

Zentrum für Biomaterialentwicklung
Helmholtz-Zentrum Geesthacht

**Cokulturtestsystem für die Untersuchung des Einflusses
physikochemischer Eigenschaften von Copolymeren auf das
Verhalten von Keratinozyten und Fibroblasten**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin
"Materialien in den Lebenswissenschaften"**

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Karoline Trescher

Juli 2012

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2012/6291/>
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-62915>
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-62915>

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig und ausschließlich mit den angegebenen Mitteln angefertigt habe und die Arbeit an keiner anderen Hochschule eingereicht wurde.

Karoline Trescher

Potsdam, Juli 2012

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	5
2	Abbildungsverzeichnis	8
3	Tabellenverzeichnis	11
4	Zusammenfassung	14
5	Summary	17
6	Einleitung und Zielsetzung	19
6.1	Polymere für biologische, biotechnologische und medizinische Anwendungen	19
6.1.1	Polymere für die Kultivierung von Zellen	21
6.1.2	Zell-Polymer Interaktionen	22
6.2	Keratinocyten und Fibroblasten als Zelltypen der Haut	34
6.2.1	Aufbau und Funktion der Haut	34
6.2.2	Kultivierung von Keratinocyten und dermalen Fibroblasten	37
6.2.2.1	Keratinocyten	37
6.2.2.2	Dermale Fibroblasten	40
6.2.3	Untersuchungen von Polymeren mit Keratinocyten und Fibroblasten	40
6.3	Motivation und Zielsetzung	45
6.4	Strategie	46
7	Material und Methoden	49
7.1	Materialien	49
7.1.1	Verbrauchsmaterialien	49
7.1.2	Geräte und Hilfsmittel	50
7.1.3	Substanzen und Lösungen	51
7.1.4	Software	52
7.2	Polymere	52
7.2.1	Vernetzte Poly(<i>n</i> -butylacrylate)	52
7.2.2	Acrylnitril-basierte Copolymere	53
7.2.2.1	Acrylnitril-basierte Copolymere mit Variation der geladenen funktionellen Gruppen	53
7.2.2.2	Acrylnitril-basierte Copolymere mit Variation der Hydrophilie	54
7.3	Zellkultur	54
7.3.1	Kultivierung primärer humaner Keratinocyten	54
7.3.2	Kultivierung primärer humaner Fibroblasten	55
7.3.3	Wachstumskurven	56
7.3.4	Zellaussaat auf Polymerproben	56
7.4	Methoden zur Untersuchung der Testparameter Zell-Vitalität, -Adhärenz, -Selektivität, ECM-Ablagerung und Sekretion löslicher Faktoren	57
7.4.1	Lebend/Tot Färbung (FDA/PI)	57
7.4.2	Durchflusszytometrische Analyse der Zellkulturüberstände	58
7.4.3	LDH-Assay	58
7.4.4	Immunfärbungen	59
7.4.4.1	Keratin/Vimentin-Färbung	60
7.4.4.2	ECM-Färbung	61
7.4.5	Analyse der Sekretion von Cytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren	62
7.4.5.1	Bioplex	62
7.4.5.2	KGF ELISA	62
7.4.6	Präparation der Polymerproben für die Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop	63
7.4.6.1	Präparation der vernetzten Poly(<i>n</i> -butylacrylate)	63

7.4.6.2	Präparation der Poly(acrylnitril- <i>co</i> -N-Vinylpyrrolidon)-Proben.....	63
7.4.7	Versuche der Methodenanpassung zur Automatisierung der Aufnahme und Auswertung mikroskopischer Bilder	63
7.4.7.1	Versuch zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz durch Sudan-Schwarz	63
7.4.7.2	Versuch zur Erhöhung des Kontrastes durch Pierce Immunostain Enhancer	64
7.5	Statistik	64
8	Ergebnisse.....	65
8.1	Wachstumskurven	65
8.2	Untersuchung des Einflusses vernetzter Poly(<i>n</i> -butylacrylate) mit Variation der Elastizität auf primäre humane Keratinozyten und Fibroblasten.....	66
8.3	Untersuchung des Einflusses Acrylnitril-basierter Copolymere auf primäre humane Keratinozyten und Fibroblasten.....	74
8.3.1	Acrylnitril-basierte Copolymere mit Variation geladener funktioneller Gruppen.....	77
8.3.1.1	Acrylnitril-basierte Copolymere mit zunehmendem molaren Anteil des Comonomers Methacrylsäure-2-aminoethylester-hydrochlorid.....	77
8.3.1.2	Acrylnitril-basierte Copolymere mit zunehmendem molaren Anteil des Comonomers N-3-Aminopropyl-methacrylamid-hydrochlorid	83
8.3.1.3	Acrylnitril-basierte Copolymere mit zunehmendem molaren Anteil des Comonomers Natriumsalz der 2-Methyl-2-propen-1-sulfonsäure	89
8.3.2	Acrylnitril-basierte Copolymere mit Variation der Hydrophilie - Copolymere mit zunehmendem Anteil des Comonomers N-Vinylpyrrolidon	94
8.4	Methodenanpassung zur Automatisierung der Aufnahme und Auswertung mikroskopischer Bilder	102
8.5	Rasterelektronenmikroskopie.....	104
9	Diskussion	105
9.1	Etablierung des Cokulturtestsystems.....	107
9.2	Einfluss physikochemischer Eigenschaften ausgewählter Copolymere auf primäre humane Keratinozyten und Fibroblasten.....	108
9.2.1	Einfluss der Elastizität	108
9.2.2	Untersuchung Acrylnitril-basierter Copolymere.....	111
9.2.2.1	Einfluss des Anteils geladener funktioneller Gruppen	111
9.2.2.2	Einfluss der Hydrophilie	115
9.3	Schlussbetrachtungen und Ausblick.....	118
10	Danksagung	119
11	Literaturverzeichnis.....	120

1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
θ	Kontaktwinkel
ρ	spezifische Dichte
AB	Antibiotika
AEMA	Methacrylsäure-2-aminoethylester-hydrochlorid
AFM	Atomic force microscope (Rasterkraftmikroskop)
AIBN	2,2'-Azobisisobutyronitril
AN	Acrylnitril
APMA	N-3-Aminopropyl-methacrylamid-hydrochlorid
BPE	Bovine pituitary extract (Rinder-Hypophysenextrakt)
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cLSM	konfokales Laserscanningmikroskop
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cPnBA	vernetztes Poly(<i>n</i> -butylacrylat)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DIN	Deutsches Institut für Normung
DSC	Differential scanning calorimetry (dynamische Differenzkalorimetrie)
DTI	Defined Trypsin Inhibitor (definierter Trypsininhibitor)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E	Elastizitätsmodul
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
EPM	Electrophoretic mobility (Elektrophoretische Mobilität)
EU	Europäische Union
EU/ml	Endotoxin Units pro Milliliter
etc.	<i>et cetera</i>
FBS	Fetal bovine serum (fetales Rinderserum)

FDA	US Food and Drug Administration (behördliche Lebensmittelüberwachung und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika)
FDA	Fluoresceindiacetat (zur Färbung lebender Zellen)
g	Erdbeschleunigung
G	Gelgehalt
GC	Gas-Chromatographie
GM-CSF	Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (Granulozyten/Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor)
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
h	Stunden
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGF	Hepatocyte growth factor (Hepatozytenwachstumsfaktor)
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells (humane Endothelzellen)
IEP	Isoelektrischer Punkt
IgG	Immunglobulin, Isotyp G
IL	Interleukin
IR	Infrarot
ISO	International Organization for Standardization (Internationale Organisation für Normung)
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KGM adv.	Keratinocyte growth medium advanced (Keratinozytenwachstumsmedium komplett)
KGF	Keratinocyte growth factor (Keratinozytenwachstumsfaktor)
kPa	Kilopascal
LDH	Laktatdehydrogenase
min	Minuten
μl	Mikroliter
mM	Millimolar
μm^2	Quadratmikrometer
MMP	Matrixmetalloproteinase
MSC	mesenchymale Stammzellen
MTT	Assay für den Nachweis der Stoffwechsellistung von Zellen
NaMAS	Natriumsalz der 2-Methyl-2-propen-1-sulfonsäure
nd	nicht definiert
NIH	National Institutes of Health (Nationale Gesundheitsinstitute der Vereinigten Staaten von Amerika)
nm	Nanometer
N/mm	Newton/Millimeter

NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz)
NVP	N-Vinylpyrrolidon
O ₂	Sauerstoff
Pa	Pascal
PAN	Polyacrylnitril (Homopolymer)
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
pg/ml	Picogramm pro Milliliter
PI	Propidiumiodid (zur Färbung toter Zellen)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PPGDMA	Poly(propylenglycol) dimethacrylat (Vernetzer)
ppm	parts per million (Teile von einer Million)
REM	Rasterelektronenmikroskop
RGD	Aminosäuresequenz (Arginin, Glycin, Asparaginsäure)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
R _q	quadratische Rauigkeit
RT	Raumtemperatur
SAM	Self assembled monolayer (selbstorganisierende Monoschicht)
s.o.	siehe oben
TCP	Tissue culture plate (für Zellkultur geeignete Polystyrol-Oberfläche)
T _g	Glasübergangstemperatur
TGA	Thermogravimetrie
TGFβ-3	Transforming growth factor (Transformierender Wachstumsfaktor)
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases (Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen)
TNFα	Tumor necrosis factor alpha (Tumornekrosefaktor alpha)
TPP	Techno Plastic Products AG
tlw.	teilweise
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WST	Assay für den Nachweis der Stoffwechsellistung von Zellen
Gew.-%	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln ausgewählter Polymere, die für die Zellkultur verwendet werden: (a) Polystyrol (PS), (b) Polytetrafluorethylen (PTFE), (c) Polycarbonat (PC) und (d) Polyethylenterephthalat (PET).....	22
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Haut.....	34
Abbildung 3: (a) Schematische Darstellung der Schichten der Epidermis, sowie einem Ausschnitt der Dermis. (b) Darstellung das graduellen Vorkommens bestimmter Zytoskelettbestandteile (K1, K5, K10, K14: Keratine 1, 5, 10 und 14) sowie Komponenten der verhornten Hülle (Inv: Involucrin, Lor: Loricrin, Fil: Filaggrin) in der Epidermis. (Abbildung adaptiert von [124,149]).	35
Abbildung 4: Schema zur Synthese der vernetzten Poly(<i>n</i> -butylacrylate). <i>n</i> -Butylacrylat wurde mit Poly(propylenglycol) dimethacrylat (PPDGMA) als Vernetzer und 2,2'-Azobisisobutyronitril (AIBN) als Initiator polymerisiert. cPnBA04 bezeichnet das Produkt aus der Synthese mit 0,4 Gew.-% des Vernetzers, und cPnBA73 das Produkt mit 73 Gew.-% (Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Abteilung PBI).	48
Abbildung 5: Strukturformeln der Comonomere (a-e) und Copolymere (f-h) der Acrylnitril-basierten Copolymere: (a) Acrylnitril, (b) Methacrylsäure-2-aminoethylesterhydrochlorid (AEMA), (c) N-3-Aminopropyl-methacrylamid-hydrochlorid (APMA), (d) Natriumsalz der 2-Methyl-2-propen-1-sulfonsäure (NaMAS), (e) N-Vinylpyrrolidon (NVP), (f) Polyacrylnitril Homopolymer (PAN), (g) Poly(AN-co-R) mit R ₁ : AEMA, R ₂ : APMA, R ₃ : NaMAS, (f) Poly(AN-co-NVP). Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Polymerrückgrade ausgeschrieben und für die Seitenketten verkürzte Formeln verwendet.	48
Abbildung 6: Wachstumskurven	65
Abbildung 7: Durchlichtmikroskopische Bilder der Zellen nach 48 h Inkubation auf cPnBA-Proben und Glas zur Darstellung der Zellmorphologie (Maßbalken = 100 µm). ...	68
Abbildung 8: Repräsentatives Bild der der ECM-Färbung nach 48 h Inkubation auf Glas. Überlagerung (a) und (b) Einzelkanäle der ECM-Komponenten Fibronectin, Elastin, Kollagen I-V sowie dem Zellkern (Maßbalken = 50 µm) [165,166].	68
Abbildung 9: Analyse der Keratinozyten- und Fibroblasten-Monokulturen sowie der Cokulturen nach 48 Stunden Inkubation auf cPnBA-Proben und Glas. (a) Daten der Lebend/Tot-Färbung (Fluoresceindiacetat/Propidiumiodid; FDA/PI). Die Daten zeigen die Mittelwerte für 3 Proben ± Standardabweichung, schraffierte Anteile der Balken repräsentieren tote Zellen. (b) Daten der immunzytochemischen Färbung der ECM-Komponenten Fibronectin, Elastin und Kollagen I-V als µm ² /Zelle. 5 Sichtfelder jeder Probe, aufgenommen mit dem cLSM, wurden gemittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte für 3 Proben ± Standardabweichung. (c) Daten der Bioplex/ELISA Analysen des Überstandes zur Untersuchung der Sekretion von Cytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren. Die Daten zeigen die Mittelwerte für 6 Proben ± Standardabweichung. cPnBA04 ist jeweils hellgrau, cPnBA73 dunkelgrau und Glas weiß dargestellt (vgl. [166]).....	72
Abbildung 10: Cokultur-Färbung von Keratinozyten (markiert mit Antikörper gegen Keratin14; grün) und Fibroblasten (markiert mit Antikörper gegen Vimentin; rot) in Cokultur nach 48 h Inkubation auf cPnBA-Proben und Glas. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und sind blau dargestellt. (a) Beispielbilder, aufgenommen mit dem cLSM	

(Maßbalken = 200 µm). (b) Graphik des Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnisses. cPnBA04 ist hellgrau, cPnBA73 dunkelgrau und Glas weiß dargestellt. (c) Graphik der Zellzahlen beider Zelltypen pro cm ² . Der grüne Anteil der Balken entspricht den Keratinozyten und der rote Anteil den Fibroblasten.....	73
Abbildung 11: Durchlichtmikroskopische Bilder der Zellen nach 60 h Inkubation auf AEMA-Proben und Kontrolle zur Darstellung der Zellmorphologie (Maßbalken = 100 µm).....	78
Abbildung 12: Analyse der Keratinozyten- und Fibroblasten-Monokulturen sowie der Cokulturen nach 60 h Inkubation auf AEMA-Proben und TCP. (a) Daten der Lebend/Tot-Färbung (Fluoresceindiacetat/Propidiumiodid; FDA/PI). (b) Daten der durchflusszytometrischen Analyse des gesamten Überstandes (1 ml) zur Untersuchung der Anzahl und Vitalität abgelöster oder nicht-adhärrierter Zellen. (c) Daten der Analyse der Überstände mittels LDH-Assay zur Untersuchung der Membranintegrität. Die high control (HC) entspricht der Freisetzung des LDHs nach Schädigung aller Zellen durch Triton. Die Daten zeigen die Mittelwerte für 3 Proben ± Standardabweichung, schraffierte Anteile der Balken repräsentieren tote Zellen.	81
Abbildung 13: Cokultur-Färbung von Keratinozyten (markiert mit Antikörper gegen Keratin14; grün) und Fibroblasten (markiert mit Antikörper gegen Vimentin; rot) in Cokultur nach 60 h Inkubation auf AEMA-Proben und Kontrollen. (a) Beispielbilder, aufgenommen mit dem cLSM (Maßbalken = 200 µm). (b) Graphik des Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnisses. (c) Graphik der Zellzahlen beider Zelltypen pro cm ² . Der grüne Anteil der Balken entspricht den Keratinozyten und der rote Anteil den Fibroblasten. Die Daten zeigen den Mittelwert von 3 Proben ± Standardabweichung (vgl. [167]).....	82
Abbildung 14: Durchlichtmikroskopische Bilder der Zellen nach 48 h Inkubation auf APMA-Proben und Kontrollen zur Darstellung der Zellmorphologie (Maßbalken = 100 µm).....	84
Abbildung 15: Analyse der Keratinozyten- und Fibroblasten-Monokulturen sowie der Cokulturen nach 48 Stunden Inkubation auf APMA-Proben und Kontrollen. (a) Daten der Lebend/Tot-Färbung (Fluoresceindiacetat/Propidiumiodid; FDA/PI). (b) Daten der durchflusszytometrischen Analyse des gesamten Überstandes (1 ml) zur Untersuchung der Anzahl und Vitalität abgelöster oder nicht-adhärrierter Zellen. (c) Daten der Analyse der Überstände mittels LDH-Assay zur Untersuchung der Membranintegrität. Die high control (HC) entspricht der Freisetzung des LDHs nach Schädigung aller Zellen durch Triton. Die Daten zeigen die Mittelwerte für 3 Proben ± Standardabweichung, schraffierte Anteile der Balken repräsentieren tote Zellen.	87
Abbildung 16: Färbung von Keratinozyten (markiert mit Antikörper gegen Keratin14; grün) und Fibroblasten (markiert mit Antikörper gegen Vimentin; rot) in Cokultur nach 48 h Inkubation auf APMA-Proben und Kontrollen. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 gefärbt und sind blau dargestellt. (a) Beispielbilder, aufgenommen mit dem InCell 2000 (Maßbalken = 200 µm). (b) Graphik des Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnisses. (c) Graphik der Zellzahlen beider Zelltypen pro cm ² . Der grüne Anteil der Balken entspricht den Keratinozyten und der rote Anteil den Fibroblasten. Die Daten zeigen den Mittelwert von 3 Proben ± Standardabweichung.....	88
Abbildung 17: Durchlichtmikroskopische Bilder der Zellen nach 48 h Inkubation auf NaMAS-Proben und Kontrollen zur Darstellung der Zellmorphologie (Maßbalken = 100 µm).....	90

- Abbildung 18: Analyse der Keratinozyten- und Fibroblasten-Monokulturen sowie der Cokulturen nach 48 Stunden Inkubation auf NaMAS-Proben und Kontrollen. (a) Daten der Lebend/Tot-Färbung (Fluoresceindiacetat/Propidiumiodid; FDA/PI). (b) Daten der durchflusszytometrischen Analyse des gesamten Überstandes (1 ml) zur Untersuchung der Anzahl und Vitalität abgelöster oder nicht-adhärierter Zellen. (c) Daten der Analyse der Überstände mittels LDH-Assay zur Untersuchung der Membranintegrität. Die high control (HC) entspricht der Freisetzung des LDHs nach Schädigung aller Zellen durch Triton. Die Daten zeigen die Mittelwerte für 3 Proben \pm Standardabweichung, schraffierte Anteile der Balken repräsentieren tote Zellen.93
- Abbildung 19: Färbung von Keratinozyten (markiert mit Antikörper gegen Keratin14; grün) und Fibroblasten (markiert mit Antikörper gegen Vimentin; rot) in Cokultur nach 48 h Inkubation auf NaMAS-Proben und Kontrollen. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 gefärbt und sind blau dargestellt. (a) Beispielbilder, aufgenommen mit dem InCell 2000 (Maßbalken = 200 μm). (b) Graphik des Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnisses. (c) Graphik der Zellzahlen beider Zelltypen pro cm^2 . Der grüne Anteil der Balken entspricht den Keratinozyten und der rote Anteil den Fibroblasten. Die Daten zeigen den Mittelwert von 3 Proben \pm Standardabweichung.....94
- Abbildung 20: Durchlichtmikroskopische Bilder der Zellen nach 48 h Inkubation auf NVP-Proben und Kontrollen zur Darstellung der Zellmorphologie (Maßbalken = 100 μm).96
- Abbildung 21: Analyse der Keratinozyten- und Fibroblasten-Monokulturen sowie der Cokulturen nach 48 Stunden Inkubation auf NVP-Proben und Kontrollen. (a) Daten der Lebend/Tot-Färbung (Fluoresceindiacetat/Propidiumiodid; FDA/PI). (b) Daten der durchflusszytometrischen Analyse des gesamten Überstandes (1 ml) zur Untersuchung der Anzahl und Vitalität abgelöster oder nicht-adhärierter Zellen. (c) Daten der Analyse der Überstände mittels LDH-Assay zur Untersuchung der Membranintegrität. Die high control (HC) entspricht der Freisetzung des LDHs nach Schädigung aller Zellen durch Triton. Die Daten zeigen die Mittelwerte für 3 Proben \pm Standardabweichung, schraffierte Anteile der Balken repräsentieren tote Zellen.100
- Abbildung 22: Cokultur-Färbung von Keratinozyten (markiert mit Antikörper gegen Keratin14; grün) und Fibroblasten (markiert mit Antikörper gegen Vimentin; rot) in Cokultur nach 48 h Inkubation auf NVP-Proben und Kontrollen. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 gefärbt und sind blau dargestellt. (a) Beispielbilder, aufgenommen mit dem InCell 2000 (Maßbalken = 200 μm). (b) Graphik des Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnisses. (c) Graphik der Zellzahlen beider Zelltypen pro cm^2 . Der grüne Anteil der Balken entspricht den Keratinozyten und der rote Anteil den Fibroblasten. Die Daten zeigen den Mittelwert von 3 Proben \pm Standardabweichung.101
- Abbildung 23: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der cPnBA-Proben nach 48 h Inkubation mit Medium und Zellen (Cokultur). Wahrscheinlich führte die Quellung der Polymernetzwerke und die anschließende Entwässerung und Schrumpfung während der Präparation zu der sichtbaren gewellten Morphologie der Zellen. (a) Maßbalken = 100 μm , (b) Maßbalken = 50 μm (Aufnahmen durch Y. Pieper).....104
- Abbildung 24: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der NVP-enthaltenden Copolymere. (a) Unbehandelte Copolymere in trockenem Zustand, Maßbalken = 5 μm . Copolymere nach 48 h Inkubation mit Medium und Zellen und Präparation, (b) Bereich ohne Zellen, Maßbalken = 5 μm und (c) geringer vergrößerter Bereich mit cokultivierten Zellen, Maßbalken = 100 μm (Aufnahmen durch Y. Pieper).104

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenstellung von Studien zur Beeinflussung verschiedener Zelltypen durch die Substratelastizität, aufsteigend geordnet nach Erscheinungsjahr.....	25
Tabelle 2: Zusammenstellung von Studien zur Beeinflussung verschiedener Zelltypen durch Polymeroberflächen mit hauptsächlich unterschiedlichen Oberflächenladungen, variablen Ladungen und gleichzeitig unterschiedlichen Benetzbarkeiten, sowie hauptsächlich unterschiedlicher Benetzbarkeit, aufsteigend geordnet nach Erscheinungsjahr.....	27
Tabelle 3: Zusammenstellung von Studien zur Interaktion von Keratinozyten bzw. Fibroblasten mit verschiedenen Polymeren.	41
Tabelle 4: Charakterisierungsdaten der cPnBA-Netzwerke, modifiziert nach [18,27,67].	66
Tabelle 5: Daten der Oberflächencharakterisierung der cPnBA-Netzwerke, modifiziert nach [18,27,67].....	66
Tabelle 6: Dichte adhärenter lebender Keratinozyten (d_{vital}), toter Keratinozyten (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), sowie die Fläche abgelagerter ECM-Komponenten pro Zelle und Konzentrationen sekretierter Faktoren nach 48 h Inkubation auf cPnBA04, cPnBA73 und Glasdeckgläschen als Kontrolle. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$ bzw. $n=6$ für sekretierte Faktoren; *: $p<0,05$ gegenüber Glas, **: $p<0,01$ gegenüber Glas, ***: $p<0,005$ gegenüber Glas; §: $p<0,05$ gegenüber cPnBA04, §§: $p<0,01$ gegenüber cPnBA04; §§§: $p<0,005$ gegenüber cPnBA04).....	69
Tabelle 7: Dichte adhärenter lebender Fibroblasten (d_{vital}), toter Fibroblasten (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), sowie die Fläche abgelagerter ECM-Komponenten pro Zelle und Konzentrationen sekretierter Faktoren nach 48 h Inkubation auf cPnBA04, cPnBA73 und Glasdeckgläschen als Kontrolle. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$ bzw. $n=6$ für sekretierte Faktoren; *: $p<0,05$ gegenüber Glas, **: $p<0,01$ gegenüber Glas; §: $p<0,05$ gegenüber cPnBA04, §§: $p<0,01$ gegenüber cPnBA04).....	70
Tabelle 8: Dichte adhärenter lebender kokultivierter Keratinozyten und Fibroblasten (d_{vital}), toter Zellen (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Keratinozyten/Fibroblasten-Ratio ($\text{Ratio}_{\text{Ker/Fib}}$) und die Zelldichte der Keratinozyten (d_{Ker}), der Fibroblasten (d_{Fib}) und der Gesamtzelldichte (d_{Co}) in der Kokultur, sowie die Fläche abgelagerter ECM-Komponenten pro Zelle und Konzentrationen sekretierter Faktoren nach 48 h Inkubation auf cPnBA04, cPnBA73 und Glasdeckgläschen als Kontrolle. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$ bzw. $n=6$ für sekretierte Faktoren; *: $p<0,05$ gegenüber Glas, **: $p<0,01$ gegenüber Glas, ***: $p<0,005$ gegenüber Glas; §: $p<0,05$ gegenüber cPnBA04).....	71
Tabelle 9: Charakterisierungsdaten der Polymerpulver, zur Verfügung gestellt durch die Abteilungen PBA, PBI und PBS und modifiziert von [140,141]......	75
Tabelle 10: Charakterisierungsdaten der Chips, zur Verfügung gestellt durch die Abteilungen PBA, PBI und PBS und modifiziert von [140,141]......	76
Tabelle 11: Dichte adhärenter lebender Keratinozyten (d_{vital}), toter Keratinozyten (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärirter lebender Keratinozyten (z_{vital}), toter Keratinozyten (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml sowie die Absorption im LDH-Assay nach 60 h Inkubation für AEMA-Proben und TCP (vgl. [167]). (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$; §: $p<0,05$ gegenüber AEMA 0,5).	79
Tabelle 12: Dichte adhärenter lebender Fibroblasten (d_{vital}), toter Fibroblasten (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärirter lebender Fibroblasten (z_{vital}), toter	

Fibroblasten (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml sowie die Absorption im LDH-Assay nach 60 h Inkubation für AEMA-Proben und TCP (vgl. [167]).	79
Tabelle 13: Dichte adhärenter lebender kokultivierter Keratinozyten und Fibroblasten (d_{vital}), toter Zellen (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärer lebender Zellen (z_{vital}), toter Zellen (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml, die Absorption im LDH-Assay sowie des Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnisses ($\text{Ratio}_{\text{Ker/Fib}}$) und die Zelldichte der Keratinozyten (d_{Ker}), der Fibroblasten (d_{Fib}) und der Gesamtzelldichte (d_{Co}) in der Kokultur nach 60 h Inkubation für AEMA-Proben und TCP (vgl. [167]). (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$; #: $p<0,05$ gegenüber TCP; ###: $p<0,005$ gegenüber TCP; &&: $p<0,01$ gegenüber AEMA 1, \$\$\$: $p<0,005$ gegenüber AEMA 0,5).	80
Tabelle 14: Dichte adhärenter lebender Keratinozyten (d_{vital}), toter Keratinozyten (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärer lebender Keratinozyten (z_{vital}), toter Keratinozyten (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml sowie die Absorption im LDH-Assay nach 48 h Inkubation auf APMA-Proben und Kontrollen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$; #: $p<0,05$ gegenüber TCP, ##: $p<0,01$ gegenüber TCP).	85
Tabelle 15: Dichte adhärenter lebender Fibroblasten (d_{vital}), toter Fibroblasten (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärer lebender Fibroblasten (z_{vital}), toter Fibroblasten (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml sowie die Absorption im LDH-Assay nach 48 h Inkubation für APMA-Proben und Kontrollen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$; *: $p<0,05$ gegenüber PAN; #: $p<0,05$ gegenüber TCP).	85
Tabelle 16: Dichte adhärenter lebender kokultivierter Keratinozyten und Fibroblasten (d_{vital}), toter Zellen (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärer lebender Zellen (z_{vital}), toter Zellen (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml, die Absorption im LDH-Assay sowie das Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnisses ($\text{Ratio}_{\text{Ker/Fib}}$) und die Zelldichte der Keratinozyten (d_{Ker}), der Fibroblasten (d_{Fib}) und der Gesamtzelldichte (d_{Co}) in der Kokultur nach 48 h Inkubation für APMA-Proben und Kontrollen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$; *: $p<0,05$ gegenüber PAN; **: $p<0,01$ gegenüber PAN; #: $p<0,05$ gegenüber TCP).	86
Tabelle 17: Dichte adhärenter lebender Keratinozyten (d_{vital}), toter Keratinozyten (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärer lebender Keratinozyten (z_{vital}), toter Keratinozyten (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml sowie die Absorption im LDH-Assay nach 48 h Inkubation für NaMAS-Proben und Kontrollen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$; \$: $p<0,05$ gegenüber NaMAS 0,5; \$\$: $p<0,01$ gegenüber NaMAS 0,5).	91
Tabelle 18: Dichte adhärenter lebender Fibroblasten (d_{vital}), toter Fibroblasten (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärer lebender Fibroblasten (z_{vital}), toter Fibroblasten (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml sowie die Absorption im LDH-Assay nach 48 h Inkubation für NaMAS-Proben und Kontrollen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$).	91
Tabelle 19: Dichte adhärenter lebender kokultivierter Keratinozyten und Fibroblasten (d_{vital}), toter Zellen (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärer lebender Zellen (z_{vital}), toter Zellen (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml, die Absorption im LDH-Assay sowie das Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnis ($\text{Ratio}_{\text{Ker/Fib}}$) und die Zelldichte der Keratinozyten (d_{Ker}), der Fibroblasten (d_{Fib}) und der Gesamtzelldichte (d_{Co}) in der Kokultur nach 48 h Inkubation für NaMAS-Proben und Kontrollen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$; ##: $p<0,01$ gegenüber TCP, \$:	

p<0,05 gegenüber NaMAS 0,5; \$\$: p<0,01 gegenüber NaMAS 0,5; &: p<0,05 gegenüber NaMAS 1; &&: p<0,01 gegenüber NaMAS 1; &&&: p<0,005 gegenüber NaMAS 1).92

Tabelle 20: Dichte adhärenter lebender Keratinozyten (d_{vital}), toter Keratinozyten (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärrierter lebender Keratinozyten (z_{vital}), toter Keratinozyten (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml sowie die Absorption im LDH-Assay nach 48 h Inkubation für NVP-Proben und Kontrollen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=3; \$: p<0,05 gegenüber NVP 30; \$\$: p<0,01 gegenüber NVP 30; \$\$\$ p<0,005 gegenüber NVP 30; &: p<0,05 gegenüber NVP 5; &&: p<0,01 gegenüber NVP 5, °: p<0,05 gegenüber NVP 10, °°: p<0,01 gegenüber NVP10).97

Tabelle 21: Dichte adhärenter lebender Fibroblasten (d_{vital}), toter Fibroblasten (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärrierter lebender Fibroblasten (z_{vital}), toter Fibroblasten (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml sowie die Absorption im LDH-Assay nach 48 h Inkubation für NVP-Proben und Kontrollen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=3; *: p<0,05 gegenüber PAN, #: p<0,05 gegenüber TCP; \$: p<0,05 gegenüber NVP 30; \$\$\$ p<0,005 gegenüber NVP 30).98

Tabelle 22: Dichte adhärenter lebender kokultivierter Keratinozyten und Fibroblasten (d_{vital}), toter Zellen (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärrierter lebender Zellen (z_{vital}), toter Zellen (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml, die Absorption im LDH-Assay sowie das Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnis ($Ratio_{Ker/Fib}$), die Zelldichte der Keratinozyten (d_{Ker}), der Fibroblasten (d_{Fib}) und der Gesamtzelldichte (d_{Co}) in der Kokultur nach 48 h Inkubation für NVP-Proben und Kontrollen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=3; *: p<0,05 gegenüber PAN; \$: p<0,05 gegenüber NVP 30; \$\$: p<0,01 gegenüber NVP 30; \$\$\$ p<0,005 gegenüber NVP 30).99

4 Zusammenfassung

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften von Polymeren können verschiedene Zelltypen unterschiedlich beeinflussen. Dabei können beispielsweise Adhärenz, Vitalität, Phänotyp oder Funktionalität der Zellen reguliert werden. Die Elastizität eines Polymers beeinflusst vor allem, welche Zugkräfte eine Zelle gegenüber ihrem Substrat entwickeln kann. Je nach Zelltyp wird dann das Zellverhalten über intrazelluläre Rückkopplungsmechanismen reguliert. Die Oberflächenladung und/oder Hydrophilie eines Polymers beeinflusst über elektrostatische und ionische Interaktionen, sowie Wasserstoffbrücken- und intermolekulare Bindungen zunächst die Adsorption von Ionen, Proteinen und anderen Molekülen. Vor allem über die Zusammensetzung, Dichte und Konformation der adsorbierten Komponenten werden anschließend die Wechselwirkungen mit den Zellen vermittelt. Des Weiteren können verschiedene Zelltypen unterschiedliche membranassoziierte Proteine, Zucker und Lipide aufweisen, so dass Polymereigenschaften zellspezifische Effekte bewirken können.

Für biotechnologische Anwendungen und für den Einsatz in der regenerativen Medizin gewinnen Polymere, die spezifische Zellreaktionen regulieren können, immer weiter an Bedeutung. Die Isolierung und Kultur von primären Keratinozyten ist noch immer anspruchsvoll und die adäquate Heilung von Hautwunden stellt eine fortwährende medizinische Herausforderung dar. Ein Polymer, das eine bevorzugte Adhärenz von Keratinozyten bei gleichzeitig verminderter Anheftung dermalen Fibroblasten ermöglicht, würde erhebliche Vorteile sowohl für den Einsatz in der Keratinozyten-Zellkultur, als auch als Wundauflage bieten. In einer früheren Studie konnte bereits ein zellselektiver Effekt eines Polymers für eine humane Keratinozyten-Zelllinie gegenüber humanen Fibroblasten gezeigt werden.

Um den potentiell spezifischen Einfluss bestimmter Polymereigenschaften auf Keratinozyten und dermale Fibroblasten zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Zellkultursystem für die Mono- und Cokultur beider Zelltypen entwickelt. Es wurden primäre Zellen verwendet, da diese das Verhalten der Zellen *in vivo* besser widerspiegeln und damit eine höhere Relevanz für spätere Anwendungen haben. Für das System wurde ein kommerzielles Zellkulturmedium gewählt, das für die Proliferation von Keratinozyten konzipiert ist, in dem jedoch auch die Fibroblasten vergleichbar gut proliferieren konnten. Um die Variabilität des Testsystems gering zu halten, enthielt das Medium weder Serum noch andere undefinierte Zusätze und die Zellen wurden von einem kommerziellen

Anbieter erworben. Das Testsystem wurde als Screening konzipiert, um den Einfluss unterschiedlicher Polymereigenschaften in mehreren Abstufungen auf die Zellen zu untersuchen. Hierfür wurde der Umfang der Untersuchungsparameter auf folgende beschränkt: 1. Vitalität und Dichte der adhärenen und nicht-adhärenen Zellen in Mono- und Cokultur, 2. eventuelle Schädigung der Zellmembran, sowie 3. die selektive Adhärenz von Keratinozyten in der Cokultur durch die spezifische immunzytochemische Färbung von Keratin14 und Vimentin. Für die Polymere mit variabler Elastizität wurden, aufgrund ihrer potentiellen Eignung als Wundauflage, zusätzlich die Ablagerung extrazellulärer Matrixkomponenten, sowie die Sekretion löslicher Faktoren durch die Zellen untersucht.

Die zu untersuchenden Polymere mit Abstufungen bestimmter Eigenschaften wurden durch die Abteilungen PBA, PBI und PBS des Helmholtz-Zentrums Geesthacht zur Verfügung gestellt. Als Modellpolymere für die Variation der Elastizität wurden vernetzte Poly(*n*-butylacrylate) (cP*n*BA) verwendet, da deren Elastizität durch den Anteil des Vernetzers eingestellt werden kann. Auf dem weniger elastischen cP*n*BA zeigte sich in der Cokultur ein doppelt so hohes Verhältnis von Keratinozyten zu Fibroblasten wie auf dem elastischeren cP*n*BA, so dass ein leichter zellselektiver Effekt angenommen werden kann. Acrylnitril-basierte Copolymere wurden als Modellpolymere für die Variation der Oberflächenladung und Hydrophilie verwendet, da die Eigenschaften durch Art und molaren Anteil des Comonomers eingestellt werden können. Durch die Variation des molaren Anteils der Comonomere mit positiver bzw. negativer Ladung, Methacrylsäure-2-aminoethylester-hydrochlorid (AEMA) und N-3-Aminopropyl-methacrylamid-hydrochlorid (APMA) bzw. Natriumsalz der 2-Methyl-2-propen-1-sulfonsäure (NaMAS), wurde der Anteil der positiven bzw. negativen Ladung im Copolymer modifiziert. Durch die Erhöhung des molaren Anteils des hydrophilen Comonomers N-Vinylpyrrolidon (NVP) wurde die Hydrophilie des Copolymers gesteigert. Die zunehmende Erhöhung des molaren Anteils an positiv geladenem Comonomer AEMA im Copolymer führte tendenziell zu einer höheren Dichte adhärenen Keratinozyten, wobei die Fibroblastendichte unverändert blieb. Unabhängig vom eingeführten molaren Anteil des positiv geladenen Comonomers APMA in die Copolymere, zeigte sich eine relativ gute Adhärenz der Keratinozyten und Fibroblasten. Unterschiede in der Dichte oder Vitalität der Zellen, oder eine selektive Anheftung von Keratinozyten traten nicht auf. Durch die stufenweise Erhöhung des molaren Anteils des negativ geladenen Comonomers NaMAS konnte, wie im Falle von AEMA, eine Tendenz der verbesserten Keratinozytenadhärenz beobachtet werden. Die

Steigerung der Hydrophilie der Copolymere führte sowohl für Keratinozyten als auch für Fibroblasten zu einer reduzierten Adhärenz und Vitalität.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde somit ein Testverfahren etabliert, das die Untersuchung von primären humanen Keratinozyten und primären humanen Fibroblasten in Monokultur und Cokultur auf verschiedenen Polymeren ermöglicht. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass sich durch die gezielte Modifizierung verschiedener Polymereigenschaften die Adhärenz und Vitalität beider Zelltypen beeinflussen lässt. Die Reduktion der Elastizität sowie die Erhöhung des molaren Anteils geladener Comonomere führten zu einer Zunahme der Keratinozytenadhärenz. Da die Fibroblasten davon unbeeinflusst blieben, zeigte sich für einige der untersuchten Polymere (z.B. für das Copolymer mit 2 mol-% NaMAS) eine leichte Zellselektivität. Diese könnte durch die weitere Erhöhung der Steifigkeit oder des Anteils geladener Comonomere möglicherweise weiter gesteigert werden.

5 Summary

The chemical and physical properties of polymers can influence the adherence, viability, phenotype or functionality of various cell types. For instance, the elasticity of a polymer can influence, which pulling force a cell can generate towards a substrate. According to the cell type, its behavior can be controlled by intracellular feedback mechanisms. The surface charge and/or hydrophilicity of a polymer initially influence the adsorption of ions, proteins and other molecules by electrostatic and ionic interaction, as well as hydrogen- and intermolecular bonds. In particular, the composition, density, and conformation of the adsorbed components mediate the cell-material interactions. Since different cell types present varying cell membrane associated proteins, sugars and lipids, it is assumed that the polymer properties can induce cell specific effects.

Polymers, which can regulate specific cell reactions, become more and more important for biotechnological uses and applications in the regenerative medicine. The isolation and culture of primary keratinocytes is still challenging and an adequate wound healing remains a clinical task. A polymer, which enables a preferential adherence of keratinocytes and induces a reduced adherence of dermal fibroblasts, would provide enormous advantages for keratinocyte culture systems as well as for wound dressings. In a previous study, a cell selective effect for a human keratinocyte cell line in contrast to fibroblasts was demonstrated.

To investigate the specific influence of certain polymer properties on keratinocytes and fibroblasts, a cell culture system for mono- and coculture of both cell types was established. Primary human cells were used, since they better reflect the behavior of the cells *in vivo* and, therefore, have a higher relevance for later applications. A cell culture medium was chosen, which is designed for keratinocyte proliferation, but supports the proliferation of fibroblasts in a comparable manner. To reduce the variability of the cell culture system, the medium was supplemented neither with serum nor other undefined components and the primary cells were purchased from a commercial supplier.

The test system was designed as a screening to investigate the influence of polymers with gradations of different properties on the cells. Thereby, the viability and density of adherent and not adhered cells, as well as the impairment of the cell membranes were analyzed in mono- and cocultures, and the selective adherence of keratinocytes in the coculture was evaluated using a specific immunocytochemical staining for keratin14 and vimentin. Furthermore, the deposition of extracellular matrix components and the secretion

of soluble factors were analyzed for the elastic polymers, due to their potential applicability as wound dressing.

The candidate polymers with gradations of properties were provided by the departments PBA, PBI and PBS of the Helmholtz-Zentrum Geesthacht. Since the elasticity of crosslinked poly(*n*-butylacrylate) (cP*n*BA) networks can be adjusted by the ratio of the crosslinker, they were used as model polymers to investigate the influence of varying elasticity to the cells. On the less elastic cP*n*BA, the ratio of keratinocytes to fibroblasts was increased compared to the more elastic one. From these results, a slight cell selective effect can be assumed. Acrylonitrile-based copolymers were used as model polymers for the variation of surface charge and hydrophilicity, since their properties can be modified by the type and amount of comonomers. By the variation of the molar ratio of positively charged comonomers (Methacrylic acid-2-aminoethylester hydrochloride (AEMA) and N-3-aminopropyl methacrylamide hydrochloride (APMA)), or a negatively charged comonomer (2-methyl-2-propene-1-sulfonic acid sodium salt (NaMAS)), the amount of positive or negative charges was modified. The hydrophilicity was increased by the molar ratio of the hydrophilic comonomer N-vinylpyrrolidone (NVP).

With an increased molar ratio of the positively charged comonomer AEMA, a tendency towards a higher density of adherent keratinocytes could be shown, whereby, the density of adherent fibroblasts remained unaffected. Independently from the introduced molar ratio of the positively charged comonomer APMA, a good keratinocyte and fibroblast adhesion was found. Neither differences between cell densities or viability, nor a selective adherence of keratinocytes were detectable. Comparable to AEMA, a tendency towards improved keratinocyte adhesion could be shown with an increasing molar ratio of the negatively charged comonomer NaMAS. The increase of the hydrophilicity of the copolymers led to a reduced adherence and viability of the keratinocytes, as well as of the fibroblasts.

In conclusion, a test system was established, which enables the evaluation of primary human keratinocytes and fibroblasts in contact with different polymers in monoculture, as well as in coculture. Furthermore, the present thesis shows that directed modifications of polymer properties influence the adherence and viability of both cell types. The decrease of elasticity and the increase of the molar ratio of charged comonomers led to an increased keratinocyte adherence. Since the fibroblasts remained unaffected, slight cell selectivity was shown (e.g. on the copolymer with 2 mol-% NaMAS). By further increasing the stiffness or the amount of charged comonomers, further enhancement of this effect might be possible.

6 Einleitung und Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Testsystem für die Untersuchung der Effekte von Polymereigenschaften auf Keratinozyten und Fibroblasten etabliert. Die Auswahl von Polymeren für den potentiellen Einsatz als Zellkultursubstrat für die Kultivierung von Keratinozyten oder für medizinische Anwendungen im Bereich der Wundheilung könnte dadurch optimiert werden. In den folgenden Kapiteln der Einleitung werden zunächst Grundlagen zu Polymeren, deren Wechselwirkungen mit Zellen, dem Aufbau der Haut und zur Wundheilung, sowie zur Keratinozyten- und Fibroblastenkultivierung dargestellt.

6.1 Polymere für biologische, biotechnologische und medizinische Anwendungen

Polymeren kommt für biologische, biotechnologische und medizinische Anwendungen eine große Bedeutung zu. Dabei ist besonders vorteilhaft, dass die Polymereigenschaften durch die Synthese, Prozessierung oder Oberflächenmodifikationen für bestimmte Anwendungen bezüglich bestimmter Parameter angepasst werden können [112,142]. Vor allem durch die Kombination verschiedener Monomere zu Copolymeren und von Polymeren zu Blends oder Compositen können Eigenschaften, z.B. die Stabilität [125], optimiert werden. Durch die passenden Eigenschaften können auch Zellen aktiv kontrolliert bzw. stimuliert werden und bei medizinischen Anwendungen passende Umgebungsbedingungen geschaffen werden, die eine induzierte Autoregeneration und somit eine schnelle und kontrollierte Heilung ermöglichen [142,146,185]. Durch den Einsatz natürlicher (auch biomimetischer, z.B. kollagenbasierter) Polymere kann meist eine gute Gewebeerträglichkeit erreicht werden, da diese natürlich im Körper vorkommen. Wie bei allen Substanzen, die extern in den Körper eingebracht werden, kann es trotzdem zu inflammatorischen und immunologischen Reaktionen kommen [4,10] und es besteht zusätzlich das Risiko der Übertragung von Pathogenen [69,102,133]. Durch die entsprechende Auswahl kontrollierter Donor-Tierherden, Modifikationen oder bestimmter Präparationen kann das Risiko minimiert werden [12,69], jedoch könnten durch den Einsatz synthetischer Polymere Aufwand und Kosten für solche Präparationen reduziert und das Risiko einer Pathogenübertragung komplett vermieden werden [101].

Polymere, die für biologische oder medizinische Zwecke hergestellt werden, sollten besondere Kriterien erfüllen. So müssen sie neben der Keimfreiheit (Sterilität) eine besondere Reinheit („medical grade“) aufweisen, d.h. möglichst geringe Mengen an nicht-polymerisierten Monomeren (Restmonomeren), Lösungsmitteln und anderen Additiven

sowie mikrobiellen Produkten wie z.B. Endotoxinen (Lipopolysaccharide von Bakterien) enthalten, da diese die Verträglichkeit gegenüber Zellen des umliegenden Gewebes negativ beeinflussen können [7,58,113].

Um den Nachweis für die Reinheit, die gewünschte Zusammensetzung sowie die passenden Eigenschaften zu erbringen und somit z.B. die Nutzbarkeit des Polymers für eine geplante Anwendung abzuschätzen, können die Polymereigenschaften durch verschiedenste Methoden charakterisiert werden [26]. Im Folgenden werden die für die vorliegende Arbeit relevanten Messparameter und Methoden kurz benannt. Der Anteil an Restmonomeren oder verbliebenen Lösungsmitteln eines Polymers kann z.B. durch Infrarot (IR)- und Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie oder durch Gas-Flüssigkeits-Chromatographie sowie Thermogravimetrie (TGA) durch Bestimmung der Restmasse überprüft werden. Die reale Einbaurate von Comonomeren in Copolymere, die sich aufgrund der Reaktionskinetiken vom eingesetzten molaren Anteil unterscheiden kann, kann durch Elementaranalysen und durch Berechnungen aus NMR-Analysen abgeschätzt werden. Die Molmassenverteilung kann mittels Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) analysiert werden. Daraus lassen sich beispielsweise das Zahlenmittel der Molmasse (M_n) und die Polydispersität (Maß für die Molmassenverteilung) berechnen. Dies bietet beispielsweise Rückschlüsse auf mechanische Eigenschaften eines Polymers. Der Elastizitätsmodul (E) kann durch Zugtestungen und Mikroindentationsmethoden mittels AFM ermittelt werden. Zur Bestimmung der thermischen Eigenschaften, z.B. der Glasübergangstemperatur (T_g), kann die dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) verwendet werden. Daraus kann beispielsweise die Verarbeitbarkeit des Polymers oder die Formstabilität abgeschätzt werden. Die Verteilung von Comonomeren an der Oberfläche kann z.B. durch RAMAN- und IR-Mikroskopie bestimmt werden. Bei vernetzten Polymeren kann der Quellungsgrad (Q) eines Polymers in verschiedenen Flüssigkeiten zur Bestimmung des Vernetzungsgrades herangezogen werden und wird durch Wiegen des Polymers mit und ohne Quellungsmedium gemessen. Für nicht-vernetzte Polymere können daraus z.B. Rückschlüsse auf die Interaktion zwischen Polymer und den Ionen und Molekülen des Quellungsmediums gezogen werden. Die topografischen Eigenschaften der Oberfläche können durch optische Profilometrie, mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) oder Rasterelektronenmikroskop (REM) beurteilt werden. Aus den Daten kann beispielsweise die quadratische Rauigkeit (R_q) berechnet werden. Durch die Strömungspotentialmessung können das Zeta-Potential (ζ) und der isoelektrische Punkt (IEP) bestimmt werden. Die Benetzbarkeit als Maß für die Hydrophilie kann durch

Kontaktwinkelmessungen in Wasser ermittelt werden. Dabei eignet sich vor allem die „captive bubble“- gegenüber der „sessile drop“-Methode zur Untersuchung von quellenden und damit hydrophilen Polymeren, oder solchen, die für den Einsatz in wässrigen Systemen geplant sind. Die letztgenannten Parameter haben u.a. Einfluss auf die Adsorption von Ionen und Molekülen an die Polymeroberfläche.

Zur Bestimmung der Biokompatibilität (d.h. mindestens die Fähigkeit eines Materials eine für die jeweilige Anwendung angemessene Reaktion des Organismus zu bewirken bzw. die Abwesenheit toxischer oder schädigender Effekte auf biologische Systeme [185]) können verschiedene Tests eingesetzt werden. Zur Untersuchung der Zellkompatibilität bzw. Zytotoxizität werden indirekte Testungen, z.B. Eluattestung, zur Erfassung der Reaktion der Zellen auf lösliche Substanzen oder Abbauprodukte, sowie direkte Testungen zur Untersuchung von Adhärenz und Verhalten der Zellen (unter oder auf dem Material ausgesät), verwendet. Meist werden dafür Zelllinien eingesetzt und die Zelladhärenz, Morphologie, Proliferation, Zelltod, oder Stoffwechsellleistungen werden als Beurteilungskriterien herangezogen [142]. Die ISO-Normen 10993-12 und 10993-5 geben Richtlinien für die Testung von Materialien vor [33,34]. Um den Endotoxingehalt von Polymeren zu bestimmen, der den von der FDA festgelegten Grenzwert von 0,5 EU/ml [58] nicht überschreiten sollte, kann beispielsweise der Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Assay verwendet werden. Dieser basiert auf der Endotoxin-vermittelten Aktivierung eines Proenzym, welches in seiner aktiven Form durch eine Farbumschlagsreaktion nachgewiesen werden kann. Zur Abschätzung der Immunokompatibilität kann die Reaktion verschiedener Immunzellen auf das Polymer getestet werden [134].

6.1.1 Polymere für die Kultivierung von Zellen

Adhärente bzw. adhäsionsabhängige Zellen („anchorage-dependent cells“), im Gegensatz zu Suspensionszellen („anchorage-independent cells“), benötigen ein Substrat bzw. eine Oberfläche, auf der sie adäquat adhärieren, sich ausbreiten und proliferieren können [158]. Zunächst wurde Glas als Zellkultursubstrat verwendet, da es gute optische Eigenschaften besitzt, sterilisierbar und verfügbar war, sowie eine relativ gute Zelladhärenz ermöglichte [43]. Später wurden zunehmend Polystyrol-Zellkulturgefäße aufgrund der guten optischen Eigenschaften sowie der reproduzierbaren und kostengünstigen Herstellung als Einwegartikel verwendet. Unbehandeltes Polystyrol bietet keine optimale Oberfläche für die Zelladhärenz und -Proliferation, daher werden polystyrolbasierte Zellkultursubstrate

durch γ -Bestrahlung, chemisch oder durch Gasentladungen (Plasma, „electric discharge“, „corona discharge“) behandelt [3,43] und dann als zellkulturbehandeltes Polystyrol bezeichnet. Je nach Modifizierung kann es zu Qualitätsunterschieden kommen und Zellkultursubstrate mit speziellen Modifikationen werden für bestimmte Zelltypen beworben (z.B. Becton Dickinson GmbH: PureCoat-Zellkultursubstrate). Neben Polystyrol werden auch andere Polymere (z.B. Polytetrafluorethylen, Polycarbonate und Polyethylenterephthalat) als Zellkultursubstrat verwendet (siehe Abbildung 1). Je nach Adhärenzeigenschaften, Zelltyp und Kulturbedingungen (z.B. serumfrei) ist die Beschichtung des Zellkultursubstrates mit Extrazellulärmatrix (ECM) Komponenten oder auch Feederlayern notwendig, um eine adäquate Anheftung und Proliferation zu gewährleisten [43]. Letztlich muss das passende Substrat jeweils entsprechend der gewünschten Anwendung ausgewählt werden.

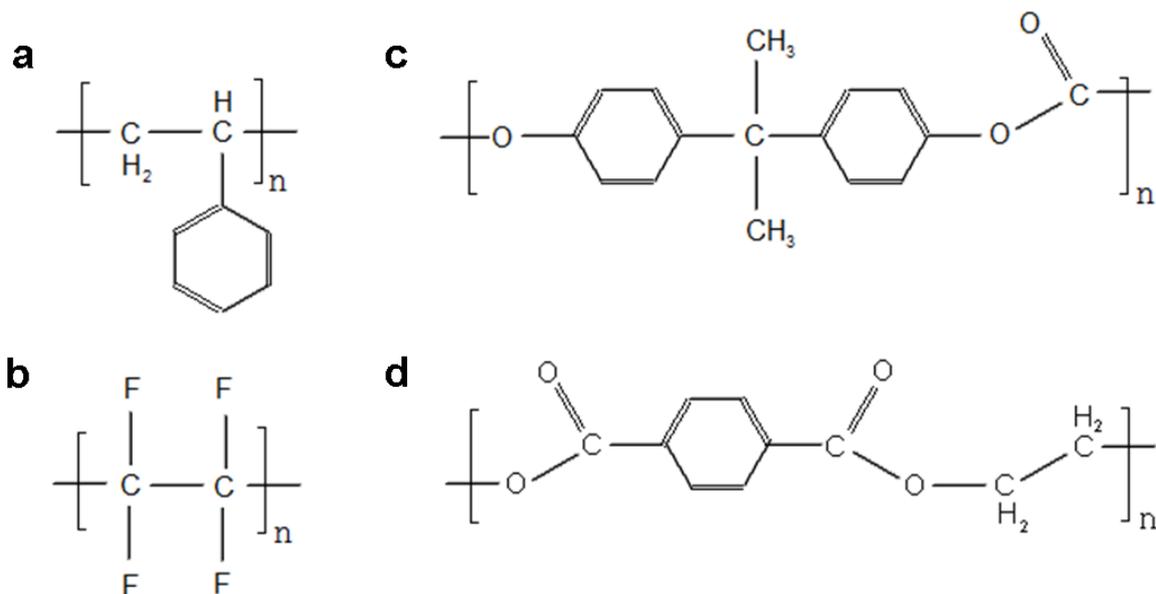


Abbildung 1: Strukturformeln ausgewählter Polymere, die für die Zellkultur verwendet werden: (a) Polystyrol (PS), (b) Polytetrafluorethylen (PTFE), (c) Polycarbonat (PC) und (d) Polyethylenterephthalat (PET).

6.1.2 Zell-Polymer Interaktionen

Die Interaktionen von Polymeren *in vitro* bzw. von Implantaten *in vivo* mit wässrigen Systemen, Proteinen und Zellen sind sehr komplex [133]. Zunächst bildet sich innerhalb von Nanosekunden eine Wasserhülle auf oder um das Polymer. Anschließend lagern sich in Sekunden bis Minuten Proteine und andere Moleküle, die im Zellkulturmedium *in vitro* oder der Gewebeflüssigkeit bzw. im Blut *in vivo* vorhanden sind, an die Polymeroberfläche an. Diese Adsorption wird durch die chemischen und physikalischen Oberflächeneigenschaften des Polymers beeinflusst [133]. Verschiedene Proteine

konkurrieren um Bindungen, und umfassende Adsorptions-, Desorptions-, Umlagerungs- und Konformationsänderungsprozesse finden statt [31]. Dabei können Aminosäurereste zugänglich werden und für Wechselwirkungen zur Verfügung stehen. Diese Prozesse werden z.B. durch elektrostatische Kräfte oder hydrophobe Effekte beeinflusst [133]. Nach einiger Zeit wird eine Gleichgewichtssituation erreicht, nachdem zuerst die mengenmäßig überwiegenden kleinen Proteine adsorbieren, da diese schneller an die Oberfläche transportiert werden, dann aber durch größere Proteine mit höherer Affinität ersetzt werden („Vroman Effekt“ [174]). Die oberflächengebundenen Proteine vermitteln dann innerhalb von Stunden oder Tagen die Zelladhärenz. Dabei spielen die Art der angelagerten Proteine, deren Menge, Mischung, Konformation und Orientierung eine Rolle, um die entsprechende Interaktion mit den Zellrezeptoren zu ermöglichen [133]. Die beteiligten Membranrezeptoren sind v.a. Integrine, die spezifisch bestimmte Peptidsequenzen binden. Integrine sind eine Superfamilie von über 20 Transmembranheterodimeren, die aus nicht-kovalent verbundenen α - und β -Untereinheiten bestehen [55]. Ihr extrazellulärer Anteil interagiert je nach Kombination der Untereinheiten ligandenspezifisch mit bestimmten Domänen von ECM-Komponenten, wie Fibronectin, Vitronectin und Laminin oder zelladhäsiven Proteinen. Der intrazelluläre Anteil ist über Adapterproteine, wie z.B. Vinkulin mit Zytoskelettbestandteilen (meist Aktin) und Signalmolekülen, z.B. FAK („focal adhesion kinase“), verbunden. Dadurch ist eine Signalweiterleitung und Rückkopplung von Substratinformationen möglich [55]. Oberflächeneigenschaften können somit über die adsorbierten Moleküle an Zellen vermittelt werden und so das Zellverhalten, z.B. Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung, beeinflussen. Integrine sind vor allem an den Zell-Fortsätzen lokalisiert und dort mit dem Zytoskelett verankert, so dass die Zellen ihre Umgebung darüber wahrnehmen können [35,55]. Die Zellfortsätze können zurückgezogen werden, wenn keine Adhärenz möglich ist. Wenn eine passende Bindungsstelle gefunden wurde, entsteht ein Rückkopplungssignal, dass mehr Adhäsionsmoleküle an der entsprechenden Stelle lokalisiert werden können - es bilden sich fokale Adhäsionen. Durch Kraftübertragungen kann die Zelle dann auch auf dem Substrat migrieren [159]. Ist keine Adhäsion auf der Oberfläche möglich, führt dies bei adhäsionsabhängigen Zellen zum Zelltod [45]. Andererseits können die Zellen bei zu starker Anheftung an das Substrat nicht mehr migrieren und proliferieren und sterben ebenfalls [133]. Demzufolge ist eine moderate Adhärenz für die Kultivierung von Zellen wünschenswert. Je nach Oberflächeneigenschaften des Substrates und den Adhärenzmöglichkeiten nimmt die Zelle auch eine bestimmte Morphologie an [42]. Diese

wird hauptsächlich durch Adhäsionspunkte und das Zytoskelett bestimmt. Dementsprechend können Lokalisation, Dichte und Häufigkeit von Zytoskelettfasern und Adhäsionsmolekülen – meist visualisiert durch Immunfärbungen - zur Beurteilung der Stärke der Zelladhärenz auf Polymeren herangezogen werden.

Die Zusammensetzung und Dichte membranassoziierter Proteine, Zucker (Glykokalyx) und Lipide kann zwischen verschiedenen Zelltypen oder Phänotypen eines Zelltyps variieren. Außerdem können Membran-Rezeptoren, z.B. Integrine, die dann an unterschiedliche ECM-Komponenten oder Domänen zelladhäsiver Proteine binden, zelltyp- oder phänotyp-spezifisch exprimiert werden [133]. Beispielsweise exprimieren Keratinozyten je nach Milieu die Integrine $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha \nu\beta 5$, $\alpha \nu\beta 6$ und $\alpha \nu\beta 8$ [178], dermale Fibroblasten in Kultur ebenfalls $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha \nu\beta 5$, aber auch $\alpha 4\beta 1$, $\alpha \nu\beta 1$, und $\alpha \nu\beta 3$ [48]. Somit kann eine Polymereigenschaft spezifische Effekte auf verschiedene Zelltypen haben.

Um das Zellverhalten zu steuern oder einen gewünschten Phänotyp beispielsweise für biotechnologische oder medizinische Anwendungen zu erhalten, können die Polymereigenschaften durch spezielle Modifikationen gestaltet werden (chemisch und topographisch) [133]. Die Untersuchung des Einflusses solcher Polymereigenschaften auf die Interaktion mit Zellen ist Gegenstand vieler Untersuchungen. Als Modellsysteme dienen dabei neben Copolymeren z.B. selbstorganisierende Monoschichten („self assembled monolayers“, SAM) und Oberflächenstrukturierungen [19,40]. Studien zu den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Polymereigenschaften, Elastizität, geladene Gruppen und Hydrophilie, sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 zusammengestellt. Es wird deutlich, dass unterschiedlichste Polymersysteme, Zellen, Kultursysteme und Analysemethoden eingesetzt wurden, und nur wenige systematische Studien zur Verfügung stehen.

verwendete Abkürzungen für Tabelle 1 und Tabelle 2 (folgende Seiten): DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium, FBS: Fetales Rinderserum, PCR: Polymerase-Kettenreaktion, AB: Antibiotika, LDH: Laktatdehydrogenase, REM: Rasterelektronenmikroskop, KGM: Keratinozytenwachstumsmedium, TGF β -3: „Transforming growth factor 3“, EGF: „endothelial growth factor“, BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine, MTT bzw. WST: Assays zum Nachweis der Stoffwechselleistung von Zellen, SAM: „self assembled monolayer“, BPE: „bovine pituitary extract“, Pa: Pascal, kPa: Kilopascal, NGF: „Nerve growth factor“, NRK: „normal rat kidney“ Zellen, RPMI: Medium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute, N/mm: Newton pro Millimeter, HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, PEG: Polyethylenglycol, F-12: Medium, entwickelt durch Ham, TCP: „tissue culture polystyrene“, AFM: „atomic force microscope“, BHK: „baby hamster kidney“ Zellen, HUVEC: „human umbilical vein endothelial cells“, VEGF: „vascular endothelial growth factor“, MDBK: „Madin-Darby Bovine Kidney“ Zellen, DMSO: Dimethylsulfoxid, CHO: „Chinese hamster ovary“ Zellen, M199: spezielles Medium, MEM: „minimum essential medium“, entwickelt durch Eagle

Tabelle 1: Zusammenstellung von Studien zur Beeinflussung verschiedener Zelltypen durch die Substratelastizität, aufsteigend geordnet nach Erscheinungsjahr.

Substrat	verwendete Zellen	verwendete Medien	untersuchtes Verhalten	Ergebnis	Ref.
Silikonsubstrate (Polydimethylsiloxane) 1. sehr weich 2. weich 3. hart	neonatale humane Fibroblasten	DMEM+10%FBS	Proliferation/ Wachstumskinetik (Zellzähler)	keine Beeinflussung	[135]
	neonatale humane Keratinocyten (Hautprobe) + Feederlayer murine Fibroblasten (3T3)	MCDB 153 bzw. MCDB 153 Ca ²⁺ gering +Insulin +EGF+Hydrocortison		keine Beeinflussung durch 1 und 2; 3 ermöglichte kein gutes Wachstum; generell große kompakte Cluster, mehr ausgebreitet auf 1 und 2	
Polyacrylamid, (Acrylamid/bis- Acrylamid), Kollagen-I beschichtet, 10 - 80 Pa	murine Fibroblasten (3T3)	DMEM+10%FBS +L-Glutamin+AB	Ausbreitung, Adhärenz, Migration (Injektion von fluoreszentem Vinkulin)	Migration hin zum härteren Substrat, stärkere Ausbreitung auf härterem Substrat, stärkere Migration auf dem weichen Substrat	[119]
	Epithelzellen (Ratte, Niere; NRK)	F-12 Medium +10%FBS+ L-Glutamin+AB			
Polyacrylamid, (Acrylamid/bis- Acrylamid), Kollagen-I beschichtet, 1. 14 kPa 2. 30 kPa	murine Fibroblasten (3T3)	DMEM+10%FBS +L-Glutamin+AB	Migration (Timelapse Mikroskopie), Zugkraftmechanismus	stärkere Zugkräfte auf härterem Substrat; Zellen können ihre Bewegung durch Testung der Substrathärte lenken; gerichtete Bewegung zum härteren Substrat („Durotaxis“)	[98]
Agarosegel, verschiedene Gelkonzentrationen bedingen unterschiedliche Elastizitäten	Neuronen (Zellen von Hühner- Spinalganglien)	DMEM+10%FBS +NGF+AB	Auswachsen bzw. Verlängerung der Neuriten, Aktinfärbung	stärkere Verlängerung mit abnehmender Härte → Neuriten wachsen bevorzugt auf weichem Untergrund	[11]
Substrate mit elastischen und härteren Regionen (µm-Bereich) a) Acrylamid: Fibronectin- beschichtet, 1,8 kPa und 34 kPa b) Poly(dimethylsiloxan) 12 kPa und 2,5 MPa	murine Fibroblasten (3T3)	DMEM+10%FBS+AB	Adhärenz, Ausbreitung, Zelldichte (Mikroskopie), Verteilung gebundenen Fibronectins (Immunfärbung)	beide Zelltypen akkumulierten auf weniger elastischen Bereichen der Substrate, Ansammlung basierte auf Migration zu den Bereichen, nicht auf einer dort verstärkten Proliferation; Fibronectinverteilung zunächst gleichmäßig, jedoch Umbau nach Zellkontakt, Reduktion von Fibronectin auf elastischeren Bereichen	[59]
	bovine Arterien- Endothelzellen (BPAEC)				
Alginate, RGD kovalent gebunden, Elastizität modifiziert durch Gelierung durch Zugabe bestimmter Mengen Ca ²⁺ bzw. Br ²⁺	Chondrozyten (bovin)	Medium F-12+AB	Zelldichte (Mikroskopie), Ausbreitung, Morphologie, Zytoskelettorganisation	reduzierte Ausbreitung, abgerundete Form und unorganisiertes Aktin auf weicherem Substrat; flache Morphologie mit Aktinfasern, schnellere und bessere Adhärenz auf härterem Substrat	[53]

Polyacrylamid, (Acrylamid/bis-Acrylamid), Kollagen-I oder Fibronectin beschichtet, (Viskoelastizität durch Rheologie gemessen) 2 Pa, 180 Pa, bis 55000 Pa	murine Fibroblasten (3T3)	DMEM(viel Glukose) +10%FBS+ L-Glutamin	Zytoskelett, Morphologie, Ausbreitung (Timelapse), Integrinexpression (WesternBlot)	180 Pa: abgekugelte Zellen, 16 kPa: stark ausgebreitete Zellen entsprechend Glas und TCP	[189]
	humane Neutrophile (Blutprobe)	RPMI 1640		keine Beeinflussung durch die Substratelastizität	
	Endothelzellen (bovin, Aorta)	DMEM (viel Glucose) +10%FBS+ L-Glutamin		ähnlich den Fibroblasten: stärkere Ausbreitung auf festerem Substrat	
Polyacrylamid, (Acrylamid/bis-Acrylamid), Kollagen-I beschichtet, 0,1 - 40 kPa	humane naive mesenchymale Stammzellen (hMSC)	DMEM(wenig Glukose) +20%FBS+AB	Morphologie, Nachweis spezieller Proteine (WesternBlot), Oligonucleotid Array	MSC differenzierten in: 0.1-1 kPa: Neuron-ähnlichen Zelltyp 8-17 kPa: Muskel-ähnlichen Zelltyp 25-40 kPa: Osteoblasten-ähnlichen Zelltyp	[38]
ultradünne Polycaprolacton Membranen (Mikrotester) 1. 0,55 N/mm 2. 0,26 N/mm 3. 0,19 N/mm 4. 0,12 N/mm 5. 0,05 N/mm	murine Fibroblasten (3T3)	DMEM+10%FBS+AB	Proliferation (AlamarBlue Assay)	vorzugsweise Proliferation auf weicherem Untergrund (0,05 N/mm)	[163]
Polyacrylamid, (Acrylamid/bis-acrylamid), Kollagen-I beschichtet (Messung der Druckspannung und Berechnung des E-Modul) 1. 3,4 kPa 2. 22,5 kPa 2. 50,3 kPa 3. 144,5 kPa	neonatale Kardiomyozyten (Ratte)	DMEM(viel Glukose) +10%FBS+HEPES +AB	Zellphänotyp und Vitalität, Erregung, Troponin II, Ausbreitung, Kontraktion	Beeinflussung der Zellen durch Substratelastizität; 50 kPa am passendsten für Kultivierung von Kardiomyozyten (beste Morphologie und Funktion)	[13]
Polyethylenglycoldiacrylat (PEGDA) + PEG-Fibrinogen; mit variierenden Kettenlängen und Konzentration von PEGDA (Messung der Elastizität mit AFM Mikroindentation) Gradient 0,7 - 50 kPa	humane neonatale Fibroblasten	nicht benannt	Adhärenz, Ausbreitung, Morphologie, Zytoskelettorganisation, Migration (Timelapse)	Zunahme der Zellfläche mit zunehmender Substratfestigkeit, Organisation von Aktin-Stressfasern, gerichtete Migration zu härteren Regionen	[22]
Polydimethylsiloxan-basierte Substrate 1. 16 kPa 2. 20 kPa 3. 200 kPa	HaCaT	Medium 1640+10%FBS	Morphologie, Proliferation (MTT Assay, Wachstumskurve, Zellzyklusproteine), Migration, Differenzierung	Ausbreitung, Proliferation und Migration höher auf härterem Substrat, Differenzierung reduziert, auf 16 kPa Zellen eher abgekugelt	[177]

Tabelle 2: Zusammenstellung von Studien zur Beeinflussung verschiedener Zelltypen durch Polymeroberflächen mit hauptsächlich unterschiedlichen Oberflächenladungen, variablen Ladungen und gleichzeitig unterschiedlichen Benetzbarkeiten, sowie hauptsächlich unterschiedlicher Benetzbarkeit, aufsteigend geordnet nach Erscheinungsjahr.

	Substrat	Zellen	Medium	untersuchtes Verhalten	Ergebnis	Ref.
Oberflächenladung	Polystyrol-Kulturplatten, behandelt mit Schwefelsäure, um Dichte der negativen Oberflächenladung zu ändern	Fibroblasten-ähnliche BHK Zellen	serumfreier Minimalsalzpuffer	Zellausbreitung	zunehmende Zellausbreitung mit zunehmender negativer Ladungsdichte im Gegensatz zu unbehandeltem Polystyrol mehr ausgebreitete Zellen, aber keine Unterschiede zw. den verschiedenen Ladungsdichten	[104]
			komplettes Medium+10%Serum			
	Glasdeckgläschen mit chemisch strukturierter Oberfläche (Photolithographie): „Wege“ mit positiv geladenen Aminen, getrennt durch Regionen mit ungeladenen Alkanen	murine Neuroblastoma Zelllinie (N1E-115)	DMEM+FBS10% +NaHCO ₃ +AB	Migration, Orientierung der Fortsätze, Morphologie (Timelapse Mikroskopie, Färbungen)	insgesamt eher Adhärenz an aminierte Wege, auch wenn einige Zellkörper und Fortsätze auch auf Alkan-Regionen vorhanden → keine Hemmung durch Alkane, eher Bevorzugung der Amin-Regionen	[152]
			DMEM+NaHCO ₃ +AB+HEPES			
			DMEM+10%FBS +NaHCO ₃ +AB +2%DMSO			
	Behandlung von Polyethylen-Oberflächen durch Koronaentladung und Pfropf-Copolymerisation mit 1. COOH (negativ geladen) 2. CO ₂ OH (neutral) 3. CONH ₂ (neutral) 4. CH ₂ NH ₂ (positiv geladen)	CHO Zellen	F-12+5%FBS+AB	Zellzahl (Zellzähler), Ausbreitung (REM)	CH ₂ NH ₂ am besten für Zelladhärenz und Ausbreitung; für die neutralen Oberflächen CH ₂ OH besser als CHNH ₂	[90]
SAM Silane auf Glas mit Funktionalisierung: 1. CH ₃ 2. NH ₂ 3. SH 4. OH 5. COOH	humane mesenchymale Stammzellen (hMSC, Knochenmark)	MSC Wachstumsmedium	Zelladhärenz und -Vitalität (Calcein und LDH Assay), Morphologie, Fibronectin und Vitronectin (Fluoreszenzmikroskopie), Differenzierung (PCR)	höchste Zelladhärenz auf NH ₂ , osteogene Differenzierung, demgegenüber andere Morphologie und Fibronectin/Vitronectin-Anordnung auf COOH sowie eher chondrogene Differenzierung	[28]	
Poly(styren-ran-acrylsäure) Filme mit verschiedener Ladungsdichte → 0%, 5,6%, 10% und 15,3%	murine Fibroblasten (3T3)	DMEM+10%FBS +AB	Zellzahl, Morphologie (Mikroskopie)	Zelladhäsion und Proliferation mit erhöhter Ladungsdichte	[78]	
		DMEM+AB		keine Unterschiede zwischen den Polymeren		

Oberflächenladung und Benetzbarkeit	(Homo/Co-)Polymere aus Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) und Methylmethacrylat (MMA) auf Glasdeckgläschen (Kontaktwinkel in °) PHEMA (4) PMMA (57) HEMA/MMA-Copolymere 1. 75/25 (8) 2. 50/50 (26) 3. 25/75 (39) a) positiv geladen: Trimethylaminoethyl Methacrylat-HCl Salz (TMAEMA-Cl) 1. HEMA/TMAEMA-Cl 85/15 (2) 2. MMA/TMAEMA-Cl 85/15 (1) b) negativ geladen: Methacrylsäure (MAA) 1. HEMA/MAA 85/15 (3) 2. MMA/MAA 85/15 (4)	humane Endothelzellen (HUVEC)	M199+RPMI1640 1:1 +20%humanes FERUM+ L-Glutamin+AB	Zelladhärenz-, Proliferation und Ausbreitung, Zellzahl, bezogen auf Kontrolle; Morphologie (Mikroskopie)	von HEMA bzw. MMA Homo- und Copolymeren beste Adhärenz auf HEMA/MMA 25/75 (moderat hydrophil); gute Adhärenz auf positiv geladenen Copolymeren; keine Adhärenz auf PHEMA; auf positiv geladenen Copolymeren stärkere Zellausbreitung	[173]
			s.o. serumfrei		Zellen adhärten auf den geladenen Oberflächen, aber nicht auf HEMA/MAA und nicht auf den HEMA und MMA Homo- und Copolymeren; komplette Zellausbreitung nur auf positiv geladenen Copolymeren	
	a) Polyurethan (PU) mit unterschiedlichen Porositäten durch verschiedene Lösungsmittel 1. THF 2. Dioxan 3. Mix b) Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) copolymerisiert mit 1. Acrylsäure (AA) = Einfügen negativer Ladung (carboxyl) 2. Dimethylaminoethylmethacrylat (DMAEMA) = Einfügen positiver Ladung (amino) 3. PolyHEMA (neutral, Hydroxy-Gruppen)	Fibroblasten-ähnliche BHK Zellen	DMEM+10%FBS +Pyruvat+AB	Adhärenz (Zellzählung), Polymer-Zell-Interaktion	1a) porös und moderat hydrophil; zunehmende Zelladhärenz bei Einfügen positiv geladener Gruppen; bei Einfügen negativ geladener Gruppen moderate Zelladhärenz (besser als PolyHEMA)	[86]
		Epithelzell-ähnliche (MDBK) Zellen	MEM+10%FBS +Pyruvat+AB			

Oberflächenladung und Benetzbarkeit	<p>Glasdeckgläschen, funktionalisiert mit (Kontaktwinkel in °)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Thiolgruppe (~59,7) 2. oxidierte Thiolgruppe (~7,3) 3. Amingruppe (~36,7) 4. quarternäre Amingruppe (~22,7) 5. Methylgruppe (~92) <p>jeweils vorinkubiert mit</p> <ol style="list-style-type: none"> a) 5% Serum b) speziellen Serumproteinen c) ECM-Komponenten d) keine Vorinkubation 	murine Fibroblasten (3T3)	DMEM+AB	Zelladhärenz, Ausbreitung und Zytoskelettorganisation (Mikroskopie, Färbungen)	nach 5%Serum Inkubation: bessere Zelladhärenz, Ausbreitung und Zytoskelettorganisation auf hydrophilen Oberflächen (2,3,4) verglichen mit hydrophoben (1,5); zwischen den hydrophilen Oberflächen wurden Zelladhärenz, aber nicht die Zellfläche, Form oder Zytoskelettorganisation beeinflusst; mit quaternären Aminen funktionalisierte Oberfläche zeige mit und ohne Vorinkubation die höchste Zelladhärenz	[180]
	<p>Acrylnitril-basierte Copolymere mit Comonomeren:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. nichtionisch, stark hydrophil (NVP5, NVP20, NVP30) 2. primäre Amingruppe (AEMA) 3. anionisch (NaMAS) 4. Homopolymer (PAN) 	murine Fibroblasten (3T3)	DMEM+10%FBS	Zytotoxizität Eluat (XTT, NR Assay) Zellmorphologie, Ausbreitung (Mikroskopie) und Proliferation (LDH Assay), Vinkulin-Färbung	keine Zytotoxizität PAN und AEMA vergleichbar, gute Zelladhärenz, Proliferation und Morphologie.; verminderte Adhärenz und Proliferation auf NaMAS; NVP5 gute Adhärenz, auf NVP20 und NVP30 deutlich reduzierte Adhärenz	[64]
		dermale humane Fibroblasten (CellLining)	DMEM+10%FBS +AB+HEPES			
	<p>SAM Silane auf Glas mit Funktionalisierung:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. OH 2. NH₂ 3. EPOXY 4. COOH 5. CF₃ 6. SO₃ 	adulte humane dermale Fibroblasten	DMEM+10%FBS	Zelladhärenz, -Proliferation (LDH Assay) und - Ausbreitung, Zytoskelettorganisation und Integrine (Fluoreszenzmikroskopie)	beste zelluläre Interaktion mit NH ₂ , schlechteste auf CF ₃	[2]
	<p>SAM Silane auf Glas mit Funktionalisierung:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. CH₃ 2. Br 3. vinyl (CH=CH₂) 4. NH₂ 5. COOH 6. PEG 7. OH 	adulte primäre humane dermale Fibroblasten	DMEM+10%FBS+AB	Proteinadsorption aus FBS, Adsorption von bovinem Vitronectin, Zelladhärenz, Wachstum, Ausbreitung, Fibronectin-Ablagerung (Färbungen, Mikroskopie)	PEG, OH weniger Proteinadsorption als CH ₃ , NH ₂ und COOH; schwache Zellinteraktion mit CH ₃ , PEG und OH, starke Zellinteraktion (starke Adhärenz, Ausbreitung, Fibronectin-Ablagerung und Wachstum) auf COOH und NH ₂ (→ verstärkte Aktivität von Integrinen)	[40]

Oberflächenladung und Benetzbarkeit	Titanfilme, oberflächenfunktionalisiert mit unterschiedlichen Endgruppen (SAM) 1. CH=CH ₂ 2. NH ₂ 3. COOH	Osteosarkoma Zellen (ACC439)	DMEM+10%FBS	Fibrinogen-Adsorption; Zellproliferation und Vitalität (Zellzählung, MTT)	geringste Fibrinogen-Adsorption auf COOH; je geringer das Zeta-Potential, desto geringer die Proteinadsorption; bessere Zellproliferation und Vitalität bei NH ₂ , geringer bei COOH	[20]
	Acrylnitril-basierte Copolymere mit zunehmendem N-vinyl-2-pyrrolidone Gehalt 1. PANCNVP 7 2. PANCNVP 15 3. PANCNVP 22 4. PANCNVP 31 Kontrollen: PAN und TCP (zunehmende Hydrophilie durch Wasseraufnahme und Quellung beschrieben)	humane Endothelzellen (HUVEC)	RPMI-1640 +20%FBS+AB	Zelldichte, Adhärenz, Proliferation (Zellzählung, MTT Assay)	abnehmende Zelladhärenz mit zunehmendem NVP-Gehalt, gegen PAN und TCP verbesserte Proliferation	[176]
		murine Makrophagen	RPMI-1640			
	SAM auf Gold, 1. CH ₃ 2. OH 3. COOH 4. NH ₃	humane Endothelzellen	EBM-2 + 2%FBS + hFGF-B+VEGF +R3IGF-1+hEGF +Hydrokortison +Heparin+AB	Proteinadsorption, Zelladhärenz, Morphologie (Mikroskopie)	Albumin adsorbierte fest an hydrophobe Polymere und wurde nicht durch andere Moleküle ersetzt, auf hydrophiler Oberfläche wurde das adsorbierte Albumin offenbar durch andere Moleküle verdrängt; moderat hydrophile Polymere ermöglichten höchste Zelladhärenz, keine Zelladhärenz an hydrophobe Polymere	[5]
		HeLa Zellen	MEM+10%FBS +nicht-essentielle Aminosäuren+AB			
Goldoberfläche auf Glas, funktionalisierte SAM mit Fibronectinbeschichtung (Kontaktwinkel in °): a) geringe Dichte b) gesättigte Dichte 1. unpolare hydrophob CH ₃ (112+/-1) 2. negative geladen COOH (29+/-2) 3. neutral hydrophil OH (20+/-2) 4. positive geladen NH ₂ (46+/-2)	humane neonatale Keratinozyten (Hautprobe) + Feederlayer murine Fibroblasten (3T3)	DMEM viel Glucose: F-12 (3:1) + Choleratoxin+Hydrocortison+Adenin +Transferrin +Triiodo-L-thyronine +Insulin+AB	Fibronectin-Adsorption, -Konzentration und -Konformation, Keratinozytenfunktion (Adhärenz, Ausbreitung, fokale Adhäsionen, Differenzierung → Mikroskopie, Färbungen)	Verfügbarkeit der Fibronectin-Bindungsstelle korreliert mit Keratinozyten-Adhärenz, Ausbreitung und Differenzierung; bei geringer Fibronectin-Dichte beste Adhärenz auf OH, bei gesättigter Fibronectin-Dichte beste Adhärenz auf NH ₂ und CH ₃	[19]	

Oberflächenladung und Benetzbarkeit	<p>Polystyrol Zellkulturplatten, beschichtet mit Titan und Gold, darauf SAM aus Alkanthiolen</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. CH₃ (hydrophob) 2. COOH (negativ geladen bei pH 7,4) 3. NH₂ (positiv geladen bei pH 7,4) 4. OH (neutral hydrophil) <p>beschichtet mit Fibronectin und geblockt mit Albumin</p>	<p>humane mesenchymale Stammzellen (hMSC, Knochenmark)</p>	<p>MSC Wachstumsmedium → osteogene Induktion DMEM+10%FBS+AB +L-Ascorbinsäure +Natrium-β-Glycerophosphat +Dexamethason</p>	<p>Differenzierung nach Induktion durch Medium (PCR, Färbungen, Calciumgehalt-Messung)</p>	<p>NH₂ verstärkt osteogene und adipogene Differenzierung verglichen mit den anderen Oberflächen; auf OH osteogene Differenzierung möglich aber adipogene Differenzierung gehemmt; die chondrogene Differenzierung wurde durch die verschiedenen Oberflächen nicht beeinflusst</p>	<p>[123]</p>
			<p>Basalmedium → Standardmedium zur chondrogenen Induktion + TGF-β3</p>			
			<p>Basalmedium → adipogenes Induktionsmedium + Dexamethason+IBMX +Insulin +Indomethacin</p>			

Benetzbarkeit	<p>verschiedene Polymere (Kontaktwinkel in °, „captive bubble“)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Zellkultur Polystyrol (35) 2. Polystyrol (77) 3. Zellkultur Polyethylenterephthalat (44) 4. Polyethylenterephthalat (65) 5. Polymethylmethacrylat (61) 6. Polycarbonat (83) 7. Fluoroethylenpropylen-Copolymer (102) 8. Poly-L-Milchsäure-Film (71) 9. Polyurethan (37) 10. Cellophan (16) 11. Cellulose-2.5-Acetat (31) 12. Cellulose-3-Acetat (52) 13. Glas (13) <p>Kontrolle: Fibronektin-beschichtetes TCPS</p>	humane Endothelzellen (HUVEC)	M199+RPMI1640 1:1 +20%humanes Serum +L-Glutamin+AB	Zelladhärenz (relativ zur Kontrolle), Ausbreitung (Mikroskopie)	optimale Adhärenz auf moderat hydrophilen Oberflächen (35-45 °); 10,11,12-Cellulose-Serie: ansteigende Zelladhärenz mit ansteigendem Kontaktwinkel	[172]
	<p>Materialien (Kontaktwinkel in °, „sessile drop“)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. FEP Teflon (FEP) (109) 2. Poly(methylmethacrylat) (PMMA) (76) 3. Glas (< 15) 4. zellkulturbehandeltes Polystyrol (TCPS) (70) 	humane dermale Fibroblasten (PK 84-1)	RPMI-1640+10%FBS+Glutamin+HEPES+AB	Adhäsion und Ablösemechanismus der Zellen in einer Flusskammer (Mikroskopie)	je geringer die Benetzbarkeit, desto schnelle/einfacher lösten sich die Zellen; Ausnahme: TCPS	[170]
	<p>Polymer (Kontaktwinkel in °, „sessile drop“)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Polytetrafluoroethylen (116 ± 3) 2. Tetrafluoroethylenhexafluorpropylen-copolymer (102 ± 4) 3. Polyethylen (PE) (96 ± 4) 4. Polypropylen (92 ± 3) 5. Polystyrol (75 ± 2) 6. Poly(ethylenterephthalat) (65± 3) 7. Nylon (61 ± 2) 8. Poly(vinyl alkohol) (42 ± 5) 9. Cellulose (18 ± 5) 10. Glas (30 ± 2) 11. Kollagen-gegraftetes PE (43 ± 3) 12. Acrylamid-gegraftetes PE (43 ± 3) 13. TCP (52 ± 2) 	Fibroblasten aus Rattenhaut (fetal)	DMEM+10%FBS+AB	Zelladhärenz (LDH Assay), Kollagensynthese (Radio-Markierung, Verdau mit Kollagenase)	Zelladhärenz und Kollagensynthese wurden durch den Kontaktwinkel beeinflusst; Kontaktwinkel um 70 ° zeigte höchste Zelladhärenz und geordnete Morphologie	[162]

Benetzbarkeit	Polyethylensubstrat, Oberfläche mit steigender Korona-Stärke modifiziert, um graduelle Änderung der Hydrophilie zu bewirken	CHO Zellen	Ham's F-12+10%FBS+AB	Adsorption von Serumproteinen; Zelladhärenz, Ausbreitung (REM, Zellzählung)	Serumproteine eher auf Bereichen moderater Hydrophilie adsorbiert; mehr Zellen adhärten im Bereich moderater Hydrophilie und breiteten sich aus, maximale Adhäsion bei ca. 55 °	[91]
		murine Fibroblasten (3T3)	DMEM+10%FBS+AB			
		Endothelzellen (bovin, Arterie)	RPMI 1640+10%FBS+AB			
	Polystyrol-Platten („bacterial grade“), Oberflächenbehandlung durch Glimmentladung tlw. beschichtet mit Fibronectin (Kontaktwinkel in °, „sessile drop“ Methode) 1. PS00 (80) 2. PS05 (57) 3. PS10 (45) 4. PS30 (27) 5. PS60 (30) TCPS als Kontrolle (75)	humane Endothelzellen (HUVEC)	RPMI-1640+Glutamax-L+20%FBS+AB	Stoffwechselaktivität (MTT Assay), Adhärenz (Fokale Adhäsionen), Fibronectin-Matrix-Anordnung, Zellproliferation, Zell/Zell und Zell/Polymer-Interaktionen (WesternBlot Adhärenzmoleküle)	Adhärenz und Wachstum auf allen Polymerien, außer auf PS00; PS30 und PS60: Zellen dichter, Fibronectin-Vorbeschichtung: weitere Erhöhung der Zellzahlen	[171]
	Hexamethyldisiloxan-Oberflächen, variiert durch Plasmabehandlung: Kontaktwinkel in ° 1. 106 2. 80 3. 60 4. 40 5. 20 6. 0	murine Fibroblasten (L929)	MEM+10%FBS+AB	Fibronectin-/Albuminadsorption, initiale Zelladhärenz, Proliferation (Zellzählung nach Trypsinierung), Morphologie, Zytoskelettorganisation (REM, Aktinfärbung)	auf hydrophiler Oberfläche eher Adsorption von Fibronectin (adhärenzfördernd), auf hydrophob eher Albumin (adhärenzhindernd); zunehmende Zelldichte und Ausbreitung mit zunehmender Hydrophilie	[181]
Acrylnitril-basierte Copolymere mit zunehmendem N-Vinylpyrrolidon-Gehalt: 1. NVP 5 2. NVP20 3. NVP30 Kontrolle: PAN und TCP (zunehmende Hydrophilie durch Wasseraufnahme und Quellung beschrieben)	humane dermale Fibroblasten (CellLining) HaCaT	DMEM+10%FBS DMEM DMEM+10%FBS DMEM	initiale Zelladhärenz, Zellwachstum, Vitalität (FDA), Proteinsyntheseblock, Cokultur	abnehmende Zelladhärenz mit zunehmendem NVP-Gehalt, stark reduziert auf NVP30; auch in Cokultur auf NVP30 stark reduziert vergleichbar mit Kontrollen Zelldichte vergleichbar mit Kontrollen, aber mehr Cluster; gute Adhärenz in Cokultur vergleichbar mit Kontrollen	[15]	
Silikonsubstrate mit unterschiedlicher Rauigkeit und Hydrophilie	murine Fibroblasten (3T3)	DMEM+10%FBS+AB	Vitalität (Lebend/Tot-Färbung), Zytoskelett und Vinkulin (Mikroskopie), REM	unabhängig von der Benetzbarkeit optimale Ausbreitung auf wenig rauem Substrat; generelle Tendenz zu besserer Adhärenz auf hydrophilerem Polymer	[130]	

6.2 Keratinozyten und Fibroblasten als Zelltypen der Haut

6.2.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut als äußere Barriere des Körpers gegen Umwelteinflüsse (mechanischen Stress, Pathogene, Toxine, Temperatur usw.) und als Schutz gegen Wasserverlust ist aus verschiedenen Schichten (Epidermis, Dermis, Subkutis) aufgebaut (siehe Abbildung 2). Die Haut dient außerdem der Thermoregulation, Immunkontrolle und der Wahrnehmung. Von der Epidermis und Dermis werden auch verschiedene Hautanhangsgebilde, die Haare mit Haarfollikeln und Talgdrüsen, Schweißdrüsen und Nägel, ausgebildet. [81]

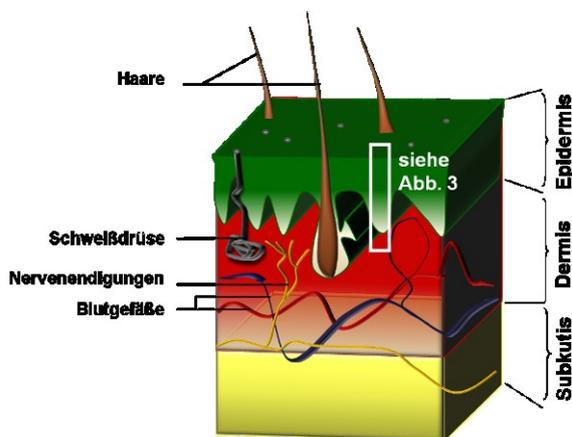


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Haut.

Die Epidermis als äußerste Hautschicht ist ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel aus Keratinozyten, mit Langerhans Zellen, Melanozyten und Merkel Zellen als weitere vorkommende Zelltypen [81]. Die Keratinozyten schieben sich nach außen, differenzieren in unterschiedliche Phänotypen mit speziellen Eigenschaften und Funktionen, und bilden dabei verschiedene Schichten [81]. Diese werden wie folgt unterteilt:

Im *stratum basale* finden asymmetrische Mitosen der Keratinozyten-Stammzellen statt. Dabei gibt es eine horizontale Teilungsachse, die zwei basale Zellen generiert und eine vertikale mitotische Spindel, die eine Tochterzelle generiert, die in das *stratum spinosum* migriert und differenziert [149]. Im *stratum spinosum* treten die Keratinozyten aus dem Zellzyklus aus, werden größer und bilden Keratohyalin granula, v.a. bestehend aus Profilaggrin, und starke intrazelluläre Verbindungen aus. Im *stratum granulosum* werden die Keratinozyten flacher und beginnen, eine wasserundurchlässige verhornte Hülle zu bilden. Spezielle Proteine (z.B. Loricrin und Involucrin) und Lipide zum Aufbau der verhornten Hülle werden produziert [127] und enzymatisch durch Transglutaminasen verknüpft. Filaggrin, das aus Profilaggrin gespalten wurde, aggregiert Keratinfilamente zu dichten Bündeln, was zur flachen Form der

verhornten Zellen führt [127]. Bei den Keratinozyten im *stratum corneum* (dann auch Corneozyten genannt) werden der Zellkern und Organellen durch lysosomale intrazelluläre Proteasen degradiert und die Zellen verhornen weiter. Zwischen den Corneozyten werden unpolare Lipide abgelagert, die als hydrophobe Matrix zusätzlich zur Barrierefunktion beitragen. Nach einiger Zeit lösen sich bestimmte Zell-Zell-Kontakte (Corneodesmosomen) und die verhornten Zellen werden als Hautschuppen abgeschilfert. Die verschiedenen Schichten können histologisch unterschieden werden und sind durch die jeweilige Expression spezieller Proteine gekennzeichnet (siehe Abbildung 3). Epidermale Intermediärfilamente (Keratine; faserbildende Polypeptide), die die mechanische Stabilität der Zellen und der Epidermis gewährleisten, werden nach ihrem Molekulargewicht und ihrem isoelektrischen Punkt (IEP) bezeichnet und in zwei Gruppen eingeteilt [46,81,111]. Keratin 9 bis 20 gehören zu den Typ I Keratinen (Molekulargewicht 40-56,5 kDa, IEP < 5,5), Keratin 1 bis 8 zu den Typ II Keratinen (Molekulargewicht 52-67 kDa, IEP > 6). Keratine in den Keratinozyten bestehen immer aus einem Paar aus saurem und basischem Keratin. Beispielsweise werden Keratin 5 und Keratin 14 basal exprimiert, Keratin 1 und Keratin 10 suprabasal [47],

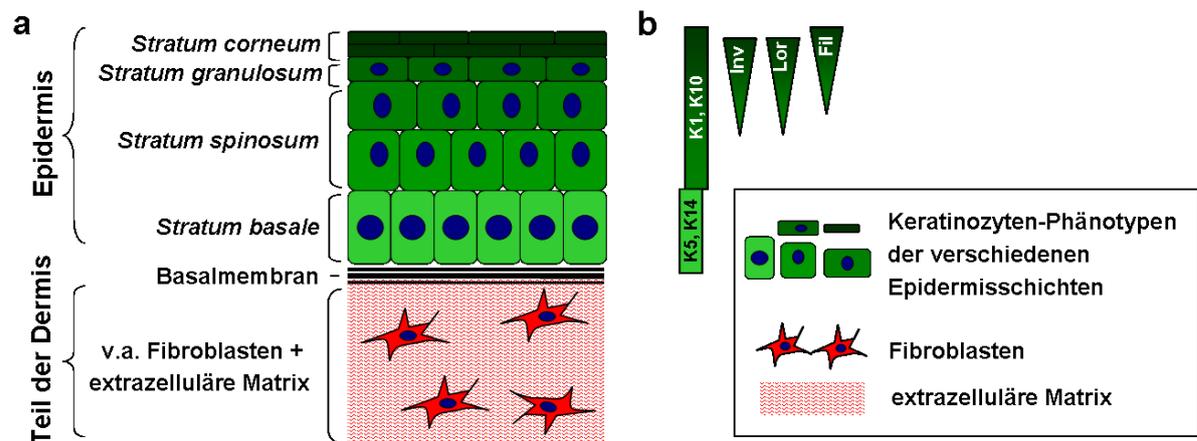


Abbildung 3: (a) Schematische Darstellung der Schichten der Epidermis, sowie einem Ausschnitt der Dermis. (b) Darstellung des graduellen Vorkommens bestimmter Zytoskelettbestandteile (K1, K5, K10, K14; Keratine 1, 5, 10 und 14) sowie Komponenten der verhornten Hülle (Inv: Involucrin, Lor: Loricrin, Fil: Filaggrin) in der Epidermis. (Abbildung adaptiert von [124,149]).

In der Epidermis tragen verschiedene interzelluläre Verbindungen zur Barrierefunktion und Stabilität des Gewebes bei [127]. Keratinozyten sekretieren außerdem verschiedene ECM-Komponenten [128]. Des Weiteren sind die Keratinozyten an der initialen Immunantwort nach Schädigung der Epidermis sowie an entzündlichen Prozessen wie Allergien beteiligt [138]. Sie können exogene Faktoren detektieren und in Reaktion darauf Cytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren synthetisieren und ausschütten [25,108], sowie auf von anderen Zelltypen sekretierte Faktoren reagieren [144]. Außerdem können Keratinozyten antimikrobielle Peptide sekretieren [143].

Epidermis und Dermis sind durch eine spezielle ECM, die dermal-epidermale Verbindung bzw. Basalmembran, verbunden bzw. getrennt [81]. Die Komponenten (z.B. Laminin 5, 6 und 10, Kollagen IV und VII) werden durch Keratinozyten und Fibroblasten synthetisiert. Die Basalmembran ermöglicht eine mechanisch stabile Verbindung und reguliert den Austausch metabolischer Produkte und löslicher Mediatoren zwischen den beiden Kompartimenten. Langerhans Zellen, Lymphozyten etc. können die Basalmembran durchwandern, um für immunologische und entzündliche Prozesse zur Verfügung zu stehen [81]. Während der Wundheilung dient die Basalmembran auch als Unterlage für die Keratinozytenmigration [115].

Die Dermis (auch Corium oder Lederhaut genannt) ist mesodermalen Ursprungs und kann als bindegewebiges, elastisches und kompressibles Stützgewebe beschrieben werden, in das Blutgefäße und Nerven eingebettet sind [81]. Die Dermis ist v.a. aus verschiedenen Fasermolekülen (v.a. Kollagene) und Grundsubstanz (Glykoproteine und Proteoglykane), die als extrazelluläre Matrix (ECM) zusammengefasst werden, aufgebaut. Diese wird durch die dermalen Fibroblasten synthetisiert. Weitere Zelltypen in der Dermis sind beispielsweise Makrophagen, dermale Dendrozyten und Mastzellen. [81]

Die Haut kann durch verschiedenste Einflüsse, z.B. mechanische, thermische oder chemische Reize und Pathogene, sowie körperinterne pathologische Prozesse, geschädigt werden und es entsteht eine Hautwunde [14]. Dies kann zu Blutverlust, Wasserverlust und zur fehlenden Barrierefunktion vor Krankheitserregern und äußeren Einflüssen führen. Bei großflächigen Verbrennungen können lebensbedrohliche Situationen entstehen. Daher ist die adäquate Wundversorgung bis heute eine klinisch relevante Herausforderung. Verschiedene Wundtypen unterscheiden sich erheblich voneinander und können beispielsweise nach ihrer Ursache (z.B. Verbrennungen, Schnittverletzung), ihrer Tiefe bzw. dem Ausmaß (oberflächlich, tief, sehr tief) oder ihrer Heilungsdauer (akut, chronisch) eingeteilt werden [120]. Die Wundheilung ist ein komplexer dynamischer Prozess koordinierter zellulärer und molekularer Ereignisse (ECM, lösliche Faktoren), die in verschiedene Phasen eingeteilt werden können (Hämostasephase, Inflammationsphase, Migrations-/Proliferations-/ Granulations- und Epithelialisierungsphase sowie Remodellingphase [57,73,105,147]). Diese strukturierten Prozesse können beispielsweise durch Infektionen, zugrunde liegende Erkrankungen, beeinträchtigte Blutzirkulation, den Ernährungsstatus und Medikamente beeinträchtigt sein. Eine andere mögliche „Komplikation“ einer Wunde ist die Bildung beeinträchtigender Narben, wobei v.a. hypertrophe, hypotrophe Narben und Keloide unterschieden werden

[52,188]. Dabei unterscheidet sich die Anordnung bzw. die Umlagerung von ECM-Komponenten, v.a. von Kollagen, von der bei der physiologischen Heilung.

Um die Wundheilung zu unterstützen und die Wunde vor weiterer Schädigung durch mechanische Einflüsse oder Pathogene zu schützen, werden verschiedenste Wirkstoffe, Wundauflagen und Wundmanagementsysteme verwendet [14,39,73]. Entsprechend der Verschiedenartigkeit der Wunden, deren Heilungsverläufen und den speziellen Gegebenheiten jeden einzelnen Patienten ist derzeit kein Wundheilungs-Produkt für alle Wundtypen geeignet und verschiedene Produkte werden tlw. gleichzeitig verwendet, um verschiedenste Anforderungen zu erfüllen [14,73]. Aufgrund dessen, dass die Eigenschaften an die jeweiligen Aufgaben angepasst werden können, eignen sich Polymere sehr gut als Wundauflagen. So können beispielsweise Alginat aufgrund ihrer hohen Saugfähigkeit zur Abdeckung stark nässender Wunden verwendet werden. Polyurethanschäume sind eher für moderat nässende Wunden geeignet und ermöglichen durch die geringe Wundhaftung einen einfacheren Verbandswechsel [57,73]. Des Weiteren werden verschiedene Therapie-Ansätze verfolgt, um die Bildung beeinträchtigender Narben zu vermindern. Dabei werden neben pharmakologischen Substanzen derzeit v.a. Silikonauflagen oder –Gele verwendet, jedoch haben die Methoden tlw. starke Nebenwirkungen und die klinische Wirksamkeit bleibt umstritten [49,52].

6.2.2 Kultivierung von Keratinozyten und dermalen Fibroblasten

6.2.2.1 Keratinozyten

Die *in vitro* Kultivierung von Keratinozyten ermöglicht die Untersuchung verschiedenster allgemeiner und spezieller Fragestellungen [71,88,132], die im Folgenden genannt werden:

- Wachstum und Differenzierung von Keratinozyten bzw. Zellalterung allgemein,
- Grundlagenforschung zur Beeinflussung der Zellen durch pharmakologische oder physiologische Substanzen,
- Karzinogenese, v.a. chemisch ausgelöst,
- Infektionsmechanismen und Effekte epidermaler Viren, einschließlich onkogener Viren,
- Verhalten epidermaler Zellen von bzw. bei humanen Erkrankungen,
- Keratinozyten als Vehikel für gentherapeutische Ansätze,
- Wundheilung und Testung von Wundverschlussystemen,
- dermal-epidermale Interaktionen,
- allergische Reaktionen,

- epidermale Morphogenese,
- Gewebeantigenität,
- Substanztestung (Medikamente oder Kosmetika; für die Industrie).

Außerdem können kultivierte Keratinozyten für die Herstellung künstlicher Hautkonstrukte oder Transplantate genutzt werden [60,114]. Zur Gewinnung von Keratinozyten werden Hautbiopsien, Hautstücke, die bei Operationen anfallen, oder Vorhäute verwendet. Im Falle von Vorhäuten werden die Keratinozyten als „neonatal“ bezeichnet, sonst als „adult“. Keratinozyten können auch aus Haarfollikeln gezupfter Haare gewonnen werden [1,93]. Prinzipiell sind primäre humane Keratinozyten somit aufgrund der Verfügbarkeit aus Hautproben im Gegensatz zu anderen Zelltypen leicht erhältlich, jedoch ist ihre Kultivierung und Passagierung z.B. im Gegensatz zu Fibroblasten recht anspruchsvoll [1]. Dabei bestehen prinzipiell zwei Hauptprobleme: 1. die limitierte Proliferationsfähigkeit und somit Subkultivierbarkeit der Keratinozyten, 2. die Kontamination bzw. das Überwachsen der Keratinozyten durch andere Zelltypen, v.a. von Fibroblasten aus der Dermis. Entsprechend dieser Herausforderungen wurden die Isolierungs- und Kultivierungsmethoden zunehmend modifiziert und verbessert. Die erste erfolgreiche Routinemethode zur *in vitro* Subkultivierung humaner Keratinozyten beschrieben Rheinwald und Green 1975 [132]. Dabei wurden humane Keratinozyten mit unterstützenden, sublethal bestrahlten murinen 3T3 Fibroblasten als Ammenzellen („Feederzellen“) kultiviert. Die Fibroblasten blieben vital und sekretierten für die Keratinozyten essentielle Wachstumsfaktoren, konnten sich aber nicht mehr teilen. Für die Keratinozytenisolierung wird zunächst die Epidermis nach Andauen mit Enzymen (z.B. Thermolysin [54] oder Dispase [24,129]) mechanisch von der Dermis abgelöst. Danach werden die Zellen enzymatisch (z.B. mit Trypsin) vereinzelt und als Suspension ausgesät. Die Keratinozyten siedeln sich dann in den ersten Stunden (bis 48 h) nach der Einsaat als Einzelzellen oder kleine Cluster bzw. Kolonien oder Inseln an [71,107]. Adhärirte Keratinozyten breiten sich zu polygonalen Zellen aus, proliferieren und die Cluster vergrößern sich. Mit fortschreitender Proliferation entsteht nach einiger Zeit (3 Tage bis zu Wochen) ein konfluenter Monolayer [71]. Je nach Kulturbedingungen können die Keratinozyten anschließend in unterschiedliche Schichten stratifizieren, die sich morphologisch unterscheiden und mit den Stadien der Differenzierung in der Epidermis korrelieren [160,179,190]. Diese „Differenzierung“ entspricht nicht den konkreten *in vivo* Charakteristika, findet aber je nach Medium und Alter in der Kultur statt [71]. Bei Kultivierung in Medium mit geringem Calcium-Gehalt (< 0,3 mM), bleiben die Zellen vorwiegend als basale Keratinozyten erhalten und differenzieren kaum, durch einen erhöhten Calcium-Gehalt von > 1 mM oder

Serum-Zugabe kann die Differenzierung induziert werden [17,190]. Die Dauer und Effizienz der Zelladhärenz und Proliferation ist u.a. abhängig vom Medium, der Ionenkonzentration im Medium, biologischen oder pharmakologischen Zusätzen, dem Substrat, der Dichte der Zellaussaat, dem Differenzierungsstatus der eingesäten Zellen, dem pH, der Kultivierungsatmosphäre (z.B. O₂) und der Temperatur [71,85,96]. Entsprechend können spezielle Kulturbedingungen ausgewählt werden, um bestimmte Phänotypen zu erhalten. Allerdings sind Adhärenzeigenschaften sowie die phänotypische Ausprägung der Keratinozyten auch von spenderspezifischen Faktoren wie Körperregion, Alter, Ernährungszustand, Stoffwechselerkrankungen, Medikamenteneinnahme, Alkohol- oder Zigarettenkonsum abhängig [75]. Mit zunehmender Kenntnis von Wachstumsfaktoren und Keratinozyten-Proliferationsfördernden Substanzen [56,131,168], wurden speziellere Medien hergestellt, um bevorzugt die Keratinozyten-Proliferation zu unterstützen und das Überwachsen durch Fibroblasten zu verhindern. Weitere Methoden zur Limitierung der Fibroblasten-Kontamination wurden untersucht, jedoch ist z.B. das Entfernen der Fibroblasten durch Na₂EDDA-Behandlung [36] sehr zeitaufwendig. Durch die morphologische Begutachtung der Kultur können Kontaminationen durch andere Zelltypen meist ausgeschlossen werden. Immunzytochemisch können Keratinozyten von anderen Zelltypen durch Antikörper gegen Keratine nachgewiesen werden. Potentiell kontaminierende Fibroblasten können z.B. durch Vimentin-Antikörper detektiert werden [89], allerdings können Keratinozyten in Kultur auch Vimentin exprimieren [44].

Serumfreien Kulturen wurden und werden oft undefinierte Zusätze wie Rinder-Hypophysenextrakt („bovine pituitary extract“, BPE) oder Gehirnextrakt beigelegt, um eine erfolgreiche Kultivierung zu gewährleisten [56,118]. Als Substrate werden z.B. Feederlayer aus murinen oder humanen Fibroblasten [77,132], Kollagen [95,96], humanem Fibronectin [56] oder andere Substanzen verwendet. Einige Medien ermöglichen auch die Aussaat auf nicht weiter behandelten Zellkultursubstraten. Vor allem für klinische Anwendungen für Patienten stellt die Verwendung xenogener Substanzen zur Zellkultivierung (z.B. nicht-spendereigenes Serum, Feederlayer-Zellen, Kollagen-Beschichtung) aufgrund der potentiellen Übertragung von Infektionen und/oder immunologischen Abstoßungsreaktionen ein Sicherheitsrisiko dar. Daher wird an der Entwicklung von Keratinozytenkultursystemen ohne Zusatz tierischer Produkte, d.h. an der Optimierung definierter Medien [23,68] und Substrate [169] bzw. an der Verwendung spendereigener Substanzen und Zellen [77] gearbeitet. Zunehmend wird auch an der Vereinfachung und Automatisierung der Zellisolierung ([79] oder z.B. Haut aus der Fabrik, Fraunhofer) gearbeitet, um ausreichende Mengen an

Keratinocyten für Substanztestungen, medizinische Anwendungen u.a. bereitzustellen. Dabei wird die Anpassung der Prozesse auf die maschinellen Möglichkeiten nötig und derzeit noch nötige zeitaufwändige manuelle Schritte, wie das Trennen von Epidermis und Dermis mit Pinzetten, sollten vermieden werden.

Neben der jeweils frischen Isolierung primärer Keratinocyten, können auch Keratinocyten-Zelllinien für die Untersuchung verschiedenster Fragestellungen genutzt werden. Z.B. HaCaT Zellen, die 1988 etabliert wurden [16], werden oft verwendet. Diese werden im Gegensatz zu primären Keratinocyten oft in serumhaltigen Medien kultiviert und weisen einige abweichende Eigenschaften auf [21,92,110,145].

6.2.2.2 Dermale Fibroblasten

Dermale Fibroblasten können ebenso wie Keratinocyten zur Untersuchung verschiedenster Fragestellungen kultiviert werden [153]. Aus Hautproben können nach Ablösen der Epidermis zerkleinerte Stücke der Dermis kultiviert werden und die Fibroblasten wachsen aus [1]. Durch enzymatisches Lösen kann später eine Zellsuspension hergestellt und in Zellkulturgefäße ausgesät werden. Die Fibroblasten lassen sich aufgrund ihres hohen Proliferationspotentials relativ einfach kultivieren und subkultivieren [103]. Als Standardmedium kann beispielsweise DMEM+FBS10% verwendet werden. Die normale Morphologie der Fibroblasten in Kultur kann als spindelförmig, oft mit langen Fortsätzen beschrieben werden. Als Bindegewebszellen teilen sich die Fibroblasten recht schnell, und zeichnen sich z.B. durch die Sekretion von ECM-Komponenten aus [153]. Des Weiteren können sie z.B. auch Wachstumsfaktoren und Immunoregulatoren sekretieren.

6.2.3 Untersuchungen von Polymeren mit Keratinocyten und Fibroblasten

Verschiedenste Polymere wurden und werden für die Kultivierung von Keratinocyten und/oder Fibroblasten sowie für den Transfer auf Wunden oder als Gerüstmaterialien („scaffolds“) für die Gewebezüchtung („tissue engineering“) bzw. Hautkonstrukte getestet. Tabelle 3 gibt einen Überblick über verschiedene Studien, wobei zumeist natürliche Polymere untersucht wurden. Die Zusammenstellung macht weiterhin deutlich, dass verschiedenste Kultursysteme und Medien verwendet, und unterschiedliche Parameter analysiert wurden.

verwendete Abkürzungen für Tabelle 3 (folgende Seiten): DMEM: Dulbecco's Modified Medium, FBS: Fetales Rinderserum, PCR: Polymerase-Kettenreaktion, AB: Antibiotika, LDH: Laktatdehydrogenase, REM: Rasterelektronenmikroskop, KGM: Keratinocytenwachstumsmedium, TGF β -3: „Transforming growth factor 3“, EGF: „Endothelial growth factor“, BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine, MTT bzw. WST: Assays für den Nachweis der Stoffwechselleistung von Zellen, SAM: „self assembled monolayer“, BPE: „bovine pituitary extract“

Tabelle 3: Zusammenstellung von Studien zur Interaktion von Keratinozyten bzw. Fibroblasten mit verschiedenen Polymeren.

	Substrat	verwendete Zellen	verwendete Medien	untersuchtes Verhalten	Ergebnisse	Ref.
natürliche Polymere	Poly(DL-Milchsäure)-Filme, modifiziert durch: 1. Kavitäten, 2. NaOH Behandlung, 3. Type I Kollagen Beschichtung	humane Fibroblasten (Hautprobe)	DMEM+10%FBS+AB	Adhärenz, Vitalität, Proliferation (MTT), Histologie	1. Zelladhärenz unbeeinflusst, Keratinozytenproliferation deutlich reduziert 2. ähnlich 3. 3. verbesserte Zelladhärenz und Proliferation, außer für murine Fibroblasten	[51]
		Fibroblasten Zelllinie 3T3 (murin)	DMEM+10%FBS+AB			
		humane neonatale Keratinozyten (Hautprobe)	SFM+EGF+BPE			
	methansäurevernetztes Seidenfibroin-Gerüst (aus Seidenleim)	humane Fibroblasten (Hautprobe) → zuerst angesiedelt	DMEM+10%FBS+AB	Adhärenz (Fluoreszenz-mikroskopie), Metabolismus, IL-1 β -Sekretion; Kollagenanordnung	lange Kultivierung der Zellen möglich (bis 95 Tage metabolisch aktiv, Kollagensynthese, kein IL-1 β)	[29]
		humane Keratinozyten (Hautprobe) + Feederlayer humane Fibroblasten → nach 10 Tagen auf andere Seite des fibroblastenbesiedelten Gerüsts ausgesiedelt	MCDB 153:Hams F12 (1:1)+10%FBS			
	poröses Chitosan-Gelatine-Hyaluronsäure Gerüst	humane neonatale Fibroblasten (Hautprobe) → zuerst angesiedelt	DMEM+10%FBS +L-Glutamin+AB	Proliferation (BrdU), Schichtung und (Laminin, Kollagen IV) (Histologie)	erfolgreiche Besiedelung, Stratifizierung und Nachweis der Basalmembranmoleküle	[94]
		humane Keratinozyten (Hautprobe) → nach 1 Woche auf fibroblastenbesiedeltes Gerüst	serumfreies KGM (Gibco), später +5%FBS und Luftexposition			
	nichtporöse und poröse Filme aus Poly(3-hydroxybutyrat) und Poly(4-hydroxybutyrat) mit Hyaluronsäure und Chitosan	HaCaT	DMEM+10%FBS+AB	Proliferation (Zellzählung), REM, Morphologie (Mikroskopie)	gute Adhärenz und Proliferation auf porösen Filmen, auf nicht-porösen Filmen erhöhte Proliferation mit abnehmender Hydrophobizität	[121]
	poröse, elektrogenespinnene Kollagen-Gerüste, variierender Faserdurchmesser, Faserabstand und Porosität	humane Fibroblasten (Hautprobe) → zuerst angesiedelt	selektives Wachstumsmedium	Vitalität (MTT), Zellorganisation, Schichtung (Histologie)	Beeinflussung der Zellen durch Porosität und Faserabstand; Abstand > 10 μ m: zu schnelle Einwanderung (keine Ausbildung einer Fibroblastenschicht auf dem Gerüst); Abstand 5-10 μ m: Vitalität, Zellorganisation und Schichtung am besten	[126]
		humane Keratinozyten (Hautprobe) → nach 1 Tag auf fibroblastenbesiedeltes Gerüst	selektives Wachstumsmedium, später Luftexposition			
PLA ₅₀ -PEO-PLA ₅₀ Triblock Copolymere mit variablem Laktat/Ethyloxid Verhältnis (LA/EO) 1, 2, 3, 4	humane Fibroblasten (Hautprobe)	DMEM+10%FBS+AB	Adhärenz und Proliferation (MTT), REM	schlechte Adhärenz und Proliferation bei LA/EO < 2	[50]	
	humane neonatale Keratinozyten (Hautprobe)	SFM+EGF+BPE		Adhärenz und Proliferation nicht beeinflusst		

natürliche Polymere	kommerziell erhältliche Kollagen-, Chitosan- und Cellulose-basierte Membranen, tlw. beschichtet mit Kollagen, Laminin, Fibronectin)	primäre humane Fibroblasten (Hautprobe)	DMEM+10%FBS	Ausbreitung, Morphologie, Zellzahl (Durchlichtmikroskopie und Haemozytometer); Proliferation (MTT)	keine Unterschiede	[76]
		primäre humane Keratinozyten (Hautprobe)	modifiziert nach Rheinwald+Green, EpiLife Medium		deutlich höhere Proliferation auf Kollagenmembran und Kollagen-beschichteter Chitosanmembran als auf Cellulose o. Chitosan	
		Cokultur (Keratinozyten nach 24 h auf Fibroblasten-besiedeltes Substrat)	serumfreies Medium		entsprechend den Monokulturen	
	verschiedene Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat-co-3-hydroxyhexanoat) Terpolyester, bakteriell hergestellt	HaCaT	MEM+10%FBS	Zellverteilung (Mikroskopie), REM, Calcium-Assay	höchste Vitalität und Wachstumskapazität auf PHBVHHx verglichen mit anderen Polymeren; evtl. wegen höherer Rauigkeit und geringer Oberflächenenergie	[74]
	Filme aus Kollagen-I/IV mit faserartigem bzw. löslichem Elastin, mit Glycosaminoglycanen, Heparin, Chondroitinsulfat oder Dermatan-sulfat; unterschiedliche Präparationen	humane Keratinozyten (Hautprobe) mit einigen bei der Isolation verbliebenen Fibroblasten	DMEM : Ham's F12 (2:1) +5%FBS +EGF+Hydrokortison +Insulin+Adenin +Ascorbinsäure +L-Glutamin +Choleratoxin +Triiodothyronin+AB	Proliferation (WST-Assay), Morphologie (Histologie, REM)	v.a. Elastin-enhaltende Präparationen ermöglichten eine verbesserte Proliferation von Keratinozyten, die Proliferation der Fibroblasten war nicht erhöht	[89]
poröses Kollagen-Chitosan Gerüst	humane neonatale Fibroblasten (Hautprobe) → in das Gerüstsystem ausgesiedelt	RPMI 1640+10%FBS+AB	Wachstum, Proliferation	Keratinozyten adhärirten schnell und bildeten konfluente Schicht nach 1-2 Tagen; ohne Fibroblasten im Gerüst langsame Proliferation → Chitosan bietet zusätzliche Aminogruppen als Bindungsstellen	[117]	
	humane neonatale Keratinozyten (Hautprobe) A. ohne Feederlayer (KGM) B. mit 3T3 Feederlayer C. mit humanen Fibroblasten Feederlayer → auf die Oberfläche des fibroblastenbesiedelten Gerüsts ausgesiedelt	KGM, modifiziertes Medium (DMEM und Ham's F12 3:1+10%FBS+EGF +Hydrokortison +Insulin+Epinephrin+ Prostaglandin +L-Glutamin+AB, später Luftexposition				

natürliche Polymere	Film aus bakteriell synthetisiertem 1. Cellulose 2. Cellulose-co-Chitosan 2a. MW 30000 2b. MW 80000	Fibroblasten-Zelllinie (murin, L929)	DMEM+10%FBS+AB +L-Glutamin +Lactalbumin	Extrakttest Zytotoxizität (ISO10993-5), MTT	keine Zytotoxizität	[84]
		primäre humane Fibroblasten (ATCC)	DMEM+10%FBS+AB , nach 16 h Mediumwechsel zu SFM	Proliferation (MTT) und Ausbreitung/Morphologie (REM)	1. und 2. vergleichbar bessere Adhärenz und Ausbreitung auf 2 verglichen mit 1, keine Unterschiede 2a und 2b	
		HaCaT				
		Cokultur auf Kollagenmembran (Zellen zunächst einzeln kultiviert, dann zusammen)	Keratinocyten: EpiLifeMedium, Cokultur: SFM	Durchlichtmikroskopie	gleichmäßigere Zellverteilung auf Kollagenmembran, aber die Zelltypen trennten sich in eine heterogene Cokultur	
	Mikrofasergestützte aus denaturiertem Rinder-Kollagen	humane Fibroblasten (Cambrex)	DMEM+10%FBS +AB	Adhärenz, Vitalität, Scaffoldeinwanderung	beide Zellen: adhären und überleben; nur Fibroblasten wanderten in das Gerüst ein, Keratinocyten (und HaCaTs) stratifizierten auf der Scaffold- Oberfläche	[82]
		HaCaTs				
		neonatale Keratinocyten (Cambrex)	KGM I (Clonetics)	REM, TEM		
	Quervernetzte Spinnenseidenfäden	murine embryonale Fibroblasten (MEF) → zuerst ausgesiedelt	DMEM (viel Glucose)+10%FBS+N atriumpyruvat+AB	Vitalität, Adhärenz, Schichtung	beide Zelltypen adhären und proliferieren, Ausbreitung in die Maschen, konfluent nach ca. 1 Woche; geschichtetes Wachstum wurde erreicht	[182]
		HaCaT → nach 2 Wochen auf das fibroblastenbesiedelte Gerüst	DMEM/Ham's F12 1:1 +1%FBS+Natriumpyruvat +AB; später DMEM/Ham's F123:1+1%FCS+Natriumpyruvat+AB mit Luftexposition			

Kombi. Polymere	Mischung Kollagen-Polycaprolacton, elektrogenesponnen; Kollagen + 1%, 3%, 10%, 30%, 100% PCL	humane Fibroblasten (Hautprobe) → zuerst angesiedelt	UCMC 160; später Luftexposition	Proliferation (BrdU), Zellmetabolismus (MTT), Schichtung und Bildung der Basalmembran (Histologie)	bis 10% PCL kaum Beeinflussung von Proliferation und Stratifizierung, ab 30% eher geringe Epidermisbildung	[125]
		humane Keratinozyten (Hautprobe) → nach 1 Tag auf fibroblastenbesiedeltes Gerüst ausgesiedelt				
Kombi. Polymere	Nanofasern aus Polyvinylalkohol (PVA), Polyhydroxybutyrat (PHB) und PVA/PHB-Mischung, leichte Änderung Hydrophilie	humane Fibroblasten (CellLining)	DMEM+10%FBS+L-Gluatamin+AB	Adhärenz und Vitalität (FDA)	höchste Zelladhärenz auf PHB, beim Vergleich der Mischungen hat PVA-Einbau einen negativen Effekt	[6]
		HaCaT			höchste Zelladhärenz auf PHB, beim Vergleich der Mischungen hat PVA-Einbau einen positiven Effekt	
synthetische Polymere	Polyethylen modifiziert durch Bestrahlung 1. Ar ⁺ 2. Xe ⁻	humane Keratinozyten nach Rheinwald+Green mit wachstumsgehemmten 3T3-Feederlayer	Eagle's MEM in Hanks' Puffer+Natrium pyruvat +NaHCO ₃ +10%FBS +Hydrocortison +Insulin +Choleratoxin +EGF+AB	Adhärenz und Proliferation (MTT)	durch Bestrahlung Degradation, Bildung von Doppelbindungen, Änderung von Rauigkeit und Oberflächenpolarität, verbesserte Adhärenz und Proliferation auf dem bestrahlten Material	[161]
	Polycaprolacton-Membran, beschichtet mit Fibrin (perforiert)	humane Keratinozyten (Hautprobe)	SFM (Gibco)	Adhärenz und Proliferation (Mikroskopie, REM)	gute Adhärenz und Proliferation, Fibrinbeschichtung bringt Vorteile; Zellen können durch die Perforierungen migrieren und beide Materialseiten besiedeln	[83]
	Tegaderm™ (Polyurethan-basierte Membran)	humane neonatale Fibroblasten (Hautprobe)	DMEM+10%FBS	Adhärenz und Proliferation (MTT), Morphologie (REM)	gute Adhärenz, Proliferation und Morphologie (Keratinozyten geringer als auf TCP)	[122]
	humane neonatale Keratinozyten (Hautprobe)	DMEM+20%FBS +EGF +Choleratoxin +Hydrocortison bzw. EpiLife (Cascade Biologics)				
		mesenchymale Stammzellen (Knochenmarkprobe vom Schwein)	DMEM+10%FBS			

6.3 Motivation und Zielsetzung

Wie in der Einleitung aufgezeigt wurde, kann die Modifizierung von Polymereigenschaften genutzt werden, um Zellen gezielt zu beeinflussen. Des Weiteren wurde dargelegt, dass Keratinozyten für biotechnologische und medizinische Anwendungen eine große Rolle spielen. Jedoch ist derzeit kein Verfahren zur kosteneffizienten, zuverlässigen und reproduzierbaren Herstellung reiner, vitaler und proliferativer Keratinozytenkulturen frei verfügbar, bei dem für Isolierung und Kultivierung komplett auf tierische Feederlayer, Beschichtungen oder Mediumzusätze verzichtet werden kann [77]. Des Weiteren stellt die adäquate Regeneration von Hautwunden noch immer eine klinisch relevante Herausforderung dar, da trotz der Verfügbarkeit verschiedenster Therapien nicht immer ein medizinisch und/oder kosmetisch befriedigendes Ergebnis erzielt werden kann.

Ein geeignetes Polymer, das das selektive Wachstum von primären humanen Keratinozyten gegenüber primären humanen dermalen Fibroblasten ermöglicht, könnte einen Lösungsansatz für die vorgenannten Herausforderungen bieten.

Gesamtziel der vorliegenden Doktorarbeit war daher die Entwicklung eines Testsystems zur schnelleren Identifizierung eines solchen Polymers oder Copolymers, sowie die Charakterisierung der Polymereigenschaften, um diese mit dem Verhalten der Zellen zu korrelieren und damit eine weitere Verbesserung der Polymere steuern zu können. Damit die Zellkulturexperimente bezüglich der Selektivität aussagekräftig sein können, musste ein für beide Zelltypen geeignetes Zellkulturmedium eingesetzt werden. Außerdem musste für die genaue Unterscheidung der beiden adhärenz Zellentypen zum Nachweis eines zellselektiven Effekts eine geeignete Methode gefunden werden. Mit dem Testsystem sollte zunächst der Einfluss der Elastizität von Modellpolymeren auf die beiden Zelltypen untersucht werden. Aus den Ergebnissen vielfältiger Studien kann davon ausgegangen werden, dass die Variation der Elastizität beeinflusst, welche Zugkräfte eine Zelle gegenüber dem Substrat ausüben kann und dies durch intrazelluläre Rückkopplungsmechanismen zu veränderten Zellantworten führt. Die Art und Dichte der Oberflächenladung, sowie der Hydrophilie von Modellpolymeren sollten als weitere Parameter zur Beeinflussung der Zellen untersucht werden. Dabei wird davon ausgegangen, dass Ladung und Hydrophilie über elektrostatische und ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken-Bindungen zunächst Ionen, Proteine und weitere Moleküle adsorbieren. Über die Zusammensetzung, Dichte und Konformation der adsorbierten Moleküle wird dann die Zelladhärenz beeinflusst, und über intrazelluläre

Rückkopplungsmechanismen die Reaktion der Zellen bedingt. Aufgrund von Unterschieden zwischen verschiedenen Zelltypen, beispielsweise in der Komposition zellmembranassoziierter Proteine, Zucker und Lipide, sowie im Aufbau des Zytoskeletts, können Polymereigenschaften zellspezifische Effekte auslösen.

6.4 Strategie

Zur Entwicklung eines Testsystems für die Untersuchung der Beeinflussung von primären humanen Keratinozyten und primären humanen dermalen Fibroblasten durch bestimmte Polymereigenschaften, wurden zunächst Wachstumskurven mit verschiedenen Einsaaten durchgeführt. Dabei wurden die Zellen in Mono- und Cokultur in gleichem Medium ausgesät und die Zelldichten nach verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Es wurde ein Zellkulturmedium gewählt, das bevorzugt die Proliferation von Keratinozyten unterstützt, in dem jedoch auch die Fibroblasten ausreichend gut proliferieren konnten. Das Medium enthielt weder Serum noch andere undefinierte Zusätze, um die Variabilität des Systems zu minimieren und das Kultursystem als Ausgangspunkt für potentielle medizinische Anwendungen der kultivierten Zellen in Richtung biologischer Sicherheit vorzubereiten. Die primären humanen Keratinozyten und primären humanen dermalen Fibroblasten wurden von einem kommerziellen Anbieter erworben, um auch hier die Variabilität gering zu halten. Um beide Zelltypen in der Cokultur sicher zu unterscheiden, wurde eine spezifische immunzytochemische Färbung für Keratin14 und Vimentin durchgeführt. Die Einsaaten, die in Mono- bzw. Cokultur eine ähnliche Proliferation beider Zelltypen ermöglichten, wurden für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Zur Analyse der Dichte und Vitalität adhärenter Zellen wurde die Anwendbarkeit einer Lebend/Tot-Färbung geprüft. Des Weiteren wurde die Eignung der Durchflusszytometrie zur Analyse der Vitalität und Zahl nicht-adhärer Zellen untersucht. Zur Untersuchung der Zellmembranintegrität wurde die Anwendbarkeit eines Laktatdehydrogenase-Assays überprüft. Außerdem wurde geprüft, ob die immunzytochemische Färbung der ECM-Komponenten Fibronectin, Elastin und Kollagen I-V, sowie die Analysen löslicher Faktoren aus dem Zellkulturüberstand durch immunologische Untersuchungsmethoden anwendbar sind.

Für die Untersuchung der Zellbeeinflussung mittels des Testsystems wurden Copolymere mit Abstufungen verschiedener Eigenschaften durch die Mitarbeiter des Zentrums für Biomaterialentwicklung, HZG, Teltow (Abteilungen PBA, PBI, PBS) synthetisiert, formiert und charakterisiert.

Vernetzte Poly(*n*-butylacrylate) (cP*n*BAs) mit verschiedenen Anteilen des Vernetzers wurden polymerisiert (siehe Abbildung 4), um die Elastizität zu modifizieren. Um die tatsächliche Variation der Elastizität nachzuweisen, wurden die Elastizitätsmoduli durch Zugtestung und Mikroindentation bestimmt.

Durch die Variation des molaren Anteils der positiv bzw. negativ geladenen Comonomere Methacrylsäure-2-aminoethylester-hydrochlorid (AEMA), N-3-Aminopropyl-methacrylamid-hydrochlorid (APMA) bzw. Natriumsalz der 2-Methyl-2-propen-1-sulfonsäure (NaMAS) in den Acrylnitril-basierten Copolymeren, sollte die Ladung der Copolymere modifiziert werden. Eine Variation der Hydrophilie sollte durch die Erhöhung des molaren Anteils des hydrophilen Comonomer N-Vinylpyrrolidon (NVP) erreicht werden (siehe Abbildung 5). Im Gegensatz zur früheren Polymersynthese [63,64,66] wurden die Polymere für die vorliegende Studie lösungsmittelfrei synthetisiert und formiert, um toxische Einflüsse von Resten des Lösungsmittels im Polymer auf die Zellen auszuschließen und so die Zellverträglichkeit zu verbessern [141]. Aufgrund der Umstellung der Prozessierung wurden die Polymere für die vorliegende Arbeit als gesinterte Chips zur Verfügung gestellt. In früheren Untersuchungen wurden bisher Membranen formiert und untersucht [15,64]. Um das tatsächliche Vorliegen eines höheren Anteils der gewünschten Comonomere zu bestätigen, wurde die tatsächliche Einbaurrate der Comonomere durch Elementaranalysen bestimmt.

Alle zu untersuchenden Polymere wurden in adäquater Reinheit für medizinische Anwendungen („medical grade“) hergestellt, vor dem Einsatz sterilisiert und der Endotoxingehalt sowie die Zytotoxizität wurden untersucht. Um die Einflüsse anderer Polymereigenschaften ausschließen bzw. abschätzen und so eine angemessene Korrelation von Zellveränderungen mit den Polymereigenschaften gewährleisten zu können, wurden die Polymere weitergehend charakterisiert (z.B. Untersuchung der Benetzbarkeit und Rauigkeit).

Die Polymerproben wurden im Testsystem hinsichtlich Adhärenz und Vitalität der Keratinozyten und Fibroblasten in Mono- und Cokultur, sowie die potentielle selektive Keratinozyten-Adhärenz in der Cokultur untersucht. Auf den cP*n*BA-Proben wurden außerdem die Ablagerung der ECM-Komponenten Kollagen I-V, Fibronectin und Elastin, sowie die Sekretion löslicher Faktoren untersucht.

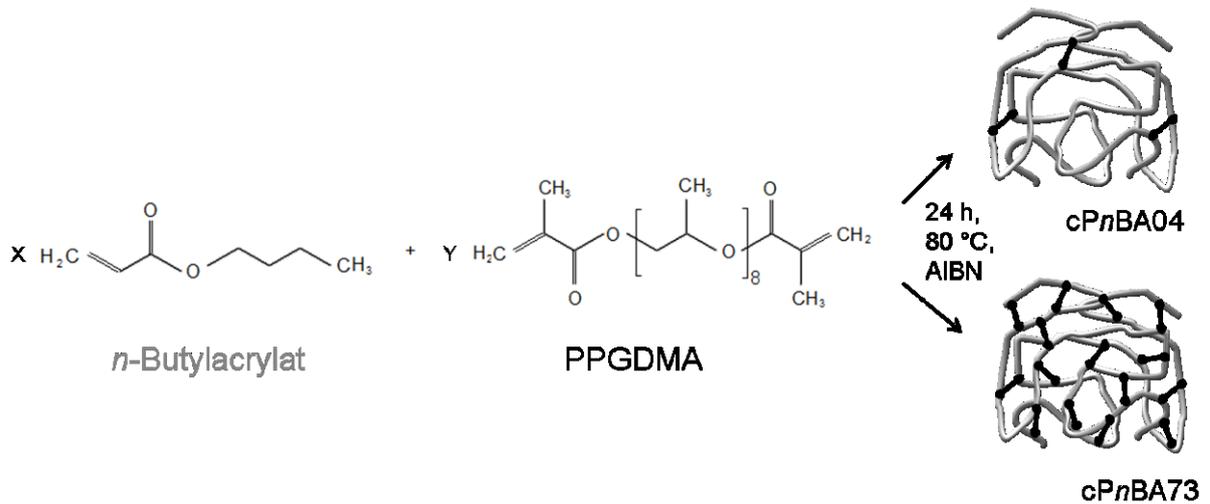


Abbildung 4: Schema zur Synthese der vernetzten Poly(*n*-butylacrylate). *n*-Butylacrylat wurde mit Poly(propylenglycol) dimethacrylat (PPGDMA) als Vernetzer und 2,2'-Azobisisobutyronitril (AIBN) als Initiator polymerisiert. cPnBA04 bezeichnet das Produkt aus der Synthese mit 0,4 Gew.-% des Vernetzers, und cPnBA73 das Produkt mit 73 Gew.-% (Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Abteilung PBI).

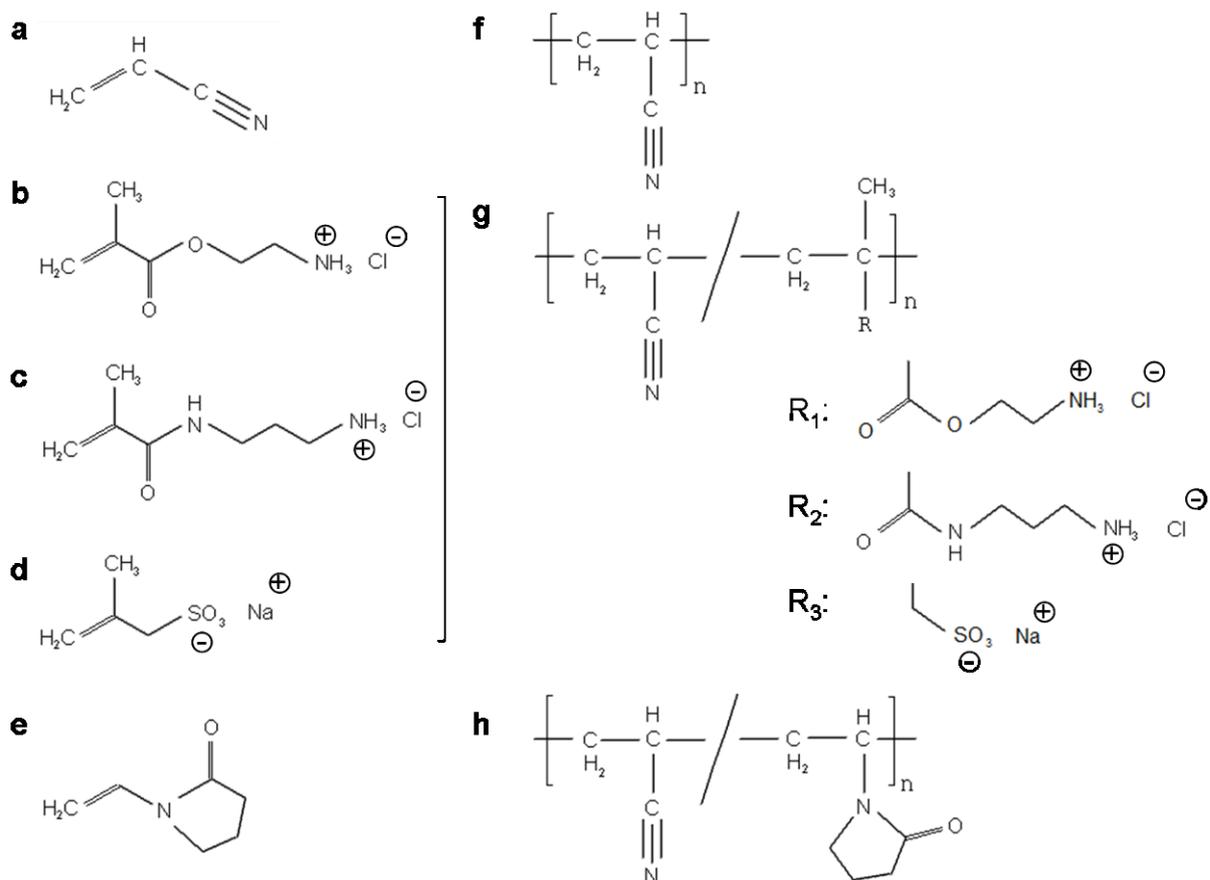


Abbildung 5: Strukturformeln der Comonomere (a-e) und Copolymere (f-h) der Acrylnitril-basierten Copolymere: (a) Acrylnitril, (b) Methacrylsäure-2-aminoethylester-hydrochlorid (AEMA), (c) N-3-Aminopropyl-methacrylamid-hydrochlorid (APMA), (d) Natriumsalz der 2-Methyl-2-propen-1-sulfonsäure (NaMAS), (e) N-Vinylpyrrolidon (NVP), (f) Polyacrylnitril Homopolymer (PAN), (g) Poly(AN-co-R) mit R₁: AEMA, R₂: APMA, R₃: NaMAS, (h) Poly(AN-co-NVP). Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Polymerrückgrade ausgeschrieben und für die Seitenketten verkürzte Formeln verwendet.

7 Material und Methoden

7.1 Materialien

7.1.1 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller / bestellt über	Katalognummer
Zellkulturflaschen, 25 cm ² und 75 cm ² mit Filter-Schraubkappen	TPP	90026 / 90076
Mikrotiterplatten mit 24 Kavitäten	TPP	92024
Zentrifugenröhrchen, 15 ml und 50 ml	TPP	91015 / 91050
Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml und 50 ml	TPP	94005, 94010, 94525 und 94550
Pipettenspitzen, 50 µl - 1000 µl und 0,1 µl - 20 µl	Eppendorf Deutschland	0030 000.919 und 0030 000.838
CASYcups	Th. Geyer	5651794
Spritzenfilter 0,2 µm	Whatman	FP30-0,2 CA-S 10 462 205
Einmalspritze 20 ml HSW NormJect	Henke Sass Wolf	
Spitzen für Multipette Combitips Plus 2,5 ml, 5 ml, 25 ml und 50 ml	Eppendorf	0030 069.242, 0030 069.471, 0030 069.250 und 0030 069.390
Adapter für die Multipetten-Spitzen Combitips Plus; 25 ml und 50 ml	Eppendorf	0030 069.498 und 0030 069.480
Einmalkanüle LuerLock Fine Ject	Henke Sass Wolf	
Parafilm M IS 4 INx250FT	VWR	291-1212
Objektträger superfrost 76x26 mm; nach ISO 8037/1	Th. Geyer	9161174
Zentrifugenröhrchen für Durchflusszytometrie	Beckman Coulter	
Deckgläschen Ø 14 mm #1	Menzel Gläser	CB00140RA1
Einmal-Pinzetten	Havelberger Sanitätsmaterial u. Medizintechnik	66-103

7.1.2 Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus / ThermoScientific
Pipettierhilfe Pipetboy	IBS Integra
Pipette research plus (0,5 µl – 20 µl und 50 µl -1000 µl)	Eppendorf Deutschland
Zentrifuge Biofuge primo R	Heraeus / ThermoScientific
Wasserbad GFL Typ 1012	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH
Wärmeblock AccuBlock Digital dry bath	Labnet
MACS Quant	Miltenyi Biotec
Mikroskop Axiovert 40	Zeiss
InCellAnalyzer 2000	GE
konfokales Laserscanningmikroskop (cLSM)	Zeiss
BioPlex200	Bio-Rad Laboratories
InfinitePro200	Tecan
CASY TTC Zellzählgerät	Schärfe System GmbH
Rasterelektronenmikroskop	Zeiss Supra 40VP
CO ₂ -Inkubator Autoflow	Nuaire US
Multipette x-stream	Eppendorf Deutschland
Glasringe (Borosilikat), ca.5 mm Höhe, ca.11 mm Innendurchmesser	Naskowski Berlin
Analysenwaage CP124S	Sartorius Göttingen AG
Schwenkschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments
Flockeneis Automat AF20	Scotman
manuelle Stanze	Bestand HZG

7.1.3 Substanzen und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen / Gibco	41965-039
Fetales Rinderserum (FBS) Superior	Biochrom AG	S 0615
Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (PBS-/-),	Biochrom AG	L 1825
Phosphatgepufferte Salzlösung mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (PBS +/+)	Biochrom AG	L 1815
EDTA Pulver	Sigma	E-5391
EDTA 1% (w/v)	Biochrom AG	L 2113
0,25% Trypsin/0,53 mM EDTA	ATCC	30-2101
CASYton ®	Schärfe System / Roche	05651808001
Keratinocyten-Wachstumsmedium (keratinocyte growth medium advanced; KGM adv.)	Provitro	2030511
KGM adv. Zusätze	Provitro	2030511
Definierter Trypsininhibitor (defined trypsin inhibitor; DTI)	Invitrogen	R-007-100
Calciumchlorid-Lösung (0,5 M CaCl ₂)	PromoCell	C-34006
TritonX-100	Fluka	93443-100ML
Rinder-Serum Albumin Fraktion V (BSA), aus Rinderserum	Merck	1.12018.0100
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Roth	6335.1
DRAQ5	Biostatus Limited	DR50200
autoMACSPro Buffer	Miltenyi Biotec	
Ethanol Absolut, reinst	Geyer Chemsolute	00002273
Isopropanol	Merck	8187661000
Hexamethyldisilazane	Polysciences Europe GmbH	00692-250
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich	G5882-1ML
Mowiol 4-88	Roth	0713.2

7.1.4 Software

Office 2003 (Microsoft)

ImageJ 1.43u und 1.43m (NIH)

LSM Image Browser 4,2,0,121 (Zeiss)

InCell Investigator (GE)

FlowJo 7.6.4 (Tree Star, Inc.)

Prism 5.03 (GraphPad Software Inc.)

Magellan 7 (Tecan)

Endnote X2 (The Thomson Corporation)

Formel Editor Version 4.1 (SimpleSoft, Buchholz Wengst GbR)

7.2 Polymere

7.2.1 Vernetzte Poly(*n*-butylacrylate)

Poly(*n*-butylacrylat)-Netzwerke (cPnBAs) wurden in der Abteilung PBI (Dr. Kratz; Dr. Cui) synthetisiert und charakterisiert [27]. Die Netzwerke wurden durch thermisch induzierte freie radikalische Polymerisation von *n*-Butylacrylat und Poly(propylenglycol) dimethacrylat (PPGDMA, $M_n = 560 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) als Vernetzer und 2,2'-Azobisisobutyronitril (AIBN) als Initiator hergestellt. Für die Synthese von cPnBA04 wurde ein PPGDMA-Gehalt von 0,4 Gew.-% im Ansatz verwendet, für cPnBA73 ein PPGDMA-Gehalt von 7,3 Gew.-%. Die homogene Lösung wurde in Formen aus zwei Glasplatten und einem Teflon-Abstandshalter mit einer Höhe von 1 mm gefüllt. Das Gewicht (m_{iso}) des Films wurde nach 24 h bei 80 °C gemessen. Der Film wurde durch aufeinander folgendes Eintauchen in *n*-Hexan, einer Mischung aus *n*-Hexan und Chloroform (50/50, v/v), einer Mischung aus *n*-Hexan und Chloroform (75/25, v/v) und *n*-Hexan gereinigt und bei 40 °C unter Vakuum bis zum konstanten Gewicht (m_d) getrocknet. Aus den gegossenen Netzwerk-Filmen wurden Chips mit 13 mm Durchmesser ausgestanzt.

Die Reinheit der Polymere wurde durch ATR-IR Spektroskopie, ¹H-NMR Spektroskopie und durch Gas-Chromatographie (GC) bestätigt. Durch dynamische Differenzkalorimetrie wurde die Glasübergangstemperatur bestimmt. Durch Zugtestung und Eindrucktestungen wurden die mechanischen Eigenschaften der Netzwerke, durch Kontaktwinkelmessungen die Benetzbarkeit und durch Zetapotentialmessungen die Oberflächennettoladung bestimmt [18,27,67].

7.2.2 *Acrylnitril-basierte Copolymere*

Die Acrylnitril (AN)-basierten Copolymere wurden durch die Abteilungen PBS (Dr. Scharnagl), PBA (Dr. Behl) und PBI (Dr. Kratz) hergestellt und charakterisiert.

Die Copolymere wurden durch Emulsions-Polymerisation mit dem jeweiligen Comonomer polymerisiert [140,141]. Als Radikalinitiator wurde das Kaliummetabisulfit (KMBS) / Kaliumperoxodisulfat (KPS)-System (KMBS: AcrosOrganics, KPS: Aldrich) verwendet. Verschiedene Comonomer-Anteile wurden durch Zugabe einer entsprechenden Menge Comonomer in die AN-Startmischung erhalten. Die Polymerisationen wurden lösungsmittelfrei und in technischem Maßstab (5 kg Ansatz) durchgeführt. Alle Reinigungs- und Trocknungsschritte wurden unter Reinraumbedingungen durchgeführt. Die erhaltenen Pulver wurden durch IR, NMR, DSC, TGA, GPC, GC-Headspace und Elementaranalysen charakterisiert [140,141].

Durch Sintern wurden aus den Pulvern kreisförmige transparente Proben (auch Chips genannt) mit einem Durchmesser von 13 mm und einer Dicke von ~ 1 mm hergestellt. Diese Chips wurden mittels Kontaktwinkelmessung, Profilometrie, IR- und RAMAN-Mikroskopie, GPC, DSC, TGA und REM charakterisiert.

Für die biologischen Testungen wurden die Proben mit Ethylenoxid sterilisiert (45 °C, Expositionszeit 180 min). Bevor die Keratinozyten/Fibroblasten-Testungen durchgeführt wurden, wurden der Endotoxingehalt und die Zytotoxizität des Eluats bestimmt.

Das reine Acrylnitril-Homopolymer (PAN) wurde außer bei der AEMA-Reihe bei allen Testungen als Kontrolle mitgeführt.

7.2.2.1 *Acrylnitril-basierte Copolymere mit Variation der geladenen funktionellen Gruppen*

Zur Herstellung von Polymeren mit zunehmendem Einbau positiv geladener funktioneller Gruppen (kationisch) wurde Methacrylsäure-2-aminoethylester-hydrochlorid (AEMA) mit AN copolymerisiert, um p(AN-co-AEMA) zu erhalten. Es wurden Copolymere mit 0,5, 1 und 2 mol-% synthetisiert (im Folgenden AEMA 0,5, AEMA 1 und AEMA 2). Eine zweite Serie mit zunehmendem Anteil positiv geladener funktioneller Gruppen wurde durch die Copolymerisation von AN mit N-3-Aminopropylmethacrylamid-hydrochlorid (APMA) zu p(AN-co-APMA) erhalten. Die Copolymere wurden mit 0,5, 1 und 2 mol-% APMA (im Folgenden APMA 0,5, APMA 1 und APMA 2) hergestellt.

Um Copolymere mit ansteigendem Anteil negativ geladener funktioneller Gruppen (anionisch) zu erhalten, wurde AN mit dem Natriumsalz der 2-Methyl-2-propen-1-sulfonsäure (NaMAS) zu p(AN-co-NaMAS) copolymerisiert. Es wurden Copolymere mit 0,5, 1 und 2 mol-% synthetisiert (im Folgenden NaMAS 0,5, NaMAS 1 und NaMAS 2).

7.2.2.2 Acrylnitril-basierte Copolymere mit Variation der Hydrophilie

Zur Variation der Hydrophilie wurde AN mit dem hydrophilen Comonomer N-Vinylpyrrolidon (NVP) copolymerisiert um Poly(acrylnitril-co-[1-vinyl-2-pyrrolidon]) zu erhalten. Copolymere mit 5, 10, 20, 25 und 30 mol-% NVP wurden hergestellt (im Folgenden NVP 5, NVP 10, NVP 20, NVP 25 und NVP 30).

7.3 Zellkultur

EDTA-Lösung 0,05%

25 mg EDTA Pulver
+ 50 ml PBS-/-
→ gemischt und sterilfiltriert
bzw. 2 ml EDTA-Lösung 1%
+ 38 ml PBS-/-

0,025% Trypsin/0,053 mM EDTA Lösung

5 ml 0,25% Trypsin/ 0,53 mM EDTA
+ 45 ml PBS-/-

2,5% BSA-Stopplösung

0,5 g BSA
+ 50 ml PBS-/-
→ gemischt und sterilfiltriert

7.3.1 Kultivierung primärer humaner Keratinozyten

Keratinozytenwachstumsmedium (Keratinocyte Growth Medium advanced; *KGM adv.*)

500 ml KGM Basalmedium
+ 1 ml Supplement

Für die Versuche wurden primäre humane Keratinozyten der Firma Provitro (Kat.Nr. 1210512) verwendet. Die kryokonservierten Zellen wurden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und nach dem Resuspendieren mit KGM adv. in vorbereitete Zellkulturflaschen überführt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂, wasserdampfgesättigte Atmosphäre). Nach spätestens 24 h erfolgte der erste Mediumwechsel, danach wurde alle 2 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt bzw. wurden die Zellen subkultiviert. Vor jedem Mediumwechsel bzw. jeder Subkultivierung erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Morphologie. Zur Subkultivierung bei einer

Zellkonfluenz von ca. 70% - 80% wurden die Zellen zunächst kurz mit PBS/-/ gespült. Dann wurde 10 min mit 0,05% EDTA und anschließend je nach Ablöseverhalten (ca. 4 bis 8 min) mit 0,025% Trypsin/0,053 mM EDTA im Brutschrank inkubiert. Mittels einer vorgewärmten 2,5%igen BSA-Lösung bzw. definierter Trypsininhibitor-Lösung (DTI) wurde das Trypsin inhibiert und die in ein Zentrifugenröhrchen überführte Zellsuspension wurde 5 min bei 250 g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das entstandene Pellet in KGM adv. resuspendiert und die Zellzahl mit dem CASY-Gerät ermittelt (Keratinocyten-Setup, „Aggregation Correction“ ausgeschaltet). Die Einsaat erfolgte mit 8000 Zellen/cm² in vorbereitete Zellkulturflaschen mit entsprechender Menge KGM adv.

7.3.2 Kultivierung primärer humaner Fibroblasten

Fibroblastenwachstumsmedium (DMEM+FBS10%)

- 450 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- + 50 ml fetales Rinderserum (FBS) Superior

Für die Versuche wurden primäre humane dermale Fibroblasten der Firma Provitro (Kat.Nr. 1210411) verwendet. Die kryokonservierten Zellen wurden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und nach dem Resuspendieren mit DMEM+FBS10% in vorbereitete Zellkulturflaschen überführt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂, wasserdampfgesättigte Atmosphäre). Nach spätestens 24 h erfolgte der erste Mediumwechsel, danach wurde alle 2 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt bzw. wurden die Zellen subkultiviert. Vor jedem Mediumwechsel bzw. jeder Subkultivierung erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Morphologie. Zur Subkultivierung bei einer Zellkonfluenz von ca. 70% - 80% wurden die Zellen zunächst kurz mit PBS/-/ gespült. Dann wurde 10 min mit 0,05% EDTA und anschließend je nach Ablöseverhalten (ca. 4 min) mit 0,025% Trypsin/0,053 mM EDTA im Brutschrank inkubiert. Mittels vorgewärmtem DMEM+FBS10% wurde das Trypsin inhibiert und die in ein Zentrifugenröhrchen überführte Zellsuspension wurde 5 min bei 250 g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das entstandene Pellet in DMEM+FBS10% resuspendiert und die Zellzahl mit dem CASY-Gerät ermittelt (Fibroblasten-Setup, „Aggregation Correction“ ausgeschaltet). Die Einsaat erfolgte mit 6000 Zellen/cm² in vorbereitete Zellkulturflaschen mit entsprechender Menge DMEM+FBS10%.

7.3.3 *Wachstumskurven*

Für die Polymertestungen wurde die Kultivierung primärer humaner Keratinozyten und Fibroblasten in Monokultur und Cokultur für Mikrotiterplatten mit 24 Kavitäten (im Folgenden (24)-Mikrotiterplatte) angepasst. Da das Fibroblasten Standardmedium (DMEM+FBS10%) bei Vorversuchen zur Statusänderung der Keratinozyten (nicht mehr proliferativ) führte, und reines DMEM keine ausreichenden Wachstumsfaktoren lieferte, wurde als Medium das Keratinozytenwachstumsmedium KGM adv. gewählt. Um in den Monokulturen und in der Cokultur über eine 48 stündige Kultivierung in etwa gleiche Zelldichten und ein 1:1 Verhältnis von Keratinozyten zu Fibroblasten, sowie die Subkonfluenz der Zellen in der Mitte der Kavitäten zu erreichen, wurden Wachstumskurven durchgeführt. Dabei wurden Einsaaten von je 10000 Zellen/cm², je 20000 Zellen/cm², je 30000 Zellen/cm² für die Monokulturen und von je 5000 Zellen/cm² und 10000 Zellen/cm² für die Cokultur getestet (die Zellen beeinflussen ihre gegenseitige Proliferation positiv, daher eine insgesamt geringere Zellzahl in der Cokultur). Für die Monokulturen wurden die Zellzahlen nach 12, 24, 48 und 60 Stunden durch die Zellzahlmessung mit dem CASY-Gerät nach dem Abtrypsinieren aus der Kavität bestimmt. Für die Cokulturen wurden die Zellen für Keratin14 und Vimentin (siehe 7.4.4.1 Keratin/Vimentin-Färbung) gefärbt. Je 5 Bilder von 4 Proben wurden mit dem cLSM aufgenommen und die Zellzahlen ausgezählt.

7.3.4 *Zellaussaat auf Polymerproben*

1,2 mM CaCl₂-Lösung
2,4 µl CaCl₂-Lösung (0,5 M)
+ 1 ml KGM adv.

TritonX-100 0,5% in PBS/-

Für die Untersuchungen der Zellen auf Polymerproben wurden Keratinozyten und Fibroblasten in Mono- und in Cokultur 48 bzw. 60 Stunden auf Polymerproben inkubiert. Die Zellen wurden vor dem Versuchsansatz mehrfach subkultiviert (hochproliferiert), um ausreichend viele Zellen zur Verfügung zu stellen.

Die (24)-Mikrotiterplatten wurden mit den zu untersuchenden Polymeren (Durchmesser ca. 13 mm) bestückt. Entsprechende Kavitäten für Kontrollen wurden berücksichtigt: unbeeinflusste Zellen zur Kontrolle der physiologischen Morphologie und Adhärenz auf TCP oder Glasdeckgläschen sowie eine „high control“ für den LDH-Assay, in der alle Zellen durch Triton geschädigt wurden. In alle Kavitäten wurden Glasringe zur Fixierung

der Polymere eingelegt, um das Aufschwimmen oder Verrutschen der Proben zu verhindern.

Für die Aussaat auf den Polymerproben wurden die Zellen aus mehreren Zellkulturflaschen (Passage 3) trypsinisiert und gepoolt. Die Trypsinierung erfolgte entsprechend der Standard-Subkultivierung, jedoch wurden die Fibroblasten nach der Zentrifugation in KGM adv. resuspendiert. Für die Cokultur wurden Keratinozyten und Fibroblasten für die gemeinsame Einsaat parallel trypsinisiert. Als Versuchsmedium wurde für alle Zellen KGM adv. verwendet (für Keratinozyten, Fibroblasten und Cokultur).

Mit einer Multipette wurden die Monokulturen mit 30000 Zellen/cm² in die vorbereiteten (24)-Mikrotiterplatten ausgesät, die Cokultur mit 10000 Zellen/cm² je Zelltyp (zusammen 20000 Zellen/cm²). Dabei wurden 1,9 cm² als Berechnungsgrundlage herangezogen. Die Fläche innerhalb des Glasringes ist kleiner (ca. 1,3 cm²), jedoch können sich auch Zellen auf dem Glasring oder außerhalb des Glasringes ansiedeln. Daher ist die konkrete Besiedlungsfläche schwer abschätzbar.

Für die Zellen der Differenzierungskontrolle wurden die Zellen in KGM adv. mit 1,2 mM CaCl₂ eingesät. In den Kavitäten für die LDH-„high-control“ wurde nach ca. 40 Stunden das Medium durch TritonX-100 0,5% ersetzt.

Die Zellen auf den Proben und Kontrollen wurden im CO₂-Inkubator für 48 h bzw. 60 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels LDH-Assay, Durchflusszytometrie, FDA/PI Färbung und/oder Immunfärbungen evaluiert.

7.4 Methoden zur Untersuchung der Testparameter Zell-Vitalität, -Adhärenz, -Selektivität, ECM-Ablagerung und Sekretion löslicher Faktoren

7.4.1 Lebend/Tot Färbung (FDA/PI)

Fluoresceindiacetat/Propidiumiodid-Färbelösung (pro Kavität)

2,5 µl Fluoresceindiacetat (FDA; F73785, SIGMA;

Stammlösung 5 mg/ml in Aceton)

+ 1 µl Propidiumiodid (PI; P35661, Invitrogen,

Stammlösung 1 mg/ml in Millipore Wasser)

+ 500 µl KGM adv.

Kurz vor der Färbung wurden entsprechend der Anzahl der zu untersuchenden Kavitäten FDA und PI zu vorgewärmtem KGM adv. zugegeben. Der Zellkulturüberstand wurde aus den Kavitäten abpipettiert und für die durchflusszytometrische Analyse in Mikroreaktionsgefäße auf Eis überführt. Je 0,5 ml der frisch angesetzten Färbelösung

wurden zugegeben und ca. 5 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden mit dem cLSM (1 Sichtfeld, 5fache Vergrößerung) bzw. InCell Analyzer (6 Sichtfelder, 10fache Vergrößerung) gescannt und die Zellzahlen pro cm^2 mit ImageJ ausgezählt (resultierende Zelldichten für die Keratinozytenmonokultur d_{Ker} , für die Fibroblastenmonokultur d_{Fib} und für die Cokultur d_{Co} ; bzw. Darstellung in den Tabellen als Zelldichte lebender d_{vital} , toter d_{tot} und Summe lebender und toter Zellen d_{gesamt}). Die NVP Proben wurden aufgrund der Undurchsichtigkeit von NVP25 und NVP30 in den Kavitäten umgedreht und dann Bilder aufgenommen.

7.4.2 Durchflusszytometrische Analyse der Zellkulturüberstände

Zur Analyse der von den Polymerproben abgelösten oder nicht adhärerten Zellen wurde der Überstand der Zellen auf den Polymerproben in Mikroreaktionsgefäße überführt und bei 4000 rpm 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet wurde in 100 μl autoMACSPro Puffer resuspendiert. DAPI wurde vom Gerät automatisch zugegeben (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und 50 μl der Zellsuspension wurden mit dem MACS Quant-Gerät analysiert. Die Empfindlichkeiten der Detektoren (Photomultiplier) wurden entsprechend der mitgeführten Kontrollen eingestellt. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo 7.6.4 Software. Entsprechend den Kontrollen wurden die Raster für lebende (DAPI-negative) und tote (DAPI-positive) Zellen gesetzt und die Ergebnisse als Zellen/ml ausgewertet (resultierende Zellkonzentration für die Keratinozytenmonokultur z_{Ker} , für die Fibroblastenmonokultur z_{Fib} und für die Cokultur z_{Co} ; bzw. Darstellung in den Tabellen als Zellzahl lebender z_{vital} , toter z_{tot} und Summe lebender und toter nicht-adhärterer Zellen z_{gesamt} pro ml). Lebende Zellen wurden als Differenz aller Zellen minus tote Zellen berechnet. Außerdem wurde die Vitalität der abgelösten Zellen berechnet (Zahl lebender Zellen $\times 100$ / Zahl aller Zellen).

7.4.3 LDH-Assay

Cytotoxicity Detection Kit (1644793, Roche Molecular Biochemicals)

11,25 ml Dye Solution (gebrauchsfertig)
+ 0,25 ml Catalyst
(Lyophilisat vorher in 1 ml sterilem Aqua bidest. gelöst)

0,5% Triton-X 100 in PBS -/-

Mikrotiterplatten (96 Kavitäten) mit flachem Boden (Art.Nr. 655180, Greiner Bio-One)

Zur relativen Quantifizierung von Zelltod, Zelllyse und Zellmembranschädigung wurde ein Lactatdehydrogenase (LDH) Assay durchgeführt. Mit dieser colorimetrischen Methode kann die Aktivität der LDH, die aus dem Zytosol membrangeschädigter Zellen freigesetzt wurde, im zellfreien Zellkulturüberstand gemessen werden. Im ersten Schritt dieses enzymatischen Farbtestes wird durch die LDH-katalysierte Umwandlung von Lactat zu Pyruvat NAD⁺ zu NADH/H⁺ reduziert. Im zweiten Schritt überträgt der Katalysator H/H⁺ von NADH/H⁺ auf das Tetrazolium Salz INT, welches dadurch zu Formazan reduziert wird.

Jeweils 100 µl Zellkulturüberstand wurden mit 100 µl LDH-Reagenz in einer (96)-Mikrotiterplatte für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 492 nm photometrisch gemessen und die Daten für die Keratinozytenmonokulturen wurden als LDH_{Ker}, für die Fibroblastenmonokulturen LDH_{Fib} und für die Cokulturen als LDH_{Co} definiert. Die gemessene Absorption entspricht der Menge des gebildeten löslichen Formazanproduktes und spiegelt die Intensität der Membranschädigung in der Kultur wider. Als Kontrollen wurden Zellen auf TCP (unbeeinflusste Zellen in der Zellkulturplatte zur Ermittlung der spontan freigesetzten LDH Aktivität aus den Zellen), die „high control“ (HC; Zellen, deren Membranintegrität durch die Zugabe von 0,5%iger TritonX-Lösung geschädigt wurde zur Ermittlung der maximalen LDH-Freisetzung) und die „background control“ (BC; Polymerproben mit Medium ohne Zellen zur Ermittlung der Eigenfarbe und der LDH Menge im Medium) mitgeführt.

7.4.4 Immunfärbungen

Paraformaldehyd (PFA) 4%

Triton 0,5% in PBS -/-

Kernfärbelösungen

4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI; Roth, Kat.Nr. 6335.1) 0,2 µg/ml
bzw. DRAQ5 (Biostatus Limited) 1:200

Zur Beurteilung der Zellen auf Polymerproben hinsichtlich ihrer Adhäsion, Morphologie und Funktionalität wurden verschiedene Strukturen (Zytoskelettbestandteile, Extrazellulärmatrix-Komponenten und der Kern) angefärbt.

Dazu wurden die Proben nach kurzem Waschen mit PBS^{+/+} mit 4%iger PFA-Lösung 30 min auf Eis fixiert (teilweise wurden die Proben dann in PBS^{+/+} über Nacht bei 4 °C gelagert) und nach dreimaligem Waschen mit PBS^{+/+} mit Methanol 10 min auf Eis bzw. mit 0,5%iger Triton-Lösung 10 min bei RT permeabilisiert. Nach erneutem dreimaligem

Waschen erfolgte das Blocken für 30 min bei RT, anschließend wurden die Primärantikörper 1 h bei RT bzw. bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS+/+ wurden die Sekundär-Antikörper 1 h bei RT inkubiert. Die Kernfärbung erfolgte mit DRAQ5 gemeinsam mit der Sekundär-Antikörper-Inkubation bzw. nach dreimaligem Waschen mit PBS+/+ mit DAPI für 5 min bei RT. Für alle Schritte wurden Tropfen (ca. 50 µl) der jeweiligen Lösung auf Parafilm aufgebracht, und die Proben wurden mit den Zellen nach unten aufgelegt. TCP-Kontrollen wurden direkt in den Kavitäten gefärbt, dazu wurden jeweils 250 µl bzw. 500 µl der Lösungen verwendet. Die Proben wurden letztlich mit Mowiol (vorher erneutes Waschen mit PBS+/+ und Millipore-Wasser) eingedeckt bzw. in (24)-Mikrotiterplatten (TCP oder mit Glasboden) in PBS+/+ gelagert. Mit Mowiol eingedeckte TCP-Proben wurden nach dem Festwerden des Eindeckmediums aus der (24)-Mikrotiterplatte ausgestanzt und auf einem Objektträger eingedeckt. Für die Kontrolle der unspezifischen Bindungen des sekundären Antikörpers (ohne primären Antikörper, opA) wurde statt des primären Antikörpers nur die Antikörper-Verdünnungslösung inkubiert.

7.4.4.1 Keratin/Vimentin-Färbung

Blocklösung (5% BSA in PBS+/+)

Antikörper-Verdünnungslösung (2% BSA in PBS+/+)

Primär-Antikörper

monoklonal Maus anti-human Keratin14 IgG1 (10003, Klon RCK 107; Progen)

1:10

monoklonal Kaninchen anti-human Vimentin IgG (ab16700, Klon SP20, abcam)

1:100

polyklonal Meerschweinchen anti-human Keratin10 IgG (GP-K10; Progen) 1:100

Sekundär-Antikörper

Ziege anti-Maus IgG, gekoppelt mit Cy2 (Jackson Immuno Research) 1:200

bzw. Esel anti-Maus IgG, gekoppelt mit DyLight488

(715-485-150, Jackson Immuno Research) 1:100

Ziege anti-Kaninchen IgG, gekoppelt mit Cy3 (Jackson Immuno Research) 1:200

bzw. Esel anti-Kaninchen IgG, gekoppelt mit DyLight549

(711-505-152, Jackson Immuno Research) 1:100

Esel anti-Meerschweinchen IgG, gekoppelt mit DyLight649

(Jackson Immuno Research) 1:200

Zur Unterscheidung der beiden Zelltypen in der Cokultur wurden die Keratinozyten für Keratin14 (basale Zellen) und Fibroblasten für Vimentin gefärbt [89]. Für die cPnBA-Proben wurde auch Keratin10 (suprabasale Zellen) gefärbt. Je 5 Sichtfelder (10fache Vergrößerung) pro Probe wurden mit dem cLSM aufgenommen bzw. 3 Sichtfelder aus 49 aufgenommenen InCell-Bildern (10fache Vergrößerung) ausgewählt und mit ImageJ die Zellzahlen pro cm^2 ausgezählt (Zelldichten aus der Cokultur: d_{Co} , davon Keratinozyten: d_{Ker} und Fibroblasten: d_{Fib}). Das Verhältnis von Keratinozyten zu Fibroblasten wurde berechnet und als $\text{Ratio}_{\text{Ker/Fib}}$ benannt.

7.4.4.2 ECM-Färbung

Blocklösung (5% BSA + 0,3% Triton in PBS+/+)

Antikörper-Verdünnungslösung (1% BSA + 0,3% Triton in PBS+/+)

Primär-Antikörper

polyklonal Kaninchen anti-human Kollagen I-V IgG (ab36064, abcam) 1:20
 polyklonal Schaf anti-human Fibronectin IgG (AF1918, R&D Systems) 1:20
 polyklonal Meerschweinchen anti-human Elastin IgG (ab52115, abcam) 1:40

Sekundär-Antikörper

Ziege anti-Kaninchen IgG, gekoppelt mit Cy5
 (111-175-047, Jackson Immuno Research) 1:200
 Esel anti-Schaf IgG, gekoppelt mit DyLight488
 (713-485-147, Jackson Immuno Research) 1:200
 Ziege anti-Meerschweinchen IgG, gekoppelt mit Alexa555
 (A-21435, Invitrogen) 1:200

Zur Darstellung der Beeinflussung der ECM-Ablagerung auf den unterschiedlichen cPnBA-Netzwerken wurden die ECM-Komponenten Kollagen I-V, Fibronectin und Elastin angefärbt. Je 5 Sichtfelder (40fache Vergrößerung) pro Probe wurden mit dem cLSM aufgenommen. Zunächst wurden die Lasereinstellungen an die Intensitäten der Kontrollfärbung ohne primären Antikörper angepasst, so dass das Kontrollbild keine Färbung außer der Zellkernfärbung zeigte (Ausblenden von Hintergrundsignalen oder unspezifischen Färbungen). Alle Bilder wurden dann mit den gleichen Laserintensitäten und Detektoreinstellungen aufgenommen. Pro Bild und Farbkanal wurde die gefärbte Fläche, deren Fluoreszenzintensitätssignal über einem festgelegten Schwellenwert lag (bei allen Bildern gleich) als Wert in μm^2 analysiert. Der Flächenwert (in μm^2) wurde durch die Anzahl der auf dem Bild gezählten Zellkerne (DAPI-Färbung) dividiert, um eine Information über die gefärbte Fläche pro Zelle zu erhalten. Von 5 Bildern einer Probe wurde der Mittelwert aus den 5 Quotienten (Fläche/Zellzahl) gebildet und aus den

Mittelwerten der 3 Proben eines Polymernetzwerkes wurde ein Mittelwert mit Standardabweichung errechnet. Im Ergebnisteil werden die Daten für die abgelagerten Komponenten in der Keratinozytenmonokultur als ECM_{Ker} , für die Fibroblastenmonokultur als ECM_{Fib} und für die Cokultur als ECM_{Co} in $\mu m^2/Zelle$ angegeben.

7.4.5 Analyse der Sekretion von Cytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren

Die Konzentration verschiedener sekretierter Cytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren von auf cPnBA-Proben inkubierten Zellen wurde aus den Überständen bestimmt, um die Beeinflussung der Zellen hinsichtlich ihrer Zell-Zell-Interaktionen und potentieller Auswirkung auf das Immunsystem zu untersuchen.

7.4.5.1 Bioplex

Die Konzentrationen von Interleukin(IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), „granulocyte macrophage colony stimulating factor“ (GM-CSF), „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) und Hepatozytenwachstumsfaktor (hepatocyte growth factor, HGF) wurden mittels des Multiplex-Systems (Bio-Plex200, Bio-Rad Laboratories, München) entsprechend den Herstellervorgaben analysiert. Mit der Bio-Plex200 Software (Bio-Rad) wurde die Hintergrund-Fluoreszenz von der Fluoreszenzintensität subtrahiert und die Konzentrationen wurden aus den Standardkurven berechnet ($Konz_{Ker}$ für die Keratinozytenmonokultur, $Konz_{Fib}$ für die Fibroblastenmonokultur und $Konz_{Co}$ für die Cokultur).

7.4.5.2 KGF ELISA

Die Konzentration des Keratinozytenwachstumsfaktors (keratinocyte growth factor, KGF) wurde mittels eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstests („enzyme linked immunosorbent assay“, ELISA; R&D, Minneapolis, USA) analysiert. Eine ELISA-Platte mit Standards wurde entsprechend den Herstellervorgaben bearbeitet und die Absorption wurde im Photometer bei 450 nm (Tecan, Männedorf, Schweiz) nach 20 min Inkubation gemessen. Aus den Absorptions-Werten wurden mittels Standardkurven in der Magellan Software (Tecan) die Konzentrationen berechnet ($Konz_{Ker}$ für die Keratinozytenmonokultur, $Konz_{Fib}$ für die Fibroblastenmonokultur und $Konz_{Co}$ für die Cokultur).

7.4.6 *Präparation der Polymerproben für die Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop*

Zur weiteren Untersuchung der Zellmorphologie bzw. der Zell-Polymer-Interaktionen wurden die Polymerproben mit Zellen (Inkubation 48 h) für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) aufgearbeitet.

7.4.6.1 Präparation der vernetzten Poly(n-butylacrylate)

Die Proben wurden 30 min auf Eis in 4% PFA fixiert, dann wurde einige Sekunden in Millipore-Wasser gespült. In einer aufsteigenden Isopropanolreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 95% 2x, 100% 3x, jeweils 10 min) und Hexamethyldisilazane (5 min) wurden die Proben entwässert. Nach dem Bedampfen mit Kohlenstoff wurden Bilder mit dem REM aufgenommen.

7.4.6.2 Präparation der Poly(acrylnitril-co-N-Vinylpyrrolidon)-Proben

Die Proben wurden 5 min in 1% Glutaraldehyd fixiert und anschließend 5 min in Millipore-Wasser gespült. In einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 85%, 95%, 100%, je 5 min, zusätzlich 100% 10 min) und dann Hexamethyldisilazane (15 min) wurden die Proben entwässert. Nach dem Aufbringen einer Platin/Palladium-Schicht wurden Bilder mit dem REM aufgenommen.

7.4.7 *Versuche der Methodenanpassung zur Automatisierung der Aufnahme und Auswertung mikroskopischer Bilder*

7.4.7.1 Versuch zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz durch Sudan-Schwarz

Sudan-Schwarz (Nr. A1407,0025; AppliChem GmbH, Darmstadt)

Entsprechend des Literaturhinweises [72] wurde das Sudan-Schwarz-Pulver 0,3%ig in Ethanol (70%ig) angesetzt und durch einen 0,2 µm Whatman Spritzenfilter gefiltert. Nach Ablauf einer normalen Keratin/Vimentin-Färbung (siehe Kapitel 7.4.4.1) wurden zwei Glas- und zwei AEMA 2 Proben 1 h bei RT in je 1 ml der Sudan-Schwarz-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Proben 2 x 5 min und 3x kurz mit PBS gespült. Die Proben wurden im InCell analysiert.

7.4.7.2 Versuch zur Erhöhung des Kontrastes durch Pierce Immunostain Enhancer

Pierce Immunostain Enhancer (Nr. 46645; Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)

Der Immunostain Enhancer wurde bei der Färbung als Antikörper-Verdünnungslösung eingesetzt. Alle anderen Schritte wurden identisch der Keratin/Vimentin-Färbung (siehe Kapitel 7.4.4.1) durchgeführt.

7.5 Statistik

Statistiken wurden mit der Prism5 Software durchgeführt. Die Daten wurden jeweils als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

Für die Wachstumskurven wurden zweifache ANOVAs mit einem Bonferoni Posttest durchgeführt. Für die cPnBAs wurden die Daten beider Polymere jeweils durch ungepaarte T-Tests miteinander verglichen. Für die AN-basierten Copolymere wurden alle unterschiedlichen Copolymere einer Serie untereinander durch einfache ANOVAs mit Tuckey Posttest verglichen, um den Effekt der Einbaurate des Comonomers zu beurteilen. Zwischen dem „besten“ Copolymer und dem Homopolymer bzw. dem „besten“ Copolymer und dem Kontrollpolymer TCP wurden jeweils zweiseitige T-Tests durchgeführt, um den potentiellen Vorteil des Copolymers zu bewerten. Ein signifikanter Unterschied wurde angenommen, wenn der p-Wert unter 0,05 lag. Aufgrund der geringen Fallzahlen sind die statistischen Auswertungen nur in den Datentabellen dargestellt und sollten mit entsprechender Vorsicht beurteilt werden.

8 Ergebnisse

8.1 Wachstumskurven

Zur Ermittlung der optimalen Einsatz von Keratinozyten und Fibroblasten in Monokultur (je 10000 Zellen/cm², je 20000 Zellen/cm², je 30000 Zellen/cm²) und Cokultur (je 5000 Zellen/cm² und 10000 Zellen/cm²; die Zellen beeinflussen ihre gegenseitige Proliferation positiv, daher eine insgesamt geringere Zellzahl in der Cokultur) für die Polymertestungen wurden Wachstumskurven jeweils in KGM adv. durchgeführt (Abbildung 6) [166]. Bei einer Einsaat von je 10000 Zellen/cm² für die Monokulturen stagnierten die Zellzahlen schon zu Beginn der Kultur, so dass die Zellen nicht in einem stoffwechselaktiven Zustand vorliegen würden. Bei einer Einsaat von je 20000 Zellen/cm² (Monokulturen) und je 5000 Z/cm² (Cokultur) proliferierten die Zelltypen nicht gleichmäßig. Für je 30000 Zellen/cm² in den Monokulturen und je 10000 Zellen/cm² in der Cokultur ergaben sich gute Übereinstimmungen der Zellzahlen nach 48 Stunden.

Aufgrund der erzielten Ergebnisse wurde somit für die Testungen die Einsaat von 30000 Zellen/cm² für die Monokulturen und von je 10000 Zellen/cm² für die Cokultur gewählt.

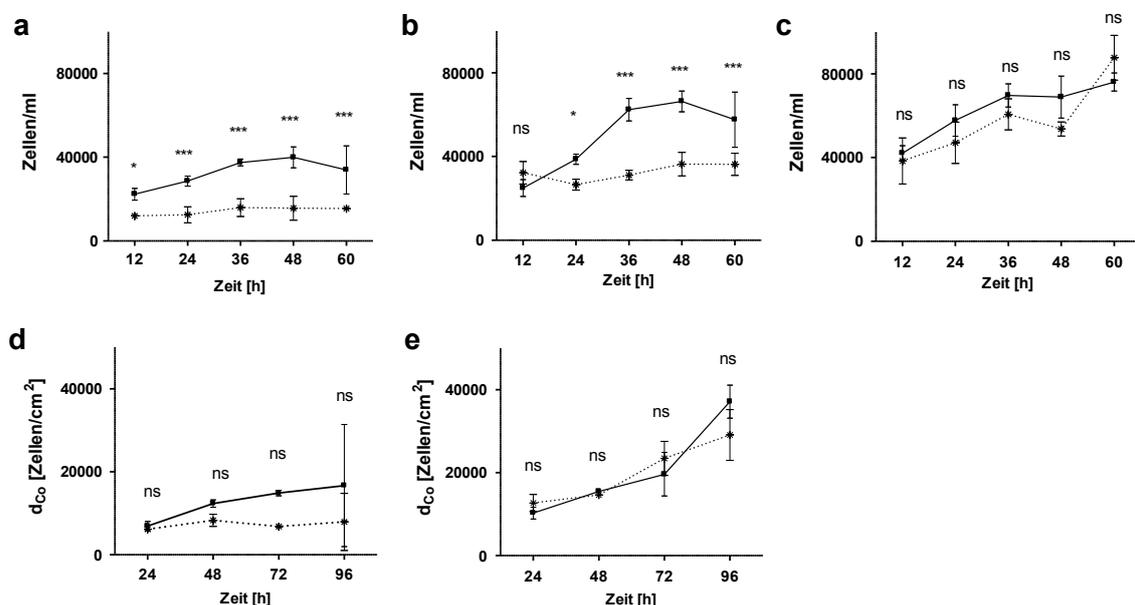


Abbildung 6: Wachstumskurven

oben: Wachstumskurven der Monokulturen. Keratinozyten (gestrichelte Linie) bzw. Fibroblasten (durchgezogene Linie) mit initialen Einsaaten von 10000 Zellen/cm² (a), 20000 Zellen/cm² (b) und 30000 Zellen/cm² (c). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden alle Zellen durch Trypsinieren abgelöst und die Lebendzellzahlen pro ml mit dem CASY System bestimmt.

unten: Keratinozyten und Fibroblasten wurden mit initialen Einsaaten von 5000 Zellen/cm² (d) und 10000 Zellen/cm² (e) je Zelltyp cokultiviert. Keratinozyten wurden mit einem Antikörper gegen Keratin14 und Fibroblasten mit einem Antikörper gegen Vimentin markiert, so dass die Zelltypen klar unterschieden und mit dem ImageJ-Programm gezählt werden konnten.

Die Daten zeigen den Mittelwert von 4 Proben \pm Standardabweichung. Eine zweifache ANOVA wurde durchgeführt (ns: $p > 0,05$; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$). [166]

Da die Wachstumskurven sehr aufwändig und kostenintensiv sind, können sie nicht für jede Zell-Charge erneut untersucht werden. Durch die biologische Variabilität wurde während des Screenings nicht immer ein 1:1 Verhältnis von Keratinozyten zu Fibroblasten erreicht. Aus den mitgeführten Kontrollen wurden die individuellen Zelldichten bzw. das Wachstumsverhalten im jeweiligen Experiment ermittelt.

8.2 Untersuchung des Einflusses vernetzter Poly(*n*-butylacrylate) mit Variation der Elastizität auf primäre humane Keratinozyten und Fibroblasten

Die Charakterisierungsdaten von cPnBA04 und cPnBA73 wurden durch die Abteilung PBI (Dr. Kratz) zur Verfügung gestellt und sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 dargestellt. Die lokalen mechanischen Eigenschaften, untersucht durch Rasterkraftmikroskopie- („atomic force microscopy“; AFM) basierte Mikroindentations-Testung bei Raumtemperatur unter wässriger Bedingung, waren mit einem Elastizitätsmodul von $E = 330 \pm 30$ kPa für cPnBA04 und $E = 1560 \pm 240$ kPa für cPnBA73 signifikant unterschiedlich [18]. Diese Daten waren prinzipiell vergleichbar mit denen, die durch die Zugtestung ermittelt wurden [27,67].

Tabelle 4: Charakterisierungsdaten der cPnBA-Netzwerke, modifiziert nach [18,27,67].

	PPGDMA [Gew.-%]	ρ_2 [g/ml]	G [%]	Q [%]	T_g [°C]	E [kPa]		
		Ultra- pycno- metrie			DSC	Zugtestung, trocken	Mikroindentation mit AFM	
							trocken	wässrige Umgebung
cPnBA04	0,4	1,05	92 ± 1	1565 ± 40	-46	250 ± 20	190 ± 10	330 ± 30
cPnBA73	7,3	1,06	95 ± 1	450 ± 5	-41	1110 ± 20	1020 ± 10	1560 ± 240

PPGDMA: Vernetzer; ρ_2 : spezifische Dichte, G: Gelgehalt, Q: Quellungsgrad, T_g : Glasübergangstemperatur; DSC: dynamische Differenzkalorimetrie, E: Elastizitätsmodul, AFM: Rasterkraftmikroskop

Tabelle 5: Daten der Oberflächencharakterisierung der cPnBA-Netzwerke, modifiziert nach [18,27,67]

	$\theta_{\text{benetzend}}$ [°]	$\theta_{\text{entnetzend}}$ [°]	R_q [nm]	IEP
	captive bubble, 1 h vorinkubiert in Wasser		AFM	Strömungspotentialmessung
cPnBA04	$122,6 \pm 3,8$	$33,3 \pm 3,4$	37 ± 10	3,7
cPnBA73	$110,6 \pm 3,8$	$41,2 \pm 3,0$	17 ± 4	3,7

R_q : quadratische Rauigkeit; IEP: isoelektrischer Punkt

Des Weiteren ergab sich ein niedrigerer Quellungsgrad für cPnBA73 verglichen mit cPnBA04. Beide Polymernetzwerke zeigten ähnliche Dichten, Gelgehalte und Glasübergangstemperaturen, sowie ähnliche Oberflächeneigenschaften [67] mit

Kontaktwinkeln von $\theta_{\text{benetzend}} = 111^\circ$ bis 123° und Rauigkeiten (R_q) im Bereich von 17 nm bis 37 nm. Die Strömungspotentialmessung ergab für beide Polymernetzwerke einen isoelektrischen Punkt bei pH 3,7. Für die biologischen Testungen wurden die Polymernetzwerke zunächst gereinigt und anschließend mit Ethylenoxid sterilisiert. Der Endotoxingehalt der Proben lag unterhalb des durch die US Food and Drug Administration (FDA) festgelegten Grenzwertes von 0,5 EU/ml [58,134]. Des Weiteren erwiesen sich die cPnBAs als nicht-zytotoxisch und kompatibel mit dem angeborenen Immunsystem [27,134]. Außerdem wurden die cPnBAs als mögliches Substrat für Endothelzellen und Monozyten untersucht [67,106].

Für die vorliegende Arbeit wurden Keratinozyten und Fibroblasten in Mono- und Cokultur nach 48 Stunden Kultur auf cPnBA04, cPnBA73 und Glasdeckgläschen als Kontrolle untersucht [165,166]. Im Durchlichtmikroskop zeigten die Zellen größtenteils ihre normale Morphologie. Jedoch waren mehr Keratinozyten und Fibroblasten auf den cPnBAs im Gegensatz zu Glas abgekugelt und die Zellen waren weniger konfluent (Abbildung 7). Die Vitalität der adhärennten Keratinozyten war vergleichbar mit der der Glaskontrolle. Auf cPnBA73 war die Vitalität der adhärennten Fibroblasten im Gegensatz zu cPnBA04 und Glas vermindert. Die Vitalität der Cokultur sowie die Zellzahlen pro cm^2 waren für die Mono- und Cokulturen auf beiden Polymernetzwerken im Gegensatz zu Glas vermindert (Abbildung 9a). Bezüglich der ECM-Komponenten - Abbildung 8 zeigt ein repräsentatives Bild der immunzytochemischen Färbung - wurde eine erhöhte Ablagerung von Kollagen für Fibroblasten in Monokultur und eine erhöhte Ablagerung von Fibronectin, Kollagen und Elastin für cokultivierte Zellen auf cPnBA04 verglichen mit cPnBA73 gefunden (Abbildung 9b). Die Analyse von Cytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren ergab höhere Werte für IL-1 α , IL-8, IL-12, GM-CSF und VEGF für Keratinozyten auf cPnBA04. Für die Fibroblasten und die Cokultur wurden keine Unterschiede, außer einer erhöhten IL-6-Konzentration in der Fibroblastenmonokultur, gefunden (Abbildung 9c). Die Auswertung der Cokulturfärbung ergab auf cPnBA73 ein zweifach höheres Verhältnis von Keratinozyten zu Fibroblasten (Abbildung 10).

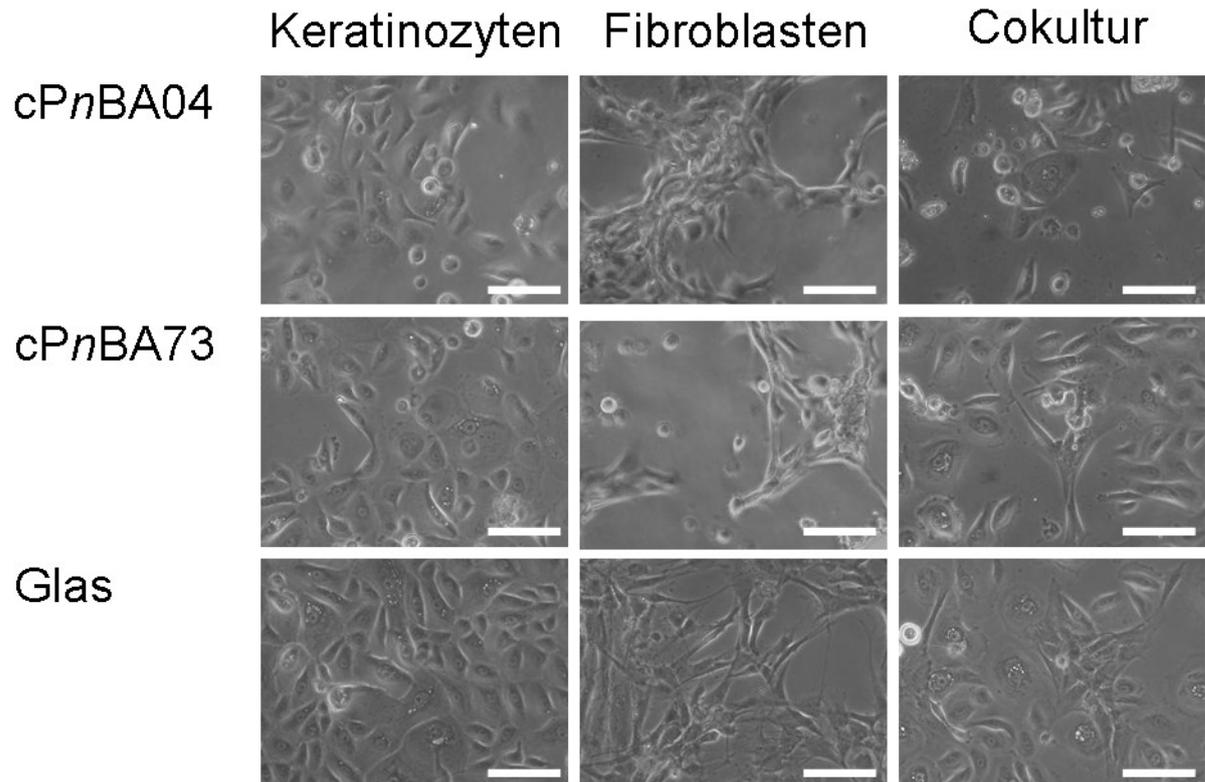


Abbildung 7: Durchlichtmikroskopische Bilder der Zellen nach 48 h Inkubation auf cPnBA-Proben und Glas zur Darstellung der Zellmorphologie (Maßbalken = 100 µm).

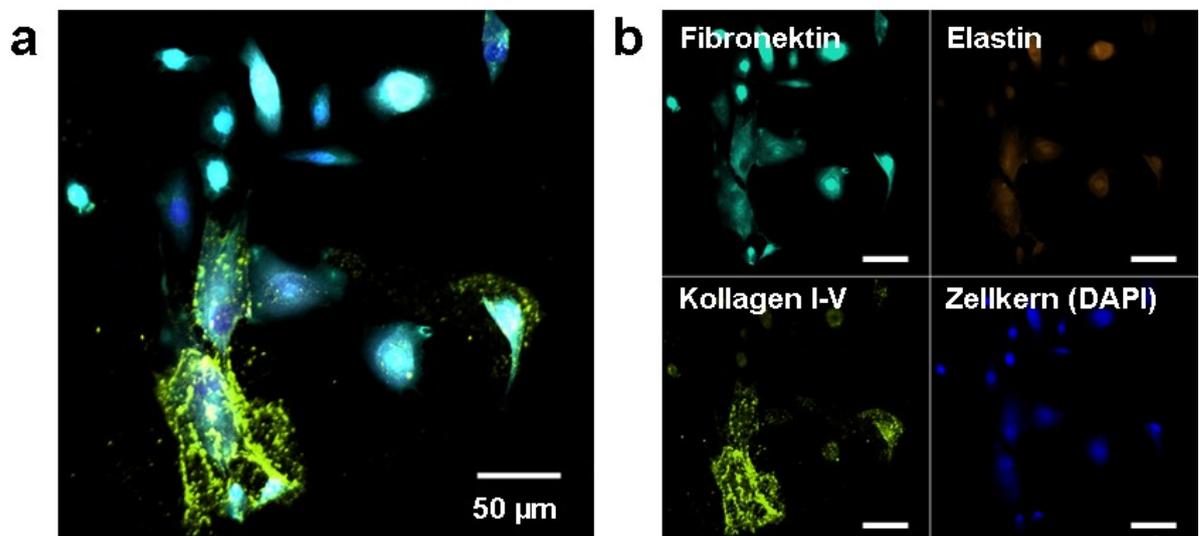


Abbildung 8: Repräsentatives Bild der der ECM-Färbung nach 48 h Inkubation auf Glas. Überlagerung (a) und (b) Einzelkanäle der ECM-Komponenten Fibronectin, Elastin, Kollagen I-V sowie dem Zellkern (Maßbalken = 50 µm) [165,166].

Tabelle 6: Dichte adhärenter lebender Keratinozyten (d_{vital}), toter Keratinozyten (d_{tot}) und der Gesamtdichte (d_{gesamt}), sowie die Fläche abgelagerter ECM-Komponenten pro Zelle und Konzentrationen sekretierter Faktoren nach 48 h Inkubation auf cPnBA04, cPnBA73 und Glasdeckgläsern als Kontrolle. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=3 bzw. n=6 für sekretierte Faktoren; *: $p < 0,05$ gegenüber Glas, **: $p < 0,01$ gegenüber Glas, ***: $p < 0,005$ gegenüber Glas; §: $p < 0,05$ gegenüber cPnBA04, §§: $p < 0,01$ gegenüber cPnBA04; §§§: $p < 0,005$ gegenüber cPnBA04).

	Keratinozyten	cPnBA04	cPnBA73	Glas
Lebend/Tot-Färbung adhärenter Zellen	d_{vital} [Zellen/cm ²]	19815 \pm 3620 **	28225 \pm 3003 * §	34774 \pm 1611
	d_{tot} [Zellen/cm ²]	1297 \pm 242	1617 \pm 620	1277 \pm 175
	d_{gesamt} [Zellen/cm ²]	21112 \pm 3461 **	29842 \pm 3586 *	36051 \pm 1717
	Vitalität [%]	93,7 \pm 2,1	94,7 \pm 1,5	96,5 \pm 0,4
	differenzierte Keratinozyten [%]	0,2 \pm 0,1	0,8 \pm 0,2	0,4 \pm 0,2
abgelagerte ECM- Komponenten [μm^2 /Zelle]	Fibronectin	47 \pm 35 *	140 \pm 155	266 \pm 86
	Elastin	545 \pm 195 **	618 \pm 18	829 \pm 52
	Kollagen I-V	26 \pm 10 *	107 \pm 66	303 \pm 112
Konzentration sekretierter Faktoren [pg/ml]	IL-1 α	813 \pm 128 ***	592 \pm 30 *** §§	344 \pm 43
	IL-1 β	49 \pm 6 ***	46 \pm 6 ***	68 \pm 7
	IL-6	153 \pm 27 ***	184 \pm 16 §	355 \pm 36
	IL-8	326 \pm 59 **	254 \pm 46 §	186 \pm 64
	IL-10	27 \pm 1	26 \pm 2	30 \pm 4
	IL-12	266 \pm 17	240 \pm 22 §	286 \pm 46
	TNF α	3 \pm 1	3 \pm 1	3 \pm 1
	GM-CSF	127 \pm 14 *	86 \pm 10 ** §§§	108 \pm 13
	VEGF	1680 \pm 166	1492 \pm 83 §	1682 \pm 280
	HGF	1 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 1
KGF	3 \pm 3	2 \pm 4	6 \pm 7	

Tabelle 7: Dichte adhärenter lebender Fibroblasten (d_{vital}), toter Fibroblasten (d_{tot}) und der Gesamtdichte (d_{gesamt}), sowie die Fläche abgelagerter ECM-Komponenten pro Zelle und Konzentrationen sekretierter Faktoren nach 48 h Inkubation auf cPnBA04, cPnBA73 und Glasdeckgläschen als Kontrolle. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=3 bzw. n=6 für sekretierte Faktoren; *: $p < 0,05$ gegenüber Glas, **: $p < 0,01$ gegenüber Glas; §: $p < 0,05$ gegenüber cPnBA04, §§: $p < 0,01$ gegenüber cPnBA04).

	Fibroblasten	cPnBA04	cPnBA73	Glas
Lebend/Tot-Färbung adhärenter Zellen	d_{vital} [Zellen/cm ²]	9902 \pm 3626 *	11112 \pm 9699	19920 \pm 4889
	d_{tot} [Zellen/cm ²]	426 \pm 235	1.136 \pm 102 ** §§	472 \pm 102
	d_{gesamt} [Zellen/cm ²]	10328 \pm 3591 *	12248 \pm 9794	20391 \pm 4818
	Vitalität [%]	95,5 \pm 3,5	84,4 \pm 13,5	97,5 \pm 1,0
abgelagerte ECM- Komponenten [μm^2 /Zelle]	Fibronectin	379 \pm 224	461 \pm 397	521 \pm 81
	Elastin	678 \pm 372	513 \pm 253	485 \pm 97
	Kollagen I-V	1329 \pm 562	529 \pm 139	8964 \pm 5057
Konzentration sekretierter Faktoren [pg/ml]	IL-1 α	1 \pm 1	0	51 \pm 125
	IL-1 β	0	0	12 \pm 27
	IL-6	531 \pm 160 *	379 \pm 40 §	330 \pm 51
	IL-8	67 \pm 37	45 \pm 22	23 \pm 37
	IL-10	6 \pm 1	6 \pm 1	10 \pm 12
	IL-12	46 \pm 10	41 \pm 7	87 \pm 121
	TNF α	1 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 2
	GM-CSF	5 \pm 12	0	18 \pm 44
	VEGF	249 \pm 20 *	223 \pm 35	160 \pm 82
	HGF	155 \pm 49	176 \pm 59	118 \pm 65
	KGF	26 \pm 8	21 \pm 4	20 \pm 10

Tabelle 8: Dichte adhärenter lebender kokultivierter Keratinozyten und Fibroblasten (d_{vital}), toter Zellen (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Keratinozyten/Fibroblasten-Ratio ($\text{Ratio}_{\text{Ker/Fib}}$) und die Zelldichte der Keratinozyten (d_{Ker}), der Fibroblasten (d_{Fib}) und der Gesamtzelldichte (d_{Co}) in der Kokultur, sowie die Fläche abgelagerter ECM-Komponenten pro Zelle und Konzentrationen sekretierter Faktoren nach 48 h Inkubation auf cPnBA04, cPnBA73 und Glasdeckgläsern als Kontrolle. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$ bzw. $n=6$ für sekretierte Faktoren; *: $p<0,05$ gegenüber Glas, **: $p<0,01$ gegenüber Glas, ***: $p<0,005$ gegenüber Glas; §: $p<0,05$ gegenüber cPnBA04).

	Cokultur	cPnBA04	cPnBA73	Glas
Lebend/Tot-Färbung adhärenter Zellen	d_{vital} [Zellen/cm ²]	3830 \pm 2453 **	6255 \pm 2606 **	17759 \pm 2876
	d_{tot} [Zellen/cm ²]	415 \pm 187	856 \pm 460	866 \pm 357
	d_{gesamt} [Zellen/cm ²]	4245 \pm 2317 **	7111 \pm 2290 **	18625 \pm 3034
	Vitalität [%]	84,5 \pm 15,8	86,5 \pm 8,5	95,4 \pm 1,7
Keratin/ Vimentin- Färbung	$\text{Ratio}_{\text{Ker/Fib}}$	2,6 \pm 0,9	5,3 \pm 2,1	3,1 \pm 1,0
	d_{Ker} [Zellen/cm ²]	9021 \pm 7194	10584 \pm 2686 **	20077 \pm 2338
	d_{Fib} [Zellen/cm ²]	3373 \pm 2607	2349 \pm 1301 *	6890 \pm 2167
	d_{Co} [Zellen/cm ²]	12393 \pm 9802	12932 \pm 3987 **	26967 \pm 4505
	differenzierte Keratinozyten [%]	0,4 \pm 0,1	0,2 \pm 0,2	0,04 \pm 0,04
abgelagerte ECM- Komponenten [μm^2/Zelle]	Fibronectin	221 \pm 139 *	64 \pm 9 **	739 \pm 166
	Elastin	1045 \pm 327	758 \pm 22 **	953 \pm 36
	Kollagen I-V	742 \pm 263	428 \pm 140 *	750 \pm 91
Konzentration sekretierter Faktoren [pg/ml]	IL-1 α	203 \pm 22 ***	204 \pm 14 ***	107 \pm 9
	IL-1 β	13 \pm 2	11 \pm 3	13 \pm 1
	IL-6	2.166 \pm 36	2.125 \pm 50	2.152 \pm 49
	IL-8	787 \pm 194	877 \pm 168	804 \pm 108
	IL-10	12 \pm 2 ***	16 \pm 2 *§	19 \pm 2
	IL-12	95 \pm 23	111 \pm 13	12914
	TNF α	9 \pm 2	8 \pm 1 *	10 \pm 1
	GM-CSF	177 \pm 23	140 \pm 29 *§	171 \pm 17
	VEGF	547 \pm 121	632 \pm 60	718 \pm 68
	HGF	15 \pm 7	20 \pm 3 **	13 \pm 3
KGF	12 \pm 4	16 \pm 4	16 \pm 2	

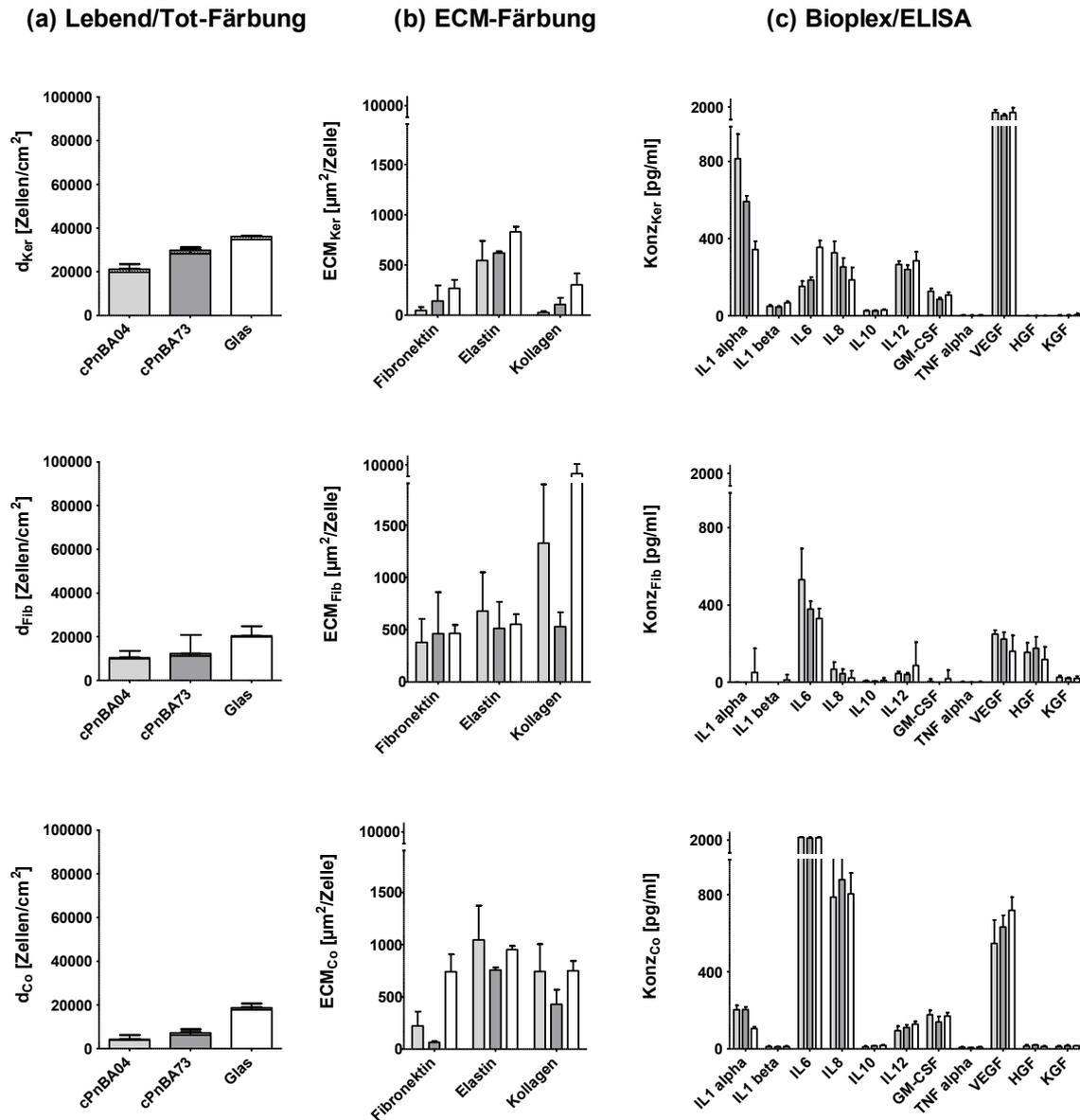


Abbildung 9: Analyse der Keratinozyten- und Fibroblasten-Monokulturen sowie der Cokulturen nach 48 Stunden Inkubation auf cPnBA-Proben und Glas. (a) Daten der Lebend/Tot-Färbung (Fluoresceindiacetat/Propidiumiodid; FDA/PI). Die Daten zeigen die Mittelwerte für 3 Proben \pm Standardabweichung, schraffierte Anteile der Balken repräsentieren tote Zellen. (b) Daten der immunzytochemischen Färbung der ECM-Komponenten Fibronectin, Elastin und Kollagen I-V als $\mu\text{m}^2/\text{Zelle}$. 5 Sichtfelder jeder Probe, aufgenommen mit dem cLSM, wurden gemittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte für 3 Proben \pm Standardabweichung. (c) Daten der Bioplex/ELISA Analysen des Überstandes zur Untersuchung der Sekretion von Cytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren. Die Daten zeigen die Mittelwerte für 6 Proben \pm Standardabweichung. cPnBA04 ist jeweils hellgrau, cPnBA73 dunkelgrau und Glas weiß dargestellt (vgl. [166]).

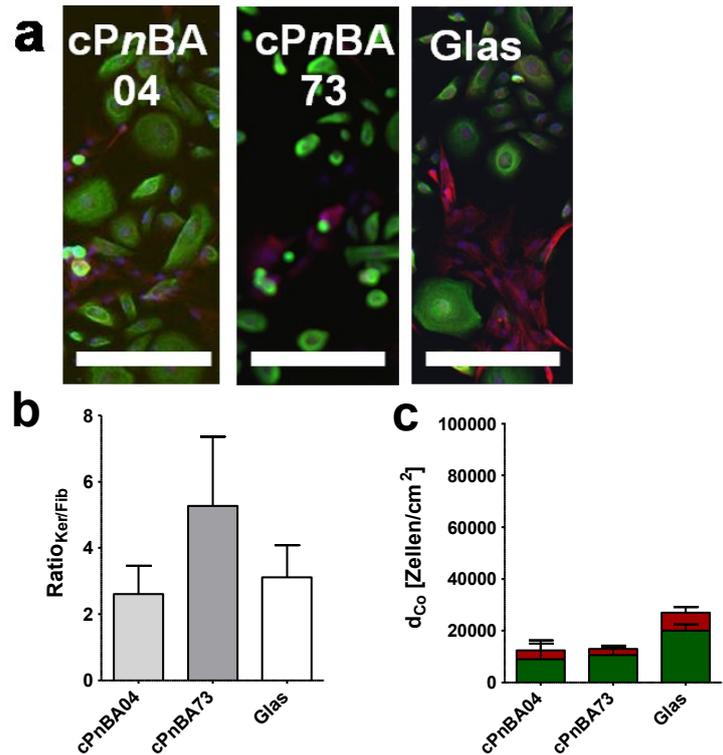


Abbildung 10: Cokultur-Färbung von Keratinozyten (markiert mit Antikörper gegen Keratin14; grün) und Fibroblasten (markiert mit Antikörper gegen Vimentin; rot) in Cokultur nach 48 h Inkubation auf cPnBA-Proben und Glas. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und sind blau dargestellt. (a) Beispielbilder, aufgenommen mit dem cLSM (Maßbalken = 200 μm). (b) Graphik des Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnisses. cPnBA04 ist hellgrau, cPnBA73 dunkelgrau und Glas weiß dargestellt. (c) Graphik der Zellzahlen beider Zelltypen pro cm^2 . Der grüne Anteil der Balken entspricht den Keratinozyten und der rote Anteil den Fibroblasten. Die Daten zeigen den Mittelwert von 3 Proben \pm Standardabweichung.

8.3 Untersuchung des Einflusses Acrylnitril-basierter Copolymere auf primäre humane Keratinozyten und Fibroblasten

Die Serien Acrylnitril(AN)-basierter Copolymere mit Abstufungen in der Einbaurate des Comonomers wurden in besonderer Qualität („medical grade“) hergestellt. Die Copolymerpulver wurden zu Chips formiert. Um eine angemessene Korrelation von möglichen Beeinflussungen der Zellen mit Polymereigenschaften zu ermöglichen, erfolgte eine umfangreiche chemische Charakterisierung sowohl der Pulver als auch der Chips (Tabelle 9 und Tabelle 10). Die Polymere wurden außerdem auf Zytotoxizität und den Endotoxin-Gehalt untersucht. Die Daten der chemischen und physikalischen Charakterisierungen wurden von den Abteilungen PBS (Dr. Scharnagl), PBA (Dr. Behl) und PBI (Dr. Kratz) zur Verfügung gestellt. Die stufenweise Erhöhung des Comonomergehaltes zur Modifikation bestimmter Polymereigenschaften konnte durch die Berechnung der realen Einbaurate aus Elementaranalysen gezeigt werden. Somit kann für AEMA- und APMA-enthaltende Copolymere ein zunehmender Anteil positiver Ladungen, für NaMAS-enthaltende Copolymere ein zunehmender Anteil negativer Ladungen und für NVP-enthaltende Copolymere eine ansteigende Hydrophilie angenommen werden. Die weiteren untersuchten Eigenschaften wie Quellungsgrad, Gelgehalt, Benetzbarkeit (Kontaktwinkel) und Rauigkeit, waren weitestgehend vergleichbar. Da in der vorliegenden Arbeit ein Screening der Polymererrien, also die Testung relativ vieler verschiedener Polymere/Copolymere, durchgeführt werden sollte, wurde auf eine detaillierte Zelltestung aller Polymere verzichtet. Als wesentliche Testparameter für das Screening wurden Adhärenz und Vitalität adhärenter und nicht-adhärerter Zellen, sowie die Selektivität von Keratinozyten und Fibroblasten in Mono- und Cokultur nach 48 h bzw. 60 h Inkubation auf den Polymeren untersucht [167].

Tabelle 9: Charakterisierungsdaten der Polymerpulver, zur Verfügung gestellt durch die Abteilungen PBA, PBI und PBS und modifiziert von [140,141].

	Pulver														
	Rest- monomer	reale Einbau- rate [mol-%]	Umsatz [%]	M _n	Poly- dispersität	T _g (onset) [°C]	T _g (offset) [°C]	Rest masse [%@500°C]	Quellung			Gelgehalt			Tox Eluat
									H ₂ O [%]	Medium [%]	Medium komplett [%]	H ₂ O	Medium	Medium komplett	
PAN	<NG (5ppm)	100 AN	96,8 (AN)	33568	5,55	99,5	102,4	55,46	591	1251	1006	94,60	89,93	101,38	1
AEMA 0,5	<NG (5ppm)	1,4	99,5 (AN)	31495	3,62	84,8	121,2	55,4	1538	1299	1072	83,31	92,37	106,20	1
AEMA 1	<NG (5ppm)	1,6	98,5 (AN)	25889	2,27	83,5	126,3	53,4 @497°C	1689	1328	1100	85,10	93,13	108,63	1
AEMA 2	<NG (5ppm)	4,4	79,3 (AN)	23465	2,39	78,7	131,1	59,6	1519	1342	1136	87,00	93,40	110,10	1
APMA 0,5	<NG (5ppm)	2,4	89,9 (AN)	30962	3,52	86,1	118,2	55,6	1800	1372	1086	82,52	93,59	110,07	1
APMA 1	<NG (5ppm)	4,1	94,3 (AN)	23746	3,32	83,4	123,6	54,7	1696	1276	1126	83,50	93,35	108,87	1
APMA 2	<NG (5ppm)	7,6	83,0 (AN)	20897	3,88	86,9	124,2	57,2	1846	1377	1154	83,89	93,64	110,78	1
NaMAS 0,5	<NG (5ppm)	0,9	92,3 (AN)	50720	4,87	85,4	121,9	47,7	1673	1323	1117	83,65	93,62	108,38	0
NaMAS 1	<NG (5ppm)	1,7	97,1 (AN)	36167	4,47	86,9	120,8	52,5	1519	1313	1110	83,76	93,62	100,29	1
NaMAS 2	<NG (5ppm)	1,9	88,6 (AN)	45771	4,86	87,2	121,7	49,9	1917	1295	1230	83,37	94,77	102,62	1
NVP 5	<NG (5ppm)	4,63	nd	42295	5,37	108,5	124,0	53,36	1421	1236	1360	83,16	90,15	97,50	1
NVP 10	<NG (5ppm)	11,81	nd	34579	5,22	115,5	125,0	39,1	1216	1107	1013	82,55	92,90	98,76	2
NVP 20	45 ppm (AN)	23,3	97,5 (AN)	48608	6,13	126,8	137,2	25,93	1191	1003	925	82,13	89,08	97,91	1
NVP 25	nd	20,84	nd	53623	6,5	125,4	137,0	30,54	1640	1580	1534	84,62	92,97	98,22	1
NVP 30	<NG (5ppm)	29,43	nd	56835	8,56	136,3	143,8	24,3	1367	1157	1034	79,53	88,52	99,73	1

Tabelle 10: Charakterisierungsdaten der Chips, zur Verfügung gestellt durch die Abteilungen PBA, PBI und PBS und modifiziert von [140,141].

	Chips											
	$\theta_{\text{benetzend}} [^\circ]$		$\theta_{\text{entnetzend}} [^\circ]$		Rauigkeit $sR_a [\mu\text{m}]$		T_g (onset) $[^\circ\text{C}]$		T_g (offset) $[^\circ\text{C}]$		Restmasse @ 500°C [%]	
	steril	nicht-steril	steril	nicht-steril	steril	nicht-steril	steril	nicht-steril	steril	nicht-steril	steril	nicht-steril
PAN	62,2 ± 3,6	62,3 ± 3,3	35,3 ± 3,7	37,9 ± 4,6	0,037 ± 0,032	0,022 ± 0,006	87,3	83,7	105,0	108,1	70	70
AEMA 0,5	66,3 ± 5,2	65,3 ± 6,3	37,4 ± 4,5	37,7 ± 3,8	0,026 ± 0,008	0,085 ± 0,098	83,5	83,8	123,6	125,7	68,8	70,2
AEMA 1	64,5 ± 7,5	65,7 ± 4,9	36,8 ± 3,4	34,5 ± 2,5	0,026 ± 0,003	0,031 ± 0,005	84,8	82,9	123,5	123,0	69,7	69,7
AEMA 2	65,5 ± 5,0	65,4 ± 3,1	41,0 ± 3,2	37,9 ± 4,6	0,033 ± 0,002	0,044 ± 0,009	88,5	83,7	129,4	126,2	69,9	69,6
APMA 0,5	60,8 ± 2,5	58,3 ± 5,4	37,3 ± 6,7	36,1 ± 5,8	0,078 ± 0,081	0,039 ± 0,015	85,2	84,3	121,3	120,0	71,1	67,9
APMA 1	57 ± 4,9	58,6 ± 11,6	31,7 ± 6,2	34,3 ± 6,5	0,065 ± 0,037	0,030 ± 0,013	79,9	80,3	114,0	106,9	71,6	70,8
APMA 2	65,6 ± 15	59,7 ± 2,5	33,4 ± 6,3	32,5 ± 2,2	0,025 ± 0,003	0,059 ± 0,043	nd	89,3	nd	107,9	69,6	71,3
NaMAS 0,5	56,7 ± 3,7	58,2 ± 3,4	29,8 ± 3,6	31,5 ± 3,3	0,043 ± 0,009	0,042 ± 0,010	88,4	82,0	114,5	127,2	69,9	66,1
NaMAS 1	61,1 ± 5,1	58,7 ± 5,0	31 ± 1,4	31,4 ± 3,5	0,063 ± 0,018	0,038 ± 0,017	91,3	87,3	119,7	127,1	69,7	67,7
NaMAS 2	57,4 ± 4,9	63,3 ± 4,6	28,8 ± 3,5	33,8 ± 3,6	0,032 ± 0,008	0,032 ± 0,019	85,4	88,4	126,7	124,9	70,1	68,3
NVP 5	65,2 ± 2,8	60,1 ± 1,7	40,8 ± 4,4	36,7 ± 3,2	0,062 ± 0,006	0,032 ± 0,008	107,3	106,6	122,8	122,9	59,4	58,6
NVP 10	65,8 ± 2,5	59,4 ± 2,7	42,0 ± 1,4	34,3 ± 3,6	0,053 ± 0,041	0,036 ± 0,024	115,0	114,3	123,3	123,3	48,3	51,6
NVP 20	60,2 ± 3,1	61,3 ± 3,1	30,3 ± 3,8	30,1 ± 3,6	0,028 ± 0,008	0,056 ± 0,024	123,1	124,1	134,2	134,0	31,3	31,2
NVP 25	60,9 ± 4,6	56,5 ± 4,6	34,8 ± 4,8	29,9 ± 4,5	0,025 ± 0,003	0,041 ± 0,009	122,8	120,8	135,6	134,5	29,02	36,3
NVP 30	57,2 ± 2,6	62,5 ± 5,3	29,1 ± 2,2	32,3 ± 1,0	0,041 ± 0,011	0,068 ± 0,047	133,5	133,4	141,2	141,1	24,0	24,6

8.3.1 Acrylnitril-basierte Copolymere mit Variation geladener funktioneller Gruppen

8.3.1.1 Acrylnitril-basierte Copolymere mit zunehmendem molaren Anteil des Comonomers Methacrylsäure-2-aminoethylester-hydrochlorid

Keratinocyten, Fibroblasten und beide Zelltypen in Cokultur zeigten auf den AEMA-enhaltenden Copolymeren weitestgehend ihre jeweils physiologische Morphologie und mit der Kontrolle vergleichbare Zelldichten. In der Keratinocytenmonokultur waren verglichen mit der Kontrolle mehr abgekugelte Zellen sichtbar (Abbildung 11). Die Lebend/Tot-Färbung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den AEMA-enhaltenden Copolymeren. Tendenziell ist mit zunehmendem AEMA-Gehalt eine Erhöhung der Dichten vitaler und eine Verringerung der Dichten toter Keratinocyten und cokultivierter Zellen zu beobachten. Für die Fibroblastenmonokultur wurden keine Unterschiede bezüglich Zelldichten oder Vitalität gefunden (Abbildung 12a). Die durchflusszytometrischen Messungen des Zellkulturüberstands zeigten keine Unterschiede hinsichtlich der Anzahl oder Vitalität der nicht-adhärierten Zellen (Abbildung 12b). Auf den Polymeren und der Kontrolle wurden in der Monokultur wesentlich mehr abgelöste Keratinocyten gefunden als in der Cokultur. In der Fibroblastenmonokultur fanden sich erheblich weniger Zellen als in der Keratinocytenmonokultur. Aus dem LDH-Assay ergaben sich für die Keratinocytenmonokultur auf AEMA 0,5 signifikant höhere Werte (entspricht mehr Zellen mit geschädigter Zellmembran) gegenüber AEMA 2 und für die cokultivierten Zellen auf AEMA 0,5 und AEMA 1 verglichen mit AEMA 2. Für die Fibroblastenmonokultur wurden keine Unterschiede gefunden. Generell ergab der LDH-Assay höhere Werte für Keratinocyten als für Fibroblasten (Abbildung 12c). Aus der Cokultur-Färbung (Keratin14/Vimentin) wurde das Verhältnis von Keratinocyten zu Fibroblasten ermittelt (Abbildung 13). Dabei ergab sich für AEMA 2 ein tendenziell höheres Verhältnis als für AEMA 0,5 und AEMA 1. Diese Erhöhung ergibt sich aus der erhöhten Dichte von Keratinocyten, wobei die Fibroblastendichte auf allen Copolymeren vergleichbar war. [167]

Aufgrund der vorgenannten Ergebnisse wurde AEMA 2 als bestes Copolymer mit TCP verglichen. Es zeigten sich geringfügig verminderte Zelldichten für Keratinocyten auf AEMA 2. Die Dichte toter Zellen und somit die Vitalität cokultivierter Zellen war im Gegensatz zu TCP auf AEMA 2 signifikant geringer und der LDH-Wert signifikant höher.

Das Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnis auf AEMA 2 war vergleichbar mit dem Verhältnis auf der TCP-Kontrolle. Die Datenwerte mit der statistischen Auswertung für die analysierten Parameter auf APMA-enthaltenden Copolymeren sind in Tabelle 11 für die Keratinozytenmonokultur, in Tabelle 12 für die Fibroblastenmonokultur und in Tabelle 13 für die Cokultur dargestellt.

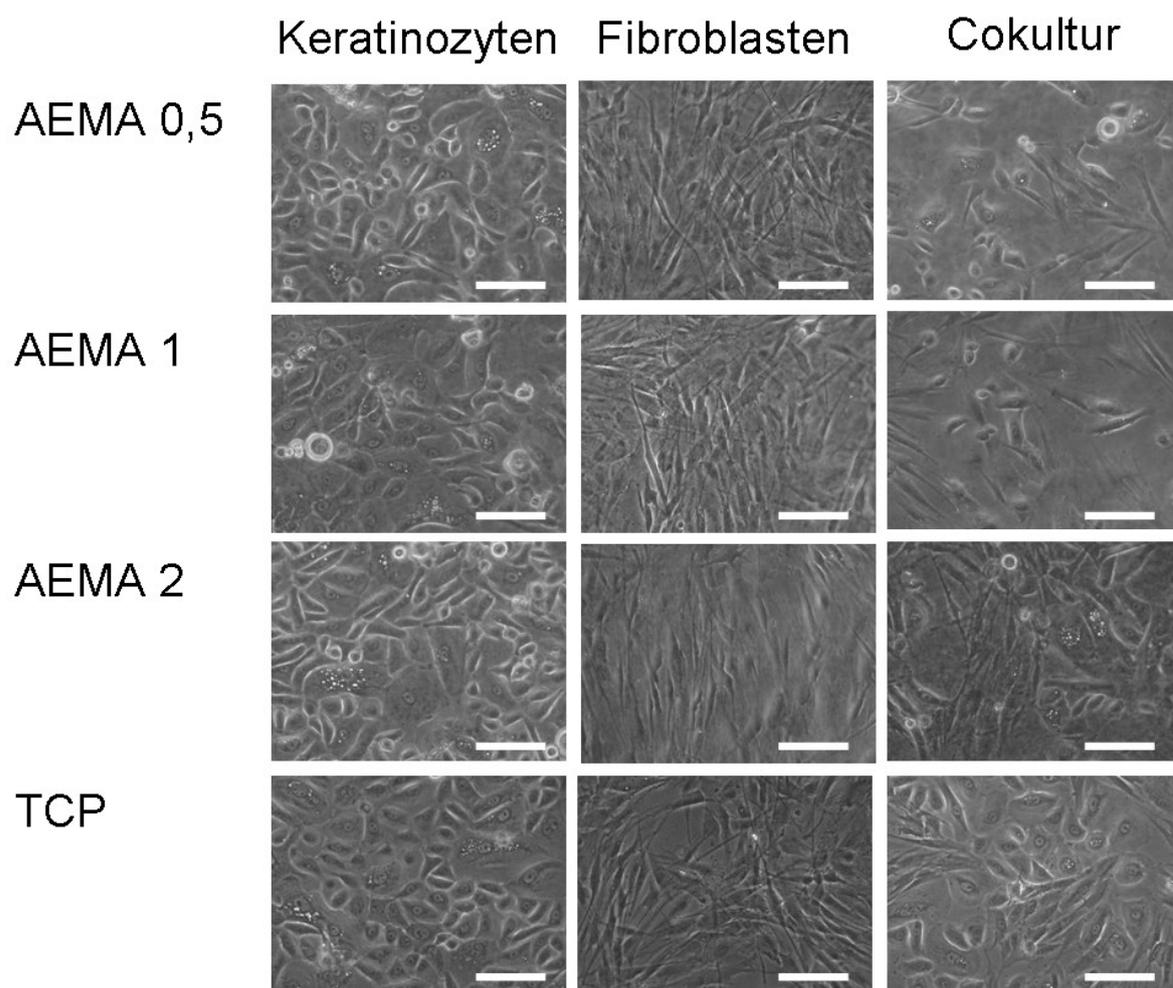


Abbildung 11: Durchlichtmikroskopische Bilder der Zellen nach 60 h Inkubation auf AEMA-Proben und Kontrolle zur Darstellung der Zellmorphologie (Maßbalken = 100 µm).

Tabelle 11: Dichte adhärenter lebender Keratinozyten (d_{vital}), toter Keratinozyten (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärrierter lebender Keratinozyten (z_{vital}), toter Keratinozyten (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml sowie die Absorption im LDH-Assay nach 60 h Inkubation für AEMA-Proben und TCP (vgl. [167]). (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$; S : $p<0,05$ gegenüber AEMA 0,5).

Keratinozyten		AEMA 0,5	AEMA 1	AEMA 2	TCP
Lebend/Tot-Färbung adhärenter Zellen	d_{vital} [Zellen/cm ²]	36573 \pm 4.818	38788 \pm 1297	42362 \pm 8983	51747 \pm 894
	d_{tot} [Zellen/cm ²]	2779 \pm 777	2108 \pm 754	1174 \pm 763	928 \pm 36
	d_{gesamt} [Zellen/cm ²]	39352 \pm 4613	40896 \pm 1660	43537 \pm 9742	52675 \pm 866
	Vitalität [%]	92 \pm 3	95 \pm 2	97 \pm 1	98 \pm 0,1
Durchflusszytometrische Analyse von Zellen im Überstand	z_{vital} [Zellen/ml]	242 \pm 101	275 \pm 81	317 \pm 128	376 \pm 11
	z_{tot} [Zellen/ml]	607 \pm 277	567 \pm 137	667 \pm 343	934 \pm 209
	z_{gesamt} [Zellen/ml]	849 \pm 377	843 \pm 218	983 \pm 461	1310 \pm 209
	Vitalität [%]	29 \pm 0,7	32 \pm 1,5	33 \pm 5	29 \pm 4
LDH-Assay	Absorption bei 492 nm	0,944 \pm 0,039	0,8 \pm 0,049	0,759 \pm 0,081 \$	0,627 \pm 0,02

Tabelle 12: Dichte adhärenter lebender Fibroblasten (d_{vital}), toter Fibroblasten (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärrierter lebender Fibroblasten (z_{vital}), toter Fibroblasten (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml sowie die Absorption im LDH-Assay nach 60 h Inkubation für AEMA-Proben und TCP (vgl. [167]).

Fibroblasten		AEMA 0,5	AEMA 1	AEMA 2	TCP
Lebend/Tot-Färbung adhärenter Zellen	d_{vital} [Zellen/cm ²]	40357 \pm 2.521	41511 \pm 1.372	41327 \pm 631	43911 \pm 1.846
	d_{tot} [Zellen/cm ²]	226 \pm 109	307,7 \pm 200	154 \pm 41	77 \pm 41
	d_{gesamt} [Zellen/cm ²]	40583 \pm 2.626	41819 \pm 1.234	41480 \pm 632	43988 \pm 1.815
	Vitalität [%]	99,5 \pm 0,2	99,3 \pm 0,5	99,6 \pm 0,1	99,8 \pm 0,1
Durchflusszytometrische Analyse von Zellen im Überstand	z_{vital} [Zellen/ml]	37 \pm 6	35 \pm 3	31 \pm 5	24 \pm 16
	z_{tot} [Zellen/ml]	41 \pm 20	15 \pm 15	25 \pm 6	37 \pm 29
	z_{gesamt} [Zellen/ml]	78 \pm 14	51 \pm 12	55 \pm 9	61 \pm 44
	Vitalität [%]	48,7 \pm 14,6	73 \pm 21	55,7 \pm 6,3	45,7 \pm 12,7
LDH-Assay	Absorption bei 492 nm	0,183 \pm 0,03	0,158 \pm 0,01	0,156 \pm 0,003	0,164 \pm 0,005

Tabelle 13: Dichte adhärenter lebender cokultivierter Keratinozyten und Fibroblasten (d_{vital}), toter Zellen (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärenter lebender Zellen (z_{vital}), toter Zellen (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml, die Absorption im LDH-Assay sowie des Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnisses ($\text{Ratio}_{\text{Ker/Fib}}$) und die Zelldichte der Keratinozyten (d_{Ker}), der Fibroblasten (d_{Fib}) und der Gesamtzelldichte (d_{Co}) in der Cokultur nach 60 h Inkubation für AEMA-Proben und TCP (vgl. [167]). (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$; #: $p<0,05$ gegenüber TCP; ###: $p<0,005$ gegenüber TCP; &&: $p<0,01$ gegenüber AEMA 1, \$\$\$: $p<0,005$ gegenüber AEMA 0,5).

Cokultur		AEMA 0,5	AEMA 1	AEMA 2	TCP
Lebend/Tot-Färbung adhärenter Zellen	d_{vital} [Zellen/cm ²]	30399 \pm 901	30424 \pm 1724	35096 \pm 3055	36542 \pm 1562
	d_{tot} [Zellen/cm ²]	3625 \pm 1155	4343 \pm 357	2518 \pm 904 *	769 \pm 307
	d_{gesamt} [Zellen/cm ²]	34742 \pm 814	32942 \pm 1977	35865 \pm 3316	37634 \pm 1504
	Vitalität [%]	89,4 \pm 3,1	87,5 \pm 1,1	93,3 \pm 2,3 *	98 \pm 0,7
Durchfluss- zytometrische Analyse von Zellen im Überstand	z_{vital} [Zellen/ml]	105 \pm 24	86 \pm 36	60 \pm 8	67 \pm 9
	z_{tot} [Zellen/ml]	153 \pm 39	133 \pm 56	126 \pm 36	97 \pm 5
	z_{gesamt} [Zellen/ml]	258 \pm 31	219 \pm 70	186 \pm 43	165 \pm 13
	Vitalität [%]	40,9 \pm 10	40,2 \pm 12,2	32,9 \pm 4,8	40,8 \pm 2,6
LDH-Assay	Absorption bei 492 nm	0,553 \pm 0,015	0,522 \pm 0,002	0,444 \pm 0,019 \$\$\$ && ***	0,295 \pm 0,012
	$\text{Ratio}_{\text{Ker/Fib}}$	0,8 \pm 0,1	0,8 \pm 0,03	1 \pm 0,1	1,1 \pm 0,2
Keratin/ Vimentin- Färbung	d_{Ker} [Zellen/cm ²]	11912 \pm 501	12159 \pm 232	14730 \pm 3076	17441 \pm 2651
	d_{Fib} [Zellen/cm ²]	15273 \pm 1194	16009 \pm 749	15001 \pm 1493	15984 \pm 981
	d_{Co} [Zellen/cm ²]	27185 \pm 789	28168 \pm 911	29731 \pm 4322	33425 \pm 2086

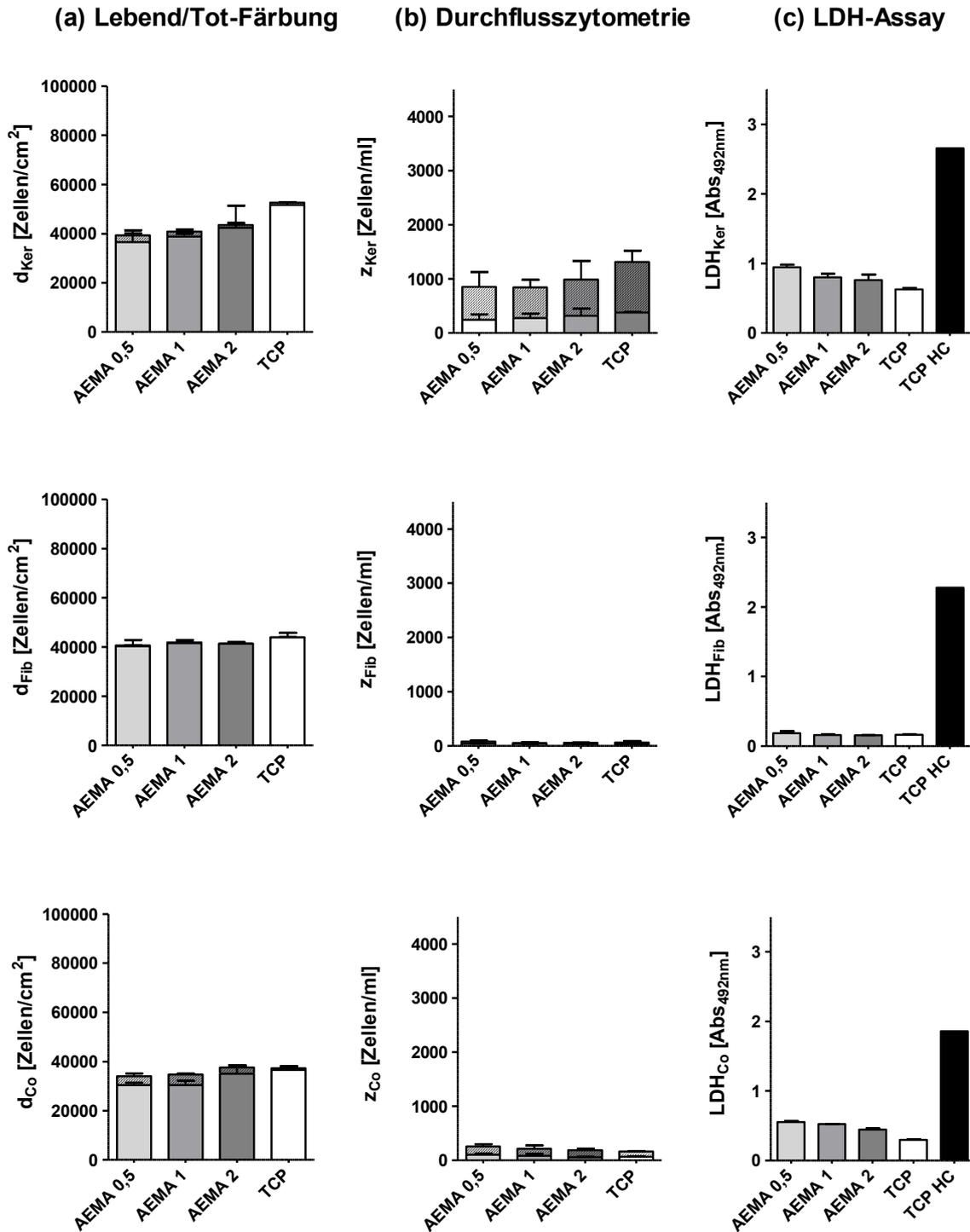


Abbildung 12: Analyse der Keratinozyten- und Fibroblasten-Monokulturen sowie der Cokulturen nach 60 h Inkubation auf AEMA-Proben und TCP. (a) Daten der Lebend/Tot-Färbung (Fluoresceindiaceat/Propidiumiodid; FDA/PI). (b) Daten der durchflusszytometrischen Analyse des gesamten Überstandes (1 ml) zur Untersuchung der Anzahl und Vitalität abgelöster oder nicht-adhärrierter Zellen. (c) Daten der Analyse der Überstände mittels LDH-Assay zur Untersuchung der Membranintegrität. Die high control (HC) entspricht der Freisetzung des LDHs nach Schädigung aller Zellen durch Triton. Die Daten zeigen die Mittelwerte für 3 Proben \pm Standardabweichung, schraffierte Anteile der Balken repräsentieren tote Zellen.

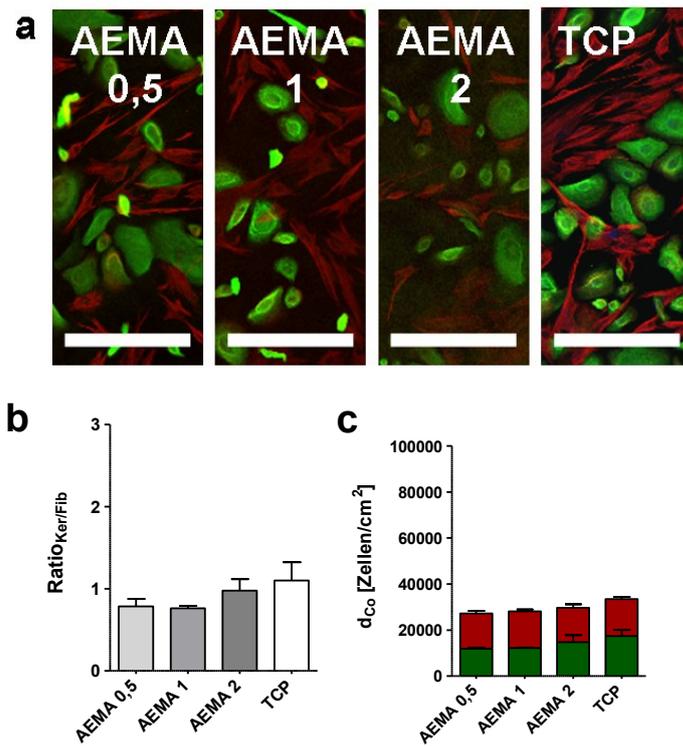


Abbildung 13: Cokultur-Färbung von Keratinozyten (markiert mit Antikörper gegen Keratin14; grün) und Fibroblasten (markiert mit Antikörper gegen Vimentin; rot) in Cokultur nach 60 h Inkubation auf AEMA-Proben und Kontrollen. (a) Beispielbilder, aufgenommen mit dem cLSM (Maßbalken = 200 μm). (b) Graphik des Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnisses. (c) Graphik der Zellzahlen beider Zelltypen pro cm^2 . Der grüne Anteil der Balken entspricht den Keratinozyten und der rote Anteil den Fibroblasten. Die Daten zeigen den Mittelwert von 3 Proben \pm Standardabweichung (vgl. [167]).

8.3.1.2 *Acrylnitril-basierte Copolymere mit zunehmendem molarem Anteil des Comonomers N-3-Aminopropyl-methacrylamid-hydrochlorid*

Die auf den APMA-enthaltenden Copolymeren und PAN inkubierten Keratinozyten, Fibroblasten und beide Zelltypen in Cokultur zeigten ihre jeweils physiologische Morphologie und zur Kontrolle vergleichbare Zelldichten (Abbildung 14). Zwischen den Copolymeren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Anzahl und Vitalität der adhärenen Keratinozyten, Fibroblasten und kokultivierten Zellen, sowie die LDH-Werte und die Zahl und Vitalität der abgelösten Zellen waren vergleichbar (Abbildung 15a, b und c). Auch das Verhältnis und die Dichte der adhärenen Keratinozyten und Fibroblasten in der Cokultur unterschied sich zwischen den verschiedenen APMA-haltigen Copolymeren nicht (Abbildung 16). Die Zelldichte in der Keratinozytenmonokultur war jedoch tendenziell auf APMA 2 geringer als auf APMA 0,5 und APMA 1. In der Fibroblastenmonokultur zeigte sich eine tendenziell geringere Zelldichte auf APMA 0,5 im Vergleich zu den anderen Copolymeren. Für die Cokultur fanden sich tendenziell mehr Keratinozyten auf APMA 2. Da die tendenziellen Unterschiede für die Mono- und Cokulturen widersprüchlich waren, konnte kein bestes Copolymer ausgewählt werden und alle Copolymere wurden mit PAN und TCP verglichen. Dabei ergaben sich für die Keratinozytenmonokultur eine signifikant höhere Vitalität und geringere Dichte toter Zellen auf APMA 2 gegenüber PAN, niedrigere Zelldichten (vital sowie gesamt) auf allen Copolymeren gegenüber TCP, sowie eine geringere Dichte toter Zellen auf APMA 2 im Vergleich zu TCP. Für die Fibroblastenmonokultur wurde auf APMA 0,5 eine signifikant geringere Zelldichte (gesamt) gegenüber TCP, sowie geringere Zahlen toter nicht adhärerter Zellen auf APMA 2 im Gegensatz zu TCP und PAN gefunden. Für die Cokultur zeigte sich eine signifikant geringere Dichte toter Zellen auf APMA 2 gegenüber TCP und PAN, eine höhere Vitalität auf APMA 2 verglichen mit PAN und auf APMA 0,5 eine geringere Dichte lebender Zellen gegenüber PAN. Außerdem wurden für die Cokultur auf APMA 1 signifikant geringere Zelldichten (Keratinozyten und gesamt) und ein geringeres Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnis gegenüber TCP gefunden. Die Datenwerte mit der statistischen Auswertung für die analysierten Parameter auf APMA-enthaltenden Copolymeren sind in Tabelle 14 für die Keratinozytenmonokultur, in Tabelle 15 für die Fibroblastenmonokultur und in Tabelle 16 für die Cokultur dargestellt.

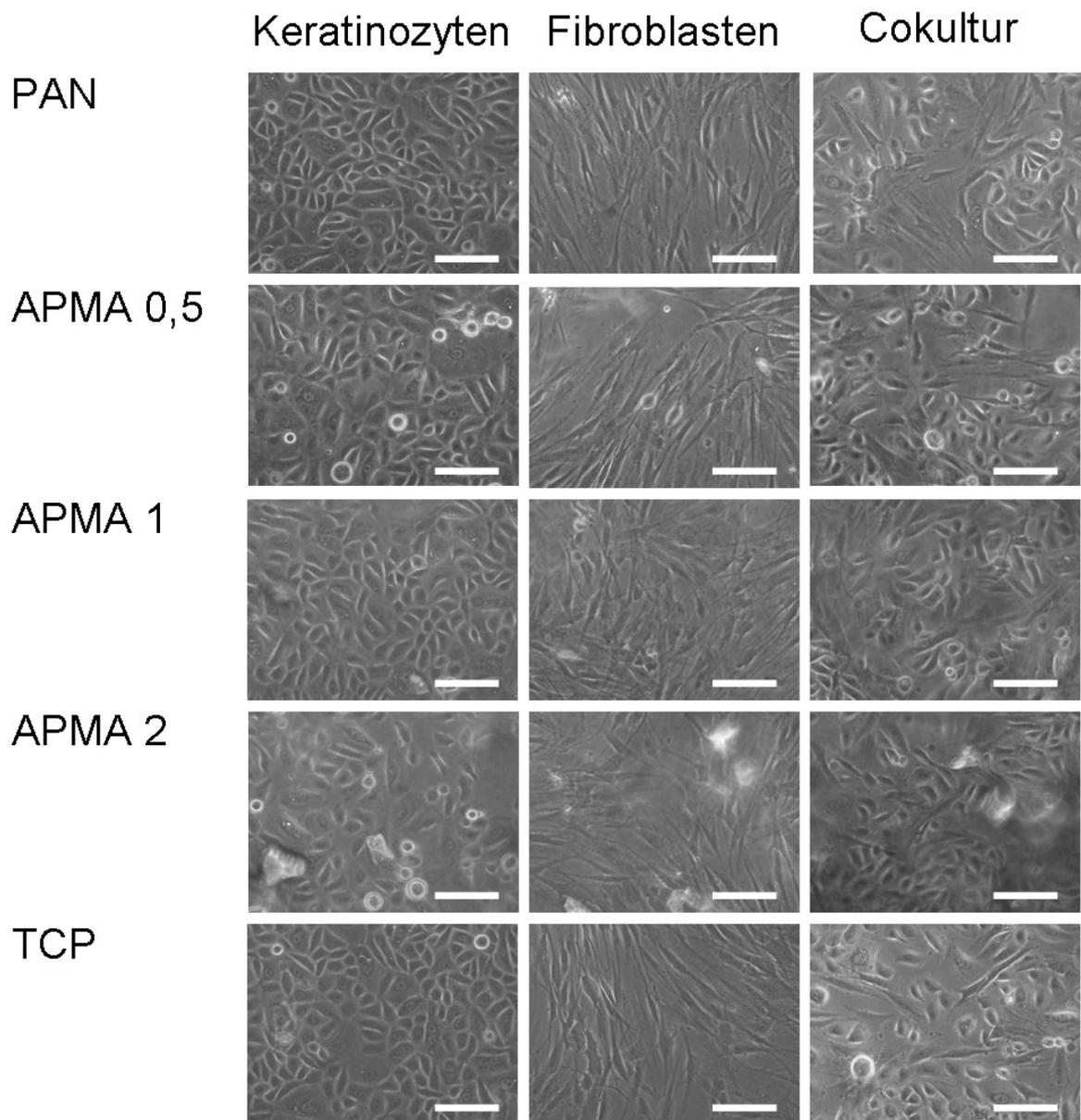


Abbildung 14: Durchlichtmikroskopische Bilder der Zellen nach 48 h Inkubation auf APMA-Proben und Kontrollen zur Darstellung der Zellmorphologie (Maßbalken = 100 µm).

Tabelle 14: Dichte adhärenter lebender Keratinozyten (d_{vital}), toter Keratinozyten (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärrierter lebender Keratinozyten (z_{vital}), toter Keratinozyten (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml sowie die Absorption im LDH-Assay nach 48 h Inkubation auf APMA-Proben und Kontrollen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$; #: $p<0,05$ gegenüber TCP, ##: $p<0,01$ gegenüber TCP).

Keratinozyten		PAN	APMA 0,5	APMA 1	APMA 2	TCP
Lebend/Tot-Färbung adhärenter Zellen	d_{vital} [Zellen/cm ²]	68.959 \pm 7.249	66.734 \pm 2.103 ##	66.958 \pm 6.026 ##	57.480 \pm 6.161 ##	92.975 \pm 6.512
	d_{tot} [Zellen/cm ²]	1.462 \pm 114	1.287 \pm 118	2.035 \pm 1247	835 \pm 102 * #	1.886 \pm 637
	d_{gesamt} [Zellen/cm ²]	70.421 \pm 7.172	68.021 \pm 2.077 ##	68.992 \pm 4.805 ##	58.314 \pm 6.241 ##	94.860 \pm 6.018
	Vitalität [%]	97,9 \pm 0,4	98,1 \pm 0,2	97 \pm 2	98,6 \pm 0,1 *	98 \pm 0,8
Durchflusszytometrische Analyse von Zellen im Überstand	z_{vital} [Zellen/ml]	137 \pm 38	93 \pm 41	141 \pm 95	135 \pm 69	103 \pm 36
	z_{tot} [Zellen/ml]	701 \pm 104	520 \pm 255	757 \pm 190	599 \pm 218	555 \pm 144
	z_{gesamt} [Zellen/ml]	837 \pm 141	613 \pm 296	897 \pm 282	734 \pm 284	658 \pm 141
	Vitalität [%]	16 \pm 2	16 \pm 1	15 \pm 5	18 \pm 4	16 \pm 7
LDH-Assay	Absorption bei 492 nm	0,506 \pm 0,078	0,513 \pm 0,067	0,494 \pm 0,076	0,513 \pm 0,002	0,552 \pm 0,153

Tabelle 15: Dichte adhärenter lebender Fibroblasten (d_{vital}), toter Fibroblasten (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärrierter lebender Fibroblasten (z_{vital}), toter Fibroblasten (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml sowie die Absorption im LDH-Assay nach 48 h Inkubation für APMA-Proben und Kontrollen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$; *: $p<0,05$ gegenüber PAN; #: $p<0,05$ gegenüber TCP).

Fibroblasten		PAN	APMA 0,5	APMA 1	APMA 2	TCP
Lebend/Tot-Färbung adhärenter Zellen	d_{vital} [Zellen/cm ²]	43742 \pm 3601	37364 \pm 2054	42405 \pm 2109	41017 \pm 2210	42595 \pm 3139
	d_{tot} [Zellen/cm ²]	762 \pm 418	979 \pm 690	370 \pm 88	349 \pm 325	2008 \pm 1655
	d_{gesamt} [Zellen/cm ²]	44505 \pm 3182	38343 \pm 2410 #	42775 \pm 2078	41366 \pm 2517	44603 \pm 1501
	Vitalität [%]	98 \pm 1	97 \pm 2	99 \pm 0,2	99 \pm 0,7	95 \pm 4
Durchflusszytometrische Analyse von Zellen im Überstand	z_{vital} [Zellen/ml]	6 \pm 2	7 \pm 5	5 \pm 3	3 \pm 1	8 \pm 7
	z_{tot} [Zellen/ml]	21 \pm 6	11 \pm 4	12 \pm 7	9 \pm 1 * #	26 \pm 9
	z_{gesamt} [Zellen/ml]	27 \pm 7	18 \pm 5	17 \pm 10	12 \pm 0	34 \pm 11
	Vitalität [%]	23 \pm 7	35 \pm 23	27 \pm 2	22 \pm 10	22 \pm 18
LDH-Assay	Absorption bei 492 nm	0,221 \pm 0,025	0,218 \pm 0,012	0,219 \pm 0,024	0,193 \pm 0,006	0,199 \pm 0,012

Tabelle 16: Dichte adhärenter lebender kokultivierter Keratinozyten und Fibroblasten (d_{vital}), toter Zellen (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärenter lebender Zellen (z_{vital}), toter Zellen (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml, die Absorption im LDH-Assay sowie das Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnisses ($\text{Ratio}_{\text{Ker/Fib}}$) und die Zelldichte der Keratinozyten (d_{Ker}), der Fibroblasten (d_{Fib}) und der Gesamtzelldichte (d_{Co}) in der Kokultur nach 48 h Inkubation für APMA-Proben und Kontrollen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$; *: $p<0,05$ gegenüber PAN; **: $p<0,01$ gegenüber PAN; #: $p<0,05$ gegenüber TCP).

Cokultur		PAN	APMA 0,5	APMA 1	APMA 2	TCP
Lebend/Tot-Färbung adhärenter Zellen	d_{vital} [Zellen/cm ²]	53963 \pm 2382	49567 \pm 645	52400 \pm 3154	52092 \pm 1882	55207 \pm 6098
	d_{tot} [Zellen/cm ²]	1190 \pm 250	2641 \pm 2714	945,2 \pm 188	399,2 \pm 116 ** #	1518 \pm 640
	d_{gesamt} [Zellen/cm ²]	55154 \pm 2609	52208 \pm 3303	53345 \pm 3104	52492 \pm 1852	56724 \pm 5640
	Vitalität [%]	98 \pm 0,4	95 \pm 5	98 \pm 0,4	99 \pm 0,2 **	97 \pm 1
Durchfluss- zytometrische Analyse von Zellen im Überstand	z_{vital} [Zellen/ml]	69 \pm 22	41 \pm 22	37 \pm 11	50 \pm 12	36 \pm 19
	z_{tot} [Zellen/ml]	119 \pm 43	81 \pm 54	72 \pm 32	83 \pm 17	67 \pm 47
	z_{gesamt} [Zellen/ml]	188 \pm 65	123 \pm 76	109 \pm 39	133 \pm 18	103 \pm 66
	Vitalität [%]	37 \pm 1	35 \pm 4	35 \pm 8	38 \pm 8	37 \pm 5
LDH-Assay	Absorption bei 492 nm	0,254 \pm 0,013	0,26 \pm 0,013	0,257 \pm 0,002	0,252 \pm 0,007	0,255 \pm 0,011
Keratin/ Vimentin- Färbung	$\text{Ratio}_{\text{Ker/Fib}}$	1,5 \pm 0,2	1,7 \pm 0,1	1,6 \pm 0,2 #	1,8 \pm 0,3	2 \pm 0,3
	d_{Ker} [Zellen/cm ²]	31433 \pm 3160	36748 \pm 3801	34074 \pm 3340 #	39971 \pm 7164	46493 \pm 4921
	d_{Fib} [Zellen/cm ²]	20519 \pm 3029	21202 \pm 1707	21635 \pm 366,9	22251 \pm 1056	22265 \pm 612
	d_{Co} [Zellen/cm ²]	51953 \pm 5588	57951 \pm 5340	55709 \pm 3121 #	62222 \pm 7685	68759 \pm 4574

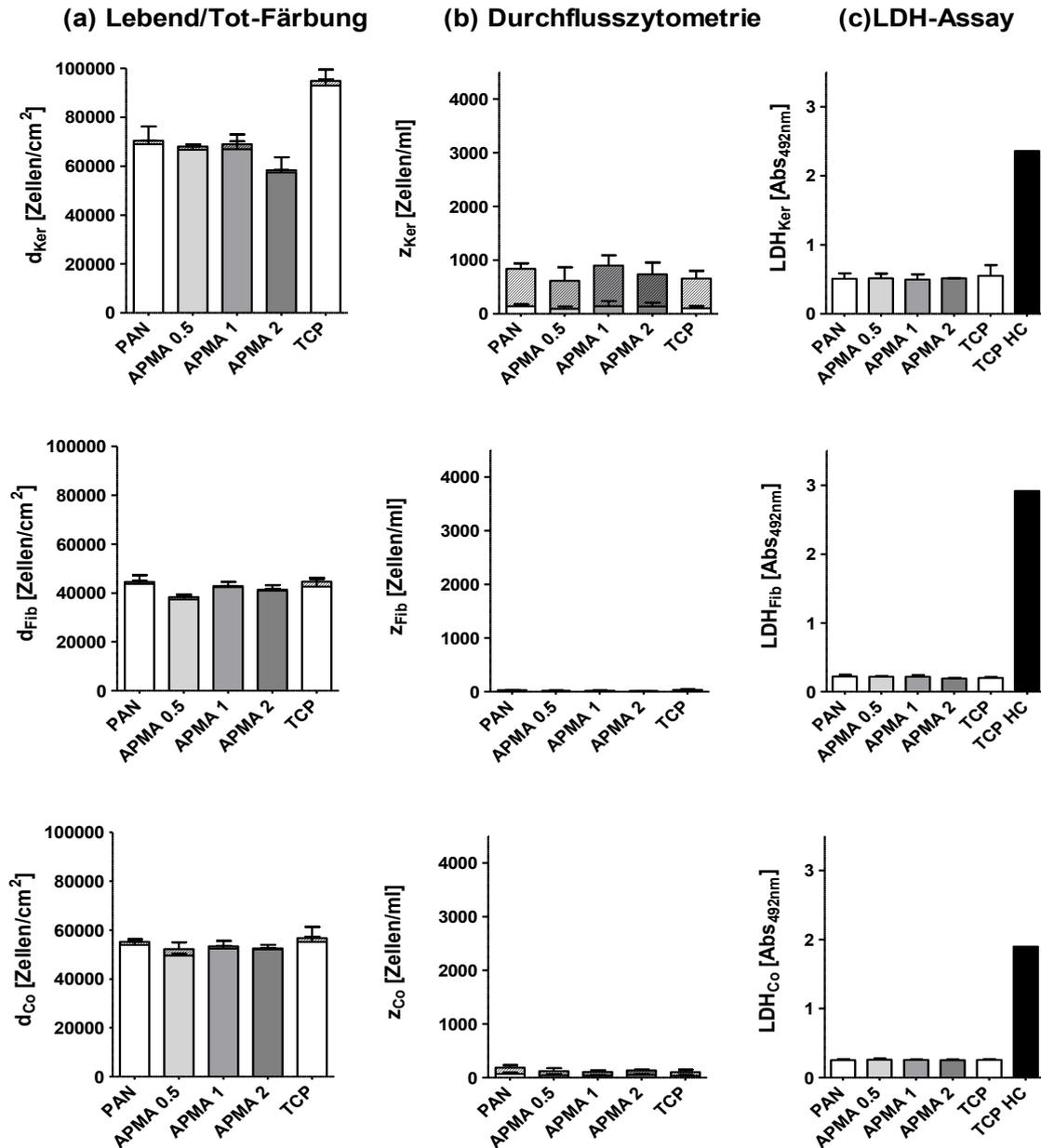


Abbildung 15: Analyse der Keratinozyten- und Fibroblasten-Monokulturen sowie der Cokulturen nach 48 Stunden Inkubation auf APMA-Proben und Kontrollen. (a) Daten der Lebend/Tot-Färbung (Fluoresceindiacetat/Propidiumiodid; FDA/PI). (b) Daten der durchflusszytometrischen Analyse des gesamten Überstandes (1 ml) zur Untersuchung der Anzahl und Vitalität abgelöster oder nicht-adhärirter Zellen. (c) Daten der Analyse der Überstände mittels LDH-Assay zur Untersuchung der Membranintegrität. Die high control (HC) entspricht der Freisetzung des LDHs nach Schädigung aller Zellen durch Triton. Die Daten zeigen die Mittelwerte für 3 Proben \pm Standardabweichung, schraffierte Anteile der Balken repräsentieren tote Zellen.

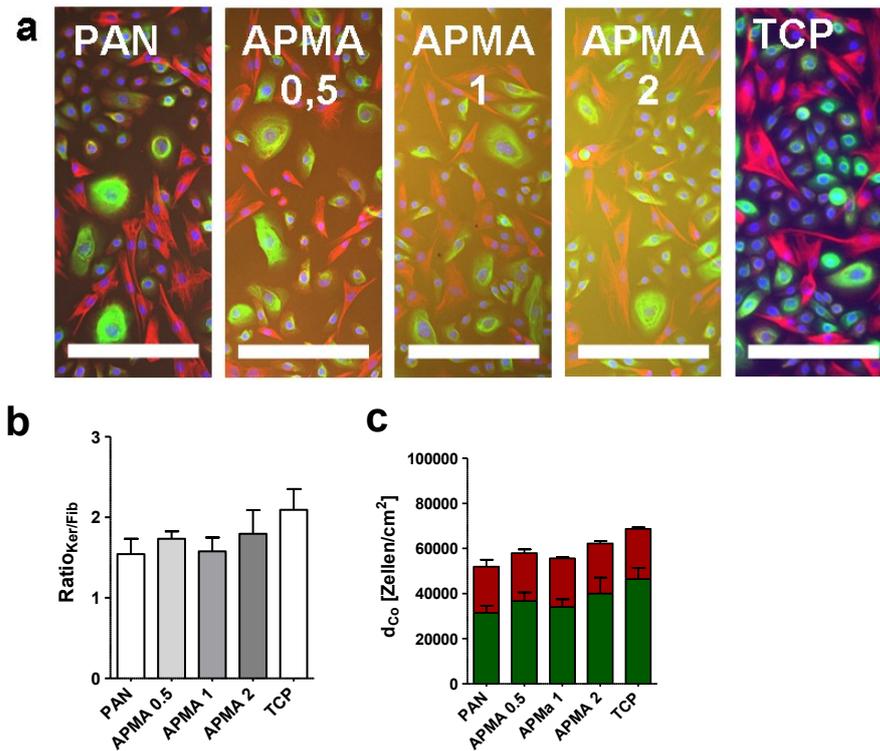


Abbildung 16: Färbung von Keratinozyten (markiert mit Antikörper gegen Keratin14; grün) und Fibroblasten (markiert mit Antikörper gegen Vimentin; rot) in Cokultur nach 48 h Inkubation auf APMA-Proben und Kontrollen. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 gefärbt und sind blau dargestellt. (a) Beispielbilder, aufgenommen mit dem InCell 2000 (Maßbalken = 200 μm). (b) Graphik des Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnisses. (c) Graphik der Zellzahlen beider Zelltypen pro cm^2 . Der grüne Anteil der Balken entspricht den Keratinozyten und der rote Anteil den Fibroblasten. Die Daten zeigen den Mittelwert von 3 Proben \pm Standardabweichung.

8.3.1.3 *Acrylnitril-basierte Copolymere mit zunehmendem molaren Anteil des Comonomers Natriumsalz der 2-Methyl-2-propen-1-sulfonsäure*

Keratinocyten, Fibroblasten und die kokultivierten Zellen zeigten auf den Polymeren der p(AN-co-NaMAS)-Serie jeweils ihre physiologische Morphologie und mit der Kontrolle vergleichbare Zelldichten (Abbildung 17). Mit zunehmendem NaMAS-Gehalt ergab die Auswertung der Lebend/Tot-Färbung eine tendenzielle Erhöhung der Dichten vitaler und eine Verringerung der Dichten toter Keratinocyten und kokultivierter Zellen. Die Dichte vitaler sowie die Summe vitaler und toter Keratinocyten war auf NaMAS 0,5 im Gegensatz zu NaMAS 2 signifikant geringer. Für die Kokultur ergab sich eine signifikant geringere Dichte vitaler Zellen, eine signifikant geringere Dichte der Summe von toten und vitalen Zellen und eine signifikant geringere Vitalität auf NaMAS 1, sowie eine signifikant geringere Dichte vitaler Zellen auf NaMAS 0,5 gegenüber NaMAS 2. Für die Fibroblastenmonokultur wurden keine Unterschiede bezüglich Zelldichte oder Vitalität gefunden (Abbildung 18a). Die Dichte toter nicht-adhärirter Keratinocyten in den Überständen von NaMAS 0,5 und NaMAS 1; sowie die Dichte der Summe toter und lebender nicht-adhärirter Keratinocyten im Überstand von NaMAS 2 war gegenüber NaMAS 2 signifikant höher. Für die Fibroblastenmonokultur und die Kokultur zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den NaMAS-enthaltenden Copolymeren (Abbildung 18b). Für die kokultivierten Zellen wurden auf NaMAS 0,5 und NaMAS 1 signifikant höhere Werte im LDH-Assay (entspricht erhöhter Beeinträchtigung der Membranintegrität) im Gegensatz zu NaMAS 2 gefunden. Tendenziell wurde dies auch für die Keratinocytenmonokultur beobachtet. Für die Fibroblastenmonokultur wurden keine Unterschiede zwischen den Copolymeren gefunden (Abbildung 18c). Auf NaMAS 0,5 und 1 zeigte sich eine signifikant geringere Anzahl adhärenter Keratinocyten bei gleicher Anzahl von Fibroblasten verglichen mit NaMAS 2. Daraus resultiert ein signifikant höheres Keratinocyten/Fibroblasten-Verhältnis auf NaMAS 2 (Abbildung 19).

Entsprechend den vorgenannten Ergebnissen wurde NaMAS 2 als bestes Copolymer ausgewählt und mit PAN und TCP verglichen. Dabei ergaben sich gegenüber PAN keine signifikanten Unterschiede. Gegenüber TCP fand sich auf NaMAS 2 ein signifikant geringeres Keratinocyten/Fibroblasten-Verhältnis. Die Datenwerte mit der statistischen Auswertung für die analysierten Parameter auf NaMAS-enthaltenden Copolymeren sind in Tabelle 17 für die Keratinocytenmonokultur, in Tabelle 18 für die Fibroblastenmonokultur und in Tabelle 19 für die Kokultur dargestellt.

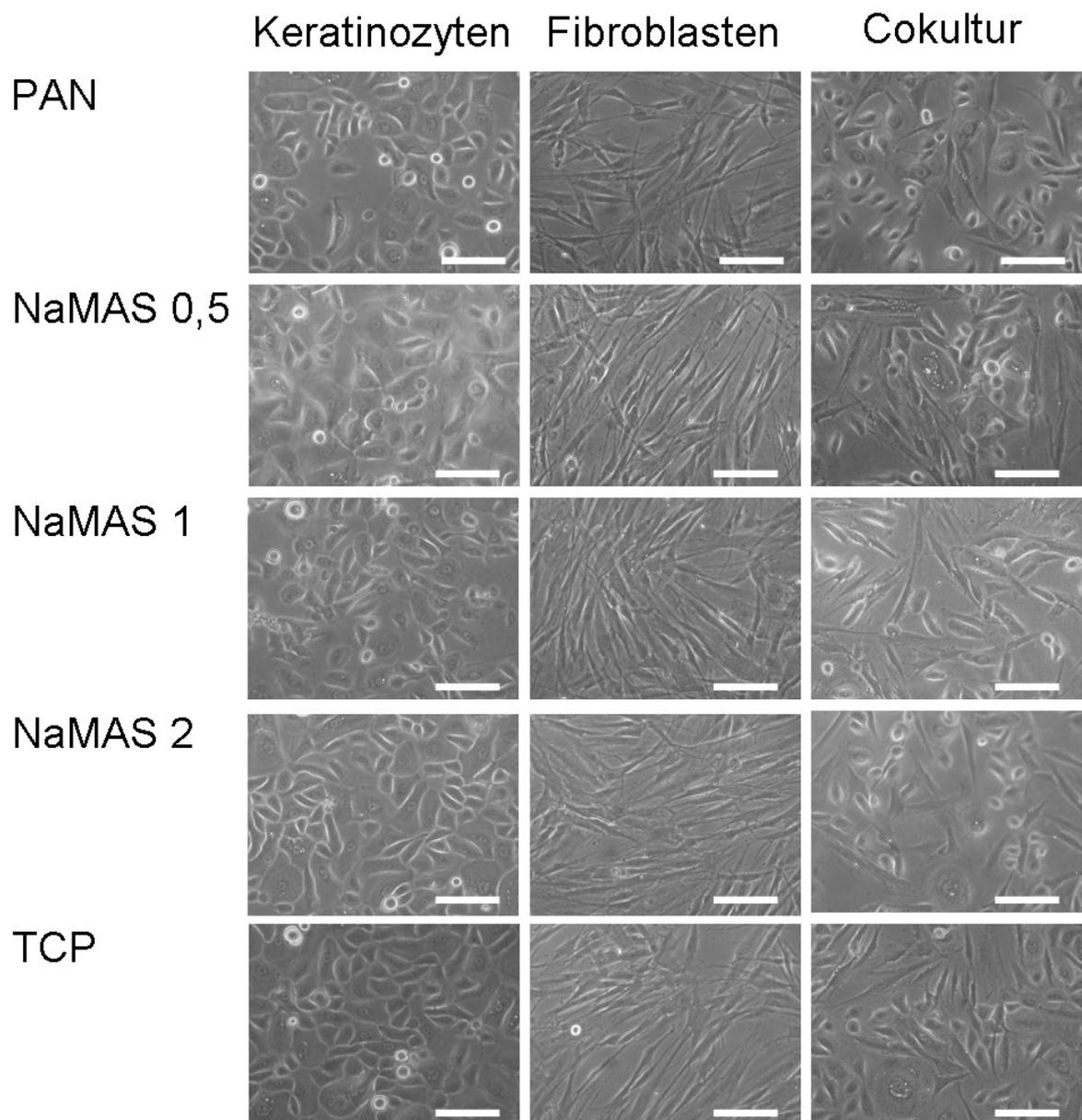


Abbildung 17: Durchlichtmikroskopische Bilder der Zellen nach 48 h Inkubation auf NaMAS-Proben und Kontrollen zur Darstellung der Zellmorphologie (Maßbalken = 100 µm).

Tabelle 17: Dichte adhärenter lebender Keratinozyten (d_{vital}), toter Keratinozyten (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärenter lebender Keratinozyten (z_{vital}), toter Keratinozyten (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml sowie die Absorption im LDH-Assay nach 48 h Inkubation für NaMAS-Proben und Kontrollen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$; \$: $p<0,05$ gegenüber NaMAS 0,5; \$\$: $p<0,01$ gegenüber NaMAS 0,5).

Keratinozyten		PAN	NaMAS 0,5	NaMAS 1	NaMAS 2	TCP
Lebend/Tot-Färbung adhärenter Zellen	d_{vital} [Zellen/cm ²]	44967 \pm 11654	26148 \pm 7100	35763 \pm 9280	53859 \pm 6216 \$	54952 \pm 5696
	d_{tot} [Zellen/cm ²]	1077 \pm 419	5236 \pm 4391	5159 \pm 1594	1431 \pm 610	708 \pm 15
	d_{gesamt} [Zellen/cm ²]	46044 \pm 12066	31383 \pm 4497	40921 \pm 8029	55290 \pm 6284 \$\$	55659 \pm 5683
	Vitalität [%]	98 \pm 0,4	83 \pm 15	87 \pm 5	97 \pm 1	99 \pm 0,1
Durchflusszytometrische Analyse von Zellen im Überstand	z_{vital} [Zellen/ml]	213 \pm 190	227 \pm 164	114 \pm 11	71 \pm 29	53 \pm 27
	z_{tot} [Zellen/ml]	419 \pm 365	472 \pm 70	258 \pm 79 \$	173 \pm 73 \$\$	132 \pm 65
	z_{gesamt} [Zellen/ml]	633 \pm 555	700 \pm 234	372 \pm 89	244 \pm 101 \$	185 \pm 92
	Vitalität [%]	34 \pm 4	30 \pm 12	32 \pm 6	30 \pm 3	29 \pm 3
LDH-Assay	Absorption bei 492 nm	0,408 \pm 0,059	0,953 \pm 0,377	0,854 \pm 0,219	0,432 \pm 0,039	0,386 \pm 0,041

Tabelle 18: Dichte adhärenter lebender Fibroblasten (d_{vital}), toter Fibroblasten (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärenter lebender Fibroblasten (z_{vital}), toter Fibroblasten (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml sowie die Absorption im LDH-Assay nach 48 h Inkubation für NaMAS-Proben und Kontrollen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$)

Fibroblasten		PAN	NaMAS 0,5	NaMAS 1	NaMAS 2	TCP
Lebend/Tot-Färbung adhärenter Zellen	d_{vital} [Zellen/cm ²]	43019 \pm 1588	40639 \pm 1240	42834 \pm 1074	41224 \pm 2434	45229 \pm 1253
	d_{tot} [Zellen/cm ²]	297 \pm 39	400 \pm 436	472 \pm 87	436 \pm 208	277 \pm 15
	d_{gesamt} [Zellen/cm ²]	43316 \pm 1625	41039 \pm 1646	43306 \pm 1108	41660 \pm 2252	45506 \pm 1257
	Vitalität [%]	99 \pm 0,1	99 \pm 1	99 \pm 0,2	99 \pm 0,6	99 \pm 0,03
Durchflusszytometrische Analyse von Zellen im Überstand	z_{vital} [Zellen/ml]	6	7 \pm 7	5 \pm 1	14 \pm 7	10 \pm 7
	z_{tot} [Zellen/ml]	21 \pm 14	26 \pm 11	11 \pm 5	21 \pm 11	21 \pm 12
	z_{gesamt} [Zellen/ml]	27 \pm 14	33 \pm 18	16 \pm 5	35 \pm 7	31 \pm 17
	Vitalität [%]	26 \pm 11	17 \pm 15	35 \pm 13	41 \pm 21	33 \pm 18
LDH-Assay	Absorption bei 492 nm	0,206 \pm 0,02	0,224 \pm 0,011	0,216 \pm 0,013	0,232 \pm 0,041	0,233 \pm 0,044

Tabelle 19: Dichte adhärenter lebender kokultivierter Keratinozyten und Fibroblasten (d_{vital}), toter Zellen (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärrierter lebender Zellen (z_{vital}), toter Zellen (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml, die Absorption im LDH-Assay sowie das Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnis ($\text{Ratio}_{\text{Ker/Fib}}$) und die Zelldichte der Keratinozyten (d_{Ker}), der Fibroblasten (d_{Fib}) und der Gesamtzelldichte (d_{Co}) in der Kokultur nach 48 h Inkubation für NaMAS-Proben und Kontrollen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$; ##: $p<0,01$ gegenüber TCP, \$: $p<0,05$ gegenüber NaMAS 0,5; \$\$: $p<0,01$ gegenüber NaMAS 0,5; &: $p<0,05$ gegenüber NaMAS 1; &&: $p<0,01$ gegenüber NaMAS 1; &&&: $p<0,005$ gegenüber NaMAS 1).

Cokultur	PAN	NaMAS 0,5	NaMAS 1	NaMAS 2	TCP	
Lebend/Tot-Färbung adhärenter Zellen	d_{vital} [Zellen/cm ²]	45224 \pm 2735	32306 \pm 3504	30609 \pm 3494	46988 \pm 5800 \$ &&	53224 \pm 3746
	d_{tot} [Zellen/cm ²]	415 \pm 147	2374 \pm 1788	3364 \pm 1591	641 \pm 175	374 \pm 85
	d_{gesamt} [Zellen/cm ²]	45639 \pm 2646	34681 \pm 5166	33973 \pm 4747	47629 \pm 5636 &	53598 \pm 3674
	Vitalität [%]	99 \pm 0,3	94 \pm 4	90 \pm 3,9	99 \pm 0,5 &	99 \pm 0,2
Durchfluss- zytometrische Analyse von Zellen im Überstand	z_{vital} [Zellen/ml]	77 \pm 24	89 \pm 60	48 \pm 12	57 \pm 41	84 \pm 66
	z_{tot} [Zellen/ml]	108 \pm 29	80 \pm 36	61 \pm 21	65 \pm 39	67 \pm 53
	z_{gesamt} [Zellen/ml]	185 \pm 53	169 \pm 96	109 \pm 34	122 \pm 78	151 \pm 119
	Vitalität [%]	41 \pm 2	49 \pm 10	45 \pm 3	43 \pm 12	55 \pm 2
LDH-Assay	Absorption bei 492 nm	0,231 \pm 0,017	0,449 \pm 0,082	0,541 \pm 0,014	0,24 \pm 0,036 \$\$ &&	0,232 \pm 0,005
Keratin/ Vimentin- Färbung	$\text{Ratio}_{\text{Ker/Fib}}$	1,4 \pm 0,09	0,8 \pm 0,13	1 \pm 0,05	1,46 \pm 0,07 \$\$ &&& ##	1,7 \pm 0,04
	d_{Ker} [Zellen/cm ²]	31809 \pm 3378	17383 \pm 2037	21669 \pm 1820	31477 \pm 5579 \$\$ &	39702 \pm 3319
	d_{Fib} [Zellen/cm ²]	22713 \pm 3780	21640 \pm 1036	21582 \pm 1526	21515 \pm 2887	23367 \pm 2214
	d_{Co} [Zellen/cm ²]	54521 \pm 7151	39024 \pm 1513	43252 \pm 3178	52992 \pm 8446 \$	63069 \pm 5500

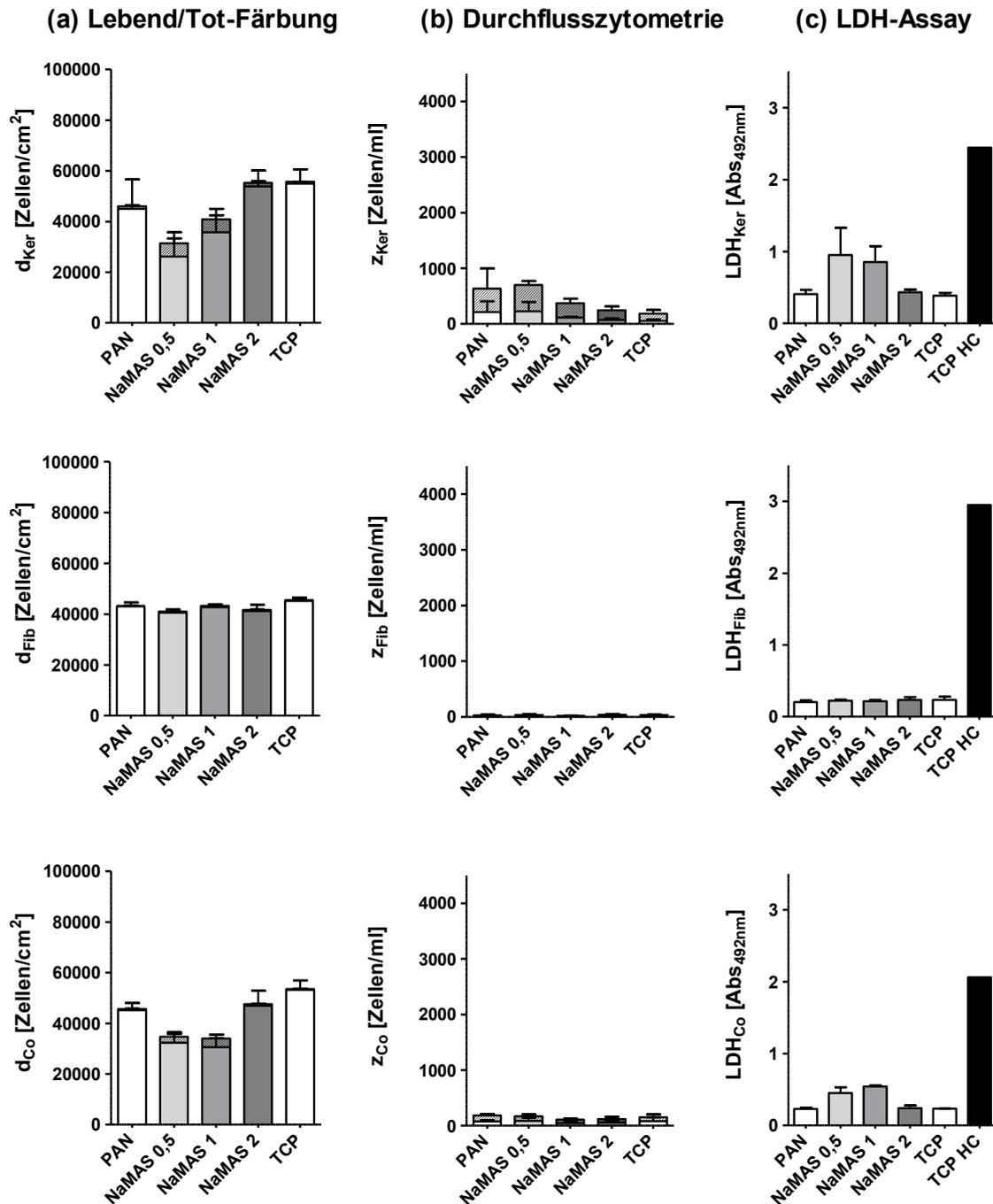


Abbildung 18: Analyse der Keratinozyten- und Fibroblasten-Monokulturen sowie der Cokulturen nach 48 Stunden Inkubation auf NaMAS-Proben und Kontrollen. (a) Daten der Lebend/Tot-Färbung (Fluoresceindiacetat/Propidiumiodid; FDA/PI). (b) Daten der durchflusszytometrischen Analyse des gesamten Überstandes (1 ml) zur Untersuchung der Anzahl und Vitalität abgelöster oder nicht-adhärirter Zellen. (c) Daten der Analyse der Überstände mittels LDH-Assay zur Untersuchung der Membranintegrität. Die high control (HC) entspricht der Freisetzung des LDHs nach Schädigung aller Zellen durch Triton. Die Daten zeigen die Mittelwerte für 3 Proben \pm Standardabweichung, schraffierte Anteile der Balken repräsentieren tote Zellen.

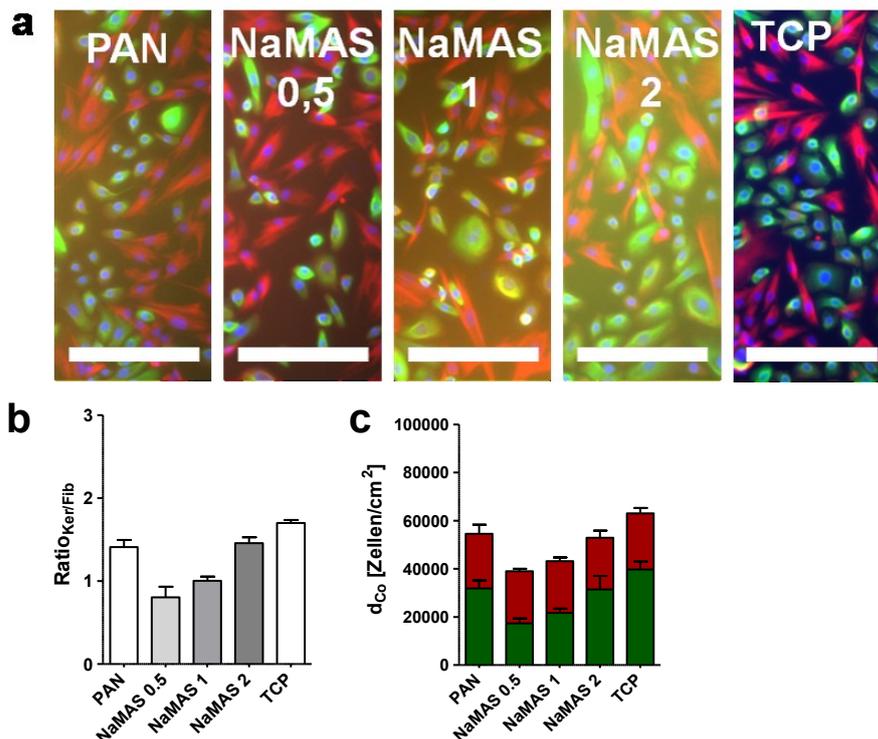


Abbildung 19: Färbung von Keratinozyten (markiert mit Antikörper gegen Keratin14; grün) und Fibroblasten (markiert mit Antikörper gegen Vimentin; rot) in Cokultur nach 48 h Inkubation auf NaMAS-Proben und Kontrollen. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 gefärbt und sind blau dargestellt. (a) Beispielbilder, aufgenommen mit dem InCell 2000 (Maßbalken = 200 µm). (b) Graphik des Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnisses. (c) Graphik der Zellzahlen beider Zelltypen pro cm². Der grüne Anteil der Balken entspricht den Keratinozyten und der rote Anteil den Fibroblasten. Die Daten zeigen den Mittelwert von 3 Proben ± Standardabweichung.

8.3.2 Acrylnitril-basierte Copolymere mit Variation der Hydrophilie - Copolymere mit zunehmendem Anteil des Comonomers N-Vinylpyrrolidon

Im Durchlichtmikroskop zeigten Keratinozyten und Fibroblasten in Mono- und Cokultur auf PAN, NVP 5, NVP 10 und NVP 20 weitestgehend ihre jeweils physiologische Morphologie und mit der Kontrolle vergleichbare Zelldichten. Teilweise fanden sich auf den NVPs im Gegensatz zu TCP mehr abgekugelte Zellen. NVP 25 und NVP 30-Proben wurden nach Kontakt mit Medium weiß und undurchsichtig, daher konnten keine Durchlichtbilder aufgenommen werden (Abbildung 20). Aus der Lebend/Tot-Färbung ergaben sich mit zunehmendem NVP-Gehalt tendenziell geringere Dichten adhärenter Keratinozyten, Fibroblasten und kokultivierter Zellen. Auf NVP 30 konnte die Dichte der toten Fibroblasten und somit auch die Vitalität nicht ermittelt werden, da die PI-gefärbten toten Zellen nicht von der diffusen Hintergrundfluoreszenz unterschieden werden konnten. Für die Fibroblastenmonokultur zeigten sich signifikant geringere Dichten vitaler Zellen auf NVP 30 im Gegensatz zu allen anderen Copolymeren, auf NVP 20 und NVP 25 im

Gegensatz zu NVP 5 und auf NVP 10 im Gegensatz zu NVP 25. Für die kokultivierten Zellen ergaben sich signifikant geringere Dichten vitaler und der Summe vitaler und toter Zellen sowie Vitalitäten auf NVP 30 im Gegensatz zu allen anderen Copolymeren (siehe Abbildung 21a). Im Überstand der NVP 30-Proben wurde eine gegenüber den anderen Copolymeren signifikant höhere Zahl nicht-adhärerter Keratinozyten und kokultivierter Zellen pro ml gefunden. Auch die Vitalität der nicht-adhärerten Zellen war reduziert (siehe Abbildung 21b). Im LDH Assay wurde aus den NVP30 Überständen signifikant erhöhte Werte (entspricht erhöhter Beeinträchtigung der Membranintegrität) für die kokultivierten Zellen im Gegensatz zu allen anderen Copolymeren gefunden. Für die Keratinozyten wurde ebenfalls eine Tendenz zu erhöhtem LDH-Wert für NVP 30 gefunden. In der Fibroblastenmonokultur zeigten sich hinsichtlich der LDH-Werte keine Unterschiede zwischen den Copolymeren (siehe Abbildung 21c). Auf den Keratin/Vimentin gefärbten Proben zeigte sich mit zunehmendem Anteil an NVP im Copolymer tendenziell eine Reduktion der Zelldichten. Gegenüber den anderen Copolymeren fand sich auf NVP 30 eine signifikant geringere Fibroblasten-Dichte, gegenüber NVP 5 auch eine signifikant geringere Keratinozyten-Dichte. Das Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnis wurde von der zunehmenden Menge an NVP im Copolymer nicht signifikant beeinflusst, verringerte sich aber tendenziell (Abbildung 22). Aufgrund der vorgenannten Ergebnisse wurde NVP 5 als bestes Copolymer ausgewählt und mit PAN und TCP verglichen. Gegenüber PAN ergaben sich auf NVP 5 eine signifikant höhere Vitalität adhärenter kokultivierter Zellen sowie ein signifikant geringerer LDH-Wert aus der Fibroblastenmonokultur. Gegenüber TCP zeigte sich eine signifikant höhere Vitalität nicht-adhärerter Fibroblasten auf NVP 5. Die Datenwerte mit der statistischen Auswertung für die analysierten Parameter auf NVP-enthaltenden Copolymeren sind in Tabelle 20 für die Keratinozytenmonokultur, in Tabelle 21 für die Fibroblastenmonokultur und in Tabelle 22 für die Kokultur dargestellt.

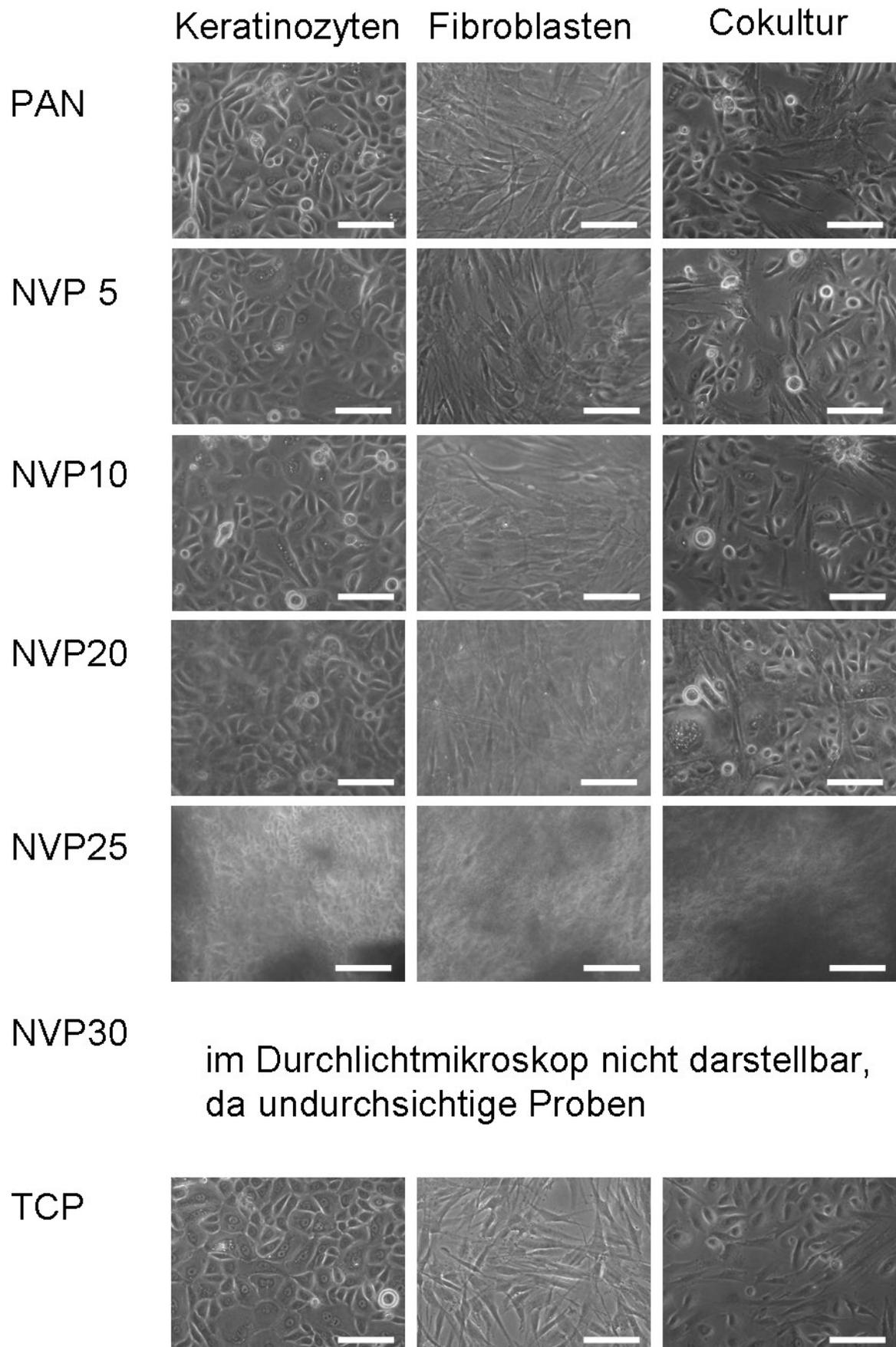


Abbildung 20: Durchlichtmikroskopische Bilder der Zellen nach 48 h Inkubation auf NVP-Proben und Kontrollen zur Darstellung der Zellmorphologie (Maßbalken = 100 µm).

Tabelle 20: Dichte adhärenter lebender Keratinozyten (d_{vital}), toter Keratinozyten (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärirter lebender Keratinozyten (z_{vital}), toter Keratinozyten (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml sowie die Absorption im LDH-Assay nach 48 h Inkubation für NVP-Proben und Kontrollen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=3; \$: p<0,05 gegenüber NVP 30; \$\$: p<0,01 gegenüber NVP 30; \$\$\$ p<0,005 gegenüber NVP 30; &: p<0,05 gegenüber NVP 5; &&: p<0,01 gegenüber NVP 5, °: p<0,05 gegenüber NVP 10, °°: p<0,01 gegenüber NVP10).

	Keratinozyten	PAN	NVP 5	NVP 10	NVP 20	NVP 25	NVP 30	TCP
Lebend/Tot-Färbung adhärenter Zellen	d_{vital} [Zellen/cm ²]	75633 \pm 9050	75223 \pm 5441	75925 \pm 6134	56070 \pm 9618 &	64997 \pm 7031 && °	44788 \pm 23072	71515 \pm 3770
	d_{tot} [Zellen/cm ²]	2067 \pm 1062	2067 \pm 904	1718 \pm 308	1646 \pm 312	1672 \pm 361	2923 \pm 2175	1503 \pm 435
	d_{gesamt} [Zellen/cm ²]	77699 \pm 10112	77289 \pm 5850	77643 \pm 6353	57716 \pm 9539 &	66669 \pm 6696 && °	47711 \pm 20903	73018 \pm 3750
	Vitalität [%]	97,4 \pm 1,1	97,4 \pm 1,1	97,8 \pm 0,3	97,1 \pm 0,8	97,4 \pm 0,8	90,5 \pm 11,6	97,9 \pm 0,6
Durchflusszytometrische Analyse von Zellen im Überstand	z_{vital} [Zellen/ml]	192 \pm 66	168 \pm 28	188 \pm 50	131 \pm 62	59 \pm 20	921 \pm 368	197 \pm 181
	z_{tot} [Zellen/ml]	401 \pm 147	293 \pm 120 \$\$	407 \pm 230 \$\$	276 \pm 182 \$\$	137 \pm 29 \$\$	2470 \pm 1062	283 \pm 280
	z_{gesamt} [Zellen/ml]	593 \pm 213	461 \pm 146	595 \pm 279	407 \pm 243	195 \pm 49	3391 \pm 1396	481 \pm 460
	Vitalität [%]	33 \pm 0,6	38 \pm 8 \$\$\$	34 \pm 7 \$\$\$	34 \pm 5 \$\$\$	30 \pm 3 \$\$\$	27 \pm 3	42 \pm 4
LDH-Assay	Absorption bei 492 nm	0,684 \pm 0,031	0,641 \pm 0,058	0,651 \pm 0,051	0,76 \pm 0,052	0,708 \pm 0,044	0,951 \pm 0,397	0,613 \pm 0,036

Tabelle 21: Dichte adhärenter lebender Fibroblasten (d_{vital}), toter Fibroblasten (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärenter lebender Fibroblasten (z_{vital}), toter Fibroblasten (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml sowie die Absorption im LDH-Assay nach 48 h Inkubation für NVP-Proben und Kontrollen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=3; *: p<0,05 gegenüber PAN, #: p<0,05 gegenüber TCP; \$: p<0,05 gegenüber NVP 30; \$\$\$ p<0,005 gegenüber NVP 30).

Fibroblasten		PAN	NVP 5	NVP 10	NVP 20	NVP 25	NVP 30	TCP
Lebend/ Tot- Färbung adhären- ter Zellen	d_{vital} [Zellen/cm ²]	42403 \pm 2053	47049 \pm 3209 \$\$\$	45208 \pm 1022 \$\$\$	40696 \pm 1051 \$	39557 \pm 1811 \$	3385 \pm 2328	43598 \pm 1633
	d_{tot} [Zellen/cm ²]	492 \pm 189	492 \pm 433	374 \pm 149	518 \pm 278	589 \pm 456	aufgrund Hinter- grund- fluores- zenz	215 \pm 30
	d_{gesamt} [Zellen/cm ²]	42896 \pm 1876	47542 \pm 2864	45583 \pm 987	41214 \pm 8278	40147 \pm 2265	nicht detektier- bar	43814 \pm 1650
	Vitalität [%]	98,8 \pm 0,5	98,9 \pm 1	99,2 \pm 0,3	98,7 \pm 0,7	98,6 \pm 1		99,5 \pm 0,06
Durchflu- ss- zytometr- ische Analyse von Zellen im Übersta- nd	z_{vital} [Zellen/ml]	9 \pm 2	17 \pm 8	15 \pm 4	15 \pm 20	15 \pm 16	29 \pm 19	10 \pm 6
	z_{tot} [Zellen/ml]	17 \pm 5	16 \pm 10	14 \pm 4	15 \pm 14	19 \pm 8	71 \pm 53	32 \pm 17
	z_{gesamt} [Zellen/ml]	26 \pm 5	33 \pm 17	29 \pm 8	31 \pm 34	33 \pm 21	100 \pm 67	42 \pm 20
	Vitalität [%]	33,9 \pm 10,5	51,6 \pm 11 #	51,1 \pm 4,7	42,5 \pm 10,7	31 \pm 30,8	29,7 \pm 9,1	23,8 \pm 9,6
LDH- Assay	Absorption bei 492 nm	0,242 \pm 0,012	0,219 \pm 0,007 *	0,223 \pm 0,006	0,256 \pm 0,019	0,24 \pm 0,031	0,236 \pm 0,016	0,215 \pm 0,011

Tabelle 22: Dichte adhärenter lebender cokultivierter Keratinozyten und Fibroblasten (d_{vital}), toter Zellen (d_{tot}) und der Gesamtzelldichte (d_{gesamt}), die Zahl nicht-adhärrierter lebender Zellen (z_{vital}), toter Zellen (z_{tot}) und der Gesamtzellzahl (z_{gesamt}) pro ml, die Absorption im LDH-Assay sowie das Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnis ($\text{Ratio}_{\text{Ker/Fib}}$), die Zelldichte der Keratinozyten (d_{Ker}), der Fibroblasten (d_{Fib}) und der Gesamtzelldichte (d_{Co}) in der Cokultur nach 48 h Inkubation für NVP-Proben und Kontrollen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$; *: $p<0,05$ gegenüber PAN; \$: $p<0,05$ gegenüber NVP 30; \$\$: $p<0,01$ gegenüber NVP 30; \$\$\$ $p<0,005$ gegenüber NVP 30).

Cokultur	PAN	NVP 5	NVP 10	NVP 20	NVP 25	NVP 30	TCP	
Lebend/Tot-Färbung adhärenter Zellen	d_{vital} [Zellen/cm ²]	50090 ± 3592	55095 ± 4253 \$\$\$	50265 ± 5944 \$\$\$	48808 ± 2667 \$\$\$	51834 ± 5898 \$\$\$	19702 ± 7010	50131 ± 1245
	d_{tot} [Zellen/cm ²]	1831 ± 233	1313 ± 288	1169 ± 343	1595 ± 324	1400 ± 215	2564 ± 2024	1020 ± 246
	d_{gesamt} [Zellen/cm ²]	51921 ± 3413	56408 ± 4531 \$\$\$	51434 ± 6278 \$\$\$	50403 ± 2989 \$\$\$	53234 ± 6046 \$\$\$	22266 ± 5063	51152 ± 1197
	Vitalität [%]	96,45 $\pm 0,65$	97,69 $\pm 0,35$ * \$\$	97,76 $\pm 0,42$ \$\$	96,85 $\pm 0,45$ \$\$	97,37 $\pm 0,31$ \$\$\$	86,87 $\pm 11,38$	98 $\pm 0,5$
Durchflusszytometrische Analyse von Zellen im Überstand	z_{vital} [Zellen/ml]	95 \pm 81	68 \pm 21 \$	55 \pm 24 \$	91 \pm 36 \$	55 \pm 16 \$	266 ± 127	43 \pm 21
	z_{tot} [Zellen/ml]	73 \pm 54	59 \pm 34 \$\$	50 \pm 14 \$\$	79 \pm 14 \$\$	54 \pm 16 \$\$	585 ± 282	41 \pm 25
	z_{gesamt} [Zellen/ml]	168 ± 134	127 \pm 53 \$\$	105 \pm 38 \$\$	170 \pm 50 \$\$	109 \pm 31 \$\$	851 ± 408	83 \pm 46
	Vitalität [%]	55 ± 4	55,42 $\pm 8,17$ \$\$\$	50,91 $\pm 6,26$ \$\$\$	52,39 $\pm 4,78$ \$\$\$	50,34 $\pm 0,59$ \$\$\$	31,44 $\pm 1,68$	51,97 $\pm 6,42$
LDH-Assay	Absorption bei 492 nm	0,353 $\pm 0,034$	0,303 $\pm 0,015$ \$	0,325 $\pm 0,009$ \$	0,352 $\pm 0,016$ \$	0,337 $\pm 0,005$ \$	0,56 $\pm 0,163$	0,315 $\pm 0,007$
	$\text{Ratio}_{\text{Ker/Fib}}$	2 \pm 0,4	2 \pm 0,2	2 \pm 0,02	1,7 $\pm 0,46$	1,4 $\pm 0,19$	1,5 $\pm 0,47$	2,3 $\pm 0,27$
Keratin/Vimentin-Färbung	d_{Ker} [Zellen/cm ²]	32496 ± 10471	39480 ± 5486 \$	34675 ± 452	32164 ± 8286	25719 ± 3147	21000 ± 9754	42391 ± 4606
	d_{Fib} [Zellen/cm ²]	17985 ± 2258	19899 ± 1691 \$\$\$	17888 $\pm 395,8$ \$	19091 ± 1389 \$\$\$	17787 ± 210 \$	13944 ± 1836	18288 ± 687
	d_{Co} [Zellen/cm ²]	50481 ± 12389	59379 ± 6968 \$	52564 $\pm 847,5$	51255 ± 8568	43506 ± 3024	34945 ± 11589	60678 ± 4567

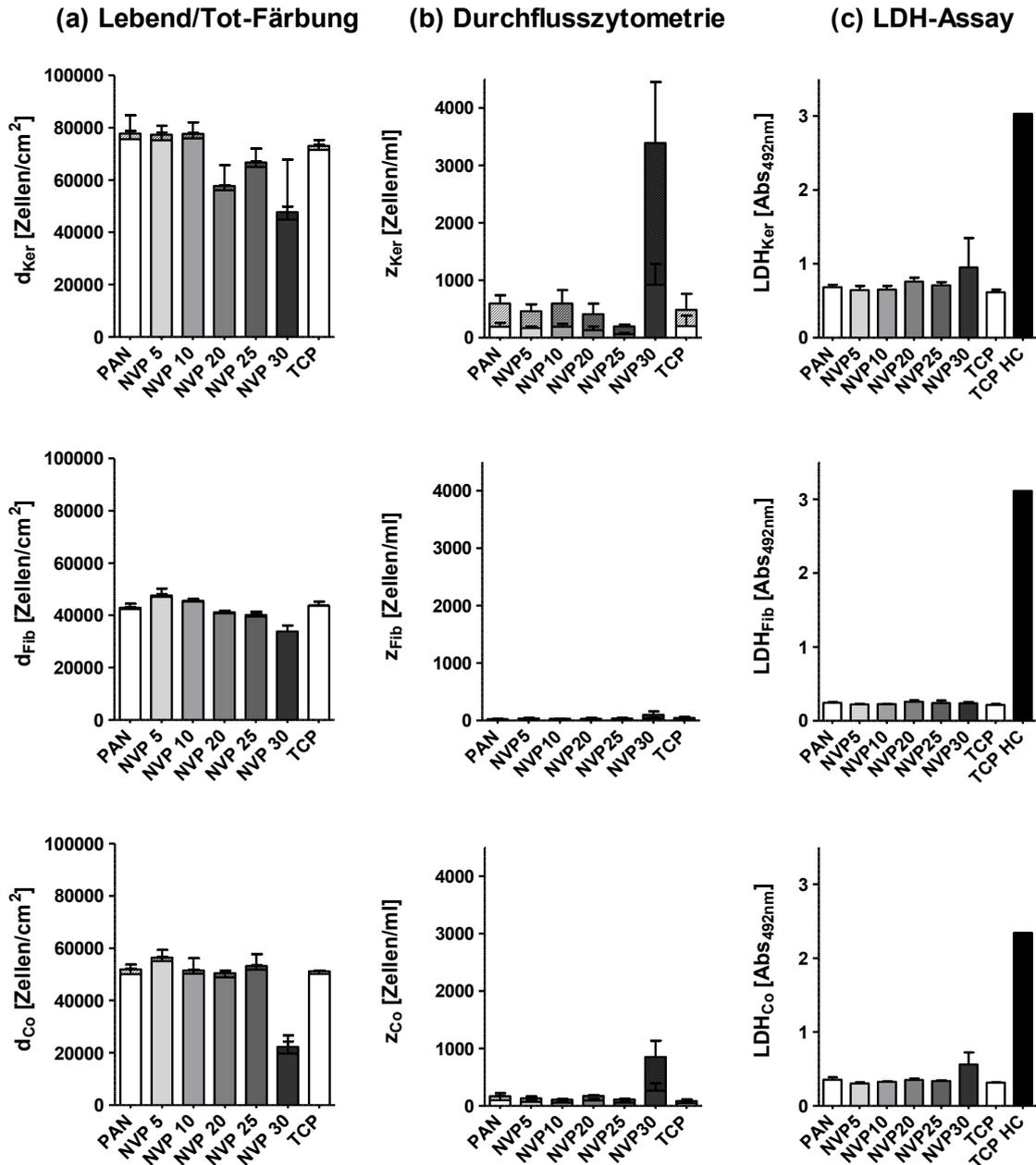


Abbildung 21: Analyse der Keratinozyten- und Fibroblasten-Monokulturen sowie der Kokulturen nach 48 Stunden Inkubation auf NVP-Proben und Kontrollen. (a) Daten der Lebend/Tot-Färbung (Fluoresceindiacetat/Propidiumiodid; FDA/PI). (b) Daten der durchflusszytometrischen Analyse des gesamten Überstandes (1 ml) zur Untersuchung der Anzahl und Vitalität abgelöster oder nicht-adhärrierter Zellen. (c) Daten der Analyse der Überstände mittels LDH-Assay zur Untersuchung der Membranintegrität. Die high control (HC) entspricht der Freisetzung des LDHs nach Schädigung aller Zellen durch Triton. Die Daten zeigen die Mittelwerte für 3 Proben \pm Standardabweichung, schraffierte Anteile der Balken repräsentieren tote Zellen.

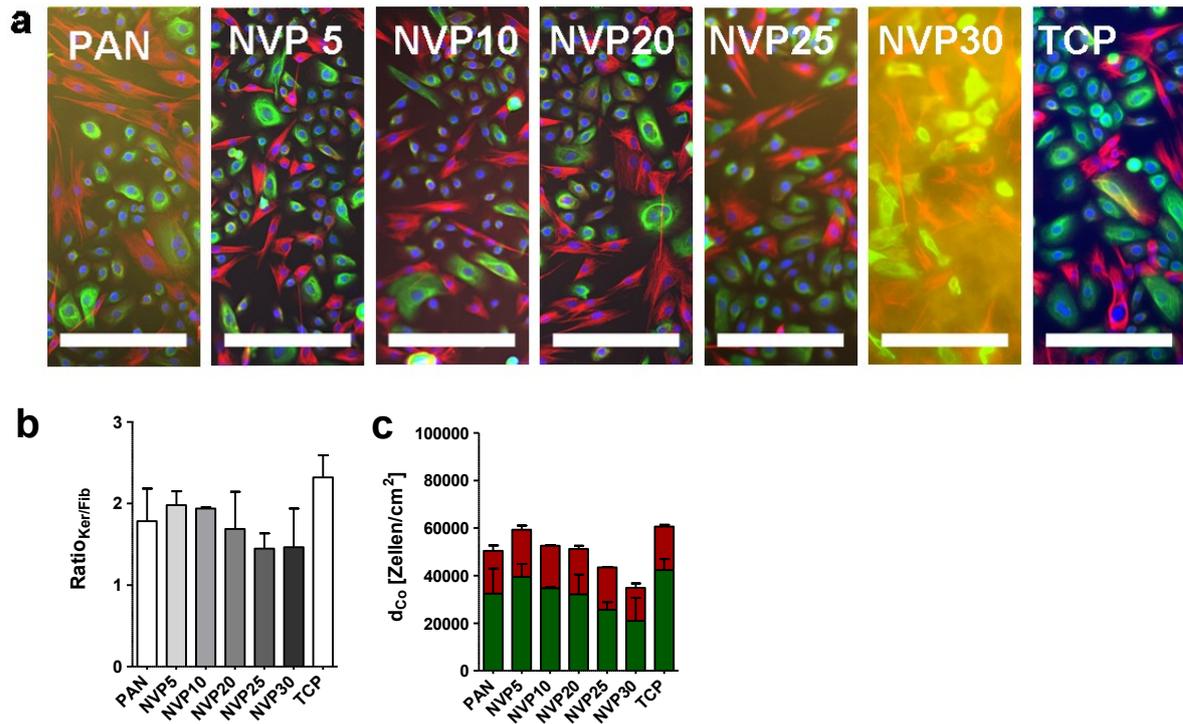


Abbildung 22: Cokultur-Färbung von Keratinozyten (markiert mit Antikörper gegen Keratin14; grün) und Fibroblasten (markiert mit Antikörper gegen Vimentin; rot) in Cokultur nach 48 h Inkubation auf NVP-Proben und Kontrollen. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 gefärbt und sind blau dargestellt. (a) Beispielbilder, aufgenommen mit dem InCell 2000 (Maßbalken = 200 μm). (b) Graphik des Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnisses. (c) Graphik der Zellzahlen beider Zelltypen pro cm^2 . Der grüne Anteil der Balken entspricht den Keratinozyten und der rote Anteil den Fibroblasten. Die Daten zeigen den Mittelwert von 3 Proben \pm Standardabweichung.

8.4 Methodenanpassung zur Automatisierung der Aufnahme und Auswertung mikroskopischer Bilder

Um die Auswertezeit des Screening-Prozesses zu verkürzen, wurde ein automatisiertes Mikroskop (InCell Analyzer 2000) bereitgestellt. Bei der Automatisierung ergaben sich jedoch Probleme bezüglich der hohen Eigenfluoreszenz der Polymere (v. a. AEMA 2), die keinen ausreichenden Kontrast zwischen gefärbten Zellen und Polymeren ermöglichten. Die Zellkernfärbung (DAPI, 358 nm Anregung, 461 nm Emission) war nicht darstellbar. Da die automatische Auswertung jedoch auf der Zellkernfärbung basiert, mussten Bilder mit dem Laserscanningmikroskop aufgenommen werden und per Hand ausgezählt werden. Um für die weiteren Versuche eine automatische Analyse durchführen zu können, wurde das Färbeprotokoll dahingehend angepasst, dass die doppelte Konzentration an fluoreszenzmarkiertem Sekundär-Antikörper und ein anderer Zellkernfarbstoff (DRAQ5, 647 nm Anregung, ca. 681 nm Emission) verwendet wurden. Daraus ergab sich, dass der Keratinozyten-Status-Marker Keratin10 nicht mehr angefärbt werden konnte, da dieser vorher mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörper im gleichen nm-Bereich wie DRAQ5 gefärbt wurde. Auf die Keratin10-Färbung wurde daraufhin verzichtet. Des Weiteren wurde AEMA 2 nach dem Eindecken mit Mowiol rissig und große Luftblasen erschwerten die Bildaufnahmen stark. Somit wurde das Eindecken für alle folgenden Proben unterlassen. Die Proben wurden in (24)-Mikrotiterplatten in PBS gelagert und mikroskopiert.

Um eventuell nötige weitere Protokolländerungen vornehmen zu können, wurden Färbetests vor der eigentlichen Polymertestung durchgeführt. Dafür war die Bereitstellung weiterer steriler Polymere notwendig.

Zur weiteren Verbesserung des Kontrastes wurden Versuche mit Sudan-Schwarz und Pierce Immunostain Enhancer vorgenommen. Diese führten jedoch nicht zum Erfolg – der Kontrast konnte nicht verstärkt werden.

Die automatische Bildaufnahme mit dem InCell war auch durch die recht unterschiedlichen Chip-Oberflächen schwierig. Teilweise wiesen die Chips Biegungen zu einer Seite oder Verdickungen am Rand usw. auf. Die Bildausbeute – die Anzahl ausählbarer Bilder mit durchgehend guter Fokuseinstellung und klar erkennbaren Zellen – war daher bei vielen Proben gering. Pro Probe wurden jeweils 49 Bilder aufgenommen, um einen Überblick über die Verteilung der Zellen zu bekommen. Daraus wurden dann (nach Ausschluss der schlechten Bilder) per Zufall 3 Bilder ausgewählt und mit ImageJ per

Hand ausgezählt. Die Verwendung von (24)-Mikrotiterplatten mit Glasboden führte zur besseren Bilddarstellung der Proben (nicht eingedeckt, in PBS+/+).

Auf NVP 30 konnten die Zellkerne nicht gefärbt werden, da aufgrund der hohen Hintergrundfluoreszenz weder DRAQ5 noch DAPI darstellbar waren. Außerdem wurde eine „Quellung“ von NVP 25 und NVP 30 festgestellt, sodass diese Proben nicht mehr in die Glasboden (24)-Mikrotiterplatten passten, da die Glaskavitäten einen kleineren Durchmesser als normale Platten haben.

Es kann geschlossen werden, dass die Aufnahme von Bildern mit dem InCell Analyzer möglich ist und realisiert wurde. Die Auswertung der FDA/PI-Färbung von APMA konnte auch teil-automatisch durchgeführt werden. Dies ist relativ gut möglich, sofern eine Kernfärbung vorhanden ist und die Bilder – bei planer Oberfläche - gut fokussiert werden können. Jedoch wurden teilweise Bilder erhalten, bei denen keine optimale Fokuseinstellung erreicht werden konnte.

Des Weiteren wurde versucht, eine automatisierte Analyse der Bilder durchzuführen. Aufgrund dessen, dass das System auf Kontrasten und Pixelwerten basiert und die Polymere unterschiedliche Hintergrundfluoreszenzen haben, konnte bisher keine optimale Einstellung gefunden werden. Teilweise wurden gute Ergebnisse erzielt, jedoch jeweils nur für ein Copolymer. Für jede Comonomer-Abstufung hätte das Protokoll erneut angepasst und evaluiert werden müssen. Es zeigte sich auch, dass die Färbungen zwischen zwei Proben des gleichen Copolymers nicht genau gleich waren, was eine automatische Auswertung weiter erschwerte. Um mehr über die Möglichkeiten des InCell Systems zu erfahren, wurde auch der technische Support konsultiert. Dieser nahm weitere Einstellungen in den Konfigurationsdateien des Gerätes vor. Mit diesen Modifikationen konnte zwar die Bildqualität und -ausbeute erhöht werden, sie stellen aber keine adäquate Lösung für ein Screening vieler verschiedener Polymere dar.

8.5 Rasterelektronenmikroskopie

Die REM-Präparation der zellbesiedelten Polymerproben gelang soweit, dass die Zellen dargestellt werden konnten, allerdings erbrachte die Ansicht im REM keine wesentliche Mehraussage. Die *cPnBA*-Proben quollen während der Präparation, wodurch die Zellen geschädigt wurden (Abbildung 23). Die Präparation für NVP gelang (keine deutlichen Schrumpfungseffekte etc.), jedoch gab es auch hier Quellungseffekte. Außerdem war die Darstellung der Zellen auf NVP aufgrund der ähnlichen chemischen Zusammensetzung von Zellen und Polymer sehr schwierig. Durch die Bilder wird deutlich, dass die Rauigkeit von NVP 30 nach Medium- bzw. Zellkontakt zunimmt (Abbildung 24).

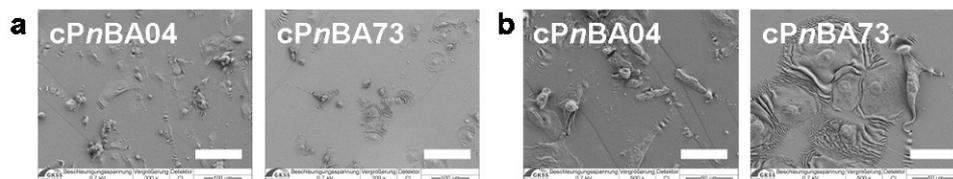


Abbildung 23: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der *cPnBA*-Proben nach 48 h Inkubation mit Medium und Zellen (Cokultur). Wahrscheinlich führte die Quellung der Polymernetzwerke und die anschließende Entwässerung und Schrumpfung während der Präparation zu der sichtbaren gewellten Morphologie der Zellen. (a) Maßbalken = 100 µm, (b) Maßbalken = 50 µm (Aufnahmen durch Y. Pieper).

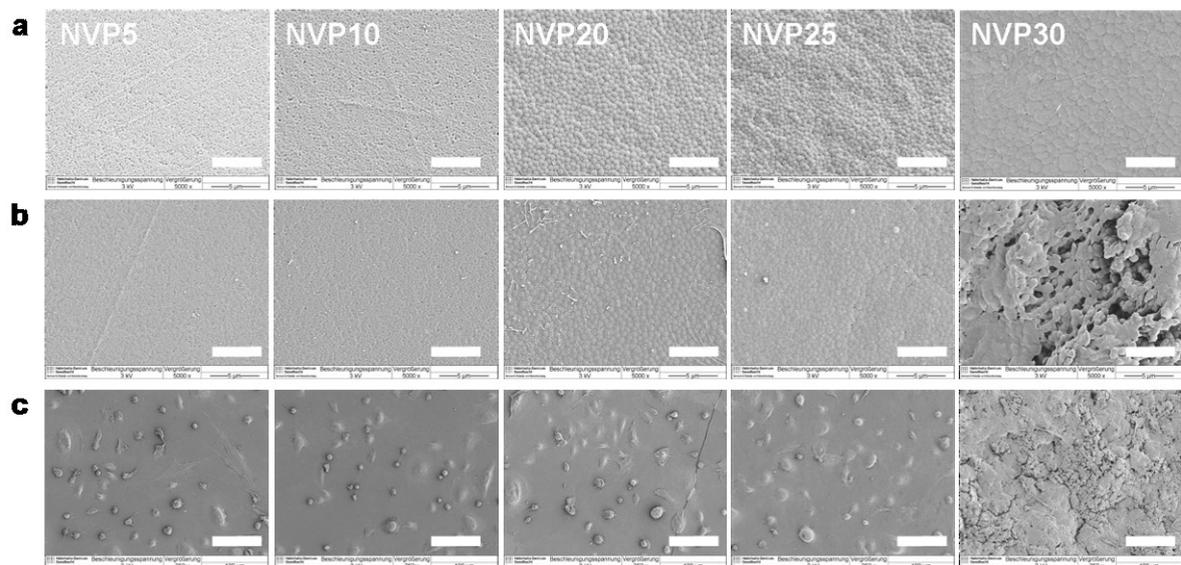


Abbildung 24: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der NVP-enthaltenden Copolymere. (a) Unbehandelte Copolymere in trockenem Zustand, Maßbalken = 5 µm. Copolymere nach 48 h Inkubation mit Medium und Zellen und Präparation, (b) Bereich ohne Zellen, Maßbalken = 5 µm und (c) geringer vergrößerter Bereich mit kokultivierten Zellen, Maßbalken = 100 µm (Aufnahmen durch Y. Pieper).

9 Diskussion

Die Epithelzellen der Epidermis (Keratinozyten) bilden die äußerste Hautschicht und schützen so den Körper vor äußeren Einflüssen [149]. Kultivierte primäre humane Keratinozyten werden für verschiedenste Fragestellungen in der Forschung, sowie für Substanztestungen und den klinischen Einsatz als Hautersatz verwendet [132,191]. Fibroblasten als Bindegewebszellen der Dermis synthetisieren v.a. ECM-Komponenten, stabilisieren damit die Haut und sind an der Hautwundheilung beteiligt [81]. Kultivierte primäre dermale Fibroblasten werden für Forschungszwecke und auch für Hautersatzkonstrukte verwendet [191]. Für die Herstellung reiner Keratinozytenmonokulturen oder Epidermiskonstrukte stellen sie allerdings eine „Kontamination“ dar, da sie wegen ihrer höheren Proliferationsrate (sofern ihre Proliferation nicht gehemmt wurde) die Keratinozyten überwachsen und somit die Funktionalität der Keratinozytenschicht beeinträchtigen können [44].

Aufgrund der optischen Eigenschaften (Transparenz), ihrer Verfügbarkeit und Verarbeitbarkeit eignen sich bestimmte Polymere als Zellkultursubstrat [43,142]. Außerdem können die Polymereigenschaften durch Kombination verschiedener Monomere zu Copolymeren, oder Polymeren zu „Blends“ oder „Composits“, sowie Oberflächenmodifikationen, unterschiedlichen Anforderungen angepasst werden [142]. Ein weit verbreitetes Zellkultursubstrat ist zellkulturbehandeltes Polystyrol (TCP). Durch Oberflächenbehandlungen konnte das sonst relativ hydrophobe Polymer für eine gute Zelladhärenz verbessert werden [3]. Für eine adäquate Zellkultivierung bestimmter Zelltypen, u.a. Keratinozyten, sind jedoch tlw. immer noch Beschichtungen mit ECM-Komponenten oder die Verwendung von „Feederlayern“ erforderlich [1]. Vor allem für klinische Anwendungen oder spezielle Fragestellungen sind ein definiertes Substrat und ein definiertes Medium für eine einfache, schnelle und reproduzierbare Kultur erstrebenswert [101].

Der Einfluss von Polymereigenschaften auf die Interaktion mit Zellen ist Gegenstand vieler Untersuchungen. Systematische Studien, in denen isoliert einzelne Parameter variiert werden, sind jedoch selten. So sollte in der vorliegenden Arbeit ein geeignetes Testsystem zur Untersuchung verschiedener Copolymer-Eigenschaften auf primäre humane Keratinozyten und primäre humane dermale Fibroblasten etabliert werden.

Durch die systematische Variation der Elastizität, des molaren Anteils positiv oder negativ geladener Comonomere bzw. eines hydrophilen Comonomers im Copolymer sollte

weiterhin eine angemessene Korrelation von Polymereigenschaften und Zellverhalten ermöglicht werden. Im Testsystem wurden die Polymerproben hinsichtlich Adhärenz und Vitalität von primären humanen Keratinozyten und Fibroblasten in Mono- und Cokultur, sowie auf eine potentielle Keratinozyten-Selektivität in der Cokultur untersucht. Ein Keratinozyten-selektives Zellkultursubstrat könnte die Vereinfachung und/oder Automatisierung der Keratinozytenisolierung aus Hautbiopsien durch die Separation der Keratinozyten ohne zeitaufwändige mechanische Epidermis-Dermis-Trennungsprozesse ermöglichen. Trotz deutlicher Verbesserungen bei der Keratinozytenisolierung und Kultivierung, ist immer noch eine mechanische Trennung (nach der enzymatischen Andauung) von Epidermis und Dermis notwendig [1], um relativ reine Keratinozyten-Suspensionen zu gewinnen. Außerdem sind je nach Medium immer noch Feederzellen oder spezielle Beschichtungen des Zellkultursubstrats mit Matrixkomponenten notwendig, um eine ausreichend proliferative Kultur zu erhalten [1,30]. Ein Keratinozyten-selektives Polymer könnte diese Schritte ersparen, wobei die „Kontamination“ und somit ein Überwachsen durch Fibroblasten verhindert und so eine reine und proliferative Keratinozytenkultur gewährleistet wäre. Dies könnte eine weitere Automatisierung der Keratinozytenkultur ermöglichen und somit die Verfügbarkeit und Reproduzierbarkeit z.B. von epidermalen Konstrukten für die Substanztestung oder für klinische Anwendungen verbessern. Im Sinne einer induzierten Autoregeneration könnte ein Keratinozyten-selektives Polymer als Wundauflage für die regenerative Medizin eingesetzt werden, um eine schnellere Reepithelialisierung und somit auch eine verminderte Narbenbildung zu ermöglichen. Verschiedenste Polymere werden für potentielle Anwendungen für die Kultivierung von Keratinozyten und in der Wundheilung untersucht. Viele Systeme basieren auf Gelatine, Chitosan oder Hyaluronsäure (siehe auch Einleitung, Tabelle 3). Lammers et. al. [89] untersuchten z.B. Filme aus systematisch variierten ECM-Komponenten. Dabei wurde eine gute Proliferation der Keratinozyten auf Elastin-enthaltenden Filmen gefunden, ohne dass die Fibroblasten-Proliferation verstärkt war. Um z.B. die mechanischen Eigenschaften natürlicher Polymere zu verbessern, wurden auch Kombinationen synthetischer und natürlicher Polymere untersucht, wobei dadurch keine Vorteile hinsichtlich Epidermisbildung in der 3D-Kultur resultierten [125]. Eine weitere Studie beschreibt ein Polymer-Blend, das die verbesserte Proliferation von HaCaT Zellen und eine Hemmung von Fibroblasten für potentielle Epidermiskonstrukte ermöglicht, allerdings ohne die Zellen in Cokultur zu untersuchen [6]. Natürliche Polymere bergen außerdem potentiell Risiken hinsichtlich der Übertragung von Pathogenen [102]. Als

xenogene Materialien haben sie auch das Risiko, durch Endotoxin- oder sonstige Verunreinigungen, Immunzellen zu aktivieren [8] und immunologische Abstoßungsreaktionen hervorzurufen [10]. Daher werden auch synthetische Polymere untersucht und eingesetzt. Allerdings wurde bisher keine hervorragende Keratinozytenadhärenz oder Proliferation gefunden, bzw. war z.B. eine Fibrinbeschichtung für eine gute Adhärenz notwendig [83]. In einer früheren Studie konnte ein zellselektiver Effekt für HaCaT Zellen gegenüber primären Fibroblasten in Cokultur für ein synthetisches Acrylnitril-basiertes hydrophiles Copolymer gezeigt werden [15].

9.1 Etablierung des Cokulturtestsystems

Cokulturen aus Keratinozyten und Fibroblasten werden zumeist für die Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen oder zur Herstellung von Hautkonstrukten für die Substanztestung oder klinische Anwendungen eingesetzt und dafür in 3D-Systemen kultiviert [99,100,154,155,191]. Des Weiteren werden Fibroblasten auch als „Feederzellen“ für die Keratinozytenkultivierung verwendet. Dabei können inzwischen auch humane Fibroblasten in einem definierten Verhältnis zu Keratinozyten in Cokultur verwendet werden, um die potentielle Übertragung durch xenogene Pathogene, z.B. von Mausfibroblasten-Feederzellen, zu vermeiden [77]. Studien, in denen der Einfluss von Polymereigenschaften auf Keratinozyten und Fibroblasten in Cokultur untersucht wurde, sind dagegen kaum verfügbar. Johnen et al. beschreiben eine Cokultur, jedoch wurden die Keratinozyten dabei nicht gemeinsam, sondern nach 24 h auf ein zuvor mit Fibroblasten besiedeltes Substrat ausgesät [76]. Für die Studie von Kingkaew et al. wurden HaCaT Zellen in Cokultur mit primären humanen Fibroblasten untersucht [84]. In der vorliegenden Arbeit wurde die gemeinsame Kultivierung von primären humanen Keratinozyten mit primären humanen dermalen Fibroblasten in Cokultur zur Untersuchung von Polymereigenschaften gezeigt. Für das Testsystem wurde ein Keratinozyten-Wachstumsmedium, das im Gegensatz zu anderen Keratinozyten-Medien keinen Rinder-Hypophysenextrakt („bovine pituitary extract“; BPE) oder andere undefinierte Zusätze enthält, gewählt. Zwar wird es nicht komplett ohne tierische Produkte hergestellt, jedoch könnten theoretisch alle Komponenten rekombinant erzeugt werden. Im Hinblick auf die potentielle klinische Anwendung der auf einem optimalen Polymer kultivierten Keratinozyten stellt das gewählte Medium für das entwickelte Testsystem einen ersten Schritt in Richtung biologischer Sicherheit dar. Außerdem ermöglicht es eine bessere Reproduzierbarkeit. Obwohl das Medium für die Proliferation von Keratinozyten konzipiert ist, konnte eine vergleichbare Proliferation von Fibroblasten gezeigt werden (für die Einsaaten von 30000 Z/cm² für die Monokulturen und

10000 Z/cm² je Zelltyp). Die gemeinsame Kultivierung im Standardmedium für die Fibroblasten war hingegen nicht möglich, da die Keratinozyten in einen nicht-proliferativen Status übergangen. Die Anwendung der unterschiedlichen Methoden zur Analyse der Testparameter Adhärenz, Vitalität und Zell-Selektivität waren auf den Copolymer-Proben prinzipiell möglich. Jedoch gab es starke Einschränkungen hinsichtlich der Hintergrundfluoreszenz, v.a. bei der Untersuchung von AEMA 2 und NVP 30.

9.2 Einfluss physikochemischer Eigenschaften ausgewählter Copolymere auf primäre humane Keratinozyten und Fibroblasten

9.2.1 Einfluss der Elastizität

Zellen können ihre Umgebung über Membranrezeptoren (z.B. Integrine) wahrnehmen [55,133]. Durch Kräfte-Wechselwirkungen kann dabei auch die Elastizität des Substrates detektiert werden [35]. Komplexe Signalkaskaden wandeln die Umgebungsinformationen in molekulare Informationen um, die wiederum Einfluss auf das Zellverhalten (Adhärenz, Ausbreitung, Migration, Proliferation, etc.) nehmen [70].

Verschiedene Zelltypen können durch die Substratelastizität unterschiedlich beeinflusst werden (siehe auch Einleitung, Tabelle 1); unter anderem wurde der Einfluss auf die Differenzierung von Stammzellen beschrieben [38]. Für murine und humane Fibroblasten sowie Endothelzellen wurde zumeist, außer von [163], die bevorzugte Adhärenz oder sogar Migration auf weniger elastischem Substrat beschrieben [22,98,119]. Meist wurden Polymere mit sehr geringen Elastizitätsmoduli untersucht. Im Gegensatz zu humanen Neutrophilen [189], wurde auch für viele weitere Zelltypen wie Neuronen [11], Chondrozyten [53] oder Kardiomyozyten [13], eine Beeinflussung durch die Substratelastizität gefunden. Für Keratinozyten sind bisher nur wenige Studien verfügbar. Rosdy et al. [135] untersuchten Keratinozyten und Fibroblasten auf Silikonsubstraten mit unterschiedlicher Elastizität. Es wurde keine deutliche Beeinflussung der Zellen beobachtet, jedoch konnte der Einfluss der Elastizität auf die Zellen durch starke Variationen anderer Oberflächeneigenschaften möglicherweise nicht adäquat beurteilt werden [135]. Für eine Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT) wurde kürzlich gezeigt, dass die Proliferation auf einem Silikonsubstrat mit einem Elastizitätsmodul von 200 kPa höher war, als auf einem Silikonsubstrat mit 10mal geringerem Elastizitätsmodul (16 und 20 kPa) [177]. Für primäre Keratinozyten, v.a. in Cokultur mit primären Fibroblasten sind bisher kaum Untersuchungen bekannt. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Verhalten von humanen primären Keratinozyten und dermalen Fibroblasten in Mono- und

Cokultur untersucht [165,166]. Vorhergehende Versuche mit sterilen cPnBA04- und cPnBA73-Proben ergaben keine Zytotoxizität (nach DIN EN ISO10993), einen unbedenklichen Endotoxin-Gehalt und keine Anzeichen für eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems [27,134]. Im Versuch der vorliegenden Arbeit adhärten die primären humanen Keratinozyten sowie Fibroblasten mit Vitalitätswerten zwischen 85% und 95%. Dies entspricht den Werten der Kontrollversuche auf Glas und bestätigt damit die Ergebnisse der Zytotoxizitätstestung mit einer Mausfibroblasten-Zelllinie [27] auch für humane primäre Zellen. Der Anteil differenzierter Keratinozyten lag auf den Polymernetzwerken und der Kontrolle sowohl in Mono- als auch in Cokultur unter 1%, so dass proliferative Kulturen angenommen werden können. Die Auszählung der Keratin14/Vimentin-gefärbten Zellen in der Cokultur zeigte für cPnBA73 ein Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnis von $5,3 \pm 2,0$ Keratinozyten zu Fibroblasten im Gegensatz zu $2,6 \pm 0,9$ auf cPnBA04. Auf Glas ergab sich ein Verhältnis von $3,1 \pm 1,0$. Somit zeigte sich ein leichter zellselektiver Effekt auf cPnBA73, so dass das Polymer gut als Zellkultursubstrat für primäre humane Keratinozyten eingesetzt werden könnte.

Ähnlich wie bei der Studie mit der HaCaT Zelllinie [177], bei der eine höhere Proliferation auf einem 200 kPa Silikonsubstrat im Gegensatz zu den elastischeren (16 und 20 kPa) Substraten gefunden wurde, zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine höhere Dichte adhärenter Zellen auf dem weniger elastischen (~1100 kPa) Substrat. Ob die Keratinozytendichte auf einem noch härteren Substrat weiter zunehmen würde, bleibt offen. Für Fibroblasten wurde bisher auch eine bessere Adhärenz bzw. Migration hin zu „härteren“ Bereichen beschrieben, allerdings wurden diese Ergebnisse auf Substraten mit wesentlich geringeren Elastizitätsmoduli und unter serumhaltigen Kulturbedingungen erzielt [22].

Sowohl cPnBA04 als auch cPnBA73 wären aufgrund ihrer Elastizität und Transparenz potentiell als Wundabdeckmaterial einsetzbar. Durch die Elastizität könnte das Polymer flexibel der Hautoberfläche angepasst werden und durch die Transparenz wäre eine Beobachtung der Wunde über die Zeit möglich. Bezüglich einer späteren potentiellen Verwendung als Wundaufgabe wurden die Sekretion von Cytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, sowie die Ablagerung von ECM-Komponenten untersucht.

Keratinozyten als erste Schutzbarriere des Körpers gegen die Umwelt sind in der Lage, verschiedenste Cytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren zu exprimieren und auszuschütten, die auf benachbarte Keratinozyten und andere Zellen der Epidermis sowie auf Fibroblasten und andere Zellen der Dermis einwirken [61,108]. Bei einer Schädigung

der Haut kann durch die Freisetzung solcher Faktoren eine Immunreaktion initiiert werden, die zu einer lokalen Entzündung führen kann. Während der nachfolgenden Wundheilung regulieren Keratinozyten die Aktivität von Fibroblasten, werden aber auch selbst von anderen Zellen reguliert [148,183]. Da cPnBAs nicht nur das Adhärenzverhalten und die Funktion von Keratinozyten und Fibroblasten beeinflussen können, sondern auch die Kommunikation der Zellen mit ihrer gesamten Umgebung über verschiedenste lösliche Faktoren, wurde die Sekretion von IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF α , GM-CSF, VEGF, HGF und KGF untersucht. Für eine potentielle Anwendung auf der Haut sollte auch eine polymerbedingte Induktion von allergie- oder hautirritations-auslösenden Faktoren unbedingt vermieden werden [25,186]. Auf cPnBA04 wurde für die Keratinozytenmonokultur eine höhere Konzentration von IL-1 α als auf cPnBA73 gefunden. IL-1 α liegt in Keratinozyten präformiert vor und kann bei einer Zellschädigung freigesetzt werden, was dann sekundär u.a. zur Sekretion von IL-6 und IL-8 führt [25]. Dies würde den erhöhten Wert von IL-8 in der Keratinozytenmonokultur auf cPnBA04 erklären. Auch GM-CSF und VEGF waren in der Keratinozytenmonokultur auf cPnBA04 erhöht. Für die Fibroblastenmonokultur und die cokultivierten Zellen wurden keine Unterschiede für IL-1 α , IL-8, GM-CSF und VEGF zwischen den cPnBAs gefunden. Für das eher als anti-inflammatorisch beschriebene Cytokin IL-10 konnten keine Unterschiede zwischen den Polymernetzwerken weder in den Monokulturen noch in der Cokultur nachgewiesen werden. IL-6 ist ein eher proinflammatorisches Cytokin, kann aber auch die Proliferation von Keratinozyten stimulieren [62]. Für die Fibroblastenmonokultur zeigte sich eine geringere IL-6 Sekretion auf cPnBA73 verglichen mit cPnBA04, in der Cokultur unterschieden sich die beiden Polymernetzwerke diesbezüglich nicht. In Übereinstimmung mit der Literatur wurde in der Cokultur aber eine deutlich höhere Konzentration von IL-6 im Vergleich zu beiden Monokulturen gefunden [175]. TNF α konnte in keiner der Kulturen nachgewiesen werden. HGF und KGF werden von Fibroblasten sekretiert und sind Wachstumsfaktoren, die die Proliferation und Migration von Keratinozyten stimulieren und somit die Reepithelialisierung positiv regulieren könnten [148]. Aus den Überständen der Kulturen konnten für beide Faktoren keine Unterschiede zwischen den Polymernetzwerken nachgewiesen werden. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass cPnBA04 eine stärkere Sekretion löslicher Faktoren auslösen könnte als cPnBA73 und so z.B. eher zu Hautirritationen der gesunden Haut (Keratinozytenmonokultur = nur Keratinozyten der Epidermis) führen könnte.

Die erhöhte Ablagerung bzw. der verminderte Abbau von ECM-Komponenten wurden als grundlegende Merkmale der hypertrophen Narben- und Keloidbildung beschrieben [52,184], daher wurde die Menge des von den Zellen abgelagerten Fibronektins, Kollagens I-V und Elastins untersucht. Auf cPnBA73 zeigte sich für Fibroblasten tendenziell eine reduzierte Ablagerung von Kollagen I-V und für die Cokultur eine Reduktion von Fibronektin, Kollagen I-V und Elastin. Falls dieser Effekt bei Verwendung von cPnBA73 als Wundauflage *in vivo* reproduzierbar wäre, könnte möglicherweise die ECM-Ablagerung bei der Wundheilung besser reguliert und somit eine Narbenbildung vermindert werden.

Insgesamt wurden damit auf cPnBA73 verglichen mit cPnBA04 eine höheres Keratinozyten/Fibroblasten-Verhältnis, eine geringere Konzentrationen inflammatorischer Faktoren und eine geringere Ablagerung von ECM-Komponenten gefunden. Da die Oberflächeneigenschaften beider Polymernetzwerke vergleichbar waren, kann geschlossen werden, dass die Elastizität der Polymernetzwerke die zellspezifischen Effekte induzierte.

9.2.2 Untersuchung Acrylnitril-basierter Copolymere

Acrylnitril (AN)-basierte Copolymere mit zunehmenden Mengen an AEMA und APMA wurden hergestellt, um eine ansteigende Dichte positiver Ladungen auf der Polymeroberfläche zu erzeugen. Außerdem wurde AN mit NaMAS copolymerisiert, um die Dichte der negativen Ladungen auf der Polymeroberfläche zu variieren. Um die Hydrophilie stufenweise zu steigern, wurde AN mit NVP copolymerisiert. Im Gegensatz zur früheren Polymersynthese und Membranformierung [63,64,66] wurden die Copolymere für die vorliegende Studie lösungsmittelfrei synthetisiert und zu Chips gesintert [141]. Die Polymere wurden in adäquater Reinheit für medizinische Anwendungen hergestellt, vor dem Einsatz sterilisiert und umfangreich chemisch und physikalisch charakterisiert, um eine angemessene Korrelation von Zellveränderungen mit den Polymereigenschaften zu ermöglichen. Die Polymere wurden auch hinsichtlich ihrer Endotoxinbelastung und ihrer Zytotoxizität untersucht [140,141]. Alle Polymerproben ergaben Endotoxinwerte unterhalb des FDA-Grenzwertes für Biomaterialien (0,5 EU/ml, [58]) und eine adäquate Zellverträglichkeit [140,141].

9.2.2.1 Einfluss des Anteils geladener funktioneller Gruppen

Neben anderen Faktoren wie Rauigkeit, Topographie, Elastizität oder Hydrophilie, kann die Ladung von Polymeroberflächen, z.B. durch die Art und Menge funktioneller Gruppen,

das Verhalten verschiedener Zelltypen beeinflussen. Obwohl z.B. auch Untersuchungen zu Zellinteraktionen mit elektrisch geladenen Keramiken durchgeführt wurden [116], wird im Weiteren nur auf Studien bezüglich der Variation der Oberflächenladung durch funktionelle geladene Gruppen eingegangen. Beispielsweise wurde für Endothelzellen (HUVEC) nur auf Polymeren mit positiv geladenen funktionellen Gruppen eine vollständige Zellausbreitung beobachtet [173]. Murine Neuroblastoma-Zellen (N1E-115), die auf einem chemisch strukturierten Substrat mit positiv geladenen Aminbeschichteten „Wegen“ und trennenden Bereichen mit ungeladenen Alkanen ausgesät wurden, adhärten bevorzugt an die aminfunktionalisierten „Wege“ [152]. Außerdem zeigten CHO („chinese hamster ovary“) Zellen - wahrscheinlich aufgrund der positiven Ladung im wässrigen Zellkulturmedium - höhere Zelladhäsion und Ausbreitung, sowie stärkeres Wachstum auf aminfunktionalisierten Polymeren im Vergleich zu Acrylsäure-, Hydroxyl- und Amid-funktionalisierten Oberflächen [90]. Auch die Beeinflussbarkeit von dermalen Fibroblasten durch Oberflächeneigenschaften von Polymeren wurde untersucht [2]. Auf aminfunktionalisierten Polymeren zeigte sich eine bessere Zelladhäsion und Ausbreitung als auf Hydroxyl-, Epoxy-, Sulfon-, Carboxyl- und 3-Fluorocarbonfunktionalisierten Polymeren. Aus den Ergebnissen wurde allerdings auch ein Einfluss der Hydrophilie vermutet [2]. Weiterhin wurde beschrieben, dass für die Fibroblasten-Zelllinien BHKC 13 [104] und NIH 3T3 [78] mit zunehmender Dichte negativer Oberflächenladungen die Zellausbreitung bzw. Zelldichten anstiegen. Weitere Studien untersuchten auch die Beeinflussbarkeit des Phänotyps mesenchymaler Stammzellen auf Modellsubstraten mit verschiedenen funktionellen Gruppen [28,123]. Keratinozyten wurden mehrfach hinsichtlich ihrer Wechselwirkungen mit geladenen Nanopartikeln [139] oder Quantum dots [136] untersucht, jedoch sind kaum Informationen über die Interaktion von Keratinozyten mit geladenen Substratmaterialien verfügbar. In einer Studie wurden die Wechselwirkungen zwischen primären Keratinozyten und verschiedenen funktionalisierten Oberflächen erst nach der Beschichtung mit Fibronectin untersucht [19]. Jedoch wurde in der Studie gezeigt, dass NH_2 und CH_3 funktionalisierte Oberflächen mit gesättigter Fibronectin-Beschichtung eine verbesserte Keratinozytenadhärenz und Ausbreitung ermöglichen. Dies deutet darauf hin, dass Fibronectin auf diesen funktionalisierten Oberflächen in einer Konformation vorlag, bei der die Zellbindungsstellen zugänglich waren [19]. Auch kommerziell erhältliche Zellkulturwaren (z.B. PureCoat Zellkulturwaren von BD) nutzen geladene Oberflächen zur Verbesserung der Zelladhärenz ohne die Notwendigkeit für weitere Beschichtungen mit ECM-Komponenten. Weiterhin gibt es

auch Untersuchungen zum Einfluss der Oberflächenladung auf die *in vivo* Gewebeantwort nach Implantation von Polyurethanmikrofasern in die Ratte (subkutan) [137]. Es ergaben sich keine Einflüsse auf die Kapselbildung, aber es wurde eine verstärkte Gefäßeinsprossung bei negativ geladener Oberfläche beobachtet.

Bei den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Versuchen erhöhte sich die Adhäsion und Vitalität von Keratinozyten tendenziell abhängig vom zunehmenden molaren Anteil des Comonomers AEMA bzw. NaMAS im Copolymer. Für APMA-enthaltende Copolymere wurde in Monokultur auf APMA 0,5, in der Cokultur jedoch tendenziell auf APMA 2 eine höhere Keratinozytendichte gefunden. Die chemischen und Oberflächen-Analysen ergaben vergleichbare Daten z.B. für die Rauigkeit und Benetzbarkeit. Aus den Unterschieden in den tatsächlichen Einbauraten der Comonomere in die Copolymere, kann die Erhöhung des Anteils positiv bzw. negativ geladener funktioneller Gruppen angenommen werden. Diese Erhöhung der Ladung scheint einen vorteilhaften Einfluss auf die Keratinozytenadhärenz zu haben. Für die Fibroblasten ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Copolymeren. Im Gegensatz dazu wurden bei den kürzlich durchgeführten Testungen mit murinen L929-Fibroblasten geringere Zelldichten auf NaMAS- und AEMA-enthaltenden Copolymeren beobachtet [141]. Auch diese Zellversuche wurden in serumfreiem Medium durchgeführt, jedoch wurde MEM und kein KGM verwendet. Außerdem wurden Unterschiede zwischen Eigenschaften muriner Fibroblasten und humaner primärer Fibroblasten beschrieben [32,41,164]. Eine weitere Erhöhung des AEMA, APMA- oder NaMAS-Gehaltes könnte möglicherweise die Adhärenz der Keratinozyten weiter fördern, so dass eine Selektivität der Copolymere für Keratinozyten möglich scheint.

Für Zellen wird generell eine negative Netto-Oberflächenladung angenommen, die durch die Zusammensetzung der Glykokalyx aus Carboxylgruppen der Sial-, Glutamin- und Asparaginsäuren, Sulphaten, Phosphaten und Aminogruppen bestimmt wird [109,150]. Für verschiedene Zelltypen oder Phänotypen des gleichen Zelltyps wurden unterschiedliche elektrophoretische Mobilitäten ("electrophoretic mobilities", EPM; abhängig von der Oberflächenladung) beschrieben [151], die auf unterschiedliche Zusammensetzungen, Kompaktheiten und Tiefen der Glykokalyx hindeuten [87,109]. Daher stellt die Modifikation der Oberflächenladung von Polymeren eine potentielle Strategie zur Modulierung der Adhärenz und des Verhaltens verschiedener Zelltypen und somit ein mögliches Werkzeug zur Erzeugung eines Keratinozyten-selektiven Polymers dar. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Polymeroberflächen und

negativ geladenen Zellen bzw. den adsorbierten Proteinschichten werden als möglicher Mechanismus solcher Beobachtungen beschrieben, und es wird angenommen, dass mehr Proteine an positiv geladene als an negativ geladene Oberflächen binden [90]. Positiv und negativ geladene Peptide der ECM-Proteine, die durch die Zellen sekretiert werden, sind wahrscheinlich ebenfalls an den Zell-Polymer-Interaktionen beteiligt [152]. Verschiedene Zelloberflächenladungen sowie die zelltypspezifische Expression von Membranrezeptoren durch unterschiedliche Zelltypen oder spezielle Phänotypen [48,65,87,109,178] könnten ein Grund für das unterschiedliche Verhalten von Keratinozyten und Fibroblasten sein. So wäre es möglich, dass mehr Keratinozyten mit proliferativer Kapazität (basale Keratinozyten) an AEMA 2 und NaMAS 2 adhäreren konnten, da eine bessere Wechselwirkung durch den höheren Anteil an geladenen funktionellen Gruppen möglich war.

Es wurde mehrfach beschrieben, dass Ionen, Moleküle und Proteine zuerst an Polymeroberflächen adsorbieren, und die Zellen anschließend mit der Proteinschicht interagieren und nicht direkt mit der Polymeroberfläche in Kontakt kommen [2]. Dabei ist die Menge, Zusammensetzung und Konformation der Proteine entscheidend für die Zelladhärenz [180]. Studien zu Zellinteraktionen mit Oberflächen mit geladenen funktionellen Gruppen werden oft in serumhaltigen Medien durchgeführt. Teilweise werden auch Vergleiche zwischen serumhaltiger und serumfreier Inkubation beschrieben. Zum Beispiel wurden unter serumhaltiger Bedingung eine höhere Dichte von HUVECs auf positiv und negativ geladenen Polymeren gefunden, während eine vollständige Ausbreitung der HUVECs bei serumfreier Bedingung nur auf dem positiv geladenem Polymer beobachtet wurde [173]. Webb et al. [180] weisen darauf hin, dass positiv geladene funktionelle Gruppen unter proteinfreien Bedingungen im Gegensatz zur Vorinkubation mit Proteinen eine größere Rolle bei der Zelladhärenz spielen. Die mit negativ geladenen Gruppen funktionalisierte Oberfläche zeigte eine eher geringe Zelladhärenz, was als eine mögliche elektrostatische Hemmung der Interaktionen mit Proteoglykanen oder eine verminderte Adsorption adhäsiver Proteine gedeutet wird [180]. Entsprechend potentieller klinischer Anwendungen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Serum- und Rinderhypophysenextrakt-freies Keratinozytenmedium für die Kultur der Zellen gewählt. Trotzdem enthält das Medium verschiedenste - insbesondere von den Zellen selbst sekretierte - Moleküle, die die Zelladhäsion beeinflussen.

9.2.2.2 Einfluss der Hydrophilie

Neben Einflussfaktoren wie Elastizität oder geladenen funktionellen Gruppen kann auch die Hydrophilie von Polymeren die Zelladhärenz und das Zellverhalten beeinflussen. Aus den Ergebnissen verschiedener Studien wird die beste Zelladhärenz auf moderat hydrophilen Polymeren angenommen [9]. Moderat hydrophile Polymere scheinen eine Adsorption von Serumproteinen zu ermöglichen, die durch ihre Zusammensetzung, Menge und Konformation eine optimale Zelladhärenz ermöglicht. Je nach Oberfläche scheinen dabei v.a. Vitronektin und Fibronektin eine große Rolle zu spielen [156,157]. Eine Studie zeigte allerdings auch die zunehmende Adhärenz bis zu super-hydrophilen Oberflächen [181]. Die Erhöhung der Hydrophilie durch den Einbau des hydrophilen Comonomers N-vinylpyrrolidon (NVP) könnte somit zu einer Verbesserung der Zelladhärenz führen. Poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidon) (PVP), das Polymer von *N*-vinyl-2-pyrrolidon (NVP) ist als wasserlösliches und biokompatibles Polymer bekannt. Auch entsprechend dem Prinzip der feuchten Wundheilung [187], bei dem ein adäquates feuchtes Milieu geschaffen werden soll, erscheint eine Erhöhung der Hydrophilie für potentielle Anwendungen des Polymers als Wundaufgabe sinnvoll. In einem *in vivo* Versuch an Ratten konnte auch eine bessere Wundheilung bei Abdeckung der Wunde mit hydrophilen Membranen im Gegensatz zur Abdeckung mit hydrophoben Membranen gezeigt werden [97].

In einer früheren Studie konnte auf dem Copolymer mit höchster NVP-Einbaurrate (NVP 30) eine gute Adhärenz einer Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT) bei gleichzeitig stark reduzierter Adhärenz von Fibroblasten und somit ein zellselektiver Polymereffekt gezeigt werden [15]. Dieser Effekt war jedoch nur unter serumhaltiger Bedingung zu beobachten. HaCaT-Zellen konnten, im Gegensatz zu den primären Keratinozyten, gemeinsam mit den Fibroblasten im Standard-Medium DMEM+FBS10% kultiviert werden. Entsprechend den Anforderungen der primären humanen Keratinozyten wurde in den Versuchen für die vorliegende Arbeit ein serumfreies Zellkulturmedium gewählt. Bei den Versuchen für die vorliegende Arbeit wurde die Fibroblastenadhärenz durch den zunehmenden NVP-Gehalt im Copolymer auch unter serumfreien Bedingungen gehemmt. Dies stimmt gut mit einer früheren Studie [64] und den Ergebnissen der Direkttestung der aktuellen Copolymere mit murinen L929 Fibroblasten [140] überein. Allerdings wurde auch die Keratinozytenadhärenz beeinträchtigt, so dass die Ergebnisse für die Keratinozyten-Zelllinie mit primären Keratinozyten nicht bestätigt und kein zellselektiver Polymereffekt nachgewiesen werden konnte.

Für die vorliegende Arbeit wurden die Polymere im Gegensatz zum früheren Versuch in einem lösungsmittelfreien Prozess hergestellt, um die Zellverträglichkeit zu verbessern. Aufgrund der veränderten Synthese wurde auch der Formierungsprozess von einer früheren Membranherstellung auf ein Sinterverfahren umgestellt. Offenbar wirkten sich die chemischen bzw. physikalischen Polymereigenschaften jedoch trotzdem hemmend auf die Adhärenz beider Zelltypen aus. So kann z.B. angenommen werden, dass eine Wasserschicht auf der Oberfläche den direkten Kontakt der Oberfläche mit Proteinen und somit auch mit den Zellen verhindern könnte [176]. Die gemessenen benetzenden und entnetzenden Kontaktwinkel gaben, auch entsprechend früheren Studien [64], nicht bzw. nur ansatzweise die erwarteten Änderungen durch den zunehmenden tatsächlichen Einbau von NVP in die Copolymere wieder. Makroskopisch sichtbare Quellungseffekte nach Kontakt mit Medium und Zellen (Vergrößerung des Probendurchmessers, verminderte Transparenz) sprechen jedoch deutlich für die zunehmende Hydrophilie. Aus den REM-Aufnahmen ist erkennbar, dass bei gleicher Rauigkeit der Ausgangsproben Veränderungen der Rauigkeit durch den Kontakt mit Medium und Zellen auftraten. Da die Rauigkeit die Kontaktwinkelbestimmung beeinflussen kann [80], könnten sich die Rauigkeitsänderungen auf die Kontaktwinkel-Messergebnisse ausgewirkt haben. Außerdem kann der Einfluss der Rauigkeit auf die Zellen nicht ausgeschlossen werden und es bleibt unklar, ob die Zunahme der Hydrophilie oder der Rauigkeit die Beeinträchtigung der Zelladhärenz bewirkte. Da die Zelluntersuchungen für die vorliegende Arbeit in serumfreiem Medium durchgeführt wurden, sind im Medium keine Serumproteine vorhanden. Jedoch enthält das Medium andere Proteine und Moleküle, die an Adsorptions- und Desorptionsprozessen beteiligt sind. Des Weiteren können die Zellen selbst Proteine, wie z.B. ECM-Komponenten oder Adhärenzfaktoren synthetisieren, die dann adsorbieren und durch unterschiedliche Menge, Konformation und Komposition die Zelladhärenz beeinflussen können.

Weiterhin ist es wahrscheinlich, dass sich das Adhärenzverhalten der Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT) vom Verhalten der primären humanen Keratinozyten unterscheidet. Zwar sind bisher keine vergleichenden Studien bezüglich des Adhärenzverhalten beider Zelltypen verfügbar, jedoch wurden beispielsweise Unterschiede zwischen der HaCaT Zelllinie und primären adulten humanen Keratinozyten für die Differenzierung und Proliferation sowie die Lipidkomposition und Synthese nachgewiesen [21,110,145]. Außerdem finden sich Hinweise auf eine unterschiedliche Zusammensetzung der Zellmembran-Glykoproteine [92].

Letztlich ist auch zu beachten, dass die Markierung der Zellen in der Cokultur für die vorliegende Arbeit mit speziellen Markern (Keratin14, Vimentin) erfolgte, so dass exakte Zelldichten ermittelt werden konnten, und die Beurteilung in der Cokultur nicht ausschließlich aufgrund morphologischer Unterschiede erfolgte.

9.3 Schlussbetrachtungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Testsystem etabliert, mit dem die eindeutige Identifikation eines zellselektiven Polymers möglich ist. Des Weiteren wurden durch die Untersuchung verschiedener Copolymere mit Abstufungen unterschiedlicher Eigenschaften Grundlagen zur Entwicklung von Zellkultursubstraten oder potentiellen Wundauflagen zur Verfügung gestellt.

Für das Polymernetzwerk cPnBA73 wurde ein leichter Keratinozyten-selektiver Effekt sowie eine geringere Sekretion von inflammatorischen Faktoren und Ablagerung von ECM-Komponenten gefunden. Des Weiteren zeigten die Copolymere AEMA 2, NaMAS 2 und NVP 5 eine gute Zellverträglichkeit (bezüglich Adhärenz und Vitalität) für primäre humane Keratinozyten und dermale Fibroblasten. Eine Anwendung als Zellkultursubstrat sowie im Bereich Hautregeneration/Wundheilung wäre somit mit diesen Polymeren prinzipiell möglich, auch wenn bisher keine deutliche Verbesserung gegenüber dem Kontrollpolymer hinsichtlich Zellelektivität erreicht wurde. Um anstatt der sehr harten Chips eher flexible AN-basierte Copolymere zu erhalten, könnten die Copolymere möglicherweise durch ein Salzleaching-Verfahren zu porösen Gerüsten („scaffolds“) verarbeitet werden [37]. Diese könnten dann für die Wundheilung der Hautoberfläche angepasst werden und auch je nach Bedarf einen adäquaten Gas- und Wasseraustausch zwischen Wunde und Umgebung ermöglichen. Außerdem könnten die Copolymere als Pulver auf passende Trägersysteme aufgebracht werden. Für weitere Arbeiten hinsichtlich Keratinozytenuntersuchungen sollten vorzugsweise flexible und semipermeable Polymere (Membranen) ausgewählt werden. Damit könnten auch weiterführende Untersuchungen mit Epidermiskonstrukten (geschichtete Keratinozyten mit Luftexposition) durchgeführt werden.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass durch Methoden der Polymerchemie eine systematische Variation von Polymereigenschaften ermöglicht werden kann, und diese die Beeinflussung von Zellen oder biologischen Systemen bewirken können. Des Weiteren wird deutlich, dass Screening-Methoden zur optimierten Auswahl von geeigneten Polymeren beitragen, und so den Entwicklungsprozess neuer Polymere beschleunigen können.

10 Danksagung

Die vorgestellte Doktorarbeit wurde am Zentrum für Biomaterialentwicklung und Berlin-Brandenburg Zentrum für Regenerative Therapien, Institut für Polymerforschung, Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Teltow, durchgeführt. Die Arbeit wurde finanziell durch die Berlin-Brandenburg School for Regenerative Therapies (DFG-Förderung GSC 203) unterstützt. Ich danke herzlich Prof. Dr. Andreas Lendlein für die Betreuung als Doktorvater an der Universität Potsdam und die Chance, in Teltow zu forschen. Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Friedrich Jung für die Betreuung als Gruppenleiter der PBE- bzw. auch PBK-Abteilung und des „Hautprojektes“, sowie die Unterstützung vor allem in der Endphase der Arbeit sehr danken. Ich bin ebenso sehr dankbar für die anfängliche Hilfe durch Dr. Bernhard Hiebl und die zwischenzeitliche Unterstützung durch Dr. Gerald Grütz. Besonderer Dank gilt auch Dr. Jing Cui, Dr. Karl Kratz und den PBI Gruppenmitgliedern für die Bereitstellung der cPnBA Proben und Charakterisierungsdaten, sowie Dr. Nico Scharnagl, Dr. Marc Behl, Dr. Benjamin Pierce, Dr. Karl Kratz und den PBS-, PBA- und PBI-Gruppenmitgliedern für die Bereitstellung der AN-basierten Copolymere und Charakterisierungsdaten. Der Dank für die Endotoxin- und Zytotoxizitätsuntersuchungen gilt den Abteilungen PBS, PBE und PBK. Vielen Dank auch an Yvonne Pieper für die REM-Aufnahmen. Weiterer Dank geht insbesondere an Dr. Nico Scharnagl, Dr. Stefan Kamlage, Dr. Thomas Weigel, Dr. Klaus Richau, Dr. Karl Kratz, Michael Schossig und Manuela Keller für die Erklärungen und die freundliche Unterstützung in chemischen oder methodischen Fragen.

Außerdem möchte ich meinen wunderbaren Kollegen in Teltow, Steffen Braune, Anke Mayer, Christian Schulz, Dr. Toralf Roch, Dr. Anne Krüger, Susanne Reinhold, Christopher Hortig, Jessica Reinert, Melanie Pietsch, Katharina Senft, Ruth Hesse, Angelika Ritschel, Anja Müller-Heyn, Dr. Barbara Seifert, Christof Mrowietz, Julia Görs, Nicole Maciej, Stefanie Schmidt und allen PhD-Studenten und Mitarbeitern des HZG Teltow, sowie den BSRT-Studenten und -Organisatoren danken.

Weiterhin danke ich herzlich Dr. Michael Schroeter für die Unterstützung bezüglich aller studentischen Angelegenheiten und chemischen Fragen und Dr. Karolin Schmäzlin für die große Hilfe bei der Vorbereitung und Einreichung von Publikationen.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und meinem Mann.

11 Literaturverzeichnis

- [1] T. Aasen and J.C. Izpisua Belmonte, Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells, *Nat Protoc* **5** (2010), 371-82.
- [2] G. Altankov, K. Richau and T. Groth, The role of surface zeta potential and substratum chemistry for regulation of dermal fibroblasts interaction, *Materialwissenschaft Und Werkstofftechnik* **34** (2003), 1120-1128.
- [3] C.F. Amstein and P.A. Hartman, Adaptation of plastic surfaces for tissue culture by glow discharge, *J Clin Microbiol* **2** (1975), 46-54.
- [4] J.M. Anderson, A. Rodriguez and D.T. Chang, Foreign body reaction to biomaterials, *Semin Immunol* **20** (2008), 86-100.
- [5] Y. Arima and H. Iwata, Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers, *Biomaterials* **28** (2007), 3074-3082.
- [6] A. Asran, K. Razghandi, N. Aggarwal, G.H. Michler and T. Groth, Nanofibers from blends of polyvinyl alcohol and polyhydroxy butyrate as potential scaffold material for tissue engineering of skin, *Biomacromolecules* **11** (2010), 3413-21.
- [7] J. Autian, Problems in the use of polymeric materials in medical and biomedical applications, *Annals of the New York Academy of Sciences* **146** (1968), 251-261.
- [8] J.E. Babensee, Interaction of dendritic cells with biomaterials, *Semin Immunol* **20** (2008), 101-8.
- [9] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml and V. Svorcik, Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants, *Biotechnol Adv* **29** (2011), 739-67.
- [10] S.F. Badylak and T.W. Gilbert, Immune response to biologic scaffold materials, *Semin Immunol* **20** (2008), 109-16.
- [11] A.P. Balgude, X. Yu, A. Szymanski and R.V. Bellamkonda, Agarose gel stiffness determines rate of DRG neurite extension in 3D cultures, *Biomaterials* **22** (2001), 1077-84.
- [12] A. Bayrak, M. Tyralla, J. Ladhoff, M. Schleicher, U.A. Stock, H.D. Volk and M. Seifert, Human immune responses to porcine xenogeneic matrices and their extracellular matrix constituents in vitro, *Biomaterials* **31** (2010), 3793-803.
- [13] B. Bhana, R.K. Iyer, W.L. Chen, R. Zhao, K.L. Sider, M. Likhitpanichkul, C.A. Simmons and M. Radisic, Influence of substrate stiffness on the phenotype of heart cells, *Biotechnol Bioeng* **105** (2009), 1148-60.
- [14] J.S. Boateng, K.H. Matthews, H.N. Stevens and G.M. Eccleston, Wound healing dressings and drug delivery systems: a review, *J Pharm Sci* **97** (2008), 2892-923.
- [15] G. Boese, C. Trimpert, W. Albrecht, G. Malsch, T. Groth and A. Lendlein, Membranes from acrylonitrile-based polymers for selective cultivation of human keratinocytes, *Tissue Eng* **13** (2007), 2995-3002.
- [16] P. Boukamp, R.T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham and N.E. Fusenig, Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line, *J Cell Biol* **106** (1988), 761-71.
- [17] S.T. Boyce and R.G. Ham, Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture, *J Invest Dermatol* **81** (1983), 33s-40s.
- [18] S. Braune, A. Honow, C. Mrowietz, J. Cui, K. Kratz, J. Hellwig, C. Uzum, R.V. Klitzing, A. Lendlein and F. Jung, Hemocompatibility of soft hydrophobic poly(n-

- butyl acrylate) networks with elastic moduli adapted to the elasticity of human arteries, *Clin Hemorheol Microcirc* **49** (2011), 375-90.
- [19] K.A. Bush, P.F. Driscoll, E.R. Soto, C.R. Lambert, W.G. McGimpsey and G.D. Pins, Designing tailored biomaterial surfaces to direct keratinocyte morphology, attachment, and differentiation, *J Biomed Mater Res A* **90** (2009), 999-1009.
- [20] K.Y. Cai, M. Frant, J. Bossert, G. Hildebrand, K. Liefeth and K.D. Jandt, Surface functionalized titanium thin films: Zeta-potential, protein adsorption and cell proliferation, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **50** (2006), 1-8.
- [21] V. Chaturvedi, J.Z. Qin, M.F. Denning, D. Choubey, M.O. Diaz and B.J. Nickoloff, Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes, *J Biol Chem* **274** (1999), 23358-67.
- [22] Y.K. Cheung, E.U. Azeloglu, D.A. Shiovitz, K.D. Costa, D. Seliktar and S.K. Sia, Microscale control of stiffness in a cell-adhesive substrate using microfluidics-based lithography, *Angew Chem Int Ed Engl* **48** (2009), 7188-92.
- [23] P.W. Cook, A.K. Shipley, M. Van Kleeck, C. Parrish, E. Tucker and S. Li, *Primary Isolation and Serial Propagation of Normal Human Keratinocytes in an Animal Product-free Environment*, Cascade Biologics, Inc., 2003, pp. 1-8.
- [24] N.A. Coolen, M. Verkerk, L. Reijnen, M. Vlig, A.J. van den Bogaardt, M. Breetveld, S. Gibbs, E. Middelkoop and M.M. Ulrich, Culture of keratinocytes for transplantation without the need of feeder layer cells, *Cell Transplant* **16** (2007), 649-61.
- [25] E. Corsini and C.L. Galli, Cytokines and irritant contact dermatitis, *Toxicol Lett* **102-103** (1998), 277-82.
- [26] J.M.G. Cowie and V. Arrighi, *Polymers: Chemistry and physics of modern materials*, CRC Press Taylor Francis Group, 2008.
- [27] J. Cui, K. Kratz, B. Hiebl, F. Jung and A. Lendlein, Soft poly(n-butyl acrylate) networks with tailored mechanical properties designed as substrates for in vitro models, *Polym Adv Technol* **22** (2011), 126-132.
- [28] J.M. Curran, R. Chen and J.A. Hunt, Controlling the phenotype and function of mesenchymal stem cells in vitro by adhesion to silane-modified clean glass surfaces, *Biomaterials* **26** (2005), 7057-7067.
- [29] I. Dal Pra, A. Chiarini, A. Boschi, G. Freddi and U. Armato, Novel dermo-epidermal equivalents on silk fibroin-based formic acid-crosslinked three-dimensional nonwoven devices with prospective applications in human tissue engineering/regeneration/repair, *Int J Mol Med* **18** (2006), 241-7.
- [30] P. De Corte, G. Verween, G. Verbeken, T. Rose, S. Jennes, A. De Coninck, D. Roseeuw, A. Vanderkelen, E. Kets, D. Haddow and J.P. Pirnay, Feeder layer- and animal product-free culture of neonatal foreskin keratinocytes: improved performance, usability, quality and safety, *Cell Tissue Bank* **13** (2011), 175-89.
- [31] J.L. Dewez, A. Doren, Y.J. Schneider and P.G. Rouxhet, Competitive adsorption of proteins: Key of the relationship between substratum surface properties and adhesion of epithelial cells, *Biomaterials* **20** (1999), 547-559.
- [32] C. Diatloff-Zito, P.J. Deschavanne, E. Loria, E.P. Malaise and A. Macieira-Coelho, Comparison between the radiosensitivity of human, mouse and chicken fibroblast-like cells using short-term endpoints, *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **39** (1981), 419-30.
- [33] DIN, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität (ISO 10993-5:2009); Deutsche Fassung EN ISO 10993-5:2009*, Beuth Verlag GmbH, 2009.

- [34] DIN, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 12: Probenvorbereitung und Referenzmaterialien (ISO/DIS 10993-12:2006) Deutsche Fassung prEN ISO 10993-12:2006*, Beuth Verlag GmbH, 2006.
- [35] D.E. Discher, P. Janmey and Y.L. Wang, Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate, *Science* **310** (2005), 1139-43.
- [36] T. Drewa, K. Szmytkowska, Z. Wlodarczyk, I. Sir and C. Kierzenkowska-Mila, Does the presence of unwanted dermal fibroblasts limit the usefulness of autologous epidermal keratinocyte grafts?, *Transplant Proc* **38** (2006), 3088-91.
- [37] G. Eichhorn, *Masterthesis: Herstellung und Integration poröser Formkörper auf Polyacrylnitril-Co-Polymerbasis in ein modulares Zelltestsystem*, Forschungszentrum GKSS, Hochschule Darmstadt, 2010.
- [38] A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney and D.E. Discher, Matrix elasticity directs stem cell lineage specification, *Cell* **126** (2006), 677-89.
- [39] K. Fan, J. Tang, J. Escandon and R.S. Kirsner, State of the art in topical wound-healing products, *Plast Reconstr Surg* **127 Suppl 1** (2011), 44S-59S.
- [40] N. Faucheux, R. Schweiss, K. Lutzow, C. Werner and T. Groth, Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies, *Biomaterials* **25** (2004), 2721-2730.
- [41] R.J. Feigal, C. Yesilsoy, H.H. Messer and J. Nelson, Differential sensitivity of normal human pulp and transformed mouse fibroblasts to cytotoxic challenge, *Arch Oral Biol* **30** (1985), 609-13.
- [42] J. Folkman and A. Moscona, Role of cell shape in growth control, *Nature* **273** (1978), 345-9.
- [43] R.I. Freshney, *Culture Vessels and Substrates*, Culture of Animal Cells, John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- [44] R.I. Freshney, *Culture of Specific Cell Types*, Culture of Animal Cells, John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- [45] S.M. Frisch and H. Francis, Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis, *J Cell Biol* **124** (1994), 619-26.
- [46] E. Fuchs, Keratins and the skin, *Annu Rev Cell Dev Biol* **11** (1995), 123-53.
- [47] E. Fuchs and H. Green, Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte, *Cell* **19** (1980), 1033-42.
- [48] J. Gailit and R.A. Clark, Studies in vitro on the role of alpha v and beta 1 integrins in the adhesion of human dermal fibroblasts to provisional matrix proteins fibronectin, vitronectin, and fibrinogen, *J Invest Dermatol* **106** (1996), 102-8.
- [49] C.L. Gallant-Behm and T.A. Mustoe, Occlusion regulates epidermal cytokine production and inhibits scar formation, *Wound Repair Regen* **18** (2010), 235-44.
- [50] X. Garric, H. Garreau, M. Vert and J.P. Moles, Behaviors of keratinocytes and fibroblasts on films of PLA50-PEO-PLA50 triblock copolymers with various PLA segment lengths, *J Mater Sci Mater Med* **19** (2008), 1645-51.
- [51] X. Garric, J.P. Moles, H. Garreau, J.J. Guilhou and M. Vert, Human skin cell cultures onto PLA50 (PDLLA) bioresorbable polymers: influence of chemical and morphological surface modifications, *J Biomed Mater Res A* **72** (2005), 180-9.
- [52] G.G. Gauglitz, H.C. Korting, T. Pavicic, T. Ruzicka and M.G. Jeschke, Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies, *Mol Med* **17** (2010), 113-25.
- [53] N.G. Genes, J.A. Rowley, D.J. Mooney and L.J. Bonassar, Effect of substrate mechanics on chondrocyte adhesion to modified alginate surfaces, *Arch Biochem Biophys* **422** (2004), 161-7.

- [54] L. Germain, M. Rouabhia, R. Guignard, L. Carrier, V. Bouvard and F.A. Auger, Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin, *Burns* **19** (1993), 99-104.
- [55] F.G. Giancotti and E. Ruoslahti, Integrin signaling, *Science* **285** (1999), 1028-32.
- [56] B.A. Gilchrest, J.K. Calhoun and T. Maciag, Attachment and growth of human keratinocytes in a serum-free environment, *J Cell Physiol* **112** (1982), 197-206.
- [57] R. Gillitzer, [Modern wound management], *Hautarzt* **53** (2002), 130-45; quiz 146-7.
- [58] M.B. Gorbet and M.V. Sefton, Endotoxin: the uninvited guest, *Biomaterials* **26** (2005), 6811-7.
- [59] D.S. Gray, J. Tien and C.S. Chen, Repositioning of cells by mechanotaxis on surfaces with micropatterned Young's modulus, *J Biomed Mater Res A* **66** (2003), 605-14.
- [60] H. Green, O. Kehinde and J. Thomas, Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting, *Proc Natl Acad Sci U S A* **76** (1979), 5665-8.
- [61] A. Grone, Keratinocytes and cytokines, *Vet Immunol Immunopathol* **88** (2002), 1-12.
- [62] R.M. Grossman, J. Krueger, D. Yourish, A. Granelli-Piperno, D.P. Murphy, L.T. May, T.S. Kupper, P.B. Sehgal and A.B. Gottlieb, Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* **86** (1989), 6367-71.
- [63] T. Groth, B. Seifert, W. Albrecht, G. Malsch, U. Gross, F. Fey-Lamprecht, G. Michanetzis, Y. Missirlis and G. Engbers, Development of polymer membranes with improved haemocompatibility for biohybrid organ technology, *Clin Hemorheol Microcirc* **32** (2005), 129-43.
- [64] T. Groth, B. Seifert, G. Malsch, W. Albrecht, D. Paul, A. Kostadinova, N. Krasteva and G. Altankov, Interaction of human skin fibroblasts with moderate wettable polyacrylonitrile--copolymer membranes, *J Biomed Mater Res* **61** (2002), 290-300.
- [65] H. Hachisuka, K. Okubo, T. Karashima, M. Kusuhara, S. Nakano, O. Mori and Y. Sasai, Surface charge of fractionated guinea pig keratinocytes measured by free-flow cell electrophoresis, *Kurume Med J* **39** (1992), 33-9.
- [66] K. Heilmann, T. Groth, O. Behrsing, W. Albrecht, M. Schossig, A. Lendlein and B. Micheel, The influence of the chemical composition of cell culture material on the growth and antibody production of hybridoma cells, *J Biotechnol* **115** (2005), 291-301.
- [67] B. Hiebl, J. Cui, K. Kratz, O. Frank, M. Schossig, K. Richau, S. Lee, F. Jung and A. Lendlein, Viability, Morphology and Function of Primary Endothelial Cells on Poly(n-Butyl Acrylate) Networks Having Elastic Moduli Comparable to Arteries, *J Biomater Sci Polym Ed* **23** (2011), 901-915.
- [68] M.C. Higham, R. Dawson, M. Szabo, R. Short, D.B. Haddow and S. MacNeil, Development of a stable chemically defined surface for the culture of human keratinocytes under serum-free conditions for clinical use, *Tissue Eng* **9** (2003), 919-30.
- [69] J. Hodde and M. Hiles, Virus safety of a porcine-derived medical device: evaluation of a viral inactivation method, *Biotechnol Bioeng* **79** (2002), 211-6.
- [70] B.D. Hoffman, C. Grashoff and M.A. Schwartz, Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction, *Nature* **475** (2011), 316-23.
- [71] K.A. Holbrook and H. Hennings, Phenotypic expression of epidermal cells in vitro: a review, *J Invest Dermatol* **81** (1983), 11s-24s.
- [72] I.H. Jaafar, C.E. LeBlon, M.T. Wei, D. Ou-Yang, J.P. Coulter and S.S. Jedlicka, Improving fluorescence imaging of biological cells on biomedical polymers, *Acta Biomaterialia* **7** (2011), 1588-1598.

- [73] J.E. Janis, R.K. Kwon and D.H. Lalonde, A practical guide to wound healing, *Plast Reconstr Surg* **125** (2010), 230e-44e.
- [74] Y. Ji, X.T. Li and G.Q. Chen, Interactions between a poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) terpolyester and human keratinocytes, *Biomaterials* **29** (2008), 3807-14.
- [75] C. Johnen, B. Hartmann, I. Steffen, K. Brautigam, T. Witascheck, N. Toman, M.V. Kuntscher and J.C. Gerlach, Skin cell isolation and expansion for cell transplantation is limited in patients using tobacco, alcohol, or are exhibiting diabetes mellitus, *Burns* **32** (2006), 194-200.
- [76] C. Johnen, I. Steffen, D. Beichelt, K. Brautigam, T. Witascheck, N. Toman, V. Moser, C. Ottomann, B. Hartmann and J.C. Gerlach, Culture of subconfluent human fibroblasts and keratinocytes using biodegradable transfer membranes, *Burns* **34** (2008), 655-63.
- [77] K. Jubin, Y. Martin, D.J. Lawrence-Watt and J.R. Sharpe, A fully autologous co-culture system utilising non-irradiated autologous fibroblasts to support the expansion of human keratinocytes for clinical use, *Cytotechnology* **63** (2011), 655-62.
- [78] H. Jung, B. Kwak, H.S. Yang, G. Tae, J.S. Kim and K. Shin, Attachment of cells to poly(styrene-co-acrylic acid) thin films with various charge densities, *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **313** (2008), 562-566.
- [79] B. Kalyanaraman and S. Boyce, Assessment of an automated bioreactor to propagate and harvest keratinocytes for fabrication of engineered skin substitutes, *Tissue Eng* **13** (2007), 983-93.
- [80] H. Kamusewitz, W. Possart and D. Paul, The relation between Young's equilibrium contact angle and the hysteresis on rough paraffin wax surfaces, *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **156** (1999), 271-279.
- [81] J. Kanitakis, Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin, *Eur J Dermatol* **12** (2002), 390-9; quiz 400-1.
- [82] M. Kempf, Y. Miyamura, P.Y. Liu, A.C. Chen, H. Nakamura, H. Shimizu, Y. Tabata, R.M. Kimble and J.R. McMillan, A denatured collagen microfiber scaffold seeded with human fibroblasts and keratinocytes for skin grafting, *Biomaterials* **32** (2011), 4782-92.
- [83] H.L. Khor, K.W. Ng, A.S. Htay, J.T. Schantz, S.H. Teoh and D.W. Hutmacher, Preliminary study of a polycaprolactone membrane utilized as epidermal substrate, *J Mater Sci Mater Med* **14** (2003), 113-20.
- [84] J. Kingkaew, N. Jatupaiboon, N. Sanchavanakit, P. Pavasant and M. Phisalaphong, Biocompatibility and growth of human keratinocytes and fibroblasts on biosynthesized cellulose-chitosan film, *J Biomater Sci Polym Ed* **21** (2010), 1009-21.
- [85] M. Kino-oka, Y. Agatahama, Y. Haga, M. Inoie and M. Taya, Long-term subculture of human keratinocytes under an anoxic condition, *J Biosci Bioeng* **100** (2005), 119-22.
- [86] M. Kiremitci, A. Pesmen, M. Pulat and I. Gurhan, Relationship of surface characteristics to cellular attachment in PU and PHEMA, *J Biomater Appl* **7** (1993), 250-64.
- [87] B. Knopf and U. Wollina, Electrophoretic mobilities of keratinocytes from normal skin and psoriatic lesions, *Arch Dermatol Res* **284** (1992), 117-8.
- [88] S. Kuhn, C. Radtke, C. Allmeling, P.M. Vogt and K. Reimers, Keratinocyte Culture Techniques in Medical and Scientific Applications. in: D.U. Khopkar, (Ed.), *Skin Biopsy - Perspectives*, InTech, 2011.

- [89] G. Lammers, G.S. Tjabringa, J. Schalkwijk, W.F. Daamen and T.H. van Kuppevelt, A molecularly defined array based on native fibrillar collagen for the assessment of skin tissue engineering biomaterials, *Biomaterials* **30** (2009), 6213-20.
- [90] J.H. Lee, H.W. Jung, I.K. Kang and H.B. Lee, Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups, *Biomaterials* **15** (1994), 705-11.
- [91] J.H. Lee, G. Khang, J.W. Lee and H.B. Lee, Interaction of Different Types of Cells on Polymer Surfaces with Wettability Gradient, *J Colloid Interface Sci* **205** (1998), 323-330.
- [92] A. Licht, C. Bauer and R. Stadler, Isolation of plasma membranes from keratinocytes: a newly developed method allows the sensitive detection of the membrane antigen pattern in normal and psoriatic skin, *Exp Dermatol* **1** (1992), 67-75.
- [93] A. Limat and F.K. Noser, Serial cultivation of single keratinocytes from the outer root sheath of human scalp hair follicles, *J Invest Dermatol* **87** (1986), 485-8.
- [94] H. Liu, Y. Yin and K. Yao, Construction of chitosan-gelatin-hyaluronic acid artificial skin in vitro, *J Biomater Appl* **21** (2007), 413-30.
- [95] S.C. Liu, M.J. Eaton and M.A. Karasek, Growth characteristics of human epidermal keratinocytes from newborn foreskin in primary and serial cultures, *In Vitro* **15** (1979), 813-22.
- [96] S.C. Liu and M. Karasek, Isolation and growth of adult human epidermal keratinocytes in cell culture, *J Invest Dermatol* **71** (1978), 157-62.
- [97] X. Liu, T. Lin, J. Fang, G. Yao, H. Zhao, M. Dodson and X. Wang, In vivo wound healing and antibacterial performances of electrospun nanofibre membranes, *J Biomed Mater Res A* **94** (2010), 499-508.
- [98] C.M. Lo, H.B. Wang, M. Dembo and Y.L. Wang, Cell movement is guided by the rigidity of the substrate, *Biophys J* **79** (2000), 144-52.
- [99] N. Maas-Szabowski, A. Shimotoyodome and N.E. Fusenig, Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism, *J Cell Sci* **112** (Pt 12) (1999), 1843-53.
- [100] M. Macfarlane, P. Jones, C. Goebel, E. Dufour, J. Rowland, D. Araki, M. Costabel-Farkas, N.J. Hewitt, J. Hibatallah, A. Kirst, P. McNamee, F. Schellauf and J. Scheel, A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: skin irritation, *Regul Toxicol Pharmacol* **54** (2009), 188-96.
- [101] S. MacNeil, Biomaterials for tissue engineering of skin, *Materials Today* **11** (2008), 26-35.
- [102] S. Magre, Y. Takeuchi and B. Bartosch, Xenotransplantation and pig endogenous retroviruses, *Rev Med Virol* **13** (2003), 311-29.
- [103] J. Mansbridge, M.R. Koller, B.O. Palsson and J.R.W. Masters, *Dermal Fibroblasts Human Cell Culture*, Springer Netherlands, 2002, pp. 125-172.
- [104] N.G. Maroudas, Adhesion and spreading of cells on charged surfaces, *J Theor Biol* **49** (1975), 417-24.
- [105] P. Martin, Wound healing--aiming for perfect skin regeneration, *Science* **276** (1997), 75-81.
- [106] A. Mayer, K. Kratz, B. Hiebl, A. Lendlein and F. Jung, Interaction of angiogenically stimulated intermediate CD163+ monocytes/macrophages with soft hydrophobic poly(*n*-butyl acrylate) networks with elastic moduli matched to that of human arteries, *Artif Organs* **36** (2012), E28-E38.
- [107] J. McGuire and N. Fedarko, Keratinocytes form multi-cell clusters in the absence of cell division or collagen synthesis; tunicamycin interferes with cell cluster formation, *Curr Probl Dermatol* **11** (1983), 83-96.

- [108] R.C. McKenzie and D.N. Sauder, The role of keratinocyte cytokines in inflammation and immunity, *J Invest Dermatol* **95** (1990), 105S-107S.
- [109] J.N. Mehrishi and J. Bauer, Electrophoresis of cells and the biological relevance of surface charge, *Electrophoresis* **23** (2002), 1984-1994.
- [110] L. Micallef, F. Belaubre, A. Pinon, C. Jayat-Vignoles, C. Delage, M. Charveron and A. Simon, Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes, *Exp Dermatol* **18** (2009), 143-51.
- [111] R. Moll, W.W. Franke, D.L. Schiller, B. Geiger and R. Krepler, The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells, *Cell* **31** (1982), 11-24.
- [112] A.T. Neffe and A. Lendlein, Tailoring established polymers for medical applications, *Med Device Technol* **18** (2007), 14-6, 18-9.
- [113] S.J. Northup, Perspectives on In Vitro Toxicity for Medical Devices, *International Journal of Toxicology* **7** (1988), 481-489.
- [114] N. O'Connor, J. Mulliken, S. Banks-Schlegel, O. Kehinde and H. Green, Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells, *The Lancet* **317** (1981), 75-78.
- [115] E.A. O'Toole, Extracellular matrix and keratinocyte migration, *Clin Exp Dermatol* **26** (2001), 525-30.
- [116] M. Ohgaki, T. Kizuki, M. Katsura and K. Yamashita, Manipulation of selective cell adhesion and growth by surface charges of electrically polarized hydroxyapatite, *J Biomed Mater Res* **57** (2001), 366-73.
- [117] S.R. Pajoum Shariati, M.A. Shokrgozar, M. Vossoughi and A. Eslamifar, In vitro co-culture of human skin keratinocytes and fibroblasts on a biocompatible and biodegradable scaffold, *Iran Biomed J* **13** (2009), 169-77.
- [118] D.M. Peehl and R.G. Ham, Growth and differentiation of human keratinocytes without a feeder layer or conditioned medium, *In Vitro* **16** (1980), 516-25.
- [119] R.J. Pelham, Jr. and Y. Wang, Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility, *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (1997), 13661-5.
- [120] N.J. Percival, Classification of Wounds and their Management, *Surgery (Oxford)* **20** (2002), 114-117.
- [121] G. Peschel, H.M. Dahse, A. Konrad, G.D. Wieland, P.J. Mueller, D.P. Martin and M. Roth, Growth of keratinocytes on porous films of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(4-hydroxybutyrate) blended with hyaluronic acid and chitosan, *J Biomed Mater Res A* **85** (2008), 1072-81.
- [122] T.T. Phan, I.J. Lim, E.K. Tan, B.H. Bay and S.T. Lee, Evaluation of cell culture on the polyurethane-based membrane (Tegaderm): implication for tissue engineering of skin, *Cell Tissue Bank* **6** (2005), 91-7.
- [123] J.E. Phillips, T.A. Petrie, F.P. Creighton and A.J. Garcia, Human mesenchymal stem cell differentiation on self-assembled monolayers presenting different surface chemistries, *Acta Biomaterialia* **6** (2010), 12-20.
- [124] T. Pommerencke, T. Steinberg, H. Dickhaus, P. Tomakidi and N. Grabe, Nuclear staining and relative distance for quantifying epidermal differentiation in biomarker expression profiling, *BMC Bioinformatics* **9** (2008), 473.
- [125] H.M. Powell and S.T. Boyce, Engineered Human Skin Fabricated Using Electrospun Collagen-PCL Blends: Morphogenesis and Mechanical Properties, *Tissue Eng Part A* (2009).
- [126] H.M. Powell and S.T. Boyce, Fiber density of electrospun gelatin scaffolds regulates morphogenesis of dermal-epidermal skin substitutes, *J Biomed Mater Res A* **84** (2008), 1078-86.

- [127] E. Proksch, J.M. Brandner and J.M. Jensen, The skin: an indispensable barrier, *Exp Dermatol* (2008).
- [128] M. Prunieras, M. Regnier, S. Fougere and D. Woodley, Keratinocytes synthesize basal-lamina proteins in culture, *J Invest Dermatol* **81** (1983), 74s-81s.
- [129] C. Radtke, K. Reimers, C. Allmeling and P.M. Vogt, [Efficient production of transfected human keratinocytes under serum-free and feeder layer-free conditions], *Handchir Mikrochir Plast Chir* **41** (2009), 333-40.
- [130] A. Ranella, M. Barberoglou, S. Bakogianni, C. Fotakis and E. Stratakis, Tuning cell adhesion by controlling the roughness and wettability of 3D micro/nano silicon structures, *Acta Biomater* **6** (2010), 2711-20.
- [131] J.G. Rheinwald and H. Green, Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes, *Nature* **265** (1977), 421-4.
- [132] J.G. Rheinwald and H. Green, Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells, *Cell* **6** (1975), 331-43.
- [133] P. Roach, D. Eglin, K. Rohde and C.C. Perry, Modern biomaterials: a review-bulk properties and implications of surface modifications, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **18** (2007), 1263-1277.
- [134] T. Roch, J. Cui, K. Kratz, A. Lendlein and F. Jung, Immuno-compatibility of soft hydrophobic poly(*n*-butyl acrylate) networks with elastic moduli for regeneration of functional tissues, *Clin Hemorheol Microcirc* **50** (2011), 131-142.
- [135] M. Rosdy, B. Grisoni and L.C. Clauss, Proliferation of normal human keratinocytes on silicone substrates, *Biomaterials* **12** (1991), 511-7.
- [136] J.P. Ryman-Rasmussen, J.E. Riviere and N.A. Monteiro-Riviere, Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes, *J Invest Dermatol* **127** (2007), 143-53.
- [137] J.E. Sanders, S.E. Lamont, A. Karchin, S.L. Golledge and B.D. Ratner, Fibro-porous meshes made from polyurethane micro-fibers: effects of surface charge on tissue response, *Biomaterials* **26** (2005), 813-8.
- [138] D.N. Sauder, The role of epidermal cytokines in inflammatory skin diseases, *J Invest Dermatol* **95** (1990), 27S-28S.
- [139] N.M. Schaeublin, L.K. Braydich-Stolle, A.M. Schrand, J.M. Miller, J. Hutchison, J.J. Schlager and S.M. Hussain, Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity, *Nanoscale* **3** (2011), 410-20.
- [140] N. Scharnagl, B. Hiebl, I. Sebastien, D. Radzik, M. Zierke, F. Jung and A. Lendlein, Behaviour of fibroblasts on water born acrylonitrile copolymers with different hydrophilicity, (2012), in Vorbereitung.
- [141] N. Scharnagl, B. Hiebl, K. Trescher, M. Zierke, M. Behl, K. Kratz, F. Jung and A. Lendlein, Behaviour of fibroblasts on water born acrylonitrile-based copolymers containing different cationic and anionic moieties, *Clin Hemorheol Microcirc* **52** (2012), 295-311.
- [142] N. Scharnagl, S. Lee, B. Hiebl, A. Sisson and A. Lendlein, Design principles for polymers as substratum for adherent cells, *J Mater Chem* **20** (2010), 8789-8802.
- [143] J. Schaubert and R.L. Gallo, Antimicrobial peptides and the skin immune defense system, *J Allergy Clin Immunol* **122** (2008), 261-6.
- [144] J.M. Schroder, Chemotactic cytokines in the epidermis, *Exp Dermatol* **1** (1992), 12-9.
- [145] N. Schurer, A. Kohne, V. Schliep, K. Barlag and G. Goerz, Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes, *Exp Dermatol* **2** (1993), 179-85.

- [146] V.P. Shastri and A. Lendlein, Materials in Regenerative Medicine, *Adv Mater* **21** (2009), 3231-3234.
- [147] T.J. Shaw and P. Martin, Wound repair at a glance, *J Cell Sci* **122** (2009), 3209-13.
- [148] Y. Shirakata, Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors, *J Dermatol Sci* **59** (2010), 73-80.
- [149] C.L. Simpson, D.M. Patel and K.J. Green, Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis, *Nat Rev Mol Cell Biol* **12** (2011), 565-80.
- [150] A.K. Singh, B.S. Kasinath and E.J. Lewis, Interaction of polycations with cell-surface negative charges of epithelial cells, *Biochim Biophys Acta* **1120** (1992), 337-42.
- [151] G.G. Slivinsky, W.C. Hymer, J. Bauer and D.R. Morrison, Cellular electrophoretic mobility data: a first approach to a database, *Electrophoresis* **18** (1997), 1109-19.
- [152] A. Soekarno, B. Lom and P.E. Hockberger, Pathfinding by neuroblastoma cells in culture is directed by preferential adhesion to positively charged surfaces, *Neuroimage* **1** (1993), 129-44.
- [153] J.M. Sorrell and A.I. Caplan, Fibroblast heterogeneity: more than skin deep, *J Cell Sci* **117** (2004), 667-75.
- [154] H.J. Stark, M. Baur, D. Breitzkreutz, N. Mirancea and N.E. Fusenig, Organotypic keratinocyte cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation, *J Invest Dermatol* **112** (1999), 681-91.
- [155] H.J. Stark, K. Boehnke, N. Mirancea, M.J. Willhauck, A. Pavesio, N.E. Fusenig and P. Boukamp, Epidermal homeostasis in long-term scaffold-enforced skin equivalents, *J Invest Dermatol Symp Proc* **11** (2006), 93-105.
- [156] J.G. Steele, B.A. Dalton, G. Johnson and P.A. Underwood, Polystyrene chemistry affects vitronectin activity: an explanation for cell attachment to tissue culture polystyrene but not to unmodified polystyrene, *J Biomed Mater Res* **27** (1993), 927-40.
- [157] J.G. Steele, B.A. Dalton, G. Johnson and P.A. Underwood, Adsorption of fibronectin and vitronectin onto Primaria and tissue culture polystyrene and relationship to the mechanism of initial attachment of human vein endothelial cells and BHK-21 fibroblasts, *Biomaterials* **16** (1995), 1057-67.
- [158] M. Stoker, C. O'Neill, S. Berryman and V. Waxman, Anchorage and growth regulation in normal and virus-transformed cells, *Int J Cancer* **3** (1968), 683-93.
- [159] T.P. Stossel, On the crawling of animal cells, *Science* **260** (1993), 1086-94.
- [160] T.T. Sun and H. Green, Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture: formation of the cornified envelope, *Cell* **9** (1976), 511-21.
- [161] V. Svorcik, K. Walachova, K. Proskova, B. Dvorankova, D. Vogtova, R. Ochsner and H. Ryssel, Adhesion and proliferation of keratinocytes on ion beam modified polyethylene, *J Mater Sci Mater Med* **11** (2000), 655-60.
- [162] Y. Tamada and Y. Ikada, Fibroblast growth on polymer surfaces and biosynthesis of collagen, *J Biomed Mater Res* **28** (1994), 783-9.
- [163] P.S. Tan and S.H. Teoh, Effect of stiffness of polycaprolactone (PCL) membrane on cell proliferation, *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* **27** (2007), 304-308.
- [164] K. Theerakittayakorn and T. Bunprasert, Differentiation Capacity of Mouse L929 Fibroblastic Cell Line Compare With Human Dermal Fibroblast, *Proceeding World Academy of Science, Engineering and Technology* (2011), 378-381.
- [165] K. Trescher, T. Roch, J. Cui, K. Kratz, M. Jünger, A. Lendlein and F. Jung, Behaviour of primary human keratinocytes and fibroblasts on soft poly(n-butyl acrylate) networks with tailored mechanical properties, *ADF Abstracts 2012. Exp Dermatol* (2012), 21: e1-e58.

- [166] K. Trescher, T. Roch, K. Kratz, A. Lendlein and F. Jung, Test system for the evaluation of polymer properties on primary human keratinocytes and fibroblasts in mono- and coculture (2012), in Vorbereitung.
- [167] K. Trescher, N. Scharnagl, K. Kratz, T. Roch, A. Lendlein and F. Jung, Adherence and viability of primary human keratinocytes and primary human dermal fibroblasts on acrylonitrile-based copolymers with different concentrations of positively charged functional groups, *Clin Hemorheol Microcirc* **52** (2012), 391-401.
- [168] M.C. Tsao, B.J. Walthall and R.G. Ham, Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium, *J Cell Physiol* **110** (1982), 219-29.
- [169] J. Vacik, B. Dvorankova, J. Michalek, M. Pradny, E. Krumbholcova, T. Fenclova and K. Smetana, Jr., Cultivation of human keratinocytes without feeder cells on polymer carriers containing ethoxyethyl methacrylate: in vitro study, *J Mater Sci Mater Med* **19** (2008), 883-8.
- [170] T.G. van Kooten, J.M. Schakenraad, H.C. van der Mei and H.J. Busscher, Influence of substratum wettability on the strength of adhesion of human fibroblasts, *Biomaterials* **13** (1992), 897-904.
- [171] T.G. van Kooten, H.T. Spijker and H.J. Busscher, Plasma-treated polystyrene surfaces: model surfaces for studying cell-biomaterial interactions, *Biomaterials* **25** (2004), 1735-47.
- [172] P.B. van Wachem, T. Beugeling, J. Feijen, A. Bantjes, J.P. Detmers and W.G. van Aken, Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities, *Biomaterials* **6** (1985), 403-8.
- [173] P.B. van Wachem, A.H. Hogt, T. Beugeling, J. Feijen, A. Bantjes, J.P. Detmers and W.G. van Aken, Adhesion of cultured human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge, *Biomaterials* **8** (1987), 323-8.
- [174] L. Vroman, Effect of Adsorbed Proteins on Wettability of Hydrophilic and Hydrophobic Solids, *Nature* **196** (1962), 476-&.
- [175] E.R. Waelti, S.P. Inaebnit, H.P. Rast, T. Hunziker, A. Limat, L.R. Braathen and U. Wiesmann, Co-culture of human keratinocytes on post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells: production of large amounts of interleukin 6, *J Invest Dermatol* **98** (1992), 805-8.
- [176] L.S. Wan, Z.K. Xu, X.J. Huang, X.D. Huang and K. Yao, Cytocompatibility of poly(acrylonitrile-co-N-vinyl-2-pyrrolidone) membranes with human endothelial cells and macrophages, *Acta Biomater* **3** (2007), 183-90.
- [177] Y. Wang, G. Wang, X. Luo, J. Qiu and C. Tang, Substrate stiffness regulates the proliferation, migration, and differentiation of epidermal cells, *Burns* **38** (2011), 414-420.
- [178] F.M. Watt, Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation, *EMBO J* **21** (2002), 3919-26.
- [179] F.M. Watt and H. Green, Involucrin synthesis is correlated with cell size in human epidermal cultures, *J Cell Biol* **90** (1981), 738-42.
- [180] K. Webb, V. Hlady and P.A. Tresco, Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization, *J Biomed Mater Res* **41** (1998), 422-30.
- [181] J.H. Wei, M. Yoshinari, S. Takemoto, M. Hattori, E. Kawada, B.L. Liu and Y. Oda, Adhesion of mouse fibroblasts on hexamethyldisiloxane surfaces with wide range of wettability, *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* **81B** (2007), 66-75.
- [182] H. Wendt, A. Hillmer, K. Reimers, J.W. Kuehner, F. Schafer-Nolte, C. Allmeling, C. Kasper and P.M. Vogt, Artificial skin--culturing of different skin cell lines for

- generating an artificial skin substitute on cross-woven spider silk fibres, *PLoS ONE* **6** (2011), e21833.
- [183] S. Werner, T. Krieg and H. Smola, Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing, *J Invest Dermatol* **127** (2007), 998-1008.
- [184] A.D. Widgerow, Cellular/extracellular matrix cross-talk in scar evolution and control, *Wound Repair Regen* **19** (2011), 117-33.
- [185] D.F. Williams, On the mechanisms of biocompatibility, *Biomaterials* **29** (2008), 2941-53.
- [186] J.L. Wilmer, F.G. Burleson, F. Kayama, J. Kanno and M.I. Luster, Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin, *J Invest Dermatol* **102** (1994), 915-22.
- [187] G.D. Winter, Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig, *Nature* **193** (1962), 293-4.
- [188] D. Wolfram, A. Tzankov, P. Pulzl and H. Piza-Katzer, Hypertrophic scars and keloids--a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management, *Dermatol Surg* **35** (2009), 171-81.
- [189] T. Yeung, P.C. Georges, L.A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver and P.A. Janmey, Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion, *Cell Motil Cytoskeleton* **60** (2005), 24-34.
- [190] S.H. Yuspa, H. Hennings, R.W. Tucker, S. Jaken, A.E. Kilkenny and D.R. Roop, Signal transduction for proliferation and differentiation in keratinocytes, *Ann N Y Acad Sci* **548** (1988), 191-6.
- [191] Z. Zhang and B.B. Michniak-Kohn, Tissue Engineered Human Skin Equivalents, *Pharmaceutics* **4** (2012), 26-41.