tiefe, Foto: Uniklinikum Gießen-Marburg).

1.9 Zusammenfassung und Wertung

Im Kontext mit den Zielen des Gesamtverbundes BioNanoPlant war das Teilvorhaben des iba auf die Erforschung der technischen Umsetzung einer 2P-Mikrostrukturierung implantierfähiger biphasischer 3D-Zellträgerstrukturen mit gewebeanalogen Eigenschaften für die Versorgung von Knorpel-Knochendefekten sowie deren intensiven Testung unter applikativen Bedingungen ausgerichtet. Aufgrund der immensen Bedeutung der extrazellulären Matrix (ECM) für die Organisation und Funktion von Zellverbänden in Geweben ist für erfolgreiche Tissue Engineering-Ansätze die weitestgehende Nachbildung der natürlichen räumlichen Umgebung von Zellen einschließlich der Induzierung bioaktiver Wechselwirkungsmechanismen mit dem Trägermaterial von entscheidender Bedeutung. 3D-Zellträgerstrukturen, die in der Regenerativen Medizin eine immer breitere Anwendung erfahren, müssen daher sowohl biochemische sowie auch mechanische Eigenschaften bereitstellen, die möglichst denen der ECM der Zielgewebe entsprechen. Das Teilvorhaben des iba beinhaltete daher Forschungsarbeiten zu drei wesentlichen Anforderungen an zukünftige Implantate:

1. Materialien mit matrixähnlichen/biomimetischen Stoffeigenschaften
2. 3D-Strukturierung zur Unterstützung der Zelladhäsion, Zellmigration und Zelldifferenzierung
3. zelltypspezifische Freisetzung bioaktiver Moleküle zur Förderung zelldifferenzierender Effekte

Zu allen drei Aspekten wurden im Rahmen des Teilvorhabens entscheidende Beiträge geliefert:

- Die 2PP-Prozessierbarkeit von 3D-Trägerstrukturen mit knorpel- wie auch knochentypischen Eigenschaften in implantierfähigen Raumdimensionen einschließlich aller materialwissenschaftlichen und verfahrenstechnischen Grundlagen wurden erarbeitet und im Sinne eines Proof-of-principle gezeigt.
- Für beide 2PP-Materialien der Chondro- und Osteophase wurden biomechanische Stoffgesetze auf der Basis der Viskoelastizitätstheorie erarbeitet, die eine gezielte Anpassung dreidimensionaler Scaffoldstrukturen an die mechanische Anforderungen am Defektort erlauben.
- Die spezifische Modifizierung der 3D-Trägerstrukturen sowie deren zellbiologischen Effekte wurde erfolgreich gezeigt (Förderung der Zelladhäsion, Zelltransfektion durch oberflächengekoppelte Nanocarrier).

Die dreidimensional strukturierten Materialien zeigen dabei gewebetypische Eigenschaften, sowohl im Sinne der Oberflächeneigenschaften, wie auch der biomechanischen Parameter. Das Tierexperiment konnte eindrucksvoll zeigen, dass insbesondere die 2PP-generierte 3D-Chondrophase ein hohes Regenerationspotential für Knorpelgewebe aufweist. Für Details wird hier auf den Schlussbericht des Projektpartners aap Biomaterials GmbH verwiesen.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Investitionen

1. Im Rahmen des BioNanoPlant-Projektes wurde das für biomechanische Charakterisierung und Stimulation von 3D-Strukturen/Geweben geeignete System „BioDynamic™ Tester“ incl. der erforderlichen Steuersoftware „Win® Test DMA“ von der Fa. Bose-Corporation-ElectroForce® Systems Group, Minnesota, USA, angeschafft. Mit diesem "Bose"-Reaktor wurden im Rahmen dieses Forschungsprojektes vornehmlich mechanische E-Moduli von Materialien und Systemsteifigkeiten der 2PP-3D-Scaffoldstrukturen mit unterschiedlichen Eigenschaften entsprechend des Einsatzes als Chondro- oder Osteophase bestimmt.
2. Für die Simulation applikationsspezifischer Einsatzbedingungen wurde weiterhin ein kompaktes aktives Schwingungsisolationsystem und ein Wärme-/Brutschrank WB 250x angeschafft.

Kooperation

Die Kooperation zur Untersuchung der Zelldifferenzierung von ovinen Stammzellen bei Kultur auf 3D-Scaffolds und auf demselben Material in 2D-Kultur erfolgte mit dem Translationszentrum für Regenerative Medizin (TRM) der Universität Leipzig. Dieses Institut hat eine ausgewiesene Expertise und die notwendige Erfahrung zur Zelldifferenzierung von Stammzellen und deren biochemischer und histologischer Analyse.

Personal

Die für die Projektbearbeitung eingeplanten Personalmittel wurden planmäßig eingesetzt. Auf folgende personellen Ressourcen wurde zurückgegriffen:

Wissenschaftler mit folgenden Aufgabenfeldern:

- Entwicklung von 2PP-Herstellungsstrategien für implantierfähige mikrostrukturierte 3D-Scaffolds aus Hydrogelvorstufen
- Planung und Auswertung zellbiologischer Zellverträglichkeitstests
- Entwicklung und Umsetzung von Modifizierungsstrategien zur Bioaktivierung von 3D-Scaffolds mit RGD-Sequenzen und Polyelektrolytmultilayern

Biologisch-Technische Assistentin (BTA) mit folgenden Aufgabenfeldern:

- Durchführung zellbiologischer Kompatibilitätstests (Zellkultivierung, Fluoreszenzmarkierungen, CLSM-Analytik)
- Durchführung von RGD-Modifizierungsarbeiten an 2D-Oberflächen und 3D-Scaffolds
- molekularbiologische Arbeiten zur Zelltransfektion
- chemische Analytik 2PP-geeigneter Polymere

Diplomand mit folgenden Aufgabenfeldern:

- 2PP-Herstellung 3D-mikrostrukturierter Scaffolds der Osteo- und Chondrophase aus verschiedenen Polymeren
- biomechanische Charakterisierung von Scaffolds der Osteo- und Chondrophase incl. vergleichender Bewertung mit nativen Geweben

Verbrauchsmaterial

Das im Rahmen des Projektes eingesetzte Verbrauchsmaterial beinhaltet im Wesentlichen die notwendigen Labormaterialien, Reagenzien und Testkits für die umfassende Bearbeitung der zellbiologischen Arbeiten (Zelllinien, Gewinnung, Kultivierung, Lagerung primärer boviner Chondrozyten aus Rinderknie-Biopsien, Langzeitkultivierung, Fluoreszenzmarkierungen, Reagenzien für die Genexpressionsanalytik) sowie der Herstellung von 3D-Scaffolds mittels 2PP sowie deren Nachprozessierung (Photoresins, Photoinitiatoren, Chemikalien, Lösungsmittel, RGD-Sequenzen, Polyelektrolyte).

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der Arbeit

Schätzungen zufolge leiden ca. 5 Millionen Deutsche an Arthrose [27]. Aufgrund der demographischen Entwicklung ist mit einem weiteren Anstieg in den nächsten Jahrzehnten zu rechnen, da schätzungsweise 20-40% aller über 60 Jährigen an dieser chronischen, nicht heilbaren Gelenkerkrankung leiden wird. Betroffen sind vorwiegend Gelenke mit hoher Belastung wie Handwurzel-, Knie- und Hüftgelenke [26]. Die Entstehung einer Arthrose ist ein komplexer, nicht vollständig verstandener Vorgang, der neben erblichen Ursachen auch Gelenkfehlstellungen, Überbelastungen durch schwere körperliche Arbeit oder Übergewicht sowie Knorpelverletzungen als Auslöser haben kann [28]. Neben erheblichen gesundheitlichen Beeinträchtigungen (Schmerzen, eingeschränkte Beweglichkeit, Gelenkversteifung) der Patienten verursacht Arthrose auch immense Kosten für das Gesundheitssystem, die sich in Deutschland im Jahr 2006 auf ca. 7,5 Milliarden Euro beliefen. Die konservativen chirurgischen Arthrosetherapien liegen je nach Schweregrad zwischen Abtrennung überhängender Gewebereste, knochenmarksstimulierenden Verfahren und OCT (osteocondrale autologe Transplantation). Sie zeigen oft nur einen zeitlich begrenzten Erfolg, der im Endstadium in die Substitution des degenerierten Gelenks durch eine Endoprothese münden kann. Neuere Therapien von Knorpelschäden beruhen wie die ACT (autologe Chondrozyten Transplantation) und dessen Weiterentwicklung, der MACI[®] (matrix-induzierte autologe Chondrozyten Implantation, Verigen Transplantation Services International, Leverkusen), auf der Vermehrung von entnommenen Knorpelzellen (Chondrozyten) in der *in vitro*-Gewebzüchtung (Tissue Engineering) ohne und mit Trägermaterialien im Labor und deren anschließende Reimplantierung. Für die Behandlung knöcherner Defekte (Osteophase) stehen Methoden zur *in vitro*-Anzucht von Osteoblasten auf verschiedenen Trägermaterialien z.B. Hydroxylapatit (HA), Polylactide und Tricalciumphosphat, welche auch kommerziell vertrieben werden (z.B. Ostim[®], aap Biomaterials), zur Verfügung. Die Entwicklung geht in Richtung des Einsatzes von gekoppelten (biphasischen) Knochen-Knorpel-implantaten zur Behandlung von großen Knorpeldefekten, welche eine passgenaue Verankerung des Implantats mit der knochenanalogen Phase im subchondralen Knochen ermöglichen. Allerdings stehen einer routinemäßigen Anwendung in der orthopädischen Praxis folgende Problemstellungen entgegen:

- Eine Dedifferenzierung der Chondrozyten führt zur Bildung eines „Faserknorpels“, der entscheidend schlechtere mechanische Eigenschaften aufweist und bei normaler Belastung schnell degradiert wird.
- Probleme beim Einwachsen von Implantaten in den Knochen führen zu einer schlechten Verankerung des Implantats ins angrenzende Gewebe.

Das Verbundprojekt zielte mit seiner Aufgabenstellung direkt auf die oben aufgeführten Problematiken. Es konnte ein biphasisches Knochen-Knorpel-Implantat auf der Basis einer Hydroxylapatit-Osteophase (produziert durch den Projektpartner aap Biomaterials) und ein 2PP generierten Chondrophase auf Polymerbasis hergestellt werden, wobei die Verbindung beider Phasen dem Projektpartner INNOVENT e.V. oblag. Durch die Anwendung des 3D-Strukturierungsverfahrens 2PP zur Herstellung der Chondrophase wurde dem Problem der Dedifferenzierung der Chondrozyten entgegengewirkt und eine Basis zur verbesserten Adhäsion der applizierten Chondrosphären (durch den Projektpartner co.don AG) geschaffen, so dass in der Summe eine verringerte Dedifferenzierung der Chondrozyten erreicht und damit der Ausbildung eines Faserknorpels entgegengewirkt werden sollte. Dem Problem des Einwachsens von Implantaten in den Knochen wurde mit der Applikation von siRNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln begegnet, die durch die Wirkung der siRNA eine Differenzierung von Stammzellen in Richtung einer Osteogenese unterstützen sowie durch das Calciumphosphat die Mineralisation des entstehenden Knochens unterstützen sollte. Das biphasische Implantat simulierte mit seinem Durchmesser von 5,4 mm die Behandlung eines großflächigen osteochondralen Defekts im Tiermodell Schaf.

Das Verbundprojekt verfolgt die Zielsetzung einer Verbesserung der Behandlung von großflächigen Knochen-/ Knorpeldefekten in Hinblick auf eine bessere Patientenversorgung in einem aufgrund des demographischen Wandels wachsenden Marktes.

4. Voraussichtlicher Nutzen und Ergebnisverwertung

Die Zielsetzung der Herstellung eines biphasischen Implantats für die Behandlung von großflächigen Knochen-Knorpeldefekten im Schafmodell konnte im Projektzeitraum im Rahmen eines Proof-of-Concept erreicht werden. Damit ist die Grundlage geschaffen worden, um ein biofunktionalisiertes osteochondrales Implantat in Kombination mit der Applikation von Chondrosphären bis zur Marktreife weiterzuentwickeln. Die Patentfähigkeit der Prototypen des biphasischen Implantates muss geprüft werden. Bezüglich der Verwertung der Hydroxylapatit basierten und mit siRNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln funktionalisierten Osteophase wird auf den Verwertungsplan des Projektpartners aap Biomaterials verwiesen. In Bezug auf die Anwendung der Applikation von Chondrosphären gilt der Verwertungsplan der co.don®AG.

Im Teilprojekt am iba konnte im Sinne des Proof-of-Principle die Herstellung von implantationsfähigen Scaffolds mittels 2PP realisiert werden kann. Damit wurden erstmalig 2PP strukturierte Zellträgerstrukturen im Tiermodell implantiert. Es ist jedoch noch Potential vorhanden, durch eine Verbesserung des Prozessierungsverfahrens in Sinne einer Beschleunigung und Parallelisierung des Polymerisationsprozesses eine höhere Stückzahl pro Zeit herzustellen sowie die Größe der Implantate heraufzusetzen. Dies würde als nächsten Meilenstein in der Verfahrensentwicklung die direkte Umsetzung von CT/MRT-Daten von Patienten in passgenaue Implantate bedeuten. Die Befähigung zur Herstellung von 3D-Scaffolds und Implantaten mittels 2PP aus verschiedenen Materialien und mit frei definierbaren Geometrien erweitert das Profil des iba Heiligenstadt als Dienstleister für Outsourcing-Lösungen im Tissue Engineering-Bereich erheblich.

5. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordene Fortschritte anderer Stellen

Die Arbeitsgruppe um B. Chichkov am Laserzentrum Hannover publizierte die Herstellung von 3D-Scaffolds mittels 2PP, die aus dem Material Polyethylenglykoldiacrylat polymerisiert wurden, und beschreibt eine spezielle, laserinduzierte Animpftechnik, dem „laser induced forward transfer“ (LIFT), mit der die 3D-Scaffolds besiedelt wurden [29]. Der Artikel fokussiert auf das Animpfverfahren und enthält keine Daten zu Kultivierungen der beimpften Scaffolds und zur Biokompatibilität des eingesetzten Materials. Die Scaffolds bestanden aus einem hexagonalen Ring mit ca. 2,5 bis 3 mm Außendurchmesser und ca. 1 mm Innendurchmesser. Die Scaffolds waren aus Röhren als Grundstruktur aufgebaut, ihre Höhe betrug ca. 300 µm. Im BioNanoPlant-Projekt hingegen wird PEG400-urethandimethacrylat eingesetzt, dessen Biokompatibilität bereits gezeigt wurde (siehe 1.3). Abweichend wurden die Scaffolds im Projekt basierend auf 3D-Achsenkreuzen als Elementarzelle hergestellt, die ein kubisches Gitter bilden. Die Größe der vom Laserzentrum hergestellten Scaffolds liegt im Größenbereich der im Teilprojekt hergestellten Teststrukturen für die Zelldifferenzierungsanalyse beim Projektpartner co.don® AG. Darüber hinaus konnte am iba bereits eine 2PP-Teststruktur mit ca. 7 mm Durchmesser und ca. 1,9 mm Höhe hergestellt werden. Die vom LZH hergestellten Scaffolds wurden für die *in vitro* Generation von Blutgefäßen konzipiert und daher mit zwei verschiedenen Zelltypen angeimpft (ovine glatte Muskelzellen im Bereich des Außendurchmessers und ovine Endothelzellen im Bereich des Innendurchmessers). Die Besiedlung wurde mit dem LIFT-Verfahren durchgeführt, wobei die Zellen aus einer Matrix in den gewünschten Bereich des Scaffolds mittels einer laser-induzierten Schockwelle platziert wurden. Im BioNanoPlant-Projekt hingegen liegt die Zielsetzung in der Entwicklung eines biphasischen Implantats für die Behandlung von Knochen/Knorpelschäden. Folglich werden Chondrozyten und Osteoblasten zur Besiedlung der Scaffolds eingesetzt. Die publizierte Arbeit berührt aufgrund einer anderen Zielsetzung (*in vitro*-Generation von Blutgefäßen) sowie abweichender Versuchsparameter (anderer Zelltypen, abweichendes Scaffoldmaterial und -geometrie, andere Animpftechnik) nicht die im vorliegenden Teilprojekt realisierten Arbeiten.

Die gleiche Arbeitsgruppe publizierte in 2011 Ergebnisse mit 3D-Strukturen aus Methacrylamid-Gelatine (Photoinitiator: Irgacure 2959). Es konnte die osteogene Stimulation von mesenchymalen Stammzellen sowie die Kalzifizierung in 3D-Konstrukten gezeigt werden [30].

Eine Arbeitsgruppe an der RWTH Aachen und des Fraunhofer-Instituts für Lasertechnologie in Aachen veröffentlichte in 2011 ebenfalls Arbeiten zur Mikrostrukturierung von gelatinebasierten Zellscaffolds. Mit Hilfe von Polymer-Protein-Hybridstrukturen (Mikrostrukturen aus quervernetzter Gelatine) wurde die oft ungenügende mechanische Stabilität von 2PP-generierten 3D-Mikrostrukturen aus ECM-Komponenten wie Kollagenen, Fibronectinen etc. verbessert [31]. Im Zuge dieser Arbeiten wurde auch ein neuer Photoinitiator eingesetzt, der mit einer ps-Laserquelle einsetzbar ist und somit einen höheren Durchsatz im Vergleich mit einer fs-Laserquelle ermöglicht. Jedoch sind keine implantierfähigen 3D-Scaffolds erzeugt worden. Die alternative Umsetzung der 2PP-Herstellung mittels fs-Lasertechnologie auf die ps-Technik wird auch im iba Heiligenstadt verfolgt, nicht zuletzt aufgrund des damit möglichen Upscalings bei der Herstellung von 3D-Scaffolds für die Therapie von Knorpel-Knochendefekten.

6. Veröffentlichung der Ergebnisse

Publikationen

Weiss T, Berg A, Fiedler S, Schade R, Hildebrand G, Schnabelrauch M, Liefeith K: Two-Photon Polymerization for Microfabrication of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Application. in: O. Dössel und W.C. Schlegel (Eds.): WC 2009, *IFMBE Proceedings*, **2009** 25/X, 140-142.

Liefeith K, Weiss T, Fiedler S, Grohmann S: Mikro- und nanostrukturierte ECM-analoge Biointerfaces. in: *Vakuumbeschichtung und Plasmaoberflächentechnik* **2009**, 22.

Fiedler S, Schade R, Hildebrand G, Liefeith K, Schnabelrauch M, Berg A, Wyrwa R: Production of scaffolds for tissue engineering applying two-photon polymerisation. in: *Future Medicine*, **2009** November 4(6), Suppl. 2, 177, ISSN: 1746-0751.

Fiedler S, Schade R, Rothe H, Hildebrand G, Liefeith K, Berg A, Wyrwa R, Schnabelrauch M, Libera-Körner J: Herstellung von 3D-Trägerstrukturen mittels 2-Photonen-Polymerisation für die Behandlung von Knorpeldefekten. *BIOMATERIALIEN* **2011**. Volume 12, Number 1-4, 27.

In Vorbereitung befindliche Publikationen auf Basis der Projekt-/Verbundergebnisse

- Herstellung sowie materialtechnische und zellbiologische Charakterisierung von 2PP-basierten biphasischen implantierbaren 3D-Konstrukten (gemeinsame Publikation von iba und INNOVENT in 2012 in *J Biomater Res Part A* bzw. *Biomaterials*)
- *In vivo*-Tierstudie zu Effekten biphasischer Knorpel-/Knochenkonstrukte aus 2PP-3D-Knorpelphase und Hydroxylapatit-Kollagen-basierter Knochenphase (gemeinsame Publikation aller Partner im Verbundprojekt, in 2012 in *Biomaterials*)
- Future-Article "Designer-Scaffolds / Designer-Grenzflächen für biomedizinische Applikationen" (in 2012/2013 in *Biomaterials*)

Poster

Libera J, Fiedler S, Schade R, Hildebrand G, Liefeith K, Schnabelrauch M, Berg A, Wyrwa R, Dingeldein E, Zukowski D, Epple M, Schnettler R, Lips KS: BioNanoPlant - Biofunktionale und mittels 2-Photonenpolymerisation (2PP) nanostrukturierte Implantate zur Stimulation der Osteo- und Chondrogenese bei der Behandlung von skeletalen Defekten. BMBF-Konferenz WING-nano.DE, Ulm, 01.-03.04.**2009**.

Fiedler S, Schade R, Hildebrand G, Liefeith K, Schnabelrauch M, Berg A, Wyrwa R: Production of scaffolds for tissue engineering applying two-photon polymerisation. World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, 29.-31.10. 2009. in: *Regenerative Medicine* **4**, **2009**, Suppl. 2, S177.

Fiedler S, Schade R, Rothe H, Hildebrand G, Liefeith K, Schnabelrauch M, Berg A, Wyrwa R: Microfabrication of polymeric scaffolds for tissue engineering applying two photon polymerization. BONETEC, Hannover, 07.-09.10.**2010**. Tissue Engineering, Part A, September 2011, Volume 17 (17-18): A-1-A-25.

Libera J, Fiedler S, Schade R, Hildebrand G, Liefeith K, Schnabelrauch M, Berg A, Wyrwa R, Dingeldein E, Zukowski D, Epple M, Schnettler R, Lips KS: Biofunktionale und mittels 2-Photonenpolymerisation (2PP) nanostrukturierte Implantate zur Stimulation der Osteo- und Chondrogenese bei der Behandlung von skeletalen Defekten. MediWing-Symposium, Nürnberg, 30.06.-01.07.2010.

Vorträge

Liefeith K, Weiss T, Fiedler S, Grohmann S: Mikro- und nanostrukturierte ECM-analoge Biointerfaces. V2009, Dresden, 20.10.2009.

Schade R, Weiss T, Fiedler S, Grohmann S, Liefeith K: Micro- and Nano-structured ECM-analogous Biointerfaces between Biomaterials and Biosystems. 10. Sitzung des Arbeitskreises Biokeramik der DGM, Aachen, 26.11.2010.

Schade R, Weiss T, Fiedler S, Hildebrand G, Berg A, Wyrwa R, Schnabelrauch M, Liefeith K: Influence of laser optical parameters on 2PP microstructuring of 3D biointerfaces. FOM 2011, Konstanz, 18.04.2011.

Fiedler S, Schade R, Rothe H, Hildebrand G, Liefeith K, Berg A, Wyrwa R, Schnabelrauch M, Libera-Körner J: Herstellung von 3D-Trägerstrukturen mittels 2-Photonen-Polymerisation für die Behandlung von Knorpeldefekten. DGBM-Jahrestagung, Giessen, 10.-12.11.2011.

Diplomarbeit

Kaltenhäuser D: Mechanobiologische Untersuchungen von durch UV- und 2-Photonenpolymerisierten Trägermaterialien für das Tissue Engineering. Diplomarbeit, Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena, Fachbereich Medizintechnik, 2012.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Shortkroff S, Spector M: Autologous chondrocyte implantation in a canine model: change in composition of reparative tissue with time. *J. Orthop. Res.* 19, 2001, 482-492.
- [2] Dorozhkin SV, Epple M: Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew. Chem.* 114 (2002), 3260-3277.
- [3] Schnürer SM, Gopp U, Kühn KD, Breusch SJ: Knochenersatzwerkstoffe. *Orthopäde* 32 (2003), 2-10.
- [4] Popov VK, Evseev AV, Ivanov AL, Roginski VV, Volozhin AI, Howdle SM: Laser stereolithography and supercritical fluid processing for custom-designed implant fabrication. *J Mater Sci Mater Med.* 2004 Feb;15(2):123-8.
- [5] Tan KH, Chua CK, Leong KF, Cheah CM, Cheang P, Abu Bakar MS, Cha SW: Scaffold development using selective laser sintering of polyetheretherketone-hydroxyapatite biocomposite blends. *Biomaterials.* 2003 Aug;24(18):3115-23.
- [6] Sherwood JK, Riley SL, Palazzolo R, Brown SC, Monkhouse DC, Coates M, Griffith LG, Landeen LK, Ratcliffe A: A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. *Biomaterials.* 2002 Dec;23(24):4739-51.

- [7] Dutta Roy T, Simon JL, Ricci JL, Rekow ED, Thompson VP, Parsons JR: Performance of hydroxyapatite bone repair scaffolds created via three-dimensional fabrication techniques. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Dec 15;67(4):1228-37.
- [8] Sun W, Lal P: Recent development on computer aided tissue engineering - a review. *Comput Methods Programs Biomed*. 2002 Feb;67(2):85-103.
- [9] Hutmacher DW, Sittinger M, Risbud MV: Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends Biotechnol*. 2004 Jul;22(7):354-62.
- [10] Göppert-Mayer M: Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann. Phys. Lpzg*, 9, 1931.
- [11] Maruo S, Nakamura O, Kawata S: Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization. *Opt Lett*. 1997 Jan 15;22(2):132-4.
- [12] Cumpston BH, Anathavel SP, Barlow S, Dyer DL, Ehrlich JE, Erskine LL, Heikal AA, Kuebler SM, Lee IYS, McCord-Maughon D, Qin J, Röckel H, Rumi M, Wu XL, Marder SR, Perry JP: Two-photon polymerization initiators for three-dimensional optical data storage and microfabrication. *Nature* 398, 1999, 51-54.
- [13] LaFratta CN, Fourkas JT, Baldacchini T, Farrer RA: Multiphoton fabrication. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2007;46(33):6238-58.
- [14] Kasko AM, Wong DY: Two-photon lithography in the future of cell-based therapeutics and regenerative medicine: a review of techniques for hydrogel patterning and controlled release. *Future Med Chem*. 2010 Nov;2(11):1669-80.
- [15] Boyan BD, Lohmann CH, Romero J, Schwartz Z: Bone and cartilage tissue engineering. *Clin Plast Surg*. 1999 Oct;26(4):629-45.
- [16] LeBaron RG, Athanasiou KA: Ex vivo synthesis of articular cartilage. *Biomaterials*. 2000 Dec;21(24):2575-87.
- [17] Schaefer D, Martin I, Shastri P, Padera RF, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G: In vitro generation of osteochondral composites. *Biomaterials* 21, 2000, 2599-2606.
- [18] Kreklau B, Sittinger M, Mensing MB, Voigt C, Berger G, Burmester GR, Rahmzadeh R, Gross U: Tissue engineering of biphasic joint cartilage transplants. *Biomaterials* 20, 1999, 1743-1749.
- [19] Niederauer GG, Slivka MA, Leatherbury NC, Korvick DL, Harroff jr. HH, Ehler WC, Dunn CJ, Kieswetter K: Evaluation of multiphase implants for repair of local osteochondral defects in goats. *Biomaterials* 21, 2000, 2561-2574.
- [20] JKSherwood, Riley SL, Palazzolo R, Brown SC, Monkhouse DC, Coates M, Griffith LG, Landeen LK, Ratcliffe A: A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. *Biomaterials* 23, 2002, 4739-4751.
- [21] Basu S, Campagnola PJ: Properties of crosslinked protein matrices for tissue engineering applications synthesized by multiphoton excitation. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Nov 1;71(2):359-68.
- [22] Elbert DL, Hubbell JA: Conjugate addition reactions combined with free-radical cross-linking for the design of materials for tissue engineering. *Biomacromolecules*. 2001 Summer;2(2):430-41.
- [23] Mapili G, Lu Y, Chen S, Roy K: Laser-layered microfabrication of spatially patterned functionalized tissue-engineering scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005 Nov;75(2):414-24.
- [24] Hu J, Kovtun A, Tomaszewski A, Singer BB, Seitz B, Epple M, Steuhl KP, Ergün S, Fuchsluger TA: A new tool for the transfection of corneal endothelial cells: calcium phosphate nanoparticles. *Acta Biomater*. 2012 Mar;8(3):1156-63.

- [25] Little CJ, Bawolin NK et al.: Mechanical Properties of Natural Cartilage and Tissue-Engineered Constructs. *Tissue Eng Part B Rev*, 2011
- [26] Werner A, et. al., 2003, *Deutsches Ärzteblatt*, 100, Heft 9, A 546-554
- [27] Statistisches Bundesamt : Gesundheitsberichterstattung 2006, www.gbe-bund.de
- [28] Hackenbroch M.H., 2002, „Arthrosen“, Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag
- [29] Ovsianikov A et al.: Laser printing of cells into 3D scaffolds. *Biofabrication* 2, 2010, 014104.
- [30] Ovsianikov A, Deiwick A, Van Vlierberghe S, Dubrue P, Möller L, Dräger G, Chichkov B: Laser fabrication of three-dimensional CAD scaffolds from photosensitive gelatin for applications in tissue engineering. *Biomacromolecules*. 2011 Apr 11;12(4):851-8.
- [31] Engelhardt S, Hoch E, Borchers K, Meyer W, Krüger H, Tovar GE, Gillner A: Fabrication of 2D protein microstructures and 3D polymer-protein hybrid microstructures by two-photon polymerization. *Biofabrication*. 2011 Jun;3(2):025003.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	geplant	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung)	Schlussbericht
3. Titel Entwicklung und Funktionsnachweis von Strukturierungsverfahren auf der Basis der Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP) zur Generierung von biphasischen Systemen für Knochen-/Knorpelimplantate			
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Fiedler, Silke Schade, Ronald Liefeith, Klaus		5. Abschlussdatum des Vorhabens 28.02.2012	6. Veröffentlichungsdatum geplant
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Institut für Bioprocess- und Analysenmesstechnik e.V. (iba) Rosenhof 37308 Heilbad Heiligenstadt		7. Form der Publikation Fachzeitschrift	
		9. Ber. Nr. Durchführende Institution	
		10. Förderkennzeichen *) 13N10035	
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn		11. Seitenzahl 48	
		12. Literaturangaben 31	
		14. Tabellen 3	
15. Abbildungen 22		16. Zusätzliche Angaben	
		17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) Titel s.o.: TIB Hannover, 31.08.2012	
18. Kurzfassung Mit Hilfe der 2-Photonenpolymerisation (2PP) wurden erstmalig biphasische Implantate zur Behandlung großflächiger Knochen- /Knorpeldefekte auf der Basis methacrylierter Polymervorstufen entwickelt. Anhand zellbiologischer Biokompatibilitätstests, Zelldifferenzierungsstudien sowie biomechanischer Materialcharakterisierungen wurden zwei geeignete Materialien selektiert: Polyethylenglycol-(PEG400)-urethandimethacrylat für die Chondrophase und Caprolactonurethanmethacrylat für die Osteophase. Das Chondrophasematerial weist dabei ausgesprochen starke Hydrogeleigenschaften auf (hydrophile Oberfläche) und entspricht somit den Eigenschaften der Knorpelmatrix. Die Hydrogeleigenschaften erschweren jedoch gleichfalls die initiale Zelladhäsion. Mit Hilfe von Oberflächenmodifizierungen (RGD-Sequenzen, Polyelektrolytmultilayer, Anbindung von Calciumphosphat-Nanopartikeln als Transfektionsvektoren) kann die Oberfläche der Chondrophase jedoch gezielt verändert werden, um bioaktive Effekte auf Zellen zu erreichen. Die biomechanischen Kennwerte der 3D-Scaffoldstrukturen insbesondere die der Chondrophase weisen Systemsteifigkeiten auf, die denen des natürlichen Knorpels entsprechen (ca. 0,68 MPa) und sind somit für die Implantation sehr gut geeignet. Für in vivo-Implantationstests (Schafmodell) wurden volumige 2PP-3D-Chondrophasen (bis 6 mm ³) bereitgestellt.			
19. Schlagwörter Zwei-Photonen-Polymerisation, biphasische Implantate, osteochondrale Defekte, RGD-Modifikation, Osteoblasten, Chondrozyten, Biomechanik, Coating, Transfektion, Biofunktionalisierung			
20. Verlag		21. Preis	

*) Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	planned	2. type of document (e.g. report, publication)	final report
3. title Development and proof of function of structuring of biphasic constructs by two-photon polymerisation (2PP) for bone-cartilage defects			
4. author(s) (family name, first name(s)) Fiedler, Silke Schade, Ronald Liefeth, Klaus		5. end of project 28.02.2012	6. publication date planned
8. performing organization(s) (name, address) Institute for Bioprocessing and Analytical Measurement Techniques (iba) Rosenhof D-37308 Heilbad Heiligenstadt		7. form of publication scientific journal	
		9. originator's report no.	
		10. reference no. 13N10035	
13. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn		11. no. of pages 48	
		12. no. of references 31	
		14. no. of tables 3	
15. no. of figures 22		16. supplementary notes	
		17. presented at (title, place, date) title see above: TIB Hannover, August 31th 2012	
18. abstract With the help of two-photon polymerisation (2PP) biphasic implants based on methacrylated polymer precursors for the treatment of large bone/cartilage defects were developed. Based on results of cell biological biocompatibility, cell differentiation studies and biomechanical material characterizations two suitable materials were selected: polyethylene glycol (PEG 400) urethane dimethacrylate for the chondrophase and caprolactone urethan methacrylate for the osteophase. The chondrophase material shows very strong hydrogel properties (hydrophilic surface) and thus corresponds to the properties of the cartilage matrix. The hydrogel properties but also complicate the initial cell adhesion. Using surface modifications (RGD sequences, polyelectrolyte multilayer, surface coupling of calcium phosphate nanoparticles as transfection vectors), the surface properties of the chondrophase however, can be adapted specifically to achieve bioactive effects on cells. The biomechanical characteristics of the 3D scaffold structures particularly of the chondrophase possess stiffnesses which correspond to those of the natural cartilage (approximately 0.68 MPa). These scaffolds are therefore suitable for implantation tests. For in vivo implantation tests (sheep model) voluminous 2PP 3D chondrophase structures was provided (volume up to 6 mm ³).			
19. keywords two-photon polymerisation, biphasic implants, osteochondral defects, RGD modification, osteoblasts, chondrocytes, biomechanics, coating, transfection, biofunctionalisation			
20. publisher		21. price	