

**ENTWICKLUNG EINER MATRIX ZUM STUDIUM
PHYSIOLOGISCHER HAUTFUNKTIONEN
IN-VITRO**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

**am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz**

CECILIA WELLING
geb. in Cuenca/Ecuador

Mainz 2001

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 12 Juni 2001

Gliederung

1	EINLEITUNG	1
1.1	AUFBAU DER HAUT.....	1
1.2	WUNDHEILUNG.....	2
1.2.1	Hämostase.....	3
1.2.2	Inflammatorische Phase.....	4
1.2.3	Proliferative Phase.....	5
1.2.4	Reparative Phase.....	6
1.3	BIOMATERIALIEN IN DER ENTWICKLUNG VON HAUTÄQUIVALENTEN	7
1.3.1	Gelatine als Biomaterial.....	8
1.3.2	Agar als Biomaterial.....	9
1.4	IN-VITRO UNTERSUCHUNGEN ZUR WUNDHEILUNG.....	10
1.5	EINFLUSS VON WUNDVERSORGUNGSPRODUKTEN AUF DIE WUNDHEILUNG.....	12
1.6	AUFGABENSTELLUNG.....	16
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	AUSWAHL GEEIGNETER BIOMATERIALIEN.....	18
2.1.1	Agar- und Gelatinelösungen verschiedener Rezepturen.....	18
2.1.2	Verfahren zur Herstellung von Folien.....	18
2.1.2.1	Beschreibung der Streichanlage.....	19
2.1.2.2	Folienherstellung.....	19
2.2	PHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG DER FOLIEN.....	20
2.2.1	Keimdichtigkeit.....	20
2.2.2	Wasserdampfdurchlässigkeit (Water Vapor Transmission Rate).....	21
2.2.3	Reißfestigkeit.....	23
2.2.4	Wassergehalt.....	24
2.2.5	Folienstärke.....	25
2.3	BIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER FOLIEN.....	25
2.3.1	Inkubation von Folien mit proteinhaltigen Lösungen.....	26
2.3.1.1	ELISA-Assays.....	27
2.3.1.1.1	ELISA-Assay gegen Albumin aus humanem Serum.....	28
2.3.1.1.2	ELISA-Assay gegen Fibronectin aus humanem Serum.....	29
2.3.1.1.3	Erstellung von Eichkurven.....	29
2.3.1.1.4	Berechnung der adsorbierten Menge an Protein an die Folienoberfläche	29

2.3.2	In-vitro Untersuchung zur Wundverklebung	30
2.3.3	Wechselwirkung der Folien mit Mausfibroblasten und Keratinozyten.....	32
2.3.3.1	Cytotoxizität der Folienextrakte	32
2.3.3.2	Cytotoxizität der Folien im direkten Kontakttest.....	34
2.4	VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON GELATINESCHÄUMEN.....	35
2.4.1	Vorversuche.....	35
2.4.1.1	Herstellung von Gelatineschäumen durch Lyophilisierung und thermische Vernetzung	35
2.4.1.2	Beimpfen der Gelatineschäume mit Mausfibroblasten.....	36
2.4.1.3	Färbung der Fibroblasten in den Gelatineschäume	37
2.4.2	Hauptversuche: chemische Vernetzung der Gelatineschäume mit EDAC.....	37
2.4.2.1	Vernetzung durch direkte Zugabe von EDAC in die Gelatinelösung.....	39
2.4.2.2	Vernetzung durch Anwendung einer EDAC-Lösung	40
2.4.3	Biologische Charakterisierung der mit EDAC vernetzten Gelatineschäume	40
2.4.3.1	Flüssigkeitsaufnahme und Quelleigenschaften.....	40
2.4.3.2	Herstellung von Gefrierschnitten zur Beurteilung der Porenstruktur	41
2.4.3.3	Überprüfung des Vernetzungsgrades durch Bestimmung des Gehaltes an freien Aminogruppen nach Reaktion der Schäume mit 2,4,6 Trinitrobenzoesäure.....	41
2.4.3.4	Enzymatische Degradation der Gelatineschäume	43
2.4.4	Gelatineschäume als Matrix für Humanfibroblasten.....	43
2.4.4.1	Kultivierung der Humanfibroblasten.....	43
2.4.4.2	Beimpfung der Gelatineschäume mit Humanfibroblasten	44
2.4.4.3	Bestimmung der Vitalität der Fibroblasten.....	45
2.4.4.4	Färbung der Fibroblasten in den Gelatineschäumen.....	47
2.4.4.5	Immunhistochemische Untersuchungen zur Proliferation von Fibroblasten..	47
2.5	ORIENTIERENDE VERSUCHE FÜR DEN AUFBAU EINES IN-VITRO TESTSYSTEMS	48
2.5.1	Aufbau einer geeigneten Testapparatur.....	48
2.5.2	Beschreibung und erste Anwendungen des in-vitro Testsystems	49
2.5.3	Vitalität der Fibroblasten nach Kontakt mit Testmaterialien.....	50
3	ERGEBNISSE.....	51
3.1	EINFLUSS DER REZEPTUR AUF PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN DER FOLIEN	51

3.1.1	Einfluß der Folienrezeptur auf die Keimdichtigkeit.....	51
3.1.2	Einfluß der Folienrezeptur auf die Wasserdampfdurchlässigkeit (WVTR)	51
3.1.3	Einfluß der Folienrezeptur auf die Reißfestigkeit.....	53
3.1.4	Einfluß der Folienrezeptur auf den Wassergehalt.....	55
3.1.5	Einfluß der Folienrezeptur auf die Folienstärke.....	56
3.1.6	Einfluß der Folienrezeptur auf das Flächengewicht.....	58
3.2	EINFLUß DER REZEPTUR AUF BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN DER FOLIEN	59
3.2.1	Ergebnisse zur Wechselwirkung von Folien mit proteinhaltigen Lösungen.....	59
3.2.1.1	Einfluß der PBS-Folienextrakte auf den Albumin ELISA-Assay.....	59
3.2.1.2	Ergebnisse zur Adsorption von Albumin aus humanem Serum.....	62
3.2.1.3	Einfluß der PBS-Folienextrakte auf den Fibronectin ELISA-Assay.....	63
3.2.1.4	Ergebnisse zur Adsorption von Fibronectin aus humanem Serum.....	64
3.2.2	Ergebnisse zur Wundverklebung in-vitro	66
3.2.3	Ergebnisse zur Wechselwirkung mit Mausfibroblasten und Keratinozyten	66
3.2.3.1	Cytotoxizität von Folienextrakten.....	66
3.2.3.2	Cytotoxizität der Folien im direkten Kontakttest mit Mausfibroblasten und Keratinozyten	67
3.3	VORVERSUCHE: HERSTELLUNG VON GELATINESCHÄUMEN.....	68
3.4	HAUPTVERSUCHE: VERNETZUNG DER GELATINESCHÄUME MIT EDAC .	68
3.4.1	Ergebnisse zur chemischen Charakterisierung der Vernetzung.....	69
3.4.2	Einfluß des Vernetzungsgrades auf die Flüssigkeitsaufnahme und die Quelleigenschaften der Gelatineschäume	71
3.4.3	Einfluß der Vernetzerkonzentration auf die Porenstruktur	73
3.4.4	Einfluß des Vernetzungsgrades auf den enzymatischen Abbau.....	77
3.5	ERGEBNISSE DER BESIEDLUNG VON GELATINESCHÄUMEN MIT HUMANFIBROBLASTEN.....	79
3.5.1	Zeitliche Entwicklung der Fibroblasten auf den Gelatineschäumen.....	79
3.5.2	Gefrierschnitte der mit Hemacolor gefärbten Gelatineschäume	87
3.5.3	Immunhistochemie: Untersuchung zur Proliferation der Fibroblasten mit Hilfe des Antikörpers gegen Ki - 67.....	91
3.6	ANWENDUNG DES IN-VITRO TESTSYSTEMS	94
3.6.1	Methodische Evaluierung.....	94

3.6.2	Zeitliche Entwicklung der Fibroblasten auf Gelatineschäumen mit und ohne Kontakt mit einem Testmaterial.....	95
4	DISKUSSION.....	101
4.1	Auswahl von Biomaterialien und Herstellung von Folien.....	101
4.2	Physikalische Eigenschaften der Folien	103
4.3	Interaktion der Folien mit biologischen Flüssigkeiten und Hautzellen.....	108
4.4	Herstellung von Gelatineschäumen mit und ohne chemische Vernetzung.....	112
4.5	Besiedlung vernetzter Gelatineschäume mit humanen Fibroblasten.....	118
4.6	Eignung der Gelatineschäume als dermale Äquivalente für ein in-vitro Testsystem.	122
5	ZUSAMMENFASSUNG	126
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	128

1 EINLEITUNG

1.1 AUFBAU DER HAUT

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers und bildet eine zusammenhängende äußere Oberfläche. Die Haut erfüllt zahlreiche Funktionen wie z.B.: Schutz vor mechanischen, thermischen und chemischen Schäden; Schutz vor dem Einwirken von Keimen durch Ausbildung des Säureschutzmantels; Abwehr von eindringenden Mikroorganismen; Sinnesorgan für Berührung, Druck, Schmerz und Temperatur; Wärmeregulation und Steuerung des Stoffwechsels durch die im Unterhautfettgewebe befindlichen Triglyceride, die den größten Energiespeicher des menschlichen Organismus darstellen. Die Haut (Cutis) besteht von außen nach innen aus drei Schichten: Oberhaut oder Epidermis, Lederhaut oder Dermis (Corium) und Unterhaut oder Subcutis (Übersicht bei WHEATER et al., 1987).

Die Epidermis ist im Durchschnitt bis zu 0,2 mm dick. Sie besteht aus fünf unterschiedlichen Schichten: Hornschicht (Stratum corneum), Glanzschicht (Stratum lucidum), Körnerschicht (Stratum granulosum), Stachelschicht (Stratum spinosum) und Basalschicht (Stratum basale).

Charakteristisch für die Zellen der Basalschicht ist, dass sie teilungsfähig sind und als Nachschub für abgestorbene, abgestoßenen Zellen der Hornschicht dienen. Die Zellen der Basalschicht haben eine kubische Form und werden, sobald sie ihre Migration in Richtung Hornschicht beginnen, flacher, differenzieren und akkumulieren immer größere Mengen an Keratin. Aus diesem Grund werden epidermale Zellen Keratinozyten genannt. Sind die Keratinozyten im oberen Teil des Stratum spinosum angelangt, bilden sie Keratohyalinkörner, die später zerfließen und dann die Lipidbasis der Hornschicht bilden.

Außer den Keratinozyten, bilden insbesondere Melanozyten und Langerhans Zellen weitere Zellkomponenten der Epidermis (Übersicht bei LEIGH et al. , 1994).

Die Dermis besteht aus zwei Schichten: Zapfenschicht (Stratum papillare) und Netzschicht (Stratum reticulare). Die Zapfenschicht und die Epidermis sind durch die Basalmembran eng miteinander verbunden. Die Basalmembran ist etwa 100 nm dick und besteht aus zwei Schichten: Lamina lucida und Lamina densa. Die Lamina lucida ist reich an Laminin und ist mit den Keratinozyten der Basalschicht durch Hemidesmosomen eng verbunden. Die Lamina densa ist reich an Kollagen Typ IV. Eine Verbindung der Dermis mit der Lamina densa der Basalmembran entsteht u.a. durch ca. 800 nm lange fibrilläre Verankerungen aus Kollagen

Typ VII. Die Zapfenschicht der Dermis besteht aus bindegewebigen Papillen, die von feinen Kapillarschlingen durchzogen werden. In dieser Schicht befinden sich initiale Lymphgefäße und freie Nervenendigungen. Die Netzschicht der Dermis ist aufgebaut aus einem dichten, wohlgeordneten Netz aus Kollagenfasern des Typs I, II und IV und aus dazwischen liegenden Fasern aus Elastin (Übersicht bei WHEATER et al., 1987).

Die Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix der Dermis sind die faserbildenden Kollagene des Typs I, II und V. Die amorphe Grundsubstanz, die den Raum zwischen den zellulären Komponenten der Dermis und den Kollagenfasern füllt, besteht aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und gebundenem Wasser. Glycosaminoglycane wie Hyaluronat, Chondroitinsulfat und Keratansulfat interagieren mit dem Kollagen.

Fibronectin und Laminin sind die wichtigsten Glycoproteine der extrazellulären Matrix. Fibronectin ist ein langgestrecktes Protein mit einer linearen Anordnung an Domänen, von denen jede in spezifischer Weise bestimmte Moleküle wie z.B. Kollagen, Proteoglycane und Zell-Oberflächen-Rezeptoren binden kann. Das Laminin besitzt eine hohe Affinität zum Kollagen Typ IV der Basalmembran (Übersicht bei HAY, 1991). Außer den eingebetteten Haarfollikeln, Talg- und Schweißdrüsen, befinden sich in der Dermis Fibroblasten, Makrophagen, Mastzellen, Lymphozyten, Monozyten und T Zellen.

Die Unterhaut oder Subcutis befindet sich unterhalb der Dermis und besteht aus einem lockeren Bindegewebe, welches von Faserzügen durchzogen wird, die der Verankerung der Subcutis an der darunterliegenden Faszie oder Knochenhaut dienen. Im Bindegewebe der Subcutis sind die Fettpolster eingelagert.

1.2 WUNDHEILUNG

Wenn die Haut durch Trennung der Gewebe ihre normale Architektur verliert, spricht man im Allgemeinen von einer Wunde. Die Wundheilung stellt die Einheit des Gewebes wieder her. Die Wundheilung ist ein dynamischer, interaktiver Prozess, der in vier zeitlich sich überlappende Phasen unterteilt werden kann: die Phase der Hämostase, die inflammatorische Phase, die proliferative Phase und die reparative Phase. Der Ablauf der einzelnen Phasen wird gesteuert durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren und Cytokine, deren genaue Wechselwirkung noch nicht vollständig geklärt ist und die derzeit intensiv erforscht wird (Übersicht bei COHEN et al., 1992; CLARK, 1996; LAWRENCE, 1998; ARUMUGAM et al., 1999; SINGER und CLARK, 1999).

1.2.1 Hämostase

Die Entstehung einer Wunde zerstört die Integrität von Gewebe und Gefäßen, wobei das Endothel der Gefäße beschädigt, die Kollagenfasern des Subendothels freigelegt und von den Thrombozyten als Fremdoberfläche erkannt werden. Es folgt eine Adhäsion der Thrombozyten an den im Subendothel gebundenen von Willebrand-Faktor. Hierzu dient der GIIb-Rezeptor, ein an der Thrombozyten-Membran gebundenes Glycoprotein. Mehrere adhärierte Thrombozyten treten zusammen, aggregieren und bilden dann einen ersten provisorischen Wundverschluss (WAHL und WAHL, 1992).

Fast gleichzeitig zur Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten wird die Blutgerinnung eingeleitet. An der Blutgerinnung sind 13 Gerinnungsfaktoren beteiligt. Diese liegen in einer Vorstufe als inaktive Proenzyme oder Zymogene vor und werden mit römischen Ziffern I bis XIII bezeichnet. Nach der Zymogen-Aktivierung bewirkt der jeweils aktivierte Faktor kaskadenförmig die Aktivierung des nächsten Faktors.

Eine Aktivierung der Gerinnungskaskade kann über das endogene oder über das exogene System erfolgen, wobei die gemeinsame Endstufe beider Gerinnungssysteme die Bildung des Faktor Xa Komplexes ist. Dieser Komplex wirkt auf Prothrombin (Faktor II) ein und bewirkt dessen Umwandlung in den aktiven Faktor IIa oder Thrombin (RUGGERI, 1997).

Das endogene Gerinnungssystem wird nach Aktivierung des Gerinnungsfaktors XII (Hageman-Faktor) durch die nach einer Verletzung freigestellte Kollagenoberfläche des Subendothels eingeleitet. Der Faktor XII durchläuft eine Konformationsänderung und wird durch weitere Einwirkung des im Plasma vorhandenen Kallikreins und des hochmolekularen Kininogens zu dem Faktor XIIa aktiviert. Kaskadenförmig wird nun das endogene Gerinnungssystem über die Faktoren XI, IX, VIII und X bis zur Bildung des Faktor Xa-Komplexes aktiviert.

Das exogene Gerinnungssystem wird durch das nach einer Verletzung freigesetzte Gewebsthromboplastin eingeleitet. Dies bewirkt eine Aktivierung des Faktors VII zu VIIa, welcher mit Calcium-Ionen und der Gewebsthrombokinasen (Faktor II) einen Komplex bildet, der im weiteren Verlauf die Bildung des Faktor Xa-Komplexes induziert.

Die gemeinsame Endstufe der endogenen und exogenen Gerinnungskaskade ist die Bildung eines Fibringerinnsels über eine Umwandlung von Fibrinogen in vernetztes Fibrin durch die Faktoren IIa (Thrombin) und XIIIa. Hierdurch wird der durch Thrombozyten-Aggregation gebildete erste Wundverschluss stabilisiert (BODY, 1996).

1.2.2 Inflammatorische Phase

In der inflammatorischen Phase der Wundheilung weiten sich die Kapillaren und werden durchlässiger. Dies ermöglicht den Eintritt von Leukozyten, Neutrophilen und Makrophagen in das Wundgebiet. Aus den α -Granula von aggregierenden Thrombozyten werden eine Reihe von Mediatoren ausgeschüttet. Einige dieser Mediatoren, wie die Adhäsionsproteine Fibronectin, Fibrinogen, Thrombospondin und von Willebrand-Faktor VIII, dienen der weiteren Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten. Dies geschieht über die GpIIb und GpIIIa Rezeptoren. Andere Mediatoren, wie die Wachstumsfaktoren *platelet derived growth factor* (PDGF), *epidermal growth factor* (EGF), *insulin-like growth factor-I* (IGF-I) und *transforming growth factor β* (TGF- β) wirken chemotaktisch auf Fibroblasten, die dann in das Wundgebiet migrieren. Zusätzlich wird von den beschädigten Endothelzellen *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) ausgeschüttet, welcher zusammen mit dem von den Thrombozyten ausgeschütteten TGF- β zu einer verstärkten Einwanderung von inflammatorischen Leukozyten in das Wundgebiet führt (SINGER und CLARK, 1999; LAWRENCE, 1998).

In der inflammatorischen Phase findet auch eine unspezifische Immunabwehr über eine Aktivierung des Komplementsystems statt. Das Komplementsystem besteht aus ungefähr 20 Proteinen. Einige Bestandteile des Komplementsystems werden durch den Buchstaben C und eine nachfolgenden Ziffer gekennzeichnet. Den mengenmäßig überwiegenden Anteil bildet der Komplementfaktor C3. Dieser Faktor kann die Komplementbindungsreaktion durch seine Spaltung in Gang setzen. Hat der Hagemann Faktor XII einmal die Blutgerinnung eingeleitet, wird der Komplementfaktor C3 in kleinere Peptide C5a und C3a gespalten. Diese wirken gefäßerweiternd und locken Neutrophile und Monozyten in das Wundgebiet. Außerdem wirken die Spaltprodukte C5a und C3a stimulierend auf Mastzellen, Neutrophile und Makrophagen, so dass eine Reihe von Faktoren freigesetzt werden, die gefäßerweiternd und wundreinigend wirken (YANCEY et al., 1985).

Auch Makrophagen werden in der frühen inflammatorischen Phase I in das Wundgebiet angelockt und dienen der Wundreinigung durch Ausschüttung von proteolytischen Enzymen wie die Elastase, Kollagenase und das Kathepsin B. Makrophagen sind zusätzlich die Hauptproduzenten von inflammatorischen Zytokinen wie *Interleukin-1* (IL-1) und TNF- α und Wachstumsfaktoren wie *basic fibroblast growth factor* (bFGF), EGF, PDGF, TGF- β und *colony stimulating factor* (CSF). Diese üben eine Steuerungsfunktion bei der Neubildung des

Bindegewebes und bei der Proliferation von Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen aus.

Die vermehrte Proliferation von Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen führt zu einem Übergang in die proliferative Phase der Wundheilung.

1.2.3 Proliferative Phase

In der proliferativen Phase wird das Granulationsgewebe aufgebaut und die Epithelisierung beginnt. Außerdem findet in dieser Phase die Gefäßneubildung oder Angiogenese statt.

Die in der inflammatorischen Phase gebildeten Thromben dienen als provisorische extrazelluläre Matrix und als Leitschiene für eine Einwanderung von Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen in das Wundgebiet (POSTLETHWAITE et al., 1981).

Die eingewanderten Fibroblasten synthetisieren große Mengen an Kollagen Typ III, Kollagen Typ I, Elastin und Hyaluronsäure. Das Kollagen wird über mehrere Stufen synthetisiert und ist entscheidend für die Stabilität des neu gebildeten Gewebes. Die Kollagenfasern liegen in der proliferativen Phase noch in einem recht ungeordnetem Zustand vor. Ihre endgültige Anordnung erfolgt erst in der letzten Phase der Wundheilung. Das Elastin und die Hyaluronsäure bilden die Hauptbestandteile des Granulationsgewebes. Das Elastin, ein extrem hydrophobes Protein, verleiht dem Granulationsgewebe elastische Eigenschaften. Die Hyaluronsäure, ein Polysaccharid, nimmt große Mengen an Wasser auf, was zu einer Quellung des Granulationsgewebes führt und die Zellmigration begünstigt.

Die Bildung des Granulationsgewebes geht mit einem Abbau der Fibringerinnsel durch Umwandlung des Plasminogen zu Plasmin und dadurch einsetzender Fibrinolyse einher. Die Degradationsprodukte des Fibrins und des Fibronectins wirken chemotaktisch auf Fibroblasten (STIRK et al., 1996).

Während der Bildung des Granulationsgewebes differenzieren sich speziell die am Wundrand befindlichen Fibroblasten zu Myofibroblasten durch Bildung von kontraktilen Aktinfilamenten. Myofibroblasten ähneln den Zellen der glatten Muskulatur. Die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten setzen die Vorgänge der Wundkontraktion und der Narbenbildung in Gang (GABBIANI et al., 1971). Der Kontakt zwischen den Myofibroblasten und den Kollagenfasern erfolgt durch Pseudopodien. Durch Kontraktion der Aktinfilamente der Myofibroblasten zieht sich das Gewebe zusammen, die Kollagenfasern werden aufgerichtet und die Wundfläche verkleinert.

Das neu gebildete Granulationsgewebe wird durch die Gefäße mit Nährstoffen versorgt, die im Wundgebiet während der Angiogenese gebildet werden. Die Angiogenese ist ein

komplizierter Prozess, dessen Verlauf bis heute noch nicht vollständig geklärt ist. Die Präsenz von Makrophagen im Wundgebiet ist essentiell für den Ablauf der Angiogenese. Die Makrophagen dienen unter anderem als Hautproduzenten von Wachstumsfaktoren, Cytokinen und proteolytischen Enzymen, die den Vorgang der Angiogenese steuern (HUNT et al, 1984). TGF- β , *basic fibroblast growth factor* (bFGF), EGF und *granulocyte macrophage-colony-stimulating factor* (GM-CSF) sind die wichtigsten Wachstumsfaktoren, die den Vorgang der Angiogenese steuern. Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen und Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie Fibrin, Fibronectin und die Hyaluronsäure sind weitere Einflussfaktoren der Angiogenese (CLARK, 1993; IRUELA-ARISPE und DVORAK, 1997). Während der Angiogenese werden Endothelzellen der Mikrogefäße aktiviert. Die aktivierten Endothelzellen bauen durch Ausschüttung von proteolytischen Enzymen die Basalmembran ab, migrieren in das Wundgebiet und nach erfolgter Teilung bilden sie tubenförmige Gebilde aus, die dann zu Venolen oder Arteriolen differenzieren.

Die Epithelisierung beginnt bereits einige Stunden nach dem Entstehen einer Verwundung (WINTER, 1964). Die am Wundrand befindlichen Keratinozyten beginnen in Richtung auf das Wundgebiet zu migrieren. Voraussetzung hierfür ist eine Auflösung der Desmosomen, die die Keratinozyten in ihrem Verband halten. Die gelösten Keratinozyten migrieren, indem sie sich über Integrine an die im Wundgrund befindlichen Plasmaproteine Fibronectin und Vitronectin binden. Wachstumsfaktoren wie das EGF, *transforming growth faktor- α* (TGF- α), das EGF, *keratinocyte growth factor* (KGF) und das IL-1 steuern die weitere Migration und Proliferation der Keratinozyten (STENN und MALHOTRA, 1992; WOODLEY, 1996). Ein Fortschreiten der Epithelisierung geht mit einer Neubildung der Basalmembran einher, mit der die Keratinozyten, über sich neu bildende Hemidesmosomen, einen festen Verbund eingehen. Die Neubildung der Basalmembran ist ein komplizierter Vorgang, der einer Steuerung durch Cytokine, wie das IL-1, und Wachstumsfaktoren, wie TGF- β , unterliegt. Eine Verbindung zu dem darunterliegenden, neu gebildeten, dermalen Gewebe wird über Kollagenfibrillen des Typs VII hergestellt (UITTO et al., 1996).

1.2.4 Reparative Phase

Die reparative Phase ist die letzte und längste Phase der Wundheilung. In dieser Phase finden durch Einwirkung von Proteasen vorläufige oder permanente Umbildungen der Architektur der extrazellulären Matrix statt (MIGNATTI et al., 1996). Die Produktion von Enzymen wird durch Keratinozyten, Makrophagen und Fibroblasten angeregt. Der Abbau des Fibronectins

durch Proteasen und der Hyaluronsäure durch Hyaluronidase wird eingeleitet. Die reifen Fibroblasten beginnen mit der Produktion von Proteoglykanen, wie Chondroitin-4-sulfat und Dermatansulfat, die dem Bindegewebe eine wesentlich größere Stabilität verleihen. Zeitgleich wird die Proliferation von Fibroblasten herunterreguliert.

In dieser Phase findet ein intensiver Auf- und Abbau von Kollagensträngen statt. Der Abbau wird gesteuert durch spezielle Proteasen, die Matrixmetalloproteasen (MMP's), die von den Fibroblasten, Makrophagen und Keratinozyten sezerniert werden. Der Abbau der Kollagenstränge des Typs I, II, XIII und X erfolgt durch die interstitielle Kollagenase (MMP-1). Die Gelatinase (MMP-2) baut denaturierte Kollagenstränge und Kollagenstränge des Typs IV und V ab. Kollagen des Typs II, IV, V, VII, IX, Proteoglycane und Glykoproteine werden durch Stromelysin (MMP-3) abgebaut. Die Struktur des neu gebildeten Gewebes wird maßgeblich durch die Einhaltung einer wohlgeordneten zeitlichen Sequenz in der Aktivierung der verschiedenen MMP's beeinflusst (ARUMUGAM et al., 1999). Die Aktivität der Matrixmetalloproteasen wird durch spezielle Inhibitoren, die *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP's) reguliert. Der Gehalt an MMP's und TIMP's in der Wundflüssigkeit unterliegt einem feinem Gleichgewicht. Wird dieses Gleichgewicht ungünstig verschoben, treten Störungen im Verlauf der Wundheilung auf (VAALAMO et al., 1999).

Mit Fortschreiten der reparativen Phase verdicken sich die Kollagenstränge und reihen sich zu geordneten Strukturen an, die Menge an Proteoglycanen in der extrazellulären Matrix nähert sich dem ursprünglichen Gehalt und die Basalmembran geht wieder eine Verbindung mit der Dermis ein.

Zusätzlich findet in dieser Phase eine Reifung der Neoepidermis statt. Die reparative Phase endet mit der Bildung einer Narbe. Dieser Prozess kann je nach Art und Schwere der Verwundung bis zu 2 Jahre dauern (LAWRENCE, 1998; SINGER et al., 1999).

1.3 BIOMATERIALIEN IN DER ENTWICKLUNG VON HAUTÄQUIVALENTEN

Die Herstellung von Hautäquivalenten, die alle Komponenten und Funktionen intakter Haut beinhalten, ist bis heute trotz weltweiter intensiver Forschungsarbeiten noch nicht gelungen. Neue Techniken in der Zellkultur, die eine Kultivierung von Hautzellen ermöglichen, und die Konzipierung geeigneter Biomaterialien, auf denen die kultivierten Hautzellen adhären, migrieren, proliferieren und differenzieren können, bilden die Grundlage für die Entwicklung von Hautäquivalenten. Grundsätzlich können unterschieden werden: *epidermale Äquivalente*

(Nachstellung der Epidermis), *dermale Äquivalente* (Nachstellung der Dermis) und *künstliche Haut* (mehrschichtige Nachstellung der Epidermis und Dermis).

Folgende Begriffe werden verwendet, um die Herkunft von Hautzellen, die in einem Hautäquivalent enthalten sein können, zu charakterisieren: *Autograft* (Zellen verschiedener Körperteile eines gleichen Individuums), *Allograft* (Zellen verschiedener Individuen der gleichen Spezies) und *Xenograft* (Zellen verschiedener Spezies, meistens Mensch und Schwein).

Biomaterialien wurden 1987 von WILLIAMS wie folgt definiert: „*A biomaterial is any material intended to interact with biological systems to evaluate, treat, augment or replace any tissue, organ or function in the body.*“

Biomaterialien, die zur Herstellung von Hautäquivalenten verwendet werden, zeichnen sich durch bestimmte physikalische, chemische und biologische Eigenschaften aus (TAVIES et al., 1978; DAVIES 1983). Diese Eigenschaften beeinflussen die Wechselwirkung zwischen dem Biomaterial und einzelnen Bestandteilen von Körperflüssigkeiten wie Blut, Plasma oder Serum. So kann z.B. die Affinität eines Biomaterials mit einzelnen Blutproteinen, die die Zelladhäsion vermitteln, zu einem direkten Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen dem Material und Hautzellen wie z.B. Fibroblasten und Keratinozyten führen (HUBBELL, 1995; STOCUM, 1998).

1.3.1 Gelatine als Biomaterial

Kollagen ist das für die Herstellung von Hautäquivalenten am meisten verwendete Biomaterial (PACHENCE, 1996). Durch thermische und chemische Hydrolyse von Kollagen wird Gelatine hergestellt. Gelatine besitzt gegenüber Kollagen veränderte physikalische und chemische Eigenschaften, wie z.B. den Geliereffekt und die Löslichkeit in warmen Wasser. In der Pharmazie wird Gelatine für die Herstellung von Kapseln verwendet, die als Schutz der Arzneimittel vor Licht und Luft dienen und gleichzeitig eine angenehme Darreichungsform darstellen. In der Medizin wird Gelatine in gelöster Form als Blut-Ersatzmittel oder als Plasma-Expander verwendet (SCHWICK et al., 1962).

Gelatine kann auch zur Herstellung von Produkten für die Versorgung von Wunden verwendet werden. Als modifiziertes Kollagen übt die Gelatine einen direkten Einfluss auf die Blutgerinnung aus. SCHROEDER et al. (1982) berichteten im Rahmen einer Tierstudie an

Ratten über den blutstillenden Einfluss des Gelatineschaums *Spongostan*. GUNDERSEN (1980) und PETERSEN et al. (1984) stellten gleiches, nach chirurgischen Eingriffen an Menschen fest. Ein in Form von Spray hergestellter Gelatineschaum, vernetzt mit Glutaraldehyd und mit Glycerin als Weichmacher, wurde von NEUMANN et al. (1981) beschrieben und für die Behandlung von tiefen infizierten Wunden empfohlen.

In Kombination mit anderen Materialien eignet sich vernetzte Gelatine für die Herstellung von mehrschichtigen Produkten, die dann als Hautersatz bei der Abdeckung von Verbrennungswunden verwendet werden können. KIM et al. (1987) beschichteten einen Gelatine-Polyvinylalkohol Schaum mit einem Polyurethan-Film, YOSHIZATO et al. (1994) kombinierten einen mit Glycerol-Polyglycidyl-Ether vernetzten Gelatinefilm mit einem Gelatineschaum und KOIDE et al. (1993) vernetzten Gelatineschäume mit Hexamethylendiisocyanat (HDI) und beschichteten diese mit Kollagen.

TABATA und IKADA (1987) stellten Mikrokapseln aus Gelatine her und dotierten sie mit immunmodulierenden Substanzen, wie z.B. Muramyl-Dipeptid und Interferon. Anschließend Untersuchungen zur Abgaberate und über die Wirksamkeit der Substanzen nach Phagozytierung der Kapseln durch Makrophagen konnten zeigen, dass Gelatine als Träger für biologisch aktive Stoffe geeignet ist (TABATA und IKADA, 1989). Weitere Untersuchungen zeigten, dass nicht nur Kapseln sondern auch Filme aus Gelatine oder Dextran-Gelatine mit Insulin (SHINDE und ERHAN, 1992) oder dem Wachstumsfaktor EGF (DRAYE et al., 1998) dotiert werden können.

CHOI et al. (1999) vernetzten Gelatine-Alginat- und Gelatine-Hyaluronat-Schäume mit EDAC und imprägnierten diese mit Silber Sulfadiazin (AgSD). Anschließend wurde die antibiotische Wirkung des abgegebenen Sulfadiazins auf den Verlauf der Wundheilung in einer Tierstudie an Ratten untersucht.

Dass Gelatine auch als Matrix für Zellen geeignet ist, konnten ALKANKOV et al. (1991) zeigen. Sie stellten Mikrokapseln aus Gelatine her, beschichteten diese mit Kollagen Typ I und untersuchten anschließend die Adhäsion von Vero-Zellen an die Mikrokapseln.

1.3.2 Agar als Biomaterial

Agar ist ein Gemisch aus Agarose und Agaropektin und wird aus der Zellwand bestimmter Rotalgenarten (*Gelidium* und *Gracilaria*) hergestellt. Das Agarpulver ist leicht in warmem

Wasser löslich und hat seine Hauptanwendung bei der Herstellung von Nährböden in der Mikrobiologie.

Die Anwendung von Agar zur Herstellung von Hautäquivalenten ist in der Literatur nur spärlich beschrieben. Bekannt ist das Produkt *Geliperm[®]*, ein synthetisches Produkt für die Wundversorgung, welches ein Gemisch aus Polyacrylamid und Agar darstellt. Die chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften von *Geliperm[®]* wurden von mehreren Autoren untersucht und als ideal für eine Anwendung in der Wundversorgung beschrieben (KICKHÖFEN et al., 1986; NANGIA et al., 1990). Insbesondere durch seine hydrogel-artigen Eigenschaften wird *Geliperm Dry[®]* für eine kombinierte Behandlung von Verbrennungswunden mit lokaler Zugabe von Antibiotika empfohlen (von CASTELBERG et al., 1985).

1.4 IN-VITRO UNTERSUCHUNGEN ZUR WUNDHEILUNG

Hautäquivalente können in in-vitro Testsystemen als Ersatz für die Dermis, Epidermis oder Haut angewendet werden. Sie dienen dabei als organotypisches Modell und können bei der Erforschung einzelner Vorgänge der Wundheilung eingesetzt werden.

Das von BELL et al. (1983) entwickelte Verfahren zur Herstellung einer mehrschichtigen künstlichen Haut ist das erste Modell, welches in der Literatur beschrieben wurde. Hierbei werden allogene Fibroblasten in einer Matrix aus Rinderkollagen Typ I (=dermale Komponente) und anschließend Keratinozyten auf der Oberfläche dieser Matrix (= epidermale Komponente) kultiviert. Die von BELL et al. entwickelte künstliche Haut wurde als Produkt unter den Namen *Apligraf[®]* für die Versorgung von akuten und chronischen Wunden erfolgreich angewendet (KIRSNER et al., 1998).

Apligraf[®] wurde dann leicht modifiziert und als in-vitro Testsystem unter den Namen *TESTSKIN[®]* auf den Markt gebracht. *TESTSKIN[®]* wird als Living Skin Equivalent (LSE) bezeichnet, wenn sowohl die dermale als auch die epidermale Komponente der Haut nachgestellt wird, und als Living Dermal Equivalent (LDE) bei Nachstellung der dermalen Komponente. Durch Anwendung von *TESTSKIN[®]* konnten spezielle Fragestellungen zu Hautkrankheiten wie Psoriasis in-vitro untersucht werden. SAIAG und BELL (1985) demonstrierten, dass psoriatische Fibroblasten eine Hyperproliferation von Keratinozyten induzierten. KONSTANTINOVA et al. (1996) bestätigten diese Ergebnisse und führten die Hyperproliferation der Keratinozyten auf eine vermehrte Ausschüttung von Interleukin-8 durch die psoriatischen Fibroblasten zurück.

COULOMB et al., (1984) verwendeten das von BELL et al., (1983) entwickelte Modell, um Vorgänge wie die Kollagensynthese und die Wundkontraktion durch Fibroblasten sowie die Produktion von Peroxidasen als Marker für die Differenzierung von Fibroblasten zu untersuchen.

LASKA et al. (1992) und GAY et al. (1992) konnten außerdem zeigen, dass *TESTSKIN*[®] eine geeignete in-vitro Alternative zu in-vivo Irritationsstudien ist.

Die Entdeckung von Biomaterialien, wie dem Polyglactin-910, führte zur Konzeption dermalen Äquivalente auf Basis von resorbierbaren Biomaterialien. HANSBROUGH et al. (1989) entwickelten *Dermagraft*, eine Matrix aus Polyglactin-910, in der Fibroblasten kultiviert werden können. Bei Anwendung in der Versorgung von schwer heilenden Wunden migrieren Fibroblasten aus der Wunde in die Matrix und nach einiger Zeit beginnen sie mit der Produktion von Kollagenasen, so dass das Polyglactin-910 abgebaut wird (HANSBROUGH et al. 1998). *Dermagraft* wurde unter dem Namen *Skin*² als Testkit für in-vitro Forschungszwecke auf dem Markt gebracht. BOWERS et al. verwendeten 1999 *Skin*² in einer in-vitro Studie zum Thema Mediatoren der Wundheilung. In dieser Studie wurde untersucht, welcher Grad an Temperaturerhöhung benötigt wird, um eine Produktion von inflammatorischen Cytokinen (Interleukine und Prostaglandine) in Fibroblasten und Keratinozyten zu induzieren.

AUGUSTIN et al. (1997) entwickelten ein Hautäquivalent bestehend aus einem Kollagen/Glycosaminoglycan/Chitosan-Schaum mit humanen Fibroblasten, auf dem Keratinozyten kultiviert wurden. Sie verwendeten dieses System, um die Wirkung eines aus der Milch gewonnenen Biopeptids auf die Alterung von Fibroblasten und Keratinozyten in-vitro zu untersuchen.

Auch der Vorgang der Reepithelisierung kann in-vitro untersucht werden. GRANDO et al. (1993) zeigten an einem relativ einfachen Modell zeigten, dass die Migration von Keratinozyten unter einer Agaroseschicht beobachtet werden kann. Ein weitaus komplizierteres in-vitro Modell zur Untersuchung der Reepithelisierung wurde von MOLL et al. (1998) entwickelt. Frisch präparierte Hautbiopsien wurden epidermal verwundet und anschließend unter Luftexposition weiter kultiviert. Unter Anwendung von Markern wurde die Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten und die Bildung eines neuen Epithels bewertet.

In-vitro Untersuchungen von STEPHENS et al. (1996) zur Migration und Proliferation von Fibroblasten und Keratinozyten dienten der Nachstellung der in der proliferativen Phase und der Reepithelisierung stattfindenden Vorgänge. Hautäquivalente aus einem Kollagen-Gel mit Fibroblasten und einer Schicht Keratinozyten auf der Oberfläche wurden mit kreisrunden Ausstanzungen beschädigt (= in-vitro Wunde) und auf einem anderen Kollagen-Gel ohne Fibroblasten platziert. Morphologische Untersuchungen zur Migration der Fibroblasten und Keratinozyten, auch nach Zusatz der Wachstumsfaktoren EGF und PDGF, dienten dabei als Bewertungskriterien.

Auch die Wundkontraktion kann in-vitro untersucht werden. Durch Anwendung eines dermalen Äquivalents bestehend aus einem Kollagen-Gel mit verschiedenen Fibroblasten konnten MOULIN et al. (1996) und BERTHOD und AUGER (1997) zeigen, dass Fibroblasten, die aus einer Wunde stammen, im Vergleich zu normalen Fibroblasten einen größeren Anteil an Aktin-Filamenten besitzen und somit eine stärkere Kontraktion des Kollagen-Gels verursachen.

Auch besondere Formen der Narbenbildung, wie die Keloide, sind Gegenstand von in-vitro Untersuchungen. CALDERON et al. (1996) berichteten, dass Fibroblasten, die aus Keloiden stammten, gegenüber normalen Fibroblasten eine deutlich vermehrte Proliferation bei Kultivierung in-vitro zeigen.

1.5 EINFLUSS VON WUNDVERSORGUNGSPRODUKTEN AUF DIE WUNDHEILUNG

WINTER und SCALES (1963) konnten nachweisen, dass nach Behandlung von oberflächlichen Wunden am Schwein mit semipermeablen Verbänden die Reepithelisierung schneller verlief als bei einer trockenen Wundbehandlung. ODLAND und ROSS (1968) beschrieben erstmalig, dass der Verlauf der Wundheilung durch die Art der Wundversorgung beeinflusst werden kann. Sie konnten beobachten, dass wenn die bei einer Verwundung entstandene Hautblase intakt blieb, die Wundheilung schneller verlief, als wenn diese Hautblase beschädigt wurde.

Sowohl unter einer Hautblase wie auch unter einer semipermeablen Wundaufgabe wird ein feuchtes Wundklima aufgebaut und die Bildung von Schorf verhindert. Hierdurch wird die Migration der Keratinozyten erleichtert und die Bildung eines neuen Epithels beschleunigt

(WINTER, 1971). Zusätzlich wird die Bildung des Granulationsgewebes unter diesen Bedingungen stimuliert (DYSON et al., 1988).

Die von WINTER (1971) beschriebenen Vorteile der feuchten Wundbehandlung durch Anwendung von semipermeablen Wundauflagen revolutionierte nicht nur die Behandlungsmethoden in der Medizin, sondern gab auch neue Impulse in der Entwicklung von neuartigen Wundauflagen durch die Industrie. Es wurden Anforderungen definiert, die eine ideale Wundauflage für die feuchte Wundbehandlung erfüllen sollte (TURNER, 1979). Hierzu gehören die Erhaltung eines feuchten Wundklimas, die Entfernung von überschüssiger Wundflüssigkeit, der Gasaustausch mit der Umwelt, Schutz vor Wärme und Kälte, Keimdichtigkeit und ein atraumatischer Verbandswechsel.

Die feuchte Wundversorgung von akuten und chronischen Wunden wird ermöglicht durch Anwendung der unterschiedlichsten Produkte. Diese können, je nach Art der Zusammensetzung und nach Komplexität ihres Aufbaus, in Gruppen unterteilt werden. Es können semipermeable Folien, Polymer-Schäume, Hydrokolloide, Hydrogele und andere unterschieden werden. Jedes dieser Produkte zeigt spezielle Wechselwirkungen mit der Wunde. Beispielsweise wird der Aufbau eines feuchten Wundklimas durch Hydrokolloide oder Hydrogele durch verschiedene Produkteigenschaften ermöglicht. Hydrokolloide nehmen große Mengen an Wundflüssigkeit auf bei gleichzeitig kontrollierter Wasserdampfdurchlässigkeit. Hydrogele andererseits nehmen sehr wenig Flüssigkeit auf. Das feuchte Klima entsteht durch die große Menge an im Gel gespeicherten Wasser, gekoppelt mit einer kontrollierten Wasserdampfdurchlässigkeit (FALANGA 1988; THOMAS und LOVELESS, 1988; THOMAS et al., 1988).

Im Idealfall werden schon während der Entwicklung eines neuen Produktes mehrere Prototypen hergestellt, deren physikalische Eigenschaften und vereinzelt auch biologische Eigenschaften, wie z.B. die Cytotoxizität, nach DIN- oder ISO-Vorschriften ermittelt und geprüft werden. Die Anwendung der in DIN- und ISO-Normen beschriebenen Methoden ermöglicht die Überwachung der Produktqualität: dabei werden allerdings einzelne, in-vivo stattfindende Vorgänge stark vereinfacht. Beispielsweise wird die Wechselwirkung zwischen Wundflüssigkeit und Wundauflagen in der Regel durch Messungen der Flüssigkeitsaufnahme nach Kontakt der Wundauflagen mit Wasser oder physiologischer Kochsalz-Lösung über einen definierten und begrenzten Zeitraum untersucht. Die zu untersuchenden Proben werden dabei vollständig mit der Testflüssigkeit in Kontakt gebracht und die Flüssigkeitsaufnahme

durch Bestimmung der Gewichts­differenz vor und nach Kontakt mit der Flüssigkeit bestimmt. Bei diesen vereinfachten Ansätzen werden weder die komplexe Zusammensetzung der Wundflüssigkeit, noch deren im Verlauf der Wundheilung sich verändernde Menge, noch die Beschränkung der Flüssigkeitsaufnahme auf die Kontaktseite der Wundauf­lage berücksichtigt.

Wenige experimentelle in-vitro Daten belegen Ausmaß und Art der Wechselwirkung zwischen Wundauf­lagen und Wundflüssigkeit oder Wundauf­lagen und zellulären Bestandteilen der Epidermis und Dermis. ACHTERBERG et al. (1996) stellten in einer in-vitro Studie, in der mit Wachstumsfaktor PDGF supplementiertes Humanplasma als künstliche Wundflüssigkeit angewendet wurde, wesentliche Unterschiede zwischen den bei den Versuchen verwendeten Wundauf­lagen fest. Nur eine bestimmte Art von Wundauf­lagen zeichnet sich durch eine selektive Aufnahme von Wasser aus der künstlichen Wundflüssigkeit aus, was zu einer Aufkonzentrierung der für die Wundheilung relevanten Proteine, wie dem Wachstumsfaktor PDGF, in der Restflüssigkeit führte.

WOLLINA et al. (1996) führten in-vitro Untersuchungen mit kommerziell erhältlichen Wundauf­lagen durch, denen eine positive Auswirkung auf die Ausbildung des Granulationsgewebes und auf die Epithelneubildung zugeschrieben wurde. Für die Durchführung dieser in-vitro Untersuchungen wurden Kulturen von Keratinozyten und Fibroblasten angelegt bis zur Bildung eines konfluenten Zellrasens. Anschließend wurden diese bis zu 7 Tage in direktem Kontakt mit den zu testenden Wundauf­lagen weiter kultiviert. In dieser Zeit wurde das Zellkulturmedium auf seinen Gehalt an für die Wundheilung relevanten löslichen Peptiden untersucht. Es zeigte sich, dass einige der Wundauf­lagen zur Produktion von Interleukinen anregen, die in der inflammatorischen Phase der Wundheilung die Wunddesinfektion und Wundreinigung steuern.

Für die Anwender in Klinik und Praxis ist es nicht leicht, eine Auswahl unter der großen Anzahl an Produkten für eine optimale Wundversorgung zu treffen. Mehrere Faktoren wie Art der Wunde (akut, chronisch), Tiefe des Defektes, Menge an Wundexsudat und Vorhandensein von Infektionen, müssen bei der Auswahl berücksichtigt werden. FALANGA (1988) und CARVER and LEIGH (1992) fassten die bekanntesten Wundversorgungsprodukte und ihren Einfluss auf einzelne Vorgänge bei der Behandlung von akuten und chronischen Wunden zusammen. Grundlage dieser Zusammenfassungen waren Erfahrungsberichte und klinische Studien.

Testsysteme, die für in-vitro Untersuchungen zur Wechselwirkung von Wundauflagen mit Hautäquivalenten nach mehrtägigem direktem Kontakt geeignet sind, werden in der Literatur spärlich beschrieben. AUTIAN (1979) entwickelte das Agar-Overlay Testsystem, bei dem Testmaterialien auf einem Agargel in einer Zellkulturschale platziert werden können und potentiell toxische Bestandteile nach Diffusion durch das Gel die Proliferation von auf dem Boden der Zellkulturschale wachsende Fibroblasten oder Keratinozyten beeinflussen können.

Speziell für die Untersuchung der Cytotoxizität von Wundauflagen wurde von VAN LUYN et al. (1992) ein in-vitro Testsystem entwickelt. Hierfür wurde ein dermales Äquivalent aus einem Carboxymethylcellulose-Gel mit Fibroblasten der Zelllinie PK 84 hergestellt. Das Gel wurde auf Zellkulturschalen gegossen und darauf die zu prüfenden Wundauflage gelegt. Während der Inkubationszeit von bis zu 7 Tagen wurden die Fibroblasten, die in Richtung Boden der Zellkulturschale migrierten, morphologisch untersucht. Danach wurden die im Gel und auf dem Boden der Zellkulturschale befindlichen Fibroblasten mit dem Cell Counter gezählt und die Auswirkungen der Wundauflagen auf die Proliferation bestimmt. Der Nachteil dieses Testsystem bei Untersuchungen zur Cytotoxizität von Hydrokolloiden, die große Mengen an Flüssigkeit binden, liegt darin, daß die Hydrokolloide dem Carboxymethylcellulose-Gel die Flüssigkeit entziehen, so dass die Versorgung der auf dem Boden der Zellkulturschale wachsenden Fibroblasten mit Flüssigkeit und Nährstoffen stark beeinträchtigt wird.

Ein weiteres in-vitro Testsystem basiert auf der Anwendung eines nach BELL et al. (1981) entwickelten Hautäquivalents, auf dem die Wundauflagen in direktem Kontakt mit Hautzellen über mehrere Tage kultiviert werden können. Der Einfluss verschiedener Wundauflagen (SIEBER et al., 1995) sowie von Gelen und Sprays (DOVER et al., 1995) auf die Migration und Proliferation von Fibroblasten und Keratinozyten konnten durch Anwendung dieses Testsystems bestimmt werden. Wird dieses Testsystem für eine Bewertung von stark absorbierenden Materialien, wie Hydrokolloiden und Alginaten, angewendet, können mechanische Verletzungen der Hautzellen durch das Quellen der Materialien auftreten.

1.6 AUFGABENSTELLUNG

Während der Entwicklung innovativer Produkte, wie z.B. Wundauflagen für die feuchte Wundbehandlung von akuten und chronischen Wunden, benötigt die Pharmaindustrie möglichst viele in-vitro Daten, die eine Wechselwirkung zwischen Wundauflagen und Wundflüssigkeit oder zwischen Wundauflagen und den zellulären Bestandteilen der Epidermis oder der Dermis belegen. Hiermit können Fragestellungen untersucht werden wie etwa die selektive Absorption einzelner Bestandteile der Wundflüssigkeit, der Einfluss der Wundauflagen auf Vorgänge wie die Proliferation und Migration von Fibroblasten und Keratinozyten und die Ablagerung von Bestandteilen der Wundauflagen nach Aufnahme der Wundflüssigkeit.

Die in der Literatur beschriebenen in-vitro Testsysteme sind insbesondere geeignet für die Untersuchung von Produktextrakten, jedoch nicht oder nur mit Einschränkungen für die Untersuchung von stark saugenden Wundauflagen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Herstellung einer Matrix, welche mit Fibroblasten besiedelt und als dermales Äquivalent für den Aufbau eines „in-vitro Testsystems“ verwendet werden kann. Die Matrix soll aus einem wasserlöslichen kostengünstigen Biomaterial bestehen, so dass große Mengen an Mustern hergestellt werden können. Für die serienmäßige Herstellung von Folien im Labormaßstab muss ein geeignetes Verfahren entwickelt werden. Hierfür ist eine Folien-Strechanlage im Labormaßstab zu planen und zu bauen. Zur Herstellung der Matrix sollen verschiedene Rezepturen für wässrige Lösungen der Biomaterialien Gelatine und Agar entwickelt und geprüft werden. Nach Herstellung gleichmäßiger Folien mit der Strechanlage sollen geeignete Rezepturen ausgewählt werden, basierend auf einer Bewertung der physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften der Folien. Die von TURNER (1977) aufgelisteten Anforderungen an Materialien für den Hautersatz (wie z.B. Flexibilität, Wassergehalt, Stabilität gegenüber einem enzymatischen Abbau, Wasserdampfdurchlässigkeit) sollen hierbei als Bewertungsgrundlage dienen.

Die aus Gelatine oder Agar bestehende Matrix soll dann mit Fibroblasten besiedelt werden. Wichtige Voraussetzungen hierfür sind die Sterilisierbarkeit des Materials mittels γ -Bestrahlung, das Fehlen von cytotoxischen Auswirkungen und die Stabilität gegenüber enzymatischem Abbau. Zusätzliche biologische Eigenschaften des Materials, wie die Wechselwirkung mit Proteinen, die die Zelladhäsion beeinflussen, sollen überprüft werden.

Die Anwendbarkeit der mit Fibroblasten besiedelten Matrix als dermales Äquivalent im „in-vitro Testsystem“ soll durch orientierende Versuche überprüft werden. Hierbei soll die Wechselwirkung zwischen Wundauflagen und den Fibroblasten im dermalen Äquivalent untersucht werden. Voraussetzung hierfür ist der Bau einer geeigneten Versuchsanordnung. Diese soll eine schonende Einspannung des dermalen Äquivalents und des Testmaterials ermöglichen. Gleichzeitig soll die Kultivierung der auf der Matrix befindlichen Fibroblasten über das Zellkulturmedium in permanentem Kontakt mit dem Testmaterial über mehrere Tage möglich sein.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 AUSWAHL GEEIGNETER BIOMATERIALIEN

Als Biomaterialien, die es ermöglichen Matrices mit hautähnlichen Eigenschaften herzustellen, wurden Agar und Gelatine in Pulverform verwendet und wässrige Lösungen hergestellt. Die Gelatine- und Agarlösungen wurden mit Rezeptur Nummern versehen. Der verwendete Agar (Sigma A-7002; Lot No. 126H1004) ist laut Hersteller für die Kultur von Pflanzen- und Insektenzellen geeignet. Die verwendete Gelatine (Sigma G-2500, Lot No. 91H0502) wurde durch Druckhydrolyse aus Kollagen von Schweinehaut und Knochen hergestellt.

Zusätzlich wurde Glyzerin (Sigma G-2025; Lot No. 116H0521) verwendet, welches den einzelnen Rezepturen in unterschiedlichen Konzentrationen als natürlicher Weichmacher beigemischt wurde.

2.1.1 Agar- und Gelatinelösungen verschiedener Rezepturen

Für die Herstellung verschiedener Rezepturen (022 bis 025) wurden die Komponenten Gelatine, Agar und Glyzerin wie folgt vermengt:

REZEPTUR 022 20 % Gelatine 15 % Glyzerin 65 % Aqua dest.	REZEPTUR 024 4,0 % Agar 8,0 % Glyzerin 88,0 % Aqua dest.
REZEPTUR 023 20 % Gelatine 30 % Glyzerin 50 % Aqua dest.	REZEPTUR 025 4,0 % Agar 12,0 % Glyzerin 84,0 % Aqua dest.

2.1.2 Verfahren zur Herstellung von Folien

Ein häufig angewendetes und in der Literatur beschriebenes Verfahren für die Herstellung von Folien ist das Gießen von Lösungen in eine mit Teflon beschichtete DIN A 4 große Edelstahlform und anschließende Äquilibrierung des gebildeten Films durch Lagerung unter definierten Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsbedingungen (SHINDE et al. 1992).

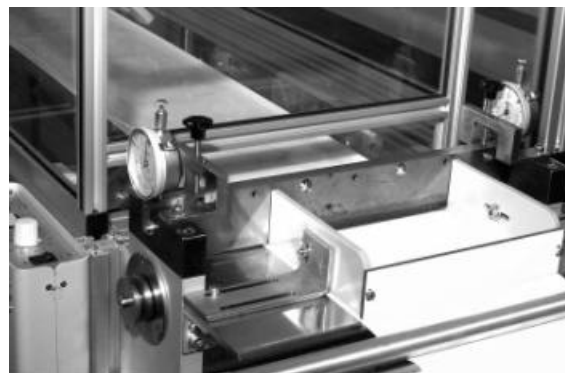
Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Streichanlage gebaut, die es ermöglichte, aus den Agar- und Gelatinelösungen große Mengen an gleichmäßigen Folien unter standardisierten Bedingungen im Labor herzustellen.

2.1.2.1 Beschreibung der Streichanlage

Die Streichanlage (Abb. 1) besteht aus einem viereckigen Vorratsbehälter, der an der Unterseite, über dem sogenannten Streichmesser, durch Betätigung des Startschalters wie eine Schleuse geöffnet werden kann. An dem Vorratsbehälter angeschlossen ist das Trägerpapier, welches in langen Bahnen auf einem Streichtisch liegt. Durch Betätigung eines Schalters, wird die Bahn Trägerpapier in Rotationsbewegung gesetzt. Nach dem Eröffnen des Vorratsbehälters über dem Streichmesser kann die Rezepturmasse für die Agar- und Gelatinefolien gleichmäßig auf das Trägerpapier gebracht werden. Die Einstellung der Höhe des Streichmessers entscheidet über die Dicke der hergestellten Folien.

Abb. 1: Streichanlage für die gleichmäßige Herstellung von Agar- und Gelatinefolien im Labor

- a) Vorratsbehälter und Streichmesse
- b) Transportband mit Trägerpapier und frisch hergestellter Folie
- c) Seitenansicht der Folienbahn



a)



b)



c)

2.1.2.2 Folienherstellung

Für die Herstellung der Gelatinefolien wurden das Gelatinepulver, das Glycerin und das destillierte Wasser in einen Erlenmeyer-Kolben gegeben und das Gemisch anschließend im

Wasserbad unter Rühren auf eine Temperatur von 85 °C erhitzt. Die Lösung wurde für weitere 5 Minuten bei dieser Temperatur gerührt und nach Abkühlung auf 45 °C sehr vorsichtig und ohne Bildung von Schaum in das Vorratsgefäß der Laborstreicheanlage gefüllt. Die Höhe des Streichmessers wurde auf 1mm eingestellt. Nach dem Start der Streicheanlage konnte eine gleichmäßige Folienbahn aus Gelatine auf dem Trägerpapier hergestellt werden.

Für die Herstellung der Agarfolien wurden das Agarpulver, das Glyzerin und das destillierte Wasser in einen Erlenmeyer-Kolben gegeben und das Gemisch anschließend im Wasserbad unter Rühren auf eine Temperatur von 100 °C erhitzt. Die Lösung wurde für weitere 5 Minuten bei dieser Temperatur gerührt, um eine gleichmäßige Vermischung der Bestandteile zu erreichen. Sobald die Lösung auf eine Temperatur von 50 °C abgekühlt war, konnte mit der Herstellung der Agarfolien in der Streicheanlage begonnen werden. Dafür wurde die 50 °C warme Agarlösung vorsichtig und ohne Schaumbildung in den Vorratsbehälter gegossen. Anschließend wurde das Streichmesser auf eine Höhe von 3 mm eingestellt und eine Folienbahn aus Agar hergestellt.

Nachdem die Folienbahnen aus Gelatine und Agar auf dem Trägerpapier ausgekühlt waren, konnten gleich große Stücke (DIN A 4 Format) geschnitten werden. Diese wurden anschließend bei einer Temperatur von 25°C und einer Luftfeuchtigkeit von 52 % für 5 - 7 Tage in der Klimakammer aufbewahrt. Danach wurden die Folien in Polyethylen-Probenbeutel der Fa. Fischer, Art.-Nr. 666 911 50 verpackt und in der Bestrahlungsanlage der Fa. Beiersdorf AG in Hamburg Hausbruch mittels γ -Bestrahlung (30 kGy) sterilisiert.

2.2 PHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG DER FOLIEN

Die physikalische Charakterisierung sterilisierter Agar- und Gelatinefolien erfolgte durch Bestimmung von Wasserdampfdurchlässigkeit, Wassergehalt, Folienstärke, Flächengewicht, Reißfestigkeit, Quellung und Keimdichtigkeit.

2.2.1 Keimdichtigkeit

Die Überprüfung der Folien auf Keimdichtigkeit bei Feuchte wurde in Anlehnung an DIN 58953/T6 („Sterilgutversorgung: Sterilisationspapier für Beutel und Schlauchverpackungen: Prüfung“) vorgenommen. Das Prinzip des Verfahrens beruht darauf, dass Mikroorganismen

in Wassertropfen auf die Probenstücke gebracht werden. Nach dem Antrocknen der Wassertropfen auf der Folienoberfläche wurde untersucht, ob Mikroorganismen auf die Unterseite der Probestücke durchgetreten waren.

Für die Versuche zur Bestimmung der Keimdichtigkeit der Folienmuster wurde zunächst eine Caso-Boullion (Merck Art.-Nr. 1.05459) mit *Staphylococcus aureus*, Stamm DSM 6744 (von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen), beimpft und bei 37 °C etwa 16 h bebrütet. Die Keimzahl für die in den Versuchen angewendete Keimsuspension lag zwischen 10^7 und 10^8 je ml.

Aus den Folienmustern wurden quadratische Probenstücke von etwa 50 mm Kantenlänge geschnitten und 5 Tropfen zu je 0,1 ml der Keimsuspension auf die Oberseite der Probenstücke gebracht und zwar so, dass die Tropfen einander nicht berührten und etwa gleichmäßig verteilt waren. Anschließend wurden die inokulierten Probestücke bei einer Temperatur von 20 – 25 °C und einer Luftfeuchte von 40 – 60 % für 6 Stunden bis zum vollständigen Antrocknen der Tropfen Keimsuspension gelagert.

Anschließend wurde jedes Probenstück mit der beimpften Fläche nach oben auf die Oberfläche einer Blutagarplatte (Merck, 13414, Ch.-B./Lot V9164) gelegt und für etwa 16 bis 24 h bei 37 °C bebrütet. Danach erfolgte eine Untersuchung der Platten auf Keimwachstum.

Für jede Rezepturvariante der Folien wurden 6 Einzelbestimmungen durchgeführt.

2.2.2 Wasserdampfdurchlässigkeit (Water Vapor Transmission Rate)

Für die Messung der Wasserdampfdurchlässigkeit von Folien wurde eine für diesen Zweck angefertigte Apparatur verwendet (Abb. 2) und die WVTR in Anlehnung an ASTM Standard (Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials) berechnet. Zunächst wurden aus den Folien kreisrunde Probenstücke mit einem Durchmesser von 5 cm geschnitten. Die Proben wurden dann im Klimaschrank über 24 Stunden bei 37 °C und 30 % relativer Luftfeuchte vorkonditioniert.

In eine zylindrische Form aus Aluminium wurden 2 g Watte und 20 g destilliertes Wasser gegeben. Auf die Öffnung der Form wurde ein Dichtungsring gelegt und darauf, zwischen zwei Fixierscheiben aus VA, die vorkonditionierte Probe. Auf die eingespannte Probe wurde ein zusätzlicher Dichtungsring gelegt und anschließend die Aluminiumformen mit einem Schraubverschluss verschlossen. Die verschlossenen Formen wurden gewogen und das Gewicht (M_1) vor der Lagerung bestimmt.

Die verschlossenen, gewogenen Formen wurden über 24 Stunden bei 37 °C und 30 % relativer Luftfeuchte im Klimaschrank gelagert. Danach wurden die Proben nochmals konditioniert, indem sie aus dem Klimaschrank entnommen und bei 25 °C und 45 % relativer Luftfeuchte für 1 Stunde im Klimaschrank gelagert wurden. Nach der Konditionierung wurden die Proben nochmals gewogen und das Gewicht (M_2) nach der Lagerung bestimmt.

Die Berechnung der Wasserdampfdurchlässigkeit (**Water Vapor Transmission Rate**) der Folien wurde durch Anwendung folgender Formel ermittelt:

$$\mathbf{WVTR} = (M_1 - M_2) \times \mathbf{Faktor}$$

M_1 = Gewicht der verschlossenen Form vor der Lagerung

M_2 = Gewicht der verschlossenen Form nach der Lagerung

Faktor = $1 / \text{Messfläche [m}^2\text{]} = 1259,09$

Einheit der WVTR = $\text{g} \times \text{m}^{-2} \times 24\text{h}^{-1}$

Angegeben wurden der Mittelwert aus 6 Einzelmessungen pro Rezepturvariante der Folien mit Angabe der Standardabweichung.

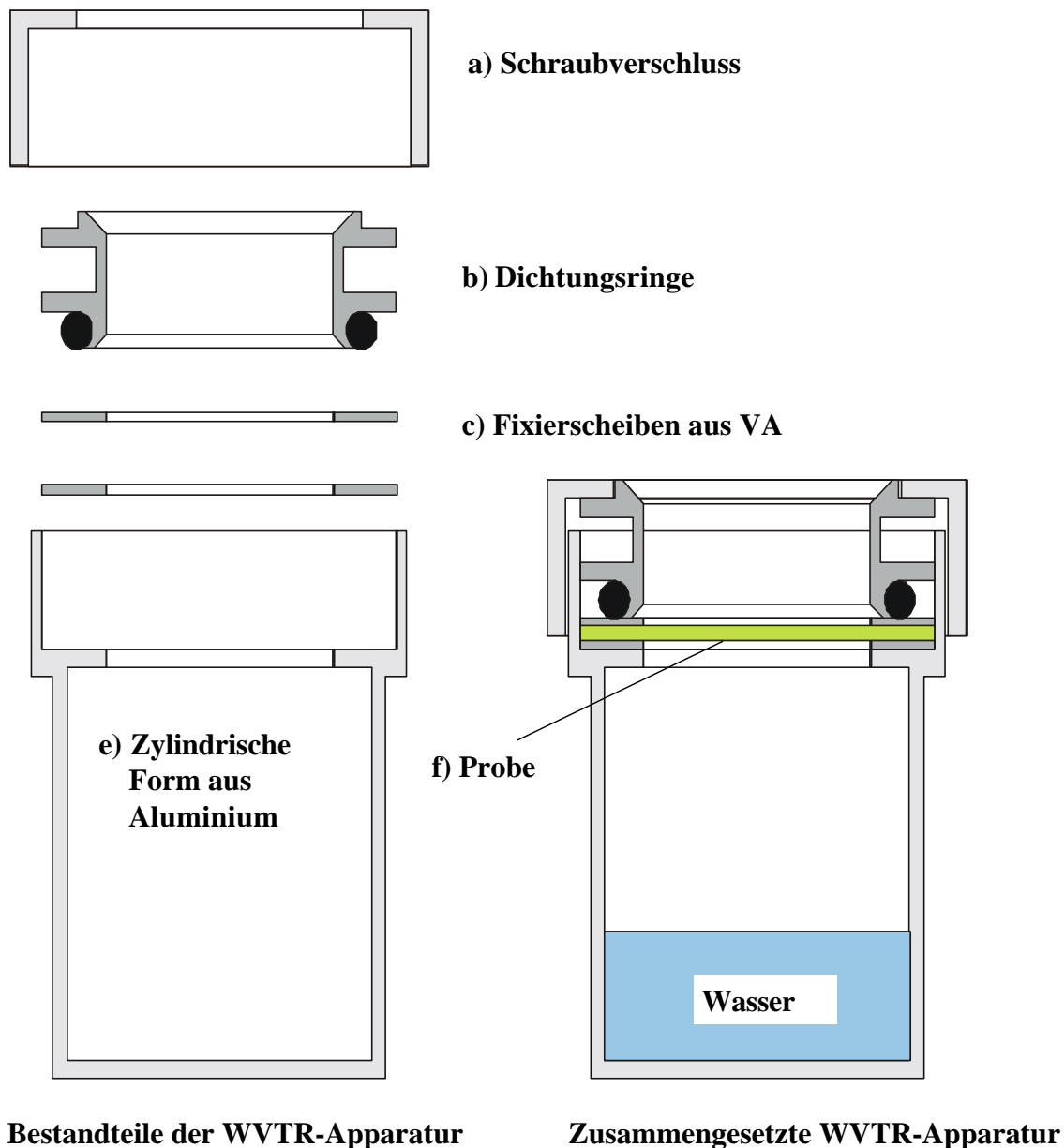


Abb. 2: Grafische Darstellung der Apparatur zur Messung der Wasserdampfdurchlässigkeit von Agar- und Gelatinefolien. Linke Abbildung: Bestandteile der Apparatur; rechte Abbildung: zusammengesetzte Apparatur.

2.2.3 Reißfestigkeit

Für die Ermittlung der mechanischen Eigenschaften, insbesondere die Reißfestigkeit der Folien, wurden Zugversuche durchgeführt, um das Verhalten der Folien bei einachsiger, gleichmäßig über den Querschnitt der jeweiligen Probe verteilter Zugbeanspruchung untersuchen zu können. Die Durchführung der Messungen erfolgte in Anlehnung an DIN 53815 („Prüfung von Textilien: Zugversuch“). Aus den Folien wurden pro Rezepturvariante 8

gleichmäßige Probenstücke mit 23 mm Länge und 5 mm Breite geschnitten und in die Zugmaschine eingespannt. Die Probenstücke wurden anschließend gleichmäßig gedehnt, bei gleichzeitigem Aufzeichnen des Verlaufs der Belastung und Dehnung der Probe. Aus dem aufgezeichneten Spannungs-Dehnungsdiagramm konnten unter anderem die Reißfestigkeit der Proben, d.h. die Zugspannung in N/mm^2 im Augenblick des Reißens und die Längenänderung der Proben bei maximaler Belastung in % ermittelt werden.

Für jede Eigenschaft wurde der Mittelwert und die Standardabweichung aus 8 Einzelmessungen berechnet.

2.2.4 Wassergehalt

Die Bestimmung des Wassergehaltes der Folien erfolgte durch Anwendung der Karl-Fischer Titrationsmethode mit einem Karl-Fischer Titrator Automat (Fa. Metrohm, 633).

Es wurden zunächst aus den einzelnen Rezepturvarianten der Folien Muster mit 1,0 g Gewicht hergestellt. Pro Rezepturvariante wurden je 14 Einzelproben hergestellt.

Die Proben wurden anschließend in einem 100 ml Jodzahlkolben genau eingewogen und 50 ml Methanol hinzugefügt. Die Suspension wurde dann für 2 Stunden gerührt und für eine weitere 1/2 Stunde ohne Rühren stehen gelassen. Als Blindwert wurden eine Methanol Lösung und der Faktor des Karl Fischer Reagenzes verwendet.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit folgender Formel:

$$\% \text{ Wasser} = (V_p - V_b) \times f \times 50 \times 100\% / E_p \times 20$$

Wobei:

- f = Faktor des Karl-Fischer Reagenz in mg/ml ($f = E_w / V_{kf}$)
- V_{kf} = Verbrauch Karl-Fischer Reagenz in ml
- E_w = Einwaage Wasser in mg
- V_p = Verbrauch Karl-Fischer Reagenz für Probe in ml
- V_b = Verbrauch Karl-Fischer Reagenz für Blindwert in ml
- E_p = Einwaage der Probe in mg

Aus den 14 Einzelwerten je Rezeptur der Folien wurden der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet. Die Wassergehalte der verschiedenen Folien wurden miteinander verglichen.

2.2.5 Folienstärke

Die Messung der Stärke der Folien erfolgte durch Anwendung eines Folien-Dickenmessers (Fa. Fischer, Typ 497 ISOSCOPE ® MPOS) mit einer Anzeigegenauigkeit von $\pm 1 \mu\text{m}$.

Aus den Folien wurden jeweils drei Prüflinge mit einem Durchmesser von 20 mm ausgestanzt und gemessen. Aus den 3 Einzelwerten pro Rezepturvariante der Folien wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

2.2.6 Flächengewicht

Das Flächengewicht der Folien wurde durch Bestimmung des Quadratmetergewichtes in g/m^2 errechnet. Hierfür wurden pro Rezepturvariante drei Prüfmuster (linke, rechte Seite, Mitte der Folie) die jeweils eine Größe von 100 cm^2 hatten, zugeschnitten. Die Proben wurden dann im Klimaraum bei $23 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchte von 50 % auf einer Analysenwaage (Mettler Toledo, Typ AT 460) gewogen.

Aus den gemessenen drei Einzelwerte wurde das Flächengewicht in g/m^2 errechnet und der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben.

2.3 BIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER FOLIEN

Die Interaktion von Biomaterialien mit im Blut enthaltenen Proteinen und die daraus resultierende Adhäsion einzelner Proteine an ihre Oberfläche sind biologische Eigenschaften, die eine Anwendung dieser Biomaterialien in der Medizin möglich machen. PACKHAM et al. (1969) konnten zeigen, dass bei einer Beschichtung von Glasoberflächen mit Albumin, die Adhäsion von Thrombozyten vermieden werden konnte. Im Gegensatz hierzu berichten BALDUINI et al. (1984) für Kollagen, ADAMS und FEUERSTEIN (1981) und GRINELL et al. (1985) für verschiedene andere Biomaterialien, dass aus der Adhäsion von Fibronectin an die Oberfläche eine vermehrte Adhäsion von Thrombozyten folgt.

Die an die Oberfläche von Agar- und Gelatinefolien adhärerten Mengen an Fibronectin und Albumin nach Kontakt mit Proteinlösungen wurden durch Anwendung von ELISA-Assays indirekt bestimmt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Haftung oder die Verklebung von Materialien mit der Wundoberfläche eine weitere wichtige biologische Eigenschaft bei Verwendung dieser

Materialien als Hautersatz ist (JÜRGENS et al. 1995). Die Verklebung von Agar- und Gelatinefolien wurde, wie unter 2.3.3 beschrieben, durch Anwendung eines in-vitro Tests untersucht (WELLING, 1991).

2.3.1 Inkubation von Folien mit proteinhaltigen Lösungen

Die im folgenden beschriebenen Versuche dienten der Charakterisierung der Folien im Hinblick auf ihre Eigenschaft, Albumin und Fibronectin an ihre Oberfläche zu adsorbieren. Für die Durchführung der Versuche wurde eine Apparatur gebaut, die eine Inkubation der Folien mit frisch hergestellten Proteinlösungen möglich machte (Abb. 3).

Zunächst wurden pro Rezeptur der Gelatine- und Agarfolien 10 kreisrunde Probenstücke mit einem Durchmesser von 28 mm mit dem Kreisschneider ausgestanzt und jeweils ein Probenstück in eine Kavität der 6-Well Greiner Makroplatte (Art. Nr. 657160) transferiert. Es konnte davon ausgegangen werden, dass nach Zugabe der Proteinlösungen die Probenstücke aufquollen, sich zusammenrollten und frei in der Proteinlösung schwammen. Aus diesem Grund wurden sie mit einem kreuzförmigen Spannungring aus Plexiglas etwa 2-3 mm über dem Boden der Zellkulturplatte gesichert. Pro Kavität der Zellkulturplatte wurden dann 3 ml verdünnte Proteinlösung mit Albumin oder Fibronectin hinzupipettiert, die im folgenden als Inkubationslösungen bezeichnet werden.

Als Inkubationslösung diente eine 3,5 % Albumin Lösung (humanes Albumin A-4327; Lot 76H9340, Sigma), die für die Versuche mit den Agar- und Gelatinefolien 1:10000 mit PBS verdünnt wurde, so dass die Konzentration bei 3,5 µg/ml lag. Zusätzlich wurde eine 0,033 % Fibronectin Lösung (humanes Fibronectin F-2006; Lot 17H9302, Sigma) für die Versuche mit den Agar- und Gelatinefolien 1:50 mit PBS verdünnt, so dass die Konzentration bei 7 µg/ml lag, und als Inkubationslösung verwendet.

Die Zellkulturplatten wurden mit einem Parafilm abgedeckt und im Kühlschrank bei 4 °C auf dem Schüttler (IKA-Vibrax VXR, Typ VX8, Fa. Jahnke & Kunkel) über 24 Stunden stehengelassen.

Die Konzentration an Albumin oder Fibronectin in den Inkubationslösungen vor und nach Kontakt mit den Folienstücken wurde, wie unter 2.3.1.1 beschrieben, durch Anwendung von ELISA-Assays indirekt bestimmt. Für die Berechnung der an die Folienoberfläche

adsorbierten Menge an Albumin oder Fibronectin in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ wurde wie unter Punkt 2.3.1.1.4 beschrieben verfahren.

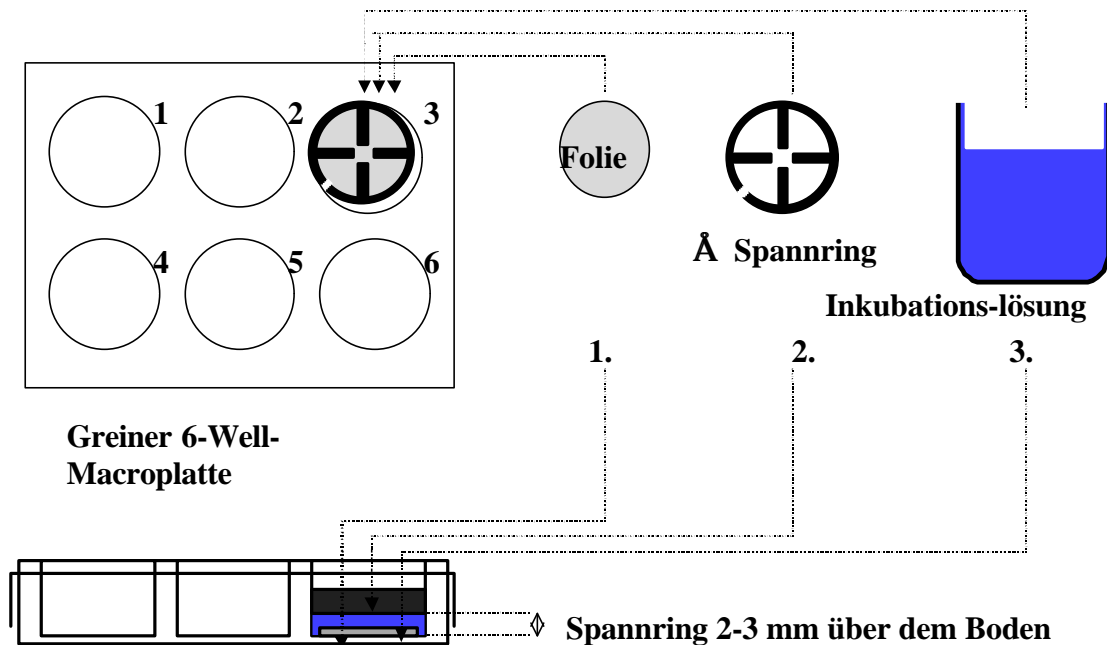


Abb. 3: Grafische Darstellung der Apparatur zur Inkubation der Agar- und Gelatinefolien mit Proteinlösungen zwecks Bestimmung der Adsorption von Albumin und Fibronectin an die Folienoberfläche.

2.3.1.1 ELISA-Assays

Für die Bestimmung der Konzentrationen an Albumin und Fibronectin in den Inkubationslösungen vor und nach Kontakt mit den Agar- und Gelatinefolien wurde eine nicht-kompetitive Anordnung der ELISA-Assays gewählt. Das Albumin oder das Fibronectin aus den Inkubationslösungen fungiert dabei als Antigen, welches sich an die Kavitäten der 96-Well Zellkulturplatten (Microtiter Fa. GREINER, No 655180) bindet. Anschließend wurde ein gegen humanes Albumin oder Fibronectin spezifischer Primärantikörper hinzugefügt und die erfolgte Bindung durch Zugabe eines Sekundärantikörpers, der mit einem Amplifikator (POD) markiert war, sichtbar gemacht.

Für den Aufbau der ELISA-Assays wurden zunächst die primären und sekundären Antikörper gegen Albumin oder Fibronectin in PBS gelöst und Antikörperlösungen mit den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen hergestellt. Diese wurden verwendet, um den Gehalt an Protein in verdünnten Albumin- oder Fibronectin-Stammlösungen zu bestimmen.

Hierdurch sollten die Empfindlichkeit des ELISA-Assays und das optimale Verhältnis zwischen primärem und sekundären Antikörper festgestellt werden.

2.3.1.1.1 ELISA-Assay gegen Albumin aus humanem Serum

Folgende Arbeitsschritte wurden für den Aufbau eines ELISA-Assays zur Bestimmung der Konzentration an Albumin aus humanem Serum (Sigma A-4327, Lot 76H9340) in PBS Lösungen durchgeführt:

- Beschichten der 96-Well-Platten mit 100 µl einer verdünnten 3,5 % Albumin PBS Lösung, mit einer Konzentration an Albumin zwischen 2,333 µg/ml und 0,014 µg/ml,
- Abdichten der Platten mit Parafilm und Inkubation über Nacht bei 8°C,
- Waschen mit Waschpuffer (PBS mit 0,045 % Tween 20) im ELISA-Waschgerät (Dynatech; Ultrawash II),
- Blockieren der unspezifischen Bindungen mit einer 1 % BSA Lösung in PBS (Sigma A-6003, Fraktion V), Zugabe von 200 µl der BSA-Lösung pro Kavität,
- Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler für 1-2 Stunden,
- Waschen der Platten mit Waschpuffer im ELISA-Waschgerät,
- Zugabe von 100 µl pro Kavität Primärantikörper-Lösung AK-anti-HSA Sigma (A-6684; Lot 056H4811) mit einer Antikörperkonzentration zwischen 1:5000 und 1:10000,
- Inkubation der Zellkulturplatten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler für 1-2 Stunden,
- Waschen der Platten mit Waschpuffer im ELISA-Waschgerät,
- Zugabe von 100 µl pro Kavität Sekundärantikörper-Lösung AK-anti-Maus, POD konjugiert, Sigma A-0168/Lot 106 H 4854) mit einer Antikörperkonzentration zwischen 1:30000 und 1:50000,
- Abpipettieren der Lösung und waschen der Platten mit Waschpuffer im ELISA-Waschgerät,
- Zugabe von 100 µl der TMB-Substratlösung bestehend aus 10mg Tetramethyl-benzidin (Boehringer-Mannheim Kat.-No. 784974; Lot-No. 83062725) pro ml DMSO,
- Zugabe von 18,5 µl 3 % H₂O₂ und Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler,
- Abstoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von 75µl 2M H₂SO₄ pro Kavität,
- Messung der O.D.-Werte mit ELISA-Photometer (Dynatech, MR 5000) bei einer Testwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 550 nm.

2.3.1.1.2 ELISA-Assay gegen Fibronectin aus humanem Serum

Beim Aufbau des ELISA-Assays zur Bestimmung der Konzentration an Fibronectin aus humanem Serum (Sigma F-2006; Lot 17H9302) in PBS Lösungen wurden die gleichen Arbeitsschritte angewendet wie für den Aufbau des Albumin ELISA-Assays (siehe Kapitel 2.3.1.1.1).

Eine 0,033%-ige Fibronectin Stammlösung wurde mit PBS verdünnt, so dass für die Beschichtung der Zellkulturplatten Lösungen mit einer Konzentration an Fibronectin zwischen 2,2 µg/ml und 0,001µg/ml verwendet werden konnten.

Der Primärantikörper (AK-anti-Fibronectin; Biomol A 001 / Lot-No 2110) wurde 1:10000 und 1:20000 verdünnt und für den Aufbau des ELISA-Assays verwendet. Der Sekundärantikörper (AK-anti-Maus, POD konjugiert; Sigma A-0168 / Lot 106 H 4854) wurde 1:30000 bis 1:50000 verdünnt.

2.3.1.1.3 Erstellung von Eichkurven

Nach der Ermittlung des optimalen Verhältnisses zwischen primären und sekundären Antikörpern konnten Messungen mit den ELISA-Assays durchgeführt und Eichkurven erstellt werden. Dabei wurden die gemessenen O.D.-Werte gegen die entsprechende Konzentration an Protein in den verdünnten Albumin und Fibronectin Lösungen in µg/ml aufgetragen.

Um einen möglichen Einfluss der extrahierbaren Anteile der Folien auf den ELISA-Assays zu berücksichtigen, wurden zusätzliche Eichkurven erstellt. Für die Erstellung dieser Eichkurven dienten Folienextrakte, versetzt mit Albumin oder Fibronectin (wie unter 2.4.1 beschrieben). Die Folienextrakte dienten als Proteinlösungen für die Durchführung der Messungen mit den ELISA-Assays gegen Albumin oder Fibronectin.

2.3.1.1.4 Berechnung der adsorbierten Menge an Protein an die Folienoberfläche

Die Konzentration an Albumin oder Fibronectin in den Inkubationslösungen vor und nach Kontakt mit den Folienstücken wurde, wie unter 2.3.1.1 beschrieben, durch Anwendung von ELISA-Assays indirekt bestimmt. Dabei wurden pro Folientyp 10 Wiederholungsansätze durchgeführt. Von den Inkubationslösungen der einzelnen Ansätze wurden dann jeweils 8 Einzelmessungen mit dem ELISA-Assay durchgeführt. Die Mittelwerte der gemessenen O.D.-Werte wurden gebildet und die Konzentration an Albumin oder Fibronectin in µg /ml

anhand der vorab erstellten Eichkurven bestimmt. Diese Konzentrationen dienen der Berechnung an adsorbiertem Albumin und Fibronectin an die Folienoberflächen in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Als Kontrollversuche dienen Zellkulturplatten mit dem Spannring, Albumin- oder Fibronectinlösung aber ohne Folienstücke.

2.3.2 In-vitro Untersuchung zur Wundverklebung

Die Verklebung von Materialien zur Wundversorgung mit der Oberfläche einer Wunde erfolgt in zwei Phasen. Die Phase I, die sogenannte Initialphase, beginnt mit dem ersten Kontakt zwischen dem Material und der Wundflüssigkeit, die aus dem Wundgrund stammt. Das Fibrin aus der Wundflüssigkeit fungiert dabei wie ein Kleber, der die Oberfläche des Materials mit dem Wundgrund verbindet. Diese Initialphase dauert ca. 72 Stunden. Danach beginnt die Phase II der Verklebung, die verursacht wird durch ein fibrovasculäres Einwachsen von neu gebildetem Gewebe in das Material (TAVIS et al. 1976).

Zeigen Wundversorgungsmaterialien bereits in der Phase I eine Verklebung, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt noch verstärkt wird durch ein Einwachsen von fibrovasculärem Gewebe in der Phase II. Eine Folge hiervon ist, dass bei einer Entfernung des Materials von der Wunde das neu gebildete Gewebe beschädigt wird (TAVIS et al. 1977).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wundverklebung von Gelatine- und Agarfolien untersucht durch Anwendung eines in-vitro Testsystems, welches die Phase I der Wundverklebung nachstellt (WELLING, 1991). Grundlage dieses Testsystems ist die durch das zu testende Material verursachte Beschädigung eines Fibrinnetzes, welches unter dem Material und auf einer Agarose-Kollagen Schicht gebildet wurde.

Das in-vitro Testsystem und der Bewertungsmodus in Hinblick auf Verklebung eines Materials sind schematisch in der Abb. 4 dargestellt.

Aus den Folien wurden 3 cm x 2 cm große Stücke (10 pro Rezepturvariante) unter sterilen Bedingungen ausgestanzt. In sterile Petrischalen wurden 4 ml einer frisch hergestellten 1 % Agarose-Kollagensuspension gegeben. Hierfür wurden 0,1 g Agarose (Fa. BioRad, Art.-Nr. 162-0102) in 10 ml destilliertes Wasser gegeben und unter ständigem Rühren kurz aufgeköcht. Anschließend wurden 0,01 g Kollagen (Fa. SIGMA, Art.-Nr. C-9879) hinzugefügt und die Lösung unter Rühren auf 50 °C abgekühlt. Jeweils 10 ml dieser Lösung wurden in Petrischalen gegossen und auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Erkalten der Suspension und Ausbildung eines Gels wurden 1 ml Humanplasma, 1 ml einer 0,025 mol/l

CaCl₂ Lösung (ORH 061 Behring/Dade) und 1ml Actin^{FS}, ein Thrombin-haltiges Gerinnungsreagenz (Fa. Dade Behring, Art.-Nr. B4218-100), hinzupipettiert. Die Gerinnungskaskade, und somit die Ausbildung eines Fibrinnetzes, wurde hiermit induziert.

Auf das noch flüssige, nicht vollständig geronnene Humanplasma wurden nun die ausgestanzten Gelatine- und Agarfolienstücke gelegt und anschließend die Petrischalen bis zur vollständigen Ausbildung des Fibrinnetzes bei 37 °C über 2 Stunden inkubiert.

Eine Bewertung der Agar- und Gelatinefolien auf Wundverklebung erfolgte nach vorsichtiger Entfernung der Probenstücke von den Petrischalen mittels Pinzette. Das unter der Folie ausgebildete Fibrinnetz wurde unter dem Mikroskop (Fa. Leica, Typ Labovert) auf Beschädigung untersucht. Ein beschädigtes Fibrinnetz deutet auf vorhandene Wundverklebung hin. Ein intaktes Fibrinnetz zeigt, dass keine Wundverklebung stattgefunden hat. Zusätzlich wurden die auf dem Fibrinnetz sichtbar gewordenen Ablagerungen vermerkt.

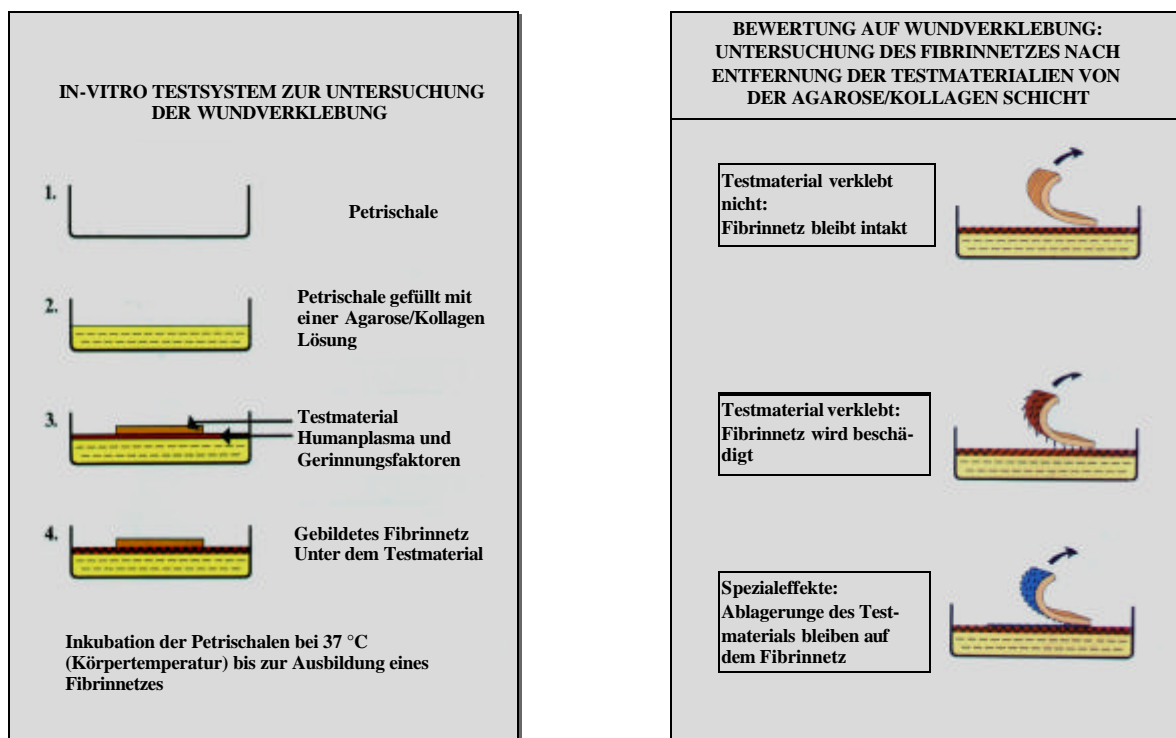


Abb. 4: Schematische Darstellung des in-vitro Tests zur Untersuchung der Wundverklebung von Materialien. Links: Simulation einer Wunde in-vitro; rechts: Bewertung der Materialien in Hinblick auf ihre Eigenschaft das Fibrinnetz nach Abzug von der in-vitro Wunde zu beschädigen.

2.3.3 Wechselwirkung der Folien mit Mausfibroblasten und Keratinozyten

Um feststellen zu können, ob die hergestellten Agar- und Gelatinefolien geeignet sind für eine weitere Besiedlung mit Hautzellen aus der Epidermis oder Dermis, wurden zunächst Versuche zur Bestimmung der Cytotoxizität von Folienextrakten durchgeführt. Anschließend wurden Mausfibroblasten und Keratinozyten direkt auf die Oberfläche der Folien gegeben, um zu prüfen, ob diese dort wachsen können.

2.3.3.1 Cytotoxizität der Folienextrakte

Die Bestimmung der Cytotoxizität erfolgte durch Anwendung eines Proliferationshemmtests mit Extrakten der Gelatine- bzw. Agarfolien und Mausfibroblasten 3T3-Swiss (ATCC CCL 92) in 96-er Zellkulturplatten (Microtiter-Zellkulturplatten, GREINER No 655180).

Der Test wurde gemäß der Normvorschrift ISO-10993-5 bzw. EN-30993-5 („Biologische Prüfung von Medizinprodukten, Teil 5: Prüfung auf Cytotoxizität: in-vitro Methoden“ vom August 1994) durchgeführt.

Für die Bestimmung des Wachstums der Mausfibroblasten wurden die Zellen in Anlehnung an die von KEISARI (1992) beschriebene Methode mit dem Hemacolor Färbeset (Merck, Art.-Nr. 1.11661), bestehend aus drei Lösungen (1, 2 und 3), gefärbt. Anschließend, nach Lösung der Farbkristalle mit SDS-Lösung, wurden die O.D.-Werte bei 630 nm photometrisch mit dem ELISA Reader (Dynatech, MR 5000) bestimmt. Im einzelnen wurde wie folgt verfahren:

- Waschen und Fixieren der Zellen durch Abkippen des Zellkulturmediums, vorsichtiges Ausklopfen der Platte auf Zellstoff, Waschen der Zellen durch Zugabe von je 200 µl PBS, anschließend Fixierung der Zellen durch Zugabe von je 50 µl Methanol-haltiges Reagenz 1, welches für 30 s auf den Zellen gelassen wurde.
- Färbung der Zellen durch Zugabe von je 80 µl Reagenz 2, welches bei Raumtemperatur für 60 s auf den Zellen gelassen und anschließend durch Abklopfen der Platten entfernt wurde, danach Zugabe von je 80 µl Reagenz 3, welches ebenfalls für 60 s bei Raumtemperatur auf die Zellen einwirkte.
- Nach Abklopfen und Entfernen des Farbstoffes von der Platte wurde diese mit Leitungswasser gründlich gewaschen und danach für 5 min in Wasser stehengelassen.

- Nach dem Ausklopfen und Abtropfen auf Zellstoff wurde der in den Zellen befindliche Farbstoff durch Zugabe von 200 µl einer 0,5 % SDS-Lösung in PBS und anschließender Inkubation über 60 min bei Raumtemperatur gelöst.
- Nach Entfernen der Luftblasen wurden die Platten bei 630 nm im ELISA-Reader vermessen.

Für die Herstellung der Extrakte wurden aus den Folien rechteckige Probenstücke von 0,5 – 1,0 cm Kantenlänge geschnitten und jeweils 1,0 g davon in 10,0 ml Zellkulturmedium (ohne FKS) für 24 h bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad (Fa. GFL, Art. Nr. 1083) extrahiert. Dies entspricht einer Testmaterial/Zellkulturmedium-Relation von 100 g/l. Nach Sterilfiltration der Extrakte (0,2 µm Millipore Filter) wurde eine Verdünnungsreihe mit Zellkulturmedium und FKS hergestellt (Verdünnungsschritte: 1:2; 1:4; 1:5; 1:10 und 1:100). Zusätzlich wurden 1 g Glycerin in 10,0 ml Zellkulturmedium gelöst und eine Verdünnungsreihe mit Zellkulturmedium und FKS hergestellt (Verdünnungsschritte: 1:2; 1:4; 1:10; 1:5 und 1:100), um die Toxizität des Glycerins untersuchen zu können.

Für den Proliferationshemmtest wurden 200 µl einer Mausfibroblasten-Suspension mit 3×10^4 Zellen/ml in die Kavitäten der Zellkulturplatten gegeben und über 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank mit 10 % CO₂ Begasung kultiviert.

Als 100 %-Kontrolle diente eine Zellkulturschale, die mit Zellkulturmedium + 5 % FKS und ohne Zusatz von Extrakten der Gelatine- und Agarfolien kultiviert wurde.

Als 0 %-Kontrolle oder Anfangswert diente eine Zellkulturplatte, die 24 Stunden nach dem Aussäen angefärbt wurde.

Die cytotoxische Kontrolle wurde hergestellt durch Extraktion einer cytotoxischen PVC-Scheibe (Portex Positive Control Disc, von Western Laboratory Service Ltd., Cat. – No. 499/300/000/000) mit einem Gewicht von 1,0 g in 10,0 ml Zellkulturmedium über 24 Stunden bei 37 °C. Dies entspricht einer Testmaterial/Zellkulturmedium-Relation von 100 g/l. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit frischem Zellkulturmedium hergestellt und für die Versuche verwendet (Verdünnungsschritte: 1:5; 1:10; 1:20; 1:50 und 1:80). Laut Angabe des Herstellers sollte bei Anwendung des 1:5 verdünnten Extraktes das Wachstum der Mausfibroblasten vollständig gehemmt werden. Bei Anwendung der 1:50 und 1:80 verdünnten Extrakte darf dagegen keine Cytotoxizität auftreten.

Nach 24 Stunden wurde das Medium der Zellkulturplatten vorsichtig abgesaugt und 200 µl der Gelatine- und Agarfolienextrakte, sowie die Extrakte der cytotoxischen Kontrolle hinzupipettiert. Außerdem wurde nach 24 Stunden Inkubation das Wachstum der Mausfibroblasten der 0 %-Kontrolle mittels Färbung mit Hemacolor und anschließender Messung der O.D.-Werte bestimmt.

Nach 48 Stunden wurde dann das Wachstum der Mausfibroblasten in Kontakt mit den Folienextrakten und mit der positiven cytotoxischen Kontrolle bestimmt.

Das relative Wachstum der Mausfibroblasten wurde wie folgt errechnet:

$$\text{Wachstum} = \frac{[\text{O.D. (Probe)} - \text{O.D. (0\%-Kontrolle)}]}{[\text{O.D. (100\%-Kontrolle)} - \text{O.D. (0\%-Kontrolle)}]}$$

Die Daten wurden dann grafisch dargestellt, um den IC₅₀-Wert zu bestimmen.

Der IC₅₀-Wert entspricht der Testmaterial/Zellkulturmedium-Relation (g/l), bei der eine 50%-ige Wachstumshemmung beobachtet wird, hohe Werte bedeuten eine geringe Cytotoxizität der Extrakte, niedrige eine stärkere Cytotoxizität.

2.3.3.2 Cytotoxizität der Folien im direkten Kontakttest

Für die Besiedlung verschiedener Gelatine- und Agarfolien mit **Mausfibroblasten** wurde die Zelllinie 3T3-Swiss albino (ATCC CCL 92) Klon 1 der Passage 35 verwendet. Die Kultivierung der Mausfibroblasten erfolgte in DMEM ohne Na-Pyruvat mit 4,5 g/l Glucose (GIBCO 41965-039) supplementiert mit 5 % FKS.

Für die Versuche wurden kreisrunde Stücke mit einem Durchmesser von 60 mm aus den Folien geschnitten, in Petrischalen gelegt und jeweils für 24 Stunden in 3 ml DMEM bei 37 °C vorgequollen. Nach Abnahme des Mediums wurden 3 ml der Mausfibroblasten-Zellsuspension mit einer Konzentration von ca. 3 x 10⁴ Zellen/ml in die Schale pipettiert. Die Folien wurden zur Fixierung auf dem Schalenboden mit Staplerklammern beschwert. Nach 2 Tagen Kultivierung wurden die Mausfibroblasten auf der Folie, neben der Folie bzw. im Kontrollschälchen unter dem Phasenkontrastmikroskop (Fa. Leica, Typ Labovert) fotografiert.

Für eine Besiedlung der Gelatine- und Agarfolien mit **Keratinocyten** wurden humane Keratinocyten aus dem DKFZ Heidelberg verwendet, die freundlicherweise von Prof. Fusenig

zur Verfügung gestellt wurden. Die Keratinozyten wurden in DMEM (GIBCO 041-01965) supplementiert mit 5 % FKS bei 10 % CO₂ Begasung im Brutschrank kultiviert. Für die Versuche wurden Keratinozyten aus einer Passage 52 verwendet. Aus den Folien wurden kreisrunde Stücke mit einem Durchmesser von 60 mm geschnitten. Anschließend wurden diese Stücke in Petrischalen gelegt und jeweils für 24 Stunden in 3 ml DMEM bei 37 °C vorgequollen. Nach Abnahme des Mediums wurden 3ml Zellsuspension mit einer Konzentration von ca. 3×10^4 Zellen/ml in die Schale pipettiert. Die Folien wurden zur Fixierung auf dem Schalenboden mit Staplerklammern beschwert. Nach 2 Tagen wurden die Keratinozyten unter dem Phasenkontrastmikroskop fotografiert.

2.4 VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON GELATINESCHÄUMEN

Aus der Literatur ist bekannt, dass Materialien die zur Besiedlung mit Hautzellen verwendet werden, verschiedene Strukturen wie z.B. Filme, perforierte Filme, Folien und Schäume haben können. Die Struktur des Materials übt einen wesentlichen Einfluss auf die Adhäsion und Proliferation insbesondere von Fibroblasten aus (DAVIES, 1983; HUBBEL, 1995).

2.4.1 Vorversuche

Die Vorversuche dienten der Herstellung stabiler Schäume aus Gelatine ohne Anwendung chemischer Vernetzer mit möglichen cytotoxischen Auswirkungen. Die Gelatineschäume sollten dann mit Mausfibroblasten besiedelt werden.

2.4.1.1 Herstellung von Gelatineschäumen durch Lyophilisierung und thermische Vernetzung

Die Lyophilisierung von Folien führt zu einer schnellen Bildung von Eiskristallen und anschließender Sublimierung des Wassers im Vakuum. Die Vernetzung der Gelatine mittels dehydrothermalen Behandlung ist eine physikalische Methode, die dazu führt, dass die vorab lyophilisierten Schäume in ihrer Struktur ohne Verwendung chemischer Vernetzer, stabilisiert werden (YANNAS et al., 1980). Aus der Literatur ist bekannt, dass die dehydrothermale Behandlung durch Kondensationsreaktionen und Bildung von Estern oder Amidinen zu einer Vernetzung von Kollagen führt (WEADOCK et al., 1984).

In einem ersten Schritt wurden wässrige Gelatinelösungen mit 1 % bzw. 10 % Gelatine und ohne Zugabe von Glycerin hergestellt. Für die Herstellung der Gelatinelösung wurden das Gelatinepulver (Sigma G-2500, Lot No. 91H0502) und das destillierte Wasser in einen

Kolben gegeben, das Gemisch im Wasserbad unter Rühren auf eine Temperatur von 85 °C erhitzt und für weitere 5 Minuten bei dieser Temperatur gehalten. Nach Abkühlen der Lösung auf 45 °C wurden jeweils 2,5 ml in jede Kavität einer 6 Well Zellkulturplatte pipettiert und diese bei Raumtemperatur bis zum Abkühlen und zur Bildung eines gleichmäßigen Films stehengelassen.

Die 6-Well Zellkulturplatten mit den Gelatinefilmen wurden dann für 6 bis 8 Stunden bei -20 °C im Gefrierschrank gekühlt. Anschließend wurden sie bei -50 °C und 0,04 mbar für ca. 67 Stunden in einen Lyophilisator (Fa. HETO, Typ HETOSICC) gestellt. Das in den Gelatinefilmen gefrorene Wasser konnte durch den Lyophilisierungsschritt in die Dampfphase übergehen. Aus den Gelatinefilmen entstanden milchig weiße Schaumgebilde.

Die Gelatineschäume wurden vorsichtig aus den Kavitäten der 6-Well Zellkulturplatten entfernt und in Petrischalen aus Glas überführt. Diese wurden dann in einen vorgewärmten Vakuumtrockenschrank (Fa. Ehret GmbH, Typ VTS 70 Nr. 0868V) gelegt und bei 110 °C und ca. 50 mbar über 24 Stunden dehydrothermal vernetzt. Danach wurden die Schäume einzeln in Polyethylen-Probenbeutel (Fa. Fischer, Art.-Nr. 666 911 50) verpackt und in der Bestrahlungsanlage der Fa. Beiersdorf AG in Hamburg Hausbruch mittels γ -Bestrahlung (30 kGy) sterilisiert.

Die Schäume konnten dann für weitere Versuche zur Besiedlung mit Mausfibroblasten verwendet werden.

2.4.1.2 Beimpfen der Gelatineschäume mit Mausfibroblasten

Für die Beimpfung der Schäume wurden Mausfibroblasten der Zelllinie 3T3-Swiss albino (ATCC CCL 92) verwendet. Zunächst wurden die Mausfibroblasten bei 37°C und 10 % CO₂ Begasung in 7,5 cm² Zellkulturflaschen mit DMEM Medium ohne Na-Pyruvat mit 4,5 g/l Glucose (GIBCO 41965-039) supplementiert mit 5 % FKS kultiviert. Nachdem ein konfluent gewachsener Zellrasen entstanden war, konnten die Zellen von der Zellkulturflasche mittels Trypsinbehandlung abgelöst werden. Anschließend wurden die Flaschen aus dem Brutschrank entnommen und 2ml DMEM Medium hinzupipettiert. Um die abgelösten Mausfibroblasten aufnehmen zu können, wurde die Suspension mehrmals mit der Pipette resuspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt mittels Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer) und eine Zellsuspension mit einer Zelldichte von ca. 4×10^5 Mausfibroblasten/ml hergestellt.

In den Kavitäten von 6-Well Zellkulturplatten wurde jeweils ein steriler Gelatineschaum platziert. Anschließend wurden die Schäume mit 0,5 ml der Mausfibroblasten-Suspension beimpft und bei 37 °C und 10 % CO₂ Begasung für ca. 2 Stunden in den Brutschrank gestellt.

Danach wurden 6 ml DMEM Zellkulturmedium pro Kavität in die 6-Well Zellkulturplatten hinzupipettiert und die Schäume über 72 Stunden weiter kultiviert.

Nach dieser Zeit wurden die Schäume aus dem Brutschrank entnommen und mittels Hemacolor gefärbt (Färbung siehe 2.4.1.3).

2.4.1.3 Färbung der Fibroblasten in den Gelatineschäume

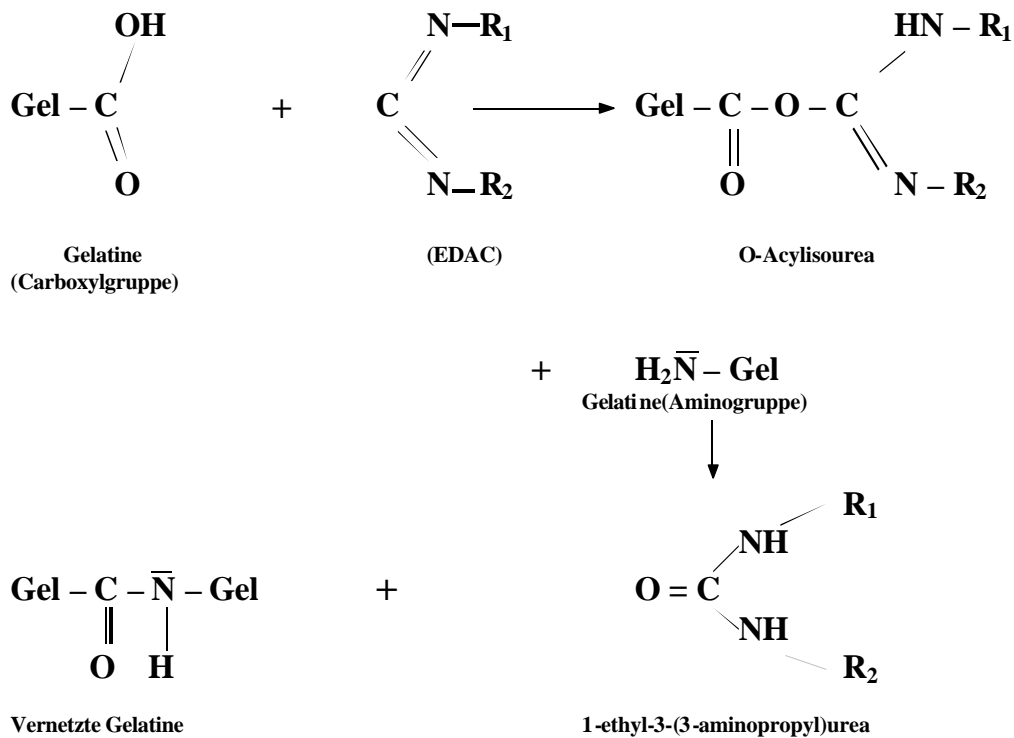
Um feststellen zu können, ob bzw. wo die Mausfibroblasten nach 72 Stunden Kultivierung verbleiben, wurde eine Färbung der Gelatineschäume vorgenommen. Hierzu diente der Hemacolor-Schnellfärbetest. Die mit Zellen besiedelten Schäume wurden zunächst aus dem Brutschrank entnommen und sehr vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Methanol für 30 sec fixiert. Nach Abnahme von der Fixierlösung wurde die Farblösung 1 hinzupipettiert (1,3 g/l Eosin G) und nach 1 Minute wieder entfernt. Anschließend wurde die Farblösung 2 hinzupipettiert (1,2 g/l Methylenblau) und nach 2 Minuten wieder abgenommen. Als letztes wurde der gefärbte Schwamm mit Leitungswasser für 1 Stunde gründlich ausgewaschen. Die gefärbten Schäume konnten dann unter dem Phasenkontrastmikroskop untersucht und fotografiert werden.

Vitale Fibroblasten färben sich nach Anwendung dieser Methode dunkel rot.

2.4.2 Hauptversuche: chemische Vernetzung der Gelatineschäume mit EDAC

Das Ziel der im folgendem beschriebenen Versuche lag in der Optimierung der Stabilität von Gelatineschäumen insbesondere gegenüber einem enzymatischen Abbau. Dies sollte erreicht werden durch Anwendung eines chemischen Vernetzers. Die Vernetzung der Gelatineschäume wurde mit einem wasserlöslichen Carbodiimid, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid hydrochlorid (EDAC), (Fa. Sigma, E-1769), vorgenommen.

Das Prinzip der Vernetzung von Proteinen wie Kollagen oder Gelatine mit dem Carbodiimid beruht auf einer Verknüpfung der Carboxyl- und Aminogruppen von Aminosäureresten durch Bildung von Isopeptidbindungen. Der überschüssige Anteil an EDAC kann aus der vernetzten Matrix leicht ausgewaschen werden, so dass mögliche cytotoxische Effekte gegenüber Fibroblasten und Keratinozyten gering gehalten werden können (LEE et al. 1996).



Für die Herstellung von mit EDAC vernetzten Gelatineschäumen wurden spezielle Förmchen aus Plexiglasscheiben mit einem Durchmesser von 14,5 mm und einer Stärke von 4,5 mm hergestellt (Abb. 5). Diese Förmchen wurden mit einer Teflon beschichteten Folie (BYTAC) beklebt, so dass keine Haftung der Gelatinemasse an die Plexiglasscheiben stattfinden konnte. Als nächstes wurde um die Plexiglasscheibe eine Wand aus Silikon angefertigt, so dass kleine kreisrunde Förmchen entstehen konnten.

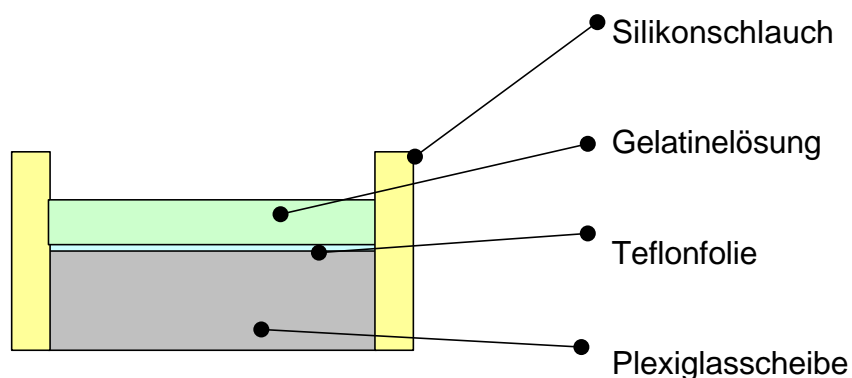


Abb. 5: Schematische Darstellung der Förmchen für die Herstellung der Schäume aus Gelatine

Eine Vernetzung der Gelatineschäume mit EDAC wurde durch Anwendung von zwei Verfahren erzielt:

- direkte Zugabe von EDAC-Pulver in eine Gelatinelösung
- Behandeln von lyophilisierten Gelatineschäumen mit einer wässrigen EDAC-Lösung wie von OLDE DAMINK et al. (1996) beschrieben.

2.4.2.1 Vernetzung durch direkte Zugabe von EDAC in die Gelatinelösung

Für die Herstellung von Gelatineschäumen und deren direkte Vernetzung durch Zugabe von EDAC-Pulver in das Reaktionsgemisch wurde eine 10 % Gelatinelösung in destilliertem Wasser verwendet (siehe 2.4.1.1). Bei einer Temperatur von 45 °C und unter ständigem Rühren wurden der Gelatinelösung 28 mg EDAC hinzugefügt. Diese wurde anschließend mit einer Pipette aufgenommen und jeweils 250 µl der Lösung in die Förmchen gegeben. Die Förmchen wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur bis zum Erkalten der Gelatinelösung und Ausbildung eines Films stehengelassen. Anschließend wurden sie für mindestens 2 Stunden bei -20 °C in die Gefriertruhe gestellt. Die gefrorenen Gelatinefolien wurden dann für mindestens 30 Stunden in den vorgekühlten Lyophilisator bei -50 °C und 0,04 mbar gestellt. Das gefrorene Wasser in den Gelatinefolien konnte in die Dampfphase übertreten, wobei lockere, weiße Gelatineschäume gebildet wurden.

Nach dem Lyophilisieren wurden die Gelatineschäume vorsichtig aus den Förmchen entnommen, in Petrischalen aus Glas gelegt und dann in einem auf 110 °C vorgeheizten Vakuumtrockenschrank bei ca. 50 mbar Vakuum für 6 – 8 Stunden dehydrothermal vernetzt. Um mögliche EDAC-Reste aus den Gelatineschäumen zu entfernen, wurden ca. 10 Gelatineschäume in mit 40 ml destilliertem Wasser gefüllten Zentrifugenröhrchen (FALCON, Art.-Nr. 227.261) gegeben und für 24 Stunden bei Raumtemperatur und bei leichtem Schütteln gewaschen. Die gewaschenen Schäume wurden für 6 Stunden in den Kühlschrank bei -20 °C und anschließend für 15 - 20 h in den Lyophilisator gestellt. Anschließend wurde wie unter 2.5.1.2 beschrieben verfahren zwecks Sterilisation der Gelatineschäume.

2.4.2.2 Vernetzung durch Anwendung einer EDAC-Lösung

Für die Vernetzung der Gelatineschäume durch Anwendung einer EDAC-Lösung wurden zunächst Schäume aus einer 10 % Gelatinelösung in destilliertem Wasser hergestellt. Hierfür wurde wie unter Punkt 2.4.2.1 beschrieben verfahren, mit dem einzigen Unterschied, dass der Gelatinelösung kein EDAC-Pulver zugefügt wurde.

Die Gelatineschäume wurden in Röhrchen (FALCON Art.-Nr. 227-261) überführt und in einer mit destilliertem Wasser und EDAC-Pulver frisch angesetzten wässrigen Lösung über 24 Stunden inkubiert. Das Verhältnis Gelatineschäume : Wasser : EDAC wurde so gewählt, dass die Konzentration an EDAC in den Gelatineschäumen bei 2, 3, 5 und 7 Gew. % lag.

Nach der Vernetzung wurden die Gelatineschäume aus den Röhrchen entnommen und mit jeweils 50 ml einer 0,1 M Na_2HPO_4 Lösung für 2 Stunden und mit 50 ml destilliertem Wasser 4 mal für jeweils 10 Minuten gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Gelatineschäume für 2 Stunden in den Gefrierschrank gestellt und anschließend bei $-50\text{ }^\circ\text{C}$ und 0,04 mbar für 48 Stunden lyophilisiert. Anschließend wurden sie in einen auf $110\text{ }^\circ\text{C}$ vorgeheizten Vakuumtrockenschrank bei ca. 50 mbar für 6 – 8 Stunden dehydrothermal vernetzt.

Die Schäume wurden dann wie unter 2.5.1.2 beschrieben verpackt und sterilisiert.

2.4.3 Biologische Charakterisierung der mit EDAC vernetzten Gelatineschäume

Die Charakterisierung der biologischen Eigenschaften EDAC-vernetzter Gelatineschäume erfolgte durch Bestimmung der Degradation nach Inkubation mit einer Kollagenaselösung, der Flüssigkeitsaufnahme und der Quellung nach Inkubation in PBS sowie durch Ermittlung des Vernetzungsgrades der Gelatine nach Anwendung verschiedener EDAC-Konzentrationen. Die Versuche sollten klären, ob bzw. inwieweit die Art der Anwendung und die Konzentration des Vernetzers EDAC einen Einfluss auf die oben aufgeführten Eigenschaften der Gelatineschäume hat.

2.4.3.1 Flüssigkeitsaufnahme und Quelleigenschaften

Gelatineschäume quellen nach Inkubation mit wässrigen Lösungen, was zu einer Gewichtszunahme führt. Der Grad an Vernetzung der Gelatineschäume beeinflusst die Gewichtszunahme: je stärker vernetzt, desto weniger Wasser wird von den Gelatineschäumen aufgenommen. Für die Bestimmung der Menge an aufgenommener Flüssigkeit wurden mit EDAC vernetzte und als Kontrolle unvernetzte, nur dehydrothermal behandelte

Gelatineschäume verwendet. Pro Variante wurden jeweils 3 Schäume gewogen und ihr Durchmesser bestimmt. Die Schäume wurden dann in Röhrchen (FALCON Art.-Nr. 22.261) überführt und mit 5ml DMEM über 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schäume vorsichtig mit einer Pinzette aus den Röhrchen entnommen, die an der Oberfläche vorhandene Flüssigkeit abgetupft und ihr Durchmesser mit dem Maßstab bestimmt. Anschließend wurden sie in den Lyophilisator gestellt, über 24 Stunden gefriergetrocknet und erneut gewogen.

Die Trockengewichtsdifferenzen vor und nach Inkubation in Zellkulturmedium dienten der Berechnung der Flüssigkeitsaufnahme der Schäume.

Die Zunahme der Durchmesser der Proben nach Inkubation in Zellkulturmedium diente der Bestimmung der Quellung.

2.4.3.2 Herstellung von Gefrierschnitten zur Beurteilung der Porenstruktur

Bei Kollagenschäumen wird eine Einwanderung von Fibroblasten in die Schaumstruktur durch die Porengröße der Schäume beeinflusst (CHVAPIL, 1977; DAGALAKIS et al., 1980; HUBBEL, 1995).

Um feststellen zu können, ob die Art und Menge des Vernetzers EDAC die Porenstruktur der Gelatineschäume beeinflusst, wurden Gefrierschnitte der Schäume mit dem Kryomikrotom (Fa. MICROM, Typ Mikrotom Kryostat HM 500 OM) hergestellt.

Hierfür wurden 1 cm² große Stücke der Schäume hochkant auf dem Mikrotom-Stempel befestigt und ein Tropfen Einbettmedium (Fa. MOCROM, Art.-Nr. 350100) dazugegeben. Das Kryomikrotom wurde auf Schnellgefrieren (-55 °C / 8 min.) eingestellt und das Probenstück mit der Pinzette hochkant so lange festgehalten, bis das Einbettmedium gefroren war. Danach wurden Schnitte mit einer Dicke zwischen 20, 40, und 90 µm hergestellt. Diese wurden mit dem Mikroskop (Leika, Typ Labovert) auf Unterschiede in Porengröße und Porenverteilung untersucht.

2.4.3.3 Überprüfung des Vernetzungsgrades durch Bestimmung des Gehaltes an freien Aminogruppen nach Reaktion der Schäume mit 2,4,6 Trinitrobenzoesäure

Um den Vernetzungsgrad von Gelatineschäumen zu ermitteln, wurde der Gehalt an freien Aminogruppen, an mit EDAC vernetzten und an unvernetzten, nur dehydrothermal behandelten Gelatineschäumen nach Reaktion der Schäume mit 2,4,6 Trinitrobenzoesäure, TNBS (SIGMA, P-2297, Lot 118H5008) bestimmt (BUBNIS et al. 1992).

Von jeder Gelatineschaumvariante wurden 10 mg abgewogen und in ein Reagenzröhrchen mit 1 ml einer 4 % NaHCO₃ Lösung pH 8,5 überführt. Anschließend wurde 1 ml einer 0,5 % TNBS Lösung hinzugefügt. Das Gemisch wurde auf 40 °C erhitzt und für 4 Stunden unter leichtem Rühren inkubiert. Anschließend wurden 3 ml einer 6 N HCL Lösung hinzupipettiert und die Röhrchen 1 Stunde bei 120 °C im Autoklaven hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde dann 3 mal mit je 20 ml Diethylether (Merck, Art.-Nr. 929, Lot 7496716) extrahiert, um den Überschuss an nicht reagiertem TNBS und die TNP-α Aminogruppen zu eliminieren. Ein Aliquot von 5,0 ml der wässrigen Phase wurde mit der Pipette aufgenommen und 15 Minuten im Wasserbad erhitzt, um das noch vorhandene Äther zu verdunsten. Das Aliquot wurde mit 15,0 ml destilliertem Wasser verdünnt und die O.D.-Werte bei 346 nm gemessen.

Pro Schaumvariante wurden jeweils 4 einzelne Probenstücke untersucht und die Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte bei 346 nm wurden für die Berechnung des Vernetzungsgrades verwendet. Als Kontrollen dienten Schäume, die nicht mit EDAC vernetzt jedoch dehydrothermal behandelt wurden. Hier wurden die höchsten O.D.-Werte erwartet.

Die gemessenen OD-Werte bei 346 nm wurden in Vernetzungsgrad der Gelatineschäume in % wie folgt umgerechnet:

Mol e Aminogruppen	(O.D.-Werte) x (0.02 l)
$\frac{3}{4} \frac{3}{4} \frac{3}{4} \frac{3}{4} \frac{3}{4} \frac{3}{4} \frac{3}{4} \frac{3}{4} \frac{3}{4} \frac{3}{4}$	$\frac{3}{4} \frac{3}{4}$
g Gelatine	(1,46 x 10⁴ l/mol x cm) x (b) x (X)

Wobei:

1,46 x 10⁴ l/mol x cm = molarer Extinktionskoeffizient von Trinitrophenyllysin

b = Schichtdicke der Küvette in cm

X = Menge an eingesetztem Gelatineschaum in g

l = Probenvolumen

Der Grad an Vernetzung der Gelatineschäume in Prozent wurde wie folgt berechnet:

Vernetzungsgrad in %	$\frac{\text{O.D.-Werte der vernetzten Gelatineschäume}}{\text{O.D.-Werte der unvernetzten Gelatineschäume}} \times 100$
-----------------------------	--

2.4.3.4 Enzymatische Degradation der Gelatineschäume

Die Degradation von mit EDAC vernetzten und nicht vernetzten Gelatineschäumen wurde durch Inkubation mit bakterieller Kollagenase (EC 3.4.24.3. *Clostridium histoliticum* von SIGMA) mit einer spezifischen Aktivität von 414 U/mg überprüft. Hierfür wurden 10 mg Gelatineschaum in Röhrchen (FALCON Art.-Nr. 227.261) gelegt, 0,5 ml einer 0,1 M Tris HCL Lösung (pH 7,4) mit 0,005M CaCl₂ hinzupipettiert und zusätzlich 0,05 mg Natriumazid hinzugefügt. Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,5 ml Kollagenaselösung in Tris HCL Puffer mit einer Volumenaktivität von 200 U/ml hinzupipettiert. Die Kollagenase-Konzentration in der Inkubationslösung betrug 100 U/ml, d.h. 10 U/mg Gelatineschaum.

Nach ½, 1, und 24 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben (pro Zeitpunkt n = 3) vorsichtig aus den Zellkulturröhrchen entnommen, mit destilliertem Wasser gewaschen und nach Trocknung im Lyophilisator das Trockengewicht erneut bestimmt.

Die Degradation der Gelatineschäume wurde bestimmt, indem der Gewichtsverlust der Proben als Restgewicht in Prozent bezogen auf das Initialgewicht berechnet wurde.

2.4.4 Gelatineschäume als Matrix für Humanfibroblasten

OSBORNE et al. (1997) berichteten über die Eignung von EDAC als Vernetzer für Kollagen und Gelatine und beschrieben den Einfluss der verwendeten Konzentration auf die Entwicklung von Fibroblasten in vernetzten Materialien.

Um feststellen zu können, in wie weit die Art und die Menge des zugegebenen EDAC einen Einfluss auf die Besiedlung der Gelatineschäume mit Humanfibroblasten hat, wurden vergleichende Versuchsreihen über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen durchgeführt.

2.4.4.1 Kultivierung der Humanfibroblasten

Die Beimpfung der Gelatineschäume erfolgte mit normalen humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) von der Fa. PromoCell (Lot. Nr. 802231).

Zunächst wurden die Cryo-Röhrchen mit den gefrorenen Fibroblasten vorsichtig durch Erwärmen in der Hand aufgetaut. Die aufgetauten Fibroblasten wurden dann vorsichtig aus den Cryo-Röhrchen entnommen und auf Zellkulturflaschen 25 cm² (Greiner 609160) pipettiert.

Als Zellkulturmedium wurde DMEM (Gibco BRL Best. Nr. 41966-029) mit Natriumpyruvat und 4500 g/L Glucose supplementiert mit Nutrient Mixture Ham's (Sigma Nr. N 4888), L-Glutamin (200 mM Gibco BRL), FKS (Gibco BRL Lot. Nr. 40Q57744) und Pen/Strep (Gibco BRL Lot. Nr. 13Q8068) verwendet.

Die verwendete Mixtur war folgende: 362,5 ml DMEM + 112,5 ml Ham's F-12 + 5 ml L-Glutamin + 2.5 ml Pen/Step + 25 ml FKS.

Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und unter Begasung mit 10 % CO₂. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt. Nach ca. 14 Tagen bildete sich ein konfluenter Zellrasen.

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Fibroblasten mittels Trypsinbehandlung von der Zellkulturflasche gelöst. Hierfür wurde zunächst das Medium aus den Flaschen vorsichtig abpipettiert und die Fibroblasten mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde 3 ml Trypsin / EDTA Lösung in die Flaschen gegeben und diese dann für 3 bis 4 Minuten in den Brutschrank bei 37 °C gestellt. Um das Trypsin zu inhibieren, wurden dann pro Flasche 6 ml Zellkulturmedium hinzupipettiert und die Suspension vorsichtig mit der Pipette resuspendiert, um alle Fibroblasten vom Boden der Flasche ablösen zu können. Die Trypsin-EDTA Lösung mit den abgekugelten Fibroblasten wurde dann für 10 min bei 110 x g abzentrifugiert und die Fibroblasten in frischem Medium resuspendiert. Diese Fibroblasten-Suspension wurde dann 1:5 verdünnt, in Zellkulturflaschen pipettiert und weiter kultiviert.

2.4.4.2 Beimpfung der Gelatineschäume mit Humanfibroblasten

Eine Beimpfung der Gelatineschäume mit der Fibroblasten-Suspension erfolgte nach vorheriger Konditionierung der Schäume mit DMEM. Hierfür wurden zunächst die Gelatineschäume in 6 Well Zellkulturschalen transferiert (ein Schwamm pro Kavität) und in die Mitte der Schäume 100 µl DMEM pipettiert. Nach 1 Stunde war das Medium in den Schwamm eingedrungen.

Die Gelatineschäume wurden dann mit 40 µl einer Fibroblasten-Suspension mit $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml beimpft und 3 Stunden bei 37 °C im Brutschrank stehengelassen. Nach dieser Zeit wurden pro Kavität jeweils 4 ml DMEM vorsichtig am Rande der Kavität hinzupipettiert und die Schäume im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ Begasung bis zu 14 Tage inkubiert.

Als Kontrolle diente ein Schaum in der 6 Well Zellkulturplatte, welcher nur mit 4,5 ml DMEM über 14 Tage inkubiert wurde.

2.4.4.3 Bestimmung der Vitalität der Fibroblasten

Die von BORENFREUND et al. (1998) beschriebenen MTT Methode wurde leicht modifiziert und für die Bestimmung der Vitalität von Fibroblasten verwendet, die auf mit EDAC vernetzten Gelatineschäumen für 1 bis 14 Tagen kultiviert wurden. Die MTT Methode beruht auf der Reduktion des Tetrazolium Salzes zu Formazan durch die Dehydrogenasen in den Mitochondrien der vitalen Fibroblasten (CIAPETTI et al. 1993).

Erstellen einer Eichkurve

Um die gemessenen O.D.-Werte nach MTT Färbung einer mittels Neubauer-Zählkammer gezählten Fibroblasten-Anzahl zuordnen zu können, wurde eine Eichkurve erstellt. Hierbei wurde wie folgt vorgegangen:

- Herstellung einer Verdünnungsreihe einer Fibroblasten-Suspensionen mit einer Anzahl von 5×10^5 , 10×10^4 , 5×10^4 , 10×10^3 und 5×10^3 Fibroblasten in 2 ml Suspension,
- Pipettieren der Fibroblasten-Suspension in einer 96-Well-Platte und Inkubation für 3 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂,
- Zugabe von 200 µl Tetrazoliumsalz-Lösung** (SIGMA, M2128, Lot 66H5033) pro Kavität und weitere Inkubation der Zellkulturschale für 3 Stunden bei 37 °C,
- Zugabe von 200 µl DMSO (Merck 102952 1000 Ch. B. K 26058752 901) pro Kavität, um die gebildeten Formazan Kristalle zu lösen,
- Inkubation im Dunkeln für 15 min,
- Messung der O.D.-Werte durch Überführung von je 200 µl der MTT Lösung auf eine neue Mikrotiterplatte und photometrische Messung mit dem ELISA Reader (Dynatech, MR 500) bei 550 nm.
- Beimpfung einer zweiten 96-Well-Zellkulturplatte mit der gleichen Verdünnungsreihe der Fibroblasten-Suspension,
- Inkubation für 6 Stunden bei 37 °C und 10 % CO₂ Begasung,
- Lösen der Fibroblasten von der Zellkulturplatte durch Trypsinbehandlung und Aufnahme in frisches Zellkulturmedium,
- Bestimmung der Zellzahl in der Suspension mittels Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer),
- Zuordnung der gemessenen O.D.-Werte nach MTT Färbung zu den mit der Neubauer-

** 5mg 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid / ml Phosphatpuffer

Zählkammer gezählten Fibroblasten-Anzahl,

- Erstellung einer Eichkurve durch Auftragung der gemessenen O.D.-Werte gegen die ermittelte Anzahl an Fibroblasten mittels Zählung mit der Zählkammer.

MTT-Färbung der Fibroblasten in den Gelatineschäumen

Die mit Humanfibroblasten beimpften Gelatineschäume wurden nach 1, 4, 7, 11 und 14 Tagen Kultur aus dem Brutschrank genommen und wie folgt behandelt:

- Pro Zeitpunkt wurden 3 ganze Schäume aus den Zellkulturschalen entnommen und in eine 6-Well Zellkulturplatte gelegt.
- Zu jeder Kavität bzw. zu jedem Schaum wurden 2 ml DMEM und 200 µl Tetrazoliumsalz-Lösung ** hinzugefügt.
- Die Zellkulturschalen wurden 3 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.
- Röhrrchen (Greiner Art.-Nr. 227.261) wurden mit Alufolie umwickelt und je 2 ml DMSO hinzupipettiert.
- Die Gelatineschäume wurden aus den Zellkulturschalen entnommen und mit einer Pinzette in die Röhrrchen überführt, wo sie für 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen wurden.
- Danach wurden die Gelatineschäume mit einem Homogenisator (Ultra Turrax Fa. Janke & Kunkel KG Typ 18/10) für 5 sec. homogenisiert und je 200 µl des Überstandes in eine 96-Well-Platte pipettiert.
- Die Absorption bei 550 nm wurde dann mittels Photometer bestimmt.
- Als Kontrolle wurde für jeden Zeitpunkt ein Gelatineschwamm in DMEM Zellkulturmedium aber ohne Fibroblasten mitgeführt.
- Der gemessene O.D.-Wert der Kontrolle wurde von den gemessenen O.D.-Werten der Gelatineschäume abgezogen
- Eine Zuordnung der O.D.-Werte zu einer vorhandenen Anzahl an Humanfibroblasten wurde anhand der Eichkurve vorgenommen.

** 5mg 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid / ml Phosphatpuffer

2.4.4.4 Färbung der Fibroblasten in den Gelatineschäumen

Um feststellen zu können, ob bzw. wo in den Gelatineschäumen vitale Fibroblasten vorhanden waren, wurden die besiedelten Schäume mit dem Hemacolor-Schnellfärbetest wie unter 2.4.1.3 beschrieben gefärbt.

2.4.4.5 Immunhistochemische Untersuchungen zur Proliferation von Fibroblasten

Eine sensitive Methode zur Bestimmung der Zellproliferation von Fibroblasten ist der Nachweis des Ki-67 Proteins. KLEIN et al. (2000) konnten zeigen, dass dieses Protein von Zellen in der G₁-, S₁-, G₂- Phase und in der Mitose exprimiert wird, aber nicht in der G₀-Phase Phase.

Diese Methode wurde verwendet, um die Proliferation von Fibroblasten an Gefrierschnitten der mit Fibroblasten besiedelten Gelatineschäume nachzuweisen. Hierfür wurden die Gelatineschäume nach 1, 4, 7, und 14 Tagen Kultur aus den Zellkulturplatten entnommen und durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff gekühlt. Anschließend wurden die Proben hochkant auf dem Mikrotom-Stempel befestigt und ein Tropfen Einbettmedium (MICROM, Cat. Nr. 350100) dazugegeben. Nachdem die Proben auf dem Stempel gefroren waren, wurden Schnitte mit einer Dicke von 20 µm bis 90 µm hergestellt.

Die Schnitte wurden dann auf silanisierte Objektträger (DAKO S 3003) gebracht und für 10 Minuten mit Aceton fixiert. Nach Abdunsten des Acetons wurden die Schnitte mit ausreichend Tris-gepufferter Kochsalzlösung pH 7,6 (TBS Puffer Dako Code Nr. S3001) gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde als nächstes ein Tropfen DAKO Peroxidase Blocking Reagent (DAKO S 2001) dazugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden die Gefrierschnitte erneut gründlich mit TBS Puffer gewaschen.

Als nächstes folgte die Inkubation der Schnitte mit einem Tropfen Maus Primärantikörper Anti-Ki-67 Monoclonal Mouse (Code Nr. M 7187 Lot. 018), welches 1:40 mit dem Antikörperverdünnungsmedium (DAKO S 0809) verdünnt wurde. Nach 30 Minuten Inkubation in der feuchten Kammer wurden die Gefrierschnitte erneut mit TBS Puffer gewaschen und für 5 Minuten in frischem TBS Pufferbad stengelassen.

Dann wurde ein Tropfen Ziege-Anti-Mausimmunglobulin konjugiert an Meerrettichperoxidase-markiertes Dextranpolymer (DAKO EnVision™ + Code Nr. K 4000) zugegeben.

Die Gefrierschnitte wurden in der feuchten Kammer 30 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Es folgte ein weiterer Waschvorgang mit TBS Puffer und ein Inkubieren der Schnitte in frischem TBS Puffer für 5 Minuten.

Als letzter Schritt folgte dann eine Inkubation für 50 Minuten bei 37 °C mit dem AEC (DAKO K 3461) Chromogen-Substrat. Die Schnitte wurden dann mit destilliertem Wasser gespült, ein paar Tropfen Hematoxylin-Lösung aufpipettiert und nach 1 Minute Einwirkzeit die Gefrierschnitte für 5 Minuten mit Leitungswasser gewaschen. Die gefärbten Gefrierschnitte wurden dann an der Luft getrocknet.

Die Zellkerne von proliferierenden Fibroblasten werden nach Anwendung dieser Methode rot gefärbt.

2.5 ORIENTIERENDE VERSUCHE FÜR DEN AUFBAU EINES IN-VITRO TESTSYSTEMS

Die im folgenden beschriebenen Versuche wurden durchgeführt, um die Eignung der mit EDAC vernetzten und mit Humanfibroblasten besiedelten Gelatineschäume für den Aufbau eines in-vitro Testsystems zu überprüfen.

Hierfür wurde zunächst eine geeignete Apparatur konzipiert, die für die Durchführung orientierender Vorversuche verwendet werden sollte. Diese sollte die Einspannung der mit Fibroblasten besiedelten Gelatineschäume und des Testmaterials ermöglichen. Dabei sollten sowohl der Gelatineschaum als auch das Testmaterial über die gesamte Inkubationszeit von bis zu 14 Tagen in Kontakt mit dem Zellkulturmedium stehen. Außerdem sollte das Testmaterial in Kontakt mit der mit Fibroblasten beschichteten Oberfläche des Gelatineschaumes stehen, ohne dass hierdurch mechanische Verletzungen an der Oberfläche des Schaumes verursacht wurden. Das in-vitro Testsystem sollte auch geeignet sein für Untersuchungen mit stark saugenden und quellenden Testmaterialien.

2.5.1 Aufbau einer geeigneten Testapparatur

Für den Aufbau einer geeigneten in-vitro Testapparatur wurden die Transwell-Platten von COSTAR Nr. 3450 modifiziert. Zunächst wurde die Membran der Einsätze in den Transwell-Platten vorsichtig mit dem Skalpell herausgeschnitten. Dann wurden Ringe aus Plexiglas eingesetzt und zwar so, dass die Gelatineschäume zwischen den zwei Ringen eingespannt werden konnten (Abb. 6). Die vorbereiteten Transwell-Platten mit den Gelatineschäumen wurden dann wie unter 2.4.1.2 beschrieben verpackt und sterilisiert. Anschließend konnten

die Gelatineschäumen mit Fibroblasten beimpft, Zellkulturmedium hinzugefügt werden und das Testmaterial auf die mit Fibroblasten besiedelten Schäume gelegt werden.

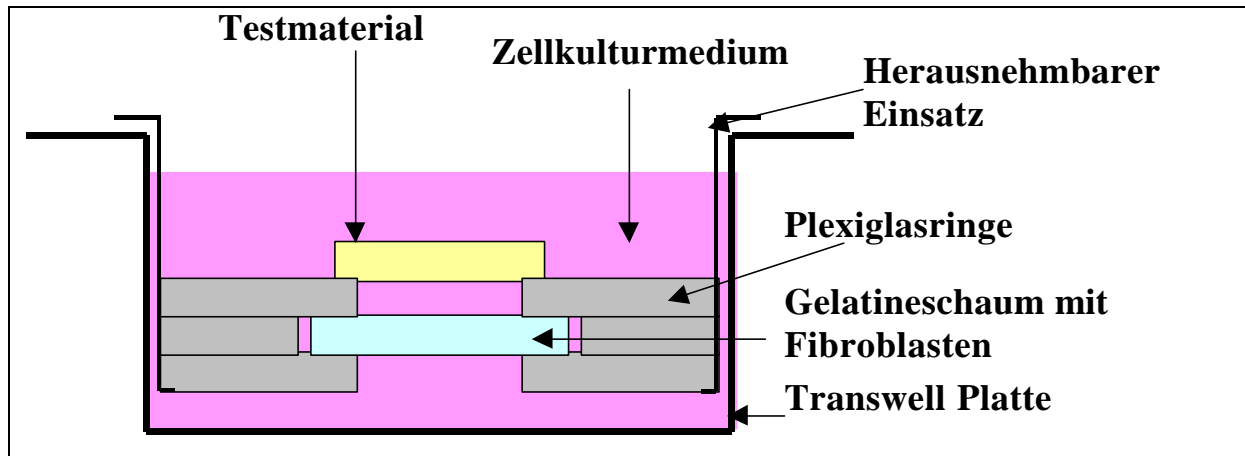


Abb. 6: Modifizierte Transwell Zellkulturplatte, die als in-vitro Apparatur verwendet werden konnte.

2.5.2 Beschreibung und erste Anwendungen des in-vitro Testsystems

Nach der Sterilisation wurden die mit dem Gelatineschaum bestückten Zellkultur-Platten unter die sterile Werkbank (Heraeus, Typ Lamin-Air) gestellt. Auf die Mitte der Gelatineschäume wurden vorsichtig 100 µl DMEM Zellkulturmedium hinzupipettiert und die Platten bei 37°C in den Brutschrank gestellt.

Nachdem das Zellkulturmedium von den Gelatineschäumen aufgenommen wurde, konnten 40 µl einer Humanfibroblasten-Suspension mit $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml hinzupipettiert und die Platten für 3 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ Begasung in den Brutschrank gestellt werden. Danach wurden mit der Pipette 9 ml DMEM Zellkulturmedium mit 5% FKS in den unteren Einsatz der Transwell Platten gegeben und die Fibroblasten über 24 Stunden in den Brutschrank gestellt.

Nach 24 Stunden Inkubation der Humanfibroblasten auf den Gelatineschäumen wurde das Zellkulturmedium vorsichtig abpipettiert. Die PVC-Scheiben mit 188 mg und 1,2 cm Durchmesser, die als Standard für cytotoxische Untersuchungen verwendet werden, wurden dann vorsichtig auf die mit Fibroblasten besiedelte Gelatineschäume gelegt. Von der Seite und auf die Unterseite der Transwell-Einsätze wurden zusätzlich 9 ml DMEM Zellkulturmedium hinzupipettiert. Unter diesen Bedingungen lag die Relation von cytotoxischer PVC-Scheibe zu DMEM bei 20,8 g/l. Die vorbereiteten Transwell-Platten

wurden dann in den Brutschrank gestellt und bei 37 °C und 5 % CO₂ Begasung über 11 Tage inkubiert. Mediumwechsel erfolgte am 4. und 7. Inkubationstag.

Als Kontrollen dienten mit Fibroblasten besiedelte Gelatineschäume, die keinen Kontakt zu dem Testmaterial hatten.

Zusätzlich wurden Versuche mit einem Schaum aus Polyurethan durchgeführt, welcher Anwendung bei der Versorgung von stark sezernierenden Wunden findet. Dieser Schaum besitzt die Eigenschaft, dass er stark quillt nach Aufnahme von Flüssigkeit. Probenstücke mit 6 mm Durchmesser und einem Gewicht von 33 mg wurden ausgestanzt und für die Versuche im „in-vitro Testsystem“ verwendet. Durch Zugabe von 9 ml DMEM in das Testsystem wurde gewährleistet, dass ausreichend Flüssigkeit für die Versorgung der Fibroblasten auf den Gelatineschäumen vorhanden war. Zusätzlich konnte eine Extraktion von löslichen Bestandteilen aus den Schaum ermöglicht werden, wobei die Relation Polyurethan Schaum zu DMEM bei 3,6 g/l lag.

2.5.3 Vitalität der Fibroblasten nach Kontakt mit Testmaterialien

Ein Einfluss der Testmaterialien auf die Entwicklung der Fibroblasten in den Gelatineschäumen wurde durch Messung der Vitalität der Fibroblasten nach 4, 7 und 11 Tagen Inkubation mit der MTT Methode nach BORENFREUND et al. (1998) bestimmt. Die gemessenen O.D.-Werte wurden mit Hilfe der Eichkurve (siehe hierzu 2.4.4.3) in Zellzahlen/Gelatineschaum umgerechnet. Anschließend wurde die Inhibition der Zellproliferation (CPI) nach der im folgenden aufgelisteten und von VAN LUYN et al. (1991) vorgeschlagenen Formel errechnet und in % angegeben:

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

wobei: **A** = Anzahl an Fibroblasten pro Gelatineschaum der Kontrolle

B = Anzahl an Fibroblasten pro Gelatineschaum nach Kontakt mit Testmaterial

Für jeden Inkubationszeitpunkt wurden bei den mitgeführten Kontrollen, d. h. Gelatineschäumen ohne Kontakt mit dem Testmaterial, 3 ganze Schäume aus den Zellkulturschalen entnommen, in 6 –Well Zellkulturplatten gelegt und wie unter Punkt 2.4.4.3 beschrieben vorgegangen. Bei den Gelatineschäumen, die Kontakt mit der PVC Scheibe hatten, wurde ein Gelatineschaum pro Zeitpunkt und Charge untersucht. Bei Anwendung des Polyurethanschaums als Testmaterial wurden pro Zeitpunkt zwei Schäume untersucht.

3 ERGEBNISSE

3.1 EINFLUSS DER REZEPTUR AUF PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN DER FOLIEN

Die Zusammensetzung der Folienrezepturen beeinflusst die physikalischen Eigenschaften der Agar- und Gelatinefolien. Untersuchungen zur Keimdichtigkeit, Wasserdampfdurchlässigkeit und Reißfestigkeit der Folien wurden an Mustern vorgenommen, die bis zu 21 Tagen im klimatisierten Raum bei 23 °C und 50 % relativer Luftfeuchte gelagert und anschließend mittels γ -Bestrahlung sterilisiert wurden. Der Wassergehalt, die Folienstärke und das Flächengewicht der Folien wurden während der Lagerung über 1, 7, 14 und 21 Tage und nach anschließender Sterilisierung der Muster bestimmt.

3.1.1 Einfluß der Folienrezeptur auf die Keimdichtigkeit

Die Ergebnisse der Versuche zur Überprüfung der Keimdichtigkeit der Folien zeigten, dass sowohl die Gelatine- wie auch die Agarfolien keimdicht waren. Nach Entfernung der Muster von den Blutagar-Platten und Inkubation über 16 h bei 37 °C, konnte kein Wachstum von *Staphylococcus aureus* festgestellt werden. Die auf der Oberfläche der Folien in einem Wassertropfen aufgetragenen *Staphylococcus aureus* traten nicht durch die Folien hindurch.

3.1.2 Einfluß der Folienrezeptur auf die Wasserdampfdurchlässigkeit (WVTR)

Die Ergebnisse der Messungen der Wasserdampfdurchlässigkeit (WVTR) von Gelatine- und Agarfolien sind in der Tabelle 1 aufgelistet und in der Abb. 7 grafisch dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Gelatine- wie auch die Agarfolien wasserdampfdurchlässig waren. Folien mit Agar als Grundsubstanz zeigten eine höhere Wasserdampfdurchlässigkeit mit Maximalwerten von 4954 ± 148 (g/m²/24h) als Folien mit Gelatine als Grundsubstanz, wo Maximalwerte von 3799 ± 64 (g/m²/24h) gemessen werden konnten.

Der Anteil an Glycerin in der Rezeptur hatte keinen Einfluß auf die Wasserdampfdurchlässigkeit der Folien.

Tab. 1: Wasserdampfdurchlässigkeit [g/m²/24h] von Agar- und Gelatinefolien nach 21 Tagen Lagerung im klimatisiertem Raum bei 23 °C und 50 % relativer Luftfeuchte

Rezeptur Zusammensetzung	Rezeptur-Nr.	Wasserdampfdurchlässigkeit [g/m ² /24h] [x] und [s] (n = 6)
Gelatine 15 Gew. % Glycerin	022	3502 ± 14
Gelatine 30 Gew. % Glycerin	023	3799 ± 64
Agar 8 Gew. % Glycerin	024	4954 ± 148
Agar 12 Gew. % Glycerin	025	4664 ± 48

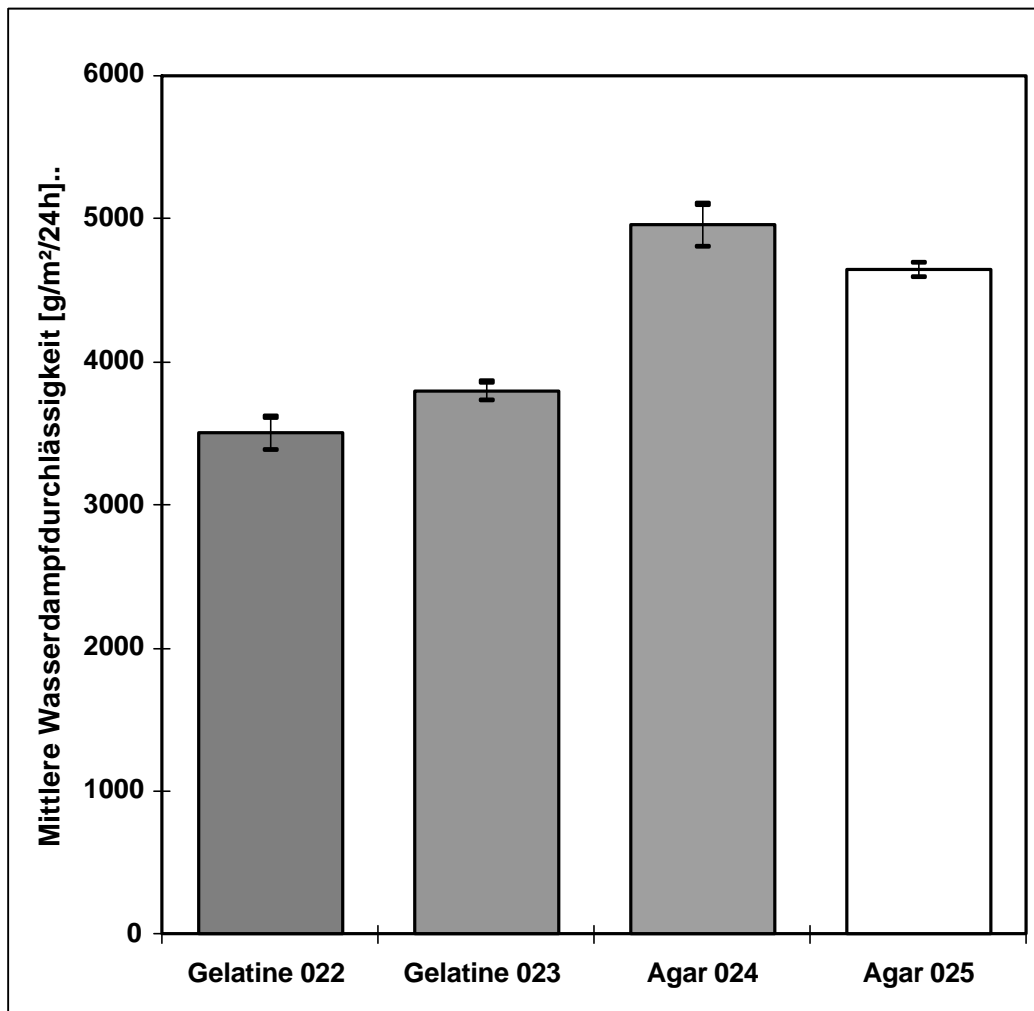


Abb. 7: Mittlere Wasserdampfdurchlässigkeit [g/m²/24h] von Agar- und Gelatinefolien nach 21 Tagen Lagerung im klimatisierten Raum bei 23 °C und 50 % relativer Luftfeuchte

3.1.3 Einfluß der Folienrezeptur auf die Reißfestigkeit

Die Ergebnisse der Messung der Reißfestigkeit von Gelatine- und Agarfolien, sind in der Tabelle 2 aufgelistet und in der Abb. 8 grafisch dargestellt.

Tabelle 2: Mittlere Reißfestigkeit [N/mm²] von Agar- und Gelatinefolien nach 21 Tagen Lagerung bei 23 °C und 50 % relativer Luftfeuchte.

Rezeptur Zusammensetzung	Rezeptur Nr.	Mittlere Kraft F max. [N/mm ²] bis zum Reißen der Folien [x] und [s] (n = 6)
Gelatine 15 Gew. % Glycerin	022	7,70 ± 0,40
Gelatine 30 Gew. % Glycerin	023	3,80 ± 0,20
Agar 8 Gew. % Glycerin	024	5,60 ± 0,30
Agar 12 Gew. % Glycerin	025	3,20 ± 0,10

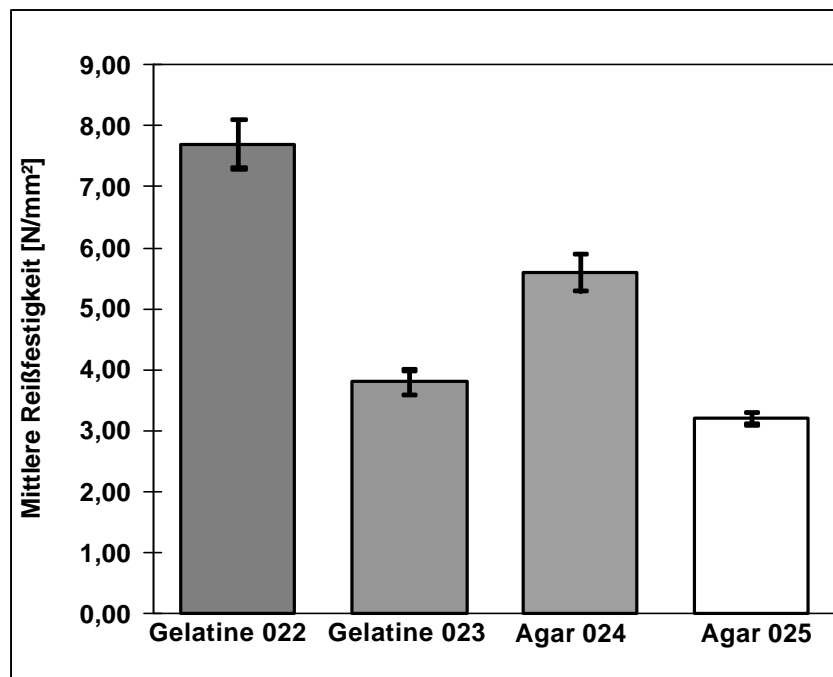


Abb. 8: Mittlere Reißfestigkeit [N/mm²] von Agar- und Gelatinefolien nach 21 Tagen Lagerung bei 23 °C und 50 % relativer Luftfeuchte.

Unabhängig vom Glyzeringehalt der Rezepturen wurden für Gelatinefolien höhere Reißfestigkeiten bestimmt als für Agarfolien. Ein Vergleich der Folien mit unterschiedlichem Glycerinanteil zeigte, dass insbesondere bei den Gelatinefolien ein höherer Anteil an Glycerin

in der Rezeptur zu einer Abnahme der Reißfestigkeit der Folien führte. Eine vergleichbare Tendenz konnte bei den Agarfolien festgestellt werden.

Zusätzlich wurden die Längenänderungen der Folien bei maximaler Belastung (F-max) gemessen. Die in Tabelle 3 gelisteten und in der Abb. 9 grafisch dargestellten Ergebnisse zeigten, dass die Folien aus Gelatine elastischer waren als die Folien aus Agar. Bei Anwendung von F-max wurde bei Gelatinefolien 023 eine mittlere Längenänderung von 204 ± 6 % gemessen. Im Gegensatz hierzu konnten bei Agarfolien deutlich geringere Längenänderungen festgestellt werden, mit Maximalwerten von 84 ± 10 % für Rezeptur 024.

Tabelle 3: Mittlere Längenänderung [%] von Agar- und Gelatinefolien nach Anwendung von F max.

Rezeptur Zusammensetzung	Rezeptur Nr.	Längenänderung [%] bei Anwendung von F-max [x] und [s] (n = 6)
Gelatine 15 Gew. % Glycerin	022	193 ± 10
Gelatine 30 Gew. % Glycerin	023	204 ± 6
Agar 8 Gew. % Glycerin	024	84 ± 10
Agar 12 Gew. % Glycerin	025	83 ± 6

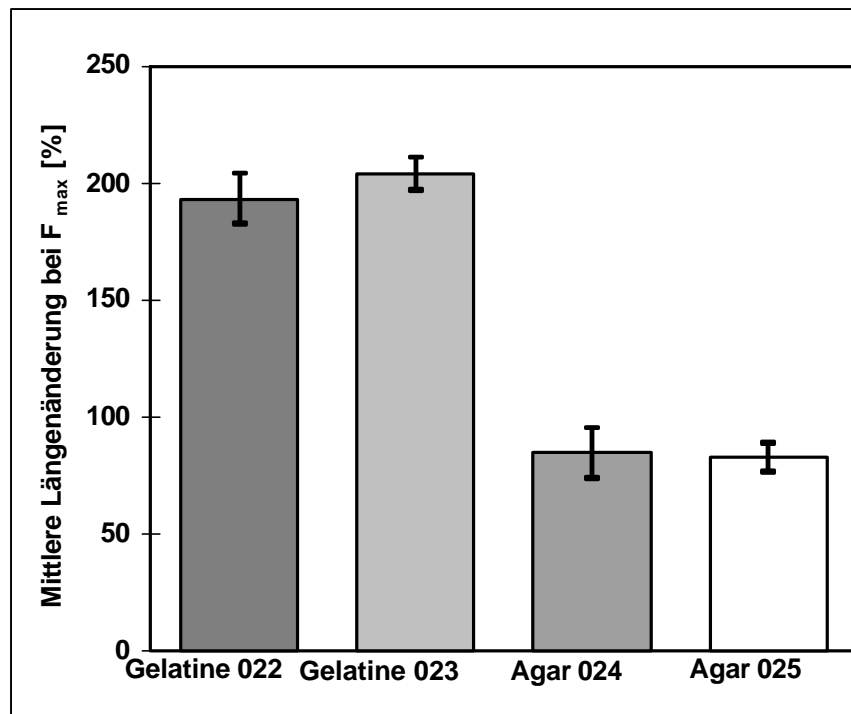


Abb. 9: Mittlere Längenänderung [%] von Agar- und Gelatinefolien nach Anwendung von F max

3.1.4 Einfluß der Folienrezeptur auf den Wassergehalt

Die Ergebnisse der Messung des Wassergehaltes von Gelatine- und Agarfolien sind in der Tabelle 4 aufgelistet und in der Abb. 10 grafisch dargestellt.

Das in den Gelatinefolien enthaltene Wasser von 50 % für Rezeptur 023 und 65 % für Rezeptur 022 wurde sehr schnell an die Umgebung abgegeben. Nach 1 Tag Lagerung wurden bei den Gelatinefolien 022 ein mittlerer Wassergehalt von 16 ± 1 % und bei den Gelatinefolien 023 ein mittlerer Wassergehalt von $17 \pm 0,1$ % gemessen. Eine weitere Abnahme des Wassergehaltes während der 21 Tagen Lagerung konnte nicht festgestellt werden.

Das in den Agarfolien enthaltene Wasser von 84 % für Rezeptur 025 und 88 % für Rezeptur 024 nahm im Verlauf der Lagerungszeit langsam ab. So konnte festgestellt werden, dass die Agarfolien 024 auch nach 7 Tagen Lagerung 81 ± 1 % Wasser enthielten. Danach folgte eine rapide Abnahme des Wassergehaltes bis auf 18 ± 1 % nach 21 Tagen.

Bei den Agarfolien 025 wurde bereits nach 7 Tagen eine deutliche Abnahme des Wassergehaltes bis auf 42 ± 16 % festgestellt. Nach 21 Tagen enthielten die Agarfolien $19 \pm 0,8$ % Wasser.

Tab. 4: Mittlerer Wassergehalt [%] der Agar- und Gelatinefolien nach 1 bis 21 Tagen Lagerung bei 23°C und 50% relativer Luftfeuchte und Vergleich mit dem laut Rezeptur enthaltenen Anfangswassergehalt

Rezeptur Nr. und Zusammensetzung	Mittlerer Wassergehalt [%] [x] und [s] (n = 14)	Rezeptur Nr. und Zusammensetzung	Mittlerer Wassergehalt [%] [x] und [s] (n = 14)
GELATINE 022: 15 Gew.% Glyzerin 65% H ₂ O	1d 16± 1 7d 15± 1 14d 14± 1 21d 13± 1	AGAR 024: 8 Gew.% Glyzerin 88% H ₂ O	1d 81± 1 7d 28± 9 14d 17± 1 21d 18± 1
GELATINE 023: 30 Gew.% Glyzerin 50% H ₂ O	1d 17 ± 0,1 7d 17± 0,8 14d 16± 0,5 21d 16± 0,3	AGAR 025: 12 Gew.% Glyzerin 84% H ₂ O	1d 77± 1 7d 42± 16 14d 21± 1 21d 19± 0,8

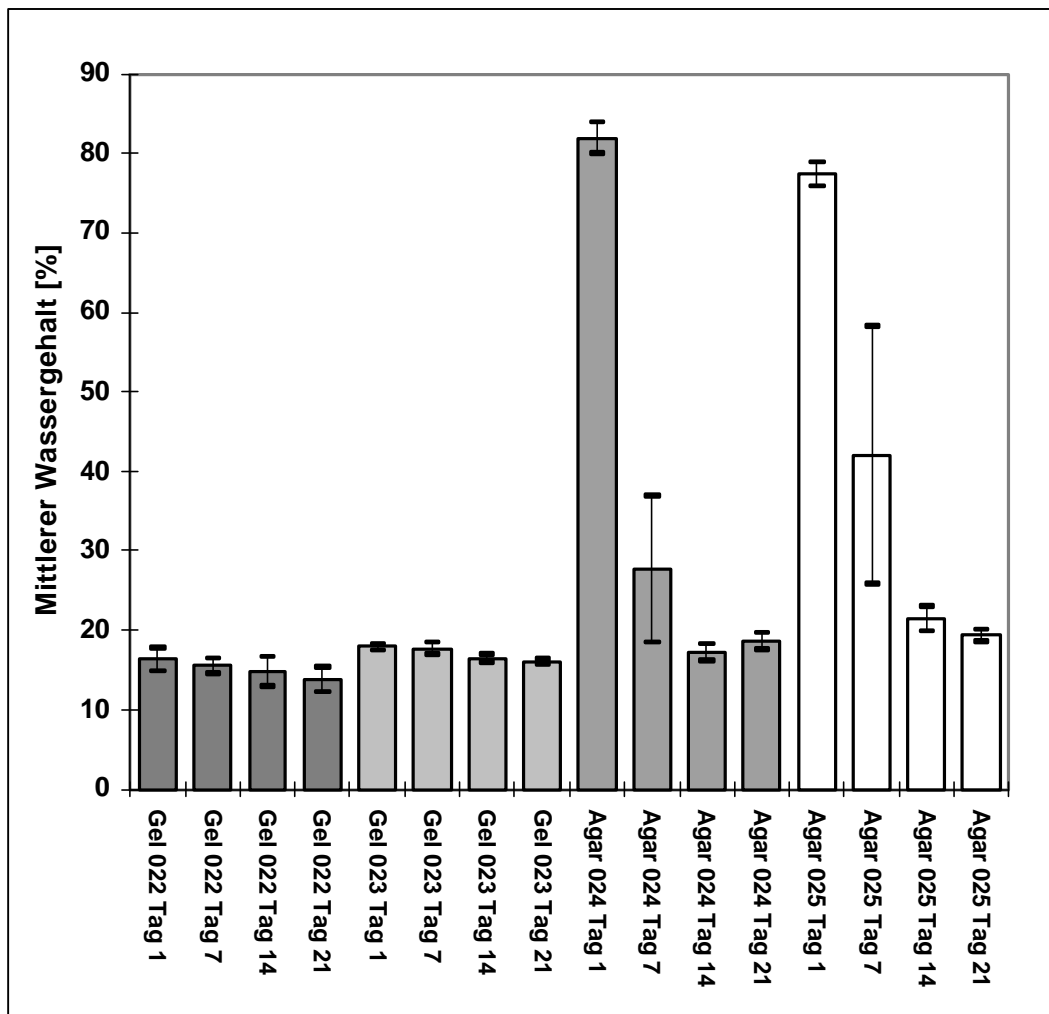


Abb. 10: Mittlerer Wassergehalt in % von Agar- und Gelatinefolien nach 1 bis 21 Tagen Lagerung bei 23 °C und 50 % relativer Luftfeuchte

3.1.5 Einfluß der Folienrezeptur auf die Folienstärke

Die Ergebnisse der Messung der Folienstärke von Gelatine- und Agarfolien sind in der Tabelle 5 aufgelistet und in der Abb. 11 grafisch dargestellt.

Die mittlere Stärke der Gelatinefolien betrug nach einem Tag Lagerung $234 \pm 8 \mu\text{m}$ und blieb über den weiteren Lagerungszeitraum von bis zu 21 Tagen konstant. Die Agarfolien waren nach 1 Tag Lagerung wesentlich dicker als die Gelatinefolien mit mittleren Stärken von $2214 \pm 282 \mu\text{m}$ bei Agarfolien 024 und $2340 \pm 128 \mu\text{m}$ bei Agarfolien 025. Eine weitere Lagerung der Agarfolien führte zu einer Abnahme der Folienstärke, so dass nach 21 Tagen eine mittlere Folienstärke von $386 \pm 18 \mu\text{m}$ gemessen werden konnte.

Tab. 5: Mittlere Stärke [mm] der Agar- und Gelatinefolien nach 1 bis 21 Tagen Lagerung bei 23 °C und 50 % relativer Luftfeuchte.

Rezeptur Nr. und Zusammensetzung	Mittlere Folienstärke [mm] [x] und [s] (n = 14)	Rezeptur Nr. und Zusammensetzung	Mittlere Folienstärke [mm] [x] und [s] (n = 14)
GELATINE 022: 15 Gew.% Glycerin 65 % H ₂ O	1d 234 ± 8	AGAR 024: 8 Gew.% Glycerin 88 % H ₂ O	1d 2214 ± 282
	7d 235 ± 6		7d 271 ± 3
	14d 235 ± 10		14d 255 ± 3
	21d 232 ± 8		21d 261 ± 1
GELATINE 023: 30 Gew.% Glycerin 50 % H ₂ O	1d 234 ± 8	AGAR 025: 12 Gew.% Glycerin 84 % H ₂ O	1d 2340 ± 128
	7d 238 ± 7		7d 942 ± 410
	14d 239 ± 7		14d 377 ± 18
	21d 245 ± 7		21d 386 ± 18

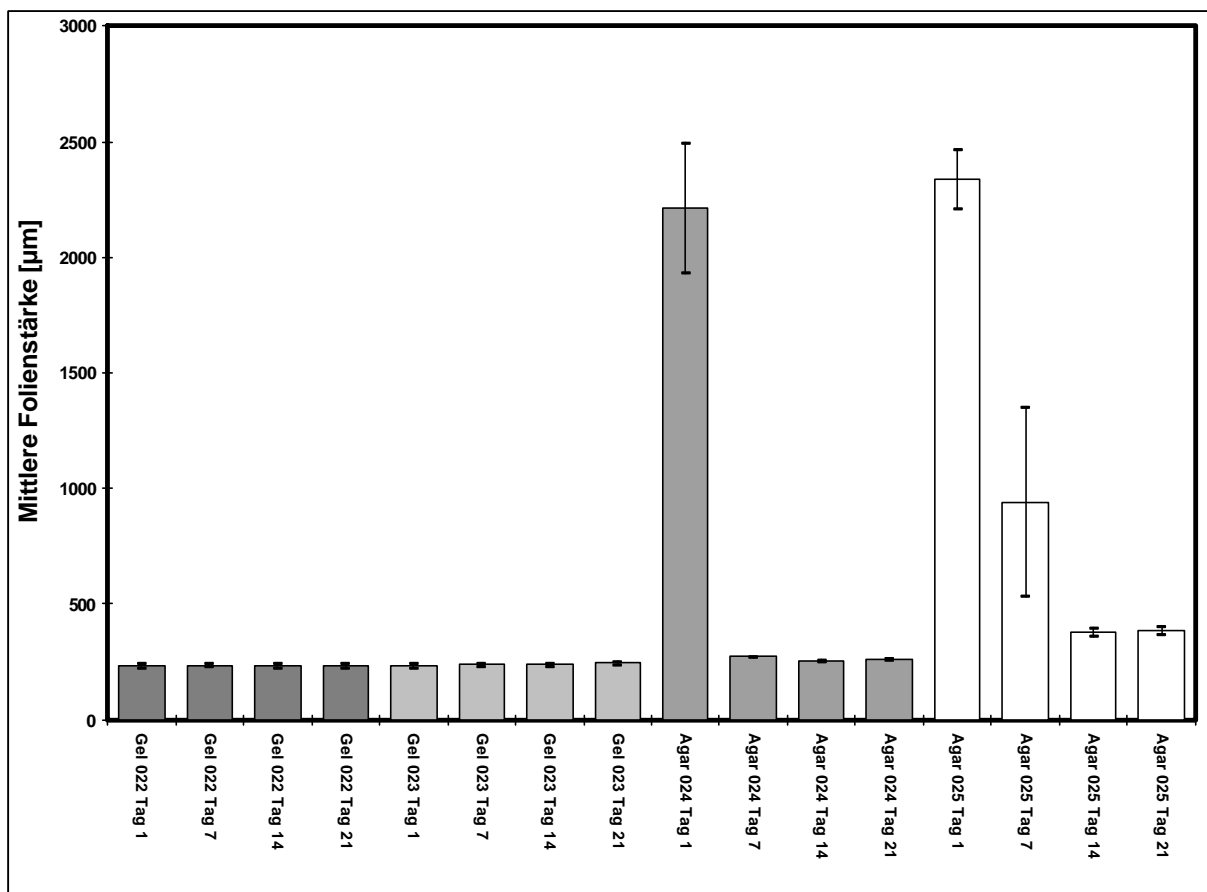


Abb. 11: Mittleren Stärke [mm] der Agar- und Gelatinefolien nach 1 bis 21 Tagen Lagerung bei 23 °C und 50 % relativer Luftfeuchte

3.1.6 Einfluß der Folienrezeptur auf das Flächengewicht

Die Ergebnisse der Messung der Flächengewichte von Gelatine- und Agarfolien, sind in der Tabelle 6 aufgelistet und in der Abb. 12 grafisch dargestellt.

Tab. 6: Mittlere Flächengewichte [g/cm²] der Agar- und Gelatinefolien nach 1 bis 21 Tagen Lagerung bei 23 °C und 50 % relativer Luftfeuchte.

Rezeptur Nr. und Zusammensetzung	Mittlere Flächengewichte [g/cm ²] [x] und [s] (n = 14)	Rezeptur Nr. und Zusammensetzung	Mittlere Flächengewichte [g/cm ²] [x] und [s] (n = 14)
GELATINE 022: 15 Gew.% Glycerin 65 % H ₂ O	1d 391 ± 26 7d 372 ± 17 14d 369 ± 14 21d 370 ± 11	AGAR 024: 8 Gew.% Glycerin 88 % H ₂ O	1d 2307 ± 289 7d 379 ± 2 14d 389 ± 0 21d 401 ± 0
GELATINE 023: 30 Gew.% Glycerin 50 % H ₂ O	1d 491 ± 26 7d 499 ± 18 14d 492 ± 18 21d 496 ± 16	AGAR 025: 12 Gew.% Glycerin 84 % H ₂ O	1d 2470 ± 119 7d 1333 ± 448 14d 609 ± 19 21d 611 ± 12

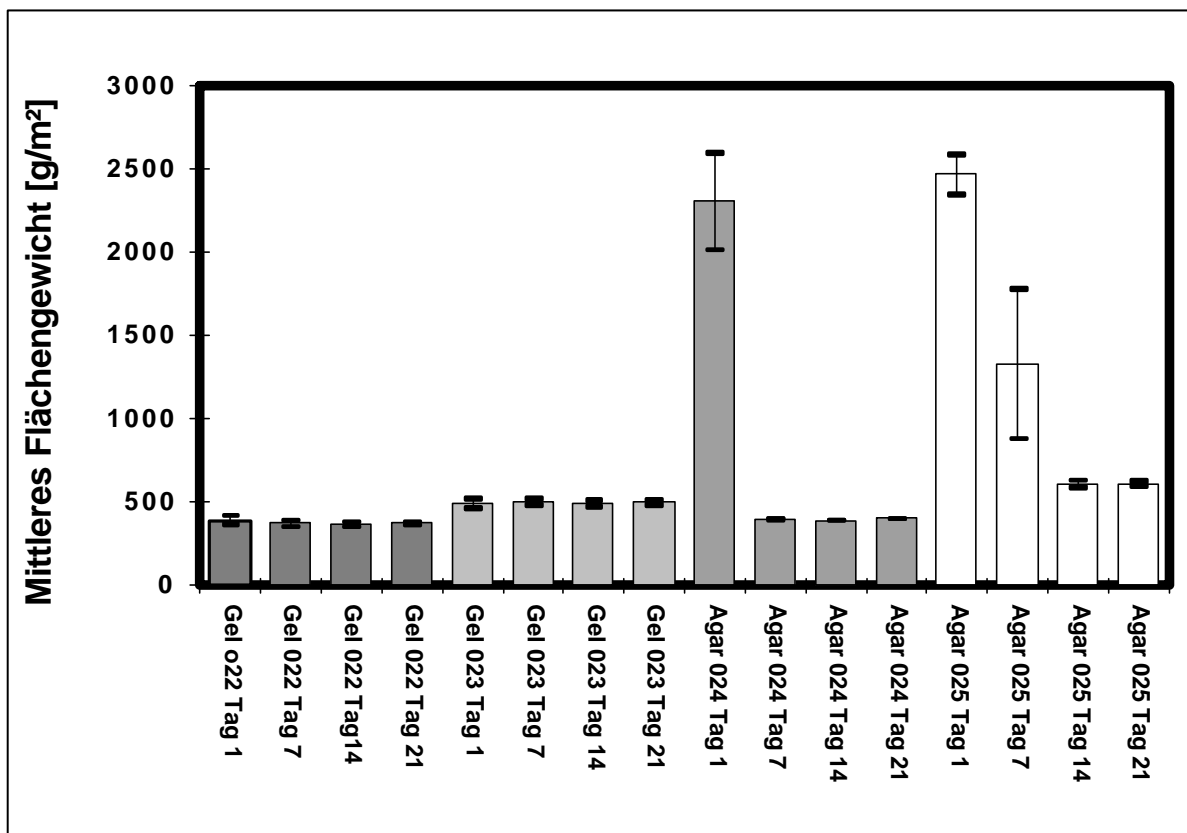


Abb. 12: Mittlere Flächengewichte [g/m²] von Agar- und Gelatinefolien nach 1 bis 21 Tagen Lagerung bei 23 °C und 50 % relativer Luftfeuchte

Bei den Agarfolien wurden nach 1 Tag Lagerung Gewichte von $2307 \pm 289 \text{ g/m}^2$ bzw. $2470 \pm 119 \text{ g/m}^2$ gemessen. Nach weiteren 7 Tagen Lagerung nahm das Gewicht bis auf Werte von $397 \pm 2 \text{ g/m}^2$ bzw. $609,47 \pm 19,94 \text{ g/m}^2$ ab und veränderte sich bis zum Ende der Lagerungszeit kaum. Die Flächengewichte der Gelatinefolien lagen nach 1 Tag Lagerung bei $391 \pm 26 \text{ g/m}^2$ bzw. $499 \pm 26 \text{ g/m}^2$ und veränderten sich kaum während der weiteren Lagerungszeit von 21 Tagen.

3.2 EINFLUß DER REZEPTUR AUF BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN DER FOLIEN

Nach Inkubation von Gelatine- und Agarfolien mit Proteinlösungen und Humanplasma wurde die Wechselwirkung zwischen den Folien und den in den Flüssigkeiten enthaltenen Proteinen und Enzymen untersucht. Die an die Folienoberfläche adsorbierten Mengen an Albumin und Fibronectin wurden durch Anwendung von ELISA-Assays bestimmt. Zusätzlich wurde die Neigung der Folien zur Wundverklebung durch Anwendung eines „in-vitro Testsystems“ untersucht.

3.2.1 Ergebnisse zur Wechselwirkung von Folien mit proteinhaltigen Lösungen

Die Menge an Protein in $\mu\text{g/cm}^2$, welches an die Oberfläche der Gelatine- und Agarfolien nach Inkubation mit Albumin- oder Fibronectinlösungen adsorbierte, wurde indirekt durch Anwendung von ELISA-Assays bestimmt.

Zunächst wurden Eichkurven erstellt, in denen eine gemessene optische Dichte (O.D.-Werte) gegen die Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] an Albumin oder Fibronectin in den Proteinlösungen aufgetragen wurde. Der Einfluß der Folienextrakte auf die gemessenen O.D.-Werte wurde anschließend untersucht. Hierfür wurden Eichkurven unter Verwendung von Proteinlösungen mit PBS-Extrakten der Gelatine- und Agarfolien erstellt.

3.2.1.1 Einfluß der PBS-Folienextrakte auf den Albumin ELISA-Assay

Die Auswirkungen von Folienextrakten auf die gemessenen O.D.-Werte der Eichkurven für die Ermittlung der Konzentration an Albumin aus humanem Serum in PBS Puffer sind in der Tabelle 7 aufgelistet und in der Abb. 13 grafisch dargestellt. Proteinlösungen mit einer Konzentration an Albumin zwischen $0,1 \mu\text{g/ml}$ bis zu $3,5 \mu\text{g/ml}$ und Verdünnungen des Primärantikörpers von 1:7500 und 1:5000 wurden verwendet.

Ein Vergleich der O.D.-Werte für Albuminlösungen in reinem PBS und in PBS-Folienextrakt-Lösungen zeigte, dass insbesondere die Extrakte der Gelatinefolien den ELISA-Assay massiv stören, so dass auch bei hohen Albumin-Konzentrationen in der Proteinlösung sehr niedrige O.D.-Werte gemessen wurden.

Die Extrakte der Agarfolien beeinflussten den ELISA-Assay jedoch in geringerem Maße. Insbesondere bei einer Verdünnung des Primärantikörpers von 1:5000 wurde eine lineare Abhängigkeit zwischen den gemessenen O.D.-Werten und den vorliegenden Konzentrationen an Albumin in der Lösung festgestellt.

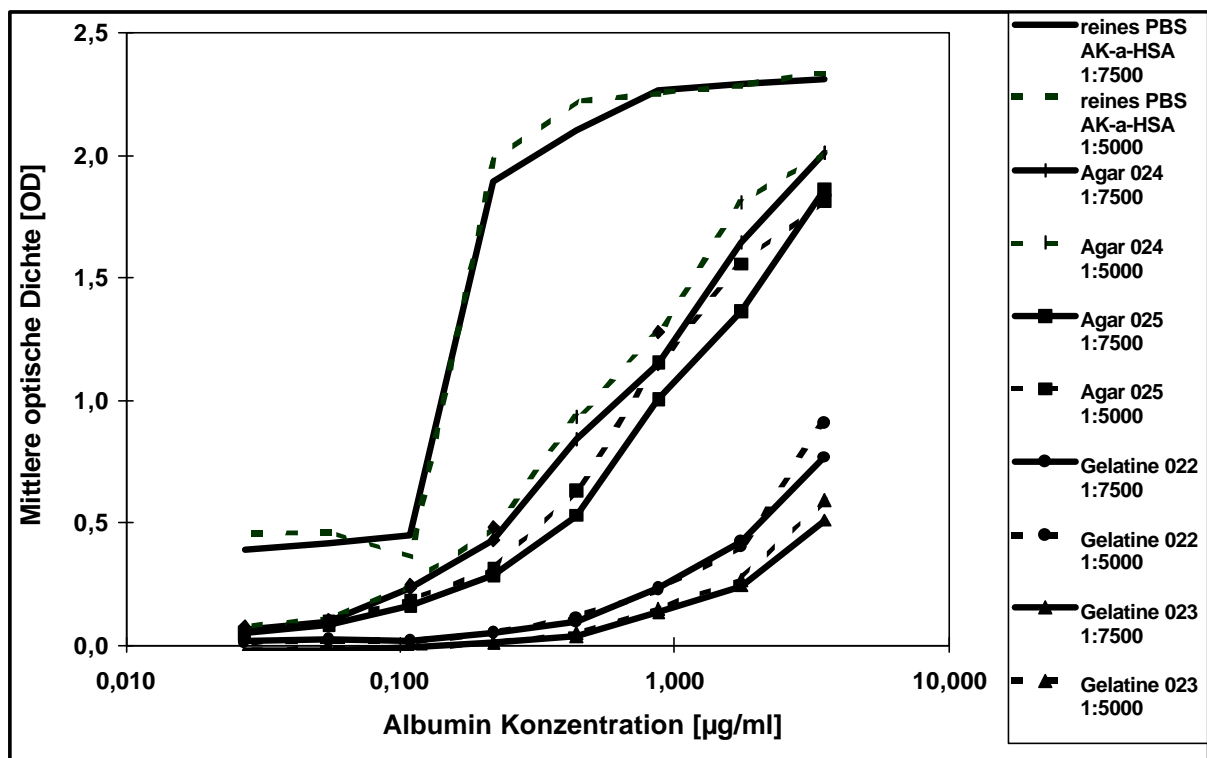


Abb. 13: Auswirkung der PBS-Extrakte von Gelatine und Agarfolien auf die gemessenen O.D.-Werte im ELISA-Assay. Die Konzentration an Albumin in den Lösungen lag zwischen 0,03 mg/ml bis 3,5 mg/ml. Der primäre Antikörper gegen humanes Albumin AK-a-HSA wurde 1:7500 und 1:5000 verdünnt.

Tabelle 7: Gemessenen O.D.-Werte im Albumin ELISA-Assay nach Anwendung von zwei Verdünnungen des Primärantikörpers AK-a-HSA (1: 7500 und 1:5000) zur Bestimmung der Konzentration an Protein in reinen PBS-Albumin Lösungen und in Albumin Lösungen mit PBS-Folienextrakten.

Konzentration Albumin in der Inkubationslösung [mg/ml]	O.D. – Wert Albumin in PBS AK-a-HSA 1:7500		O.D. - Wert Albumin in PBS AK-a-HSA 1:5000	
3,500	2,315		2,339	
1,750	2,289		2,287	
0,875	2,265		2,253	
0,438	2,103		2,220	
0,219	1,894		1,980	
0,109	0,451		0,360	
0,055	0,418		0,462	
0,027	0,391		0,454	
	O.D. - Wert Extrakt Gel 022 AK-a-HSA 1:7500	O.D. – Wert Extrakt Gel 022 AK-a-HSA 1:5000	O.D. – Wert Extrakt Gel 023 AK-a-HSA 1:7500	O.D. – Wert Extrakt Gel 023 AK-a-HSA 1:7500
	0,766	0,098	0,509	0,592
	0,422	0,400	0,242	0,268
	0,231	0,224	0,136	0,149
	0,095	0,112	0,037	0,046
	0,051	0,048	0,010	0,010
	0,020	0,014	-0,011	-0,013
	0,024	0,018	-0,019	-0,016
	0,017	0,011	-0,020	-0,021
	O.D. – Wert Extrakt Agar 024 AK-a-HSA 1:7500	O.D. - Wert Extrakt Agar 024 AK-a-HSA 1:5000	O.D. – Wert Extrakt Agar 025 AK-a-HSA 1:7500	O.D. – Wert Extrakt Agar 025 AK-a-HSA 1:5000
	2,011	2,010	1,861	1,814
	1,647	1,808	1,364	1,556
	1,147	1,280	1,001	1,156
	0,840	0,930	0,529	0,633
	0,428	0,482	0,288	0,311
	0,231	0,245	0,159	0,184
	0,093	0,105	0,081	0,098
	0,065	0,075	0,048	0,050

3.2.1.2 Ergebnisse zur Adsorption von Albumin aus humanem Serum

Wie unter 3.2.1.1 bereits beschrieben, beeinflussten insbesondere die PBS-Extrakte der Gelatinefolien den ELISA-Assay.

Es wurden trotzdem Inkubationsversuche mit Albuminlösungen (Konzentration des Albumins in der Lösung = 3,5 µg/ml) und Folien durchgeführt. Die Menge des an die Folienoberfläche adsorbierten Albumins in µg/cm² wurde durch Bestimmung der Differenz an Albumin-Gehalt in der Inkubationslösung vor und nach Inkubation mit den Folien in µg/ml und unter Berücksichtigung der Folienoberfläche berechnet.

Die Ergebnisse der Versuche und die berechneten Werte an adsorbiertem Albumin sind in der Tabelle 8 aufgelistet.

Die starke Störung des ELISA-Assays durch die Folienextrakte konnte in dieser Versuchsserie bestätigt werden. Es ergaben sich negative Werte für das adsorbierte Albumin, insbesondere bei den Gelatinefolien (Tabelle 8). Hieraus läßt sich ableiten, daß die gewählten Versuchsbedingungen für den ELISA-Assay nicht geeignet waren für den Nachweis der Albumin Adsorption an Gelatine- und Agarfolien.

Tabelle 8: Adsorption an Albumin in mg/cm² an die Oberfläche von Gelatine- und Agarfolien.

PROBEN Nr.	Errechnete Menge an adsorbiertem Albumin an die Folienoberfläche in mg/cm ² , aus n=8 Einzelmessungen pro Probe mit dem ELISA-Assay			
	Gelatine 022	Gelatine 023	Agar 024	Agar 025
1	-1,047	-0,773	-0,128	-0,067
2	-2,686	-0,810	-0,240	-0,122
3	-1,457	-0,713	-0,192	-0,037
4	-1,047	-0,739	-0,150	-0,082
5	-1,466	-0,745	-0,192	-0,070
6	-1,846	-0,782	-0,168	-0,077
7	-1,216	-0,773	-0,233	-0,111
8	-1,053	-0,691	-0,253	-0,095
9	-0,732	-1,095	-0,182	-0,071
10	-0,469	-0,501	-0,122	-0,059
[x] n=10	-1,302	-0,762	-0,186	-0,079
[s] n=10	0,590	0,138	0,043	0,024

3.2.1.3 Einfluß der PBS-Folienextrakte auf den Fibronectin ELISA-Assay

Die Auswirkungen der Folienextrakte auf die gemessenen O.D.-Werte der Eichkurven zur Ermittlung der Konzentration an Fibronectin aus humanem Serum in PBS Puffer sind in der Tabelle 9 aufgelistet und in der Abb. 14 grafisch dargestellt. Es wurden Proteinlösungen mit einer Konzentration an Fibronectin zwischen 0,1 µg/ml bis 3,5 µg/ml und einer Verdünnung des Primärantikörpers von 1:10000 verwendet.

Ein Vergleich der O.D.-Werte für Fibronectinlösungen in reinem PBS und in PBS-Folienextrakt-Lösungen zeigte, dass Extrakte der Gelatinefolien den ELISA-Assay leicht stören, so dass niedrigere O.D.-Werte gemessen wurden als bei Anwendung von reinem PBS. Die Extrakte der Agarfolien beeinflussten den ELISA-Assay nicht. Die gemessenen O.D.-Werte der Fibronectin-Lösungen nach Anwendung von PBS-Folienextrakten sind vergleichbar mit denen, die nach Anwendung von reinem PBS erzielt wurden.

Tabelle 9: Gemessene O.D.-Werte im Fibronectin ELISA-Assay nach Anwendung einer 1:10000 Primärantikörper AK-a-Fibronectin Verdünnung zur Bestimmung der Konzentration an Fibronectin in reinen PBS-Fibronectin und in Fibronectin Lösungen mit Folienextrakten und einer Konzentration an Protein zwischen 0,013 und 3,3 und mg/ml.

Fibronectin Konzentration [mg/ml]	O.D.-Wert Fibronectin in reinem PBS	O.D.-Wert Fibronectin in PBS-Agar 024	O.D.-Wert Fibronectin in PBS- Agar 025	O.D.-Wert Fibronectin in PBS-Gel. 022	O.D.-Wert Fibronectin in PBS-Gel. 023
	AK-a-Fib 1:10000				
3,300	1,875	1,849	1,824	1,624	1,494
1,650	1,888	1,908	1,762	1,323	1,190
0,825	1,611	1,631	1,518	0,971	0,817
0,413	1,087	1,150	1,184	0,691	0,539
0,206	0,622	0,730	0,725	0,355	0,270
0,103	0,293	0,412	0,379	0,153	0,142
0,052	0,171	0,217	0,178	0,080	0,079
0,026	0,078	0,113	0,078	0,045	0,037
0,013	0,040	0,054	0,032	0,021	0,012

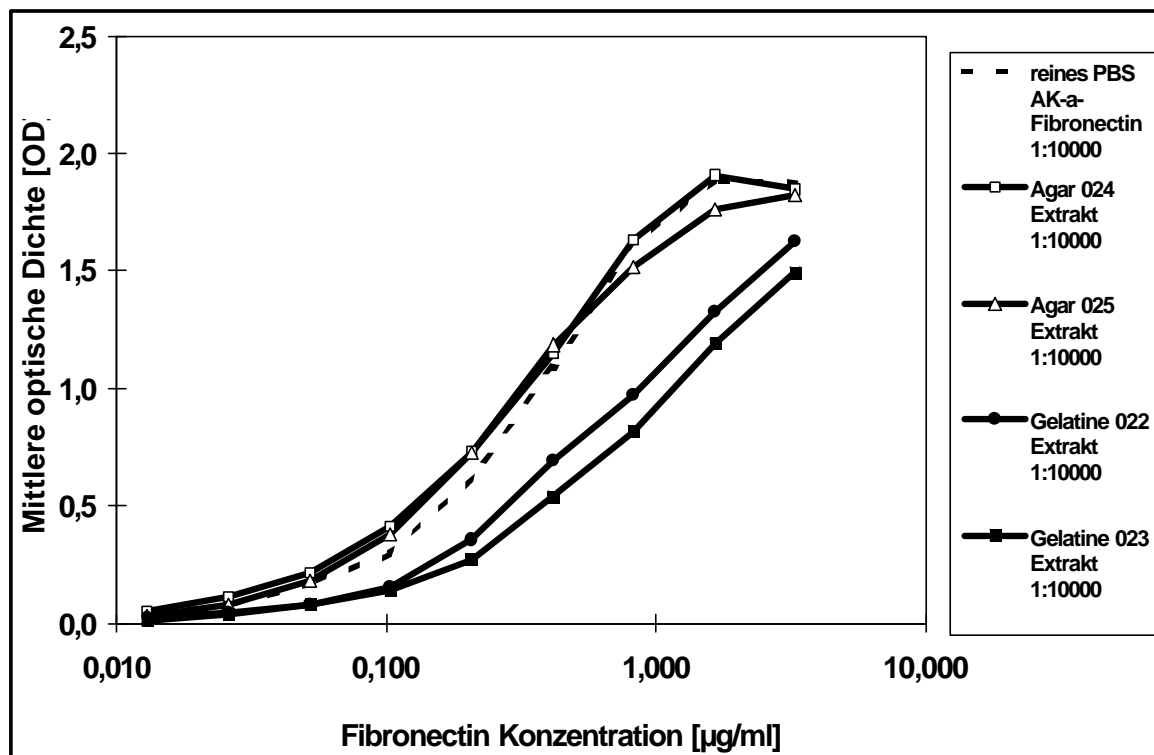


Abb. 14: Auswirkung der PBS-Extrakte von Gelatine und Agarfolien auf die O.D.-Werte im ELISA-Assay zur Bestimmung der Konzentration an Protein in Lösungen mit 3,3 mg/ml bis 0,013 mg/ml Fibronectin. Der primäre Antikörper gegen humanes Fibronectin AK-a-Fib wurde 1:10000 verdünnt.

3.2.1.4 Ergebnisse zur Adsorption von Fibronectin aus humanem Serum

Die errechneten Mengen an die Oberfläche von Gelatine- und Agarfolien adsorbiertem Fibronectin in $\mu\text{g/cm}^2$ sind in der Tabelle 10 aufgelistet und in der Abb. 15 grafisch dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass Agarfolien nach Inkubation mit einer PBS-Fibronectinlösung (Konzentration an Fibronectin in der Lösung = $7\mu\text{g/ml}$) mehr Fibronectin an die Folienoberfläche adsorbierten als Gelatinefolien. Agarfolien der Rezeptur 024 adsorbierten $1,297 \pm 0,051 \mu\text{g/cm}^2$ Fibronectin an die Folienoberfläche. Im Gegensatz hierzu wurden bei Gelatinefolien der Rezeptur 023 lediglich Maximalwerte von $0,617 \pm 0,108 \mu\text{g/cm}^2$ errechnet.

Tabelle 10: Überblick über die berechneten Einzelwerte, Mittelwert und Standardabweichung der Adsorption von Fibronectin [mg/cm^2] an die Oberfläche von 10 Proben der Gelatine- und Agarfolien

PROBEN Nr.	Errechnete Menge an adsorbiertem Fibronectin an die Folienoberfläche in mg/cm^2 der Proben 1-10 pro Folienrezeptur, und aus n=8 Einzelmessungen pro Probe mit dem ELISA-Assay			
	Gelatine 022	Gelatine 023	Agar 024	Agar 025
1	0,602	0,672	1,318	1,010
2	0,831	0,421	1,273	1,113
3	0,773	0,708	1,228	1,125
4	0,515	0,472	1,377	1,060
5	0,173	0,782	1,327	1,061
6	0,243	0,681	1,287	1,082
7	0,534	0,698	1,301	1,077
8	0,534	0,630	1,276	1,112
9	0,833	0,546	1,221	1,114
10	0,607	0,559	1,374	1,051
[x] Probe1-10	0,565	0,617	1,297	1,081
[s]Probe 1-10	0,212	0,108	0,051	0,034

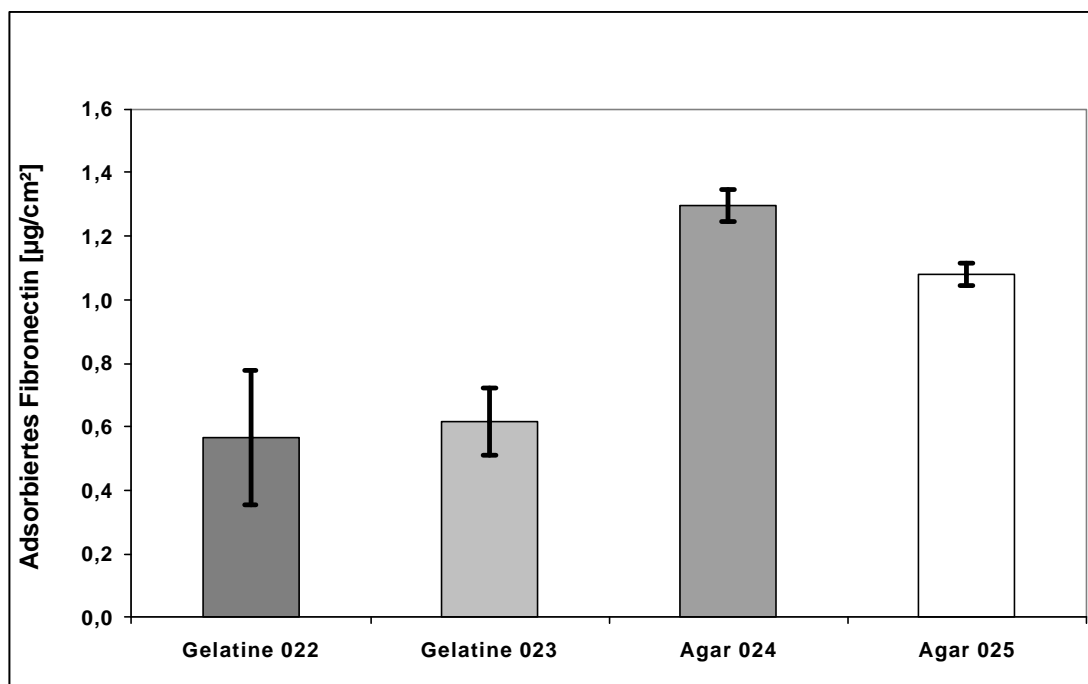


Abb. 15: Mittlere (n = 10) Adsorption von Fibronectin an die Oberfläche von Gelatine- und Agarfolien [mg/cm^2] nach 24-stündiger Inkubation mit einer 0,033% Fibronectin Lösung in PBS.

3.2.2 Ergebnisse zur Wundverklebung in-vitro

Die Ergebnisse der Versuche zur Untersuchung der Wundverklebung zeigten deutlich, dass sowohl die Gelatine- als auch die Agarfolien keine Verklebung im in-vitro Testmodell verursachten. Nach Abzug der Folien konnte beobachtet werden, dass das Fibrinnetz intakt und leicht mit Glyzerin benetzt war.

3.2.3 Ergebnisse zur Wechselwirkung mit Mausfibroblasten und Keratinozyten

Um feststellen zu können, ob die Gelatine- und die Agarfolien für eine Besiedlung mit Fibroblasten oder Keratinozyten geeignet sind, wurde zunächst ihre Cytotoxizität, durch Anwendung von Folienextrakten, untersucht. In einer weiteren Versuchsreihe wurden dann Fibroblasten und Keratinozyten im direkten Kontakt mit den Folien kultiviert und der Einfluß der Folien auf das Wachstum der Zellen untersucht.

3.2.3.1 Cytotoxizität von Folienextrakten

Die Ergebnisse der Untersuchung zur Cytotoxizität der Extrakte von Gelatine- und Agarfolien im Proliferationshemmtest mit Mausfibroblasten sind in der Tabelle 11 zusammengestellt. Aufgelistet wurde dabei der IC_{50} Wert, d.h. die Testmaterial/Zellkulturmedium-Relation, bei der eine 50 %-ige Wachstumshemmung beobachtet wurde. Zusätzlich wurden wesentliche Änderungen, die während der Inkubation auftraten, wie z.B. eine pH Verschiebung des Zellkulturmediums, vermerkt. Ein hoher IC_{50} Wert bedeutet eine geringe Cytotoxizität, niedrige Werte eine stärkere Cytotoxizität.

Die für die Gelatinefolie 022 und Gelatinefolie 023 ermittelten IC_{50} Werte von 56 g/l weisen auf eine geringe Toxizität der Folien gegenüber Mausfibroblasten hin (siehe Tabelle 11). Die Agarfolien 024 und 025 zeigten dagegen eine hohe Toxizität mit IC_{50} Werten von 14,5 g/l und 17,4 g/l. Das reine Glyzerin, welches als Vergleich und als potentiell toxischer Inhaltstoff der Gelatine- und Agarfolien im Versuch mit untersucht wurde, zeigte eine hohe Toxizität mit IC_{50} Werte zwischen 17 g/l und 21 g/l.

Tabelle 11: IC₅₀ Werte der Gelatine- und Agarfolienextrakte (angegeben als Relation Testmaterial/Zellkulturmedium in g/l)

Rezeptur Zusammensetzung	Rezeptur Nr.	IC ₅₀ [g/l] *	
		Versuch 1	Versuch 2
Gelatinefolie 15 Gew.% Glycerin	022	67	84
Gelatinefolie 30 Gew.% Glycerin	023	56	82
Agarfolie 8 Gew.% Glycerin	024	14,5	17,4
Agarfolie 12 Gew.% Glycerin	025	15,4	15,2
Kontrolle Glycerin (Sigma)		17	21

* keine wesentliche pH Verschiebung

3.2.3.2 Cytotoxizität der Folien im direkten Kontakttest mit Mausfibroblasten und Keratinozyten

Während der Versuche zur Untersuchung der Cytotoxizität im direkten Kontakttest mit Mausfibroblasten und Keratinozyten der Zelllinie HaCaT wurde bestätigt, dass die Gelatinefolien sehr instabil waren. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C zerfielen die Gelatinefolien in Stücke. Die Versuche wurden aus diesem Grunde abgebrochen.

Im Gegensatz hierzu konnte festgestellt werden, dass Agarfolien sehr stabil waren. Bei Anwendung von Mausfibroblasten 3T3-Swiss zeigte sich, dass diese um die Agarfolien herum ein völlig normales, auf den Folien dagegen überhaupt kein Wachstum zeigten.

Eine Kultivierung von Keratinozyten der Zelllinie HaCaT auf den Agarfolien erschien grundsätzlich möglich. Nach Entnahme der Zellkulturschalen aus dem Brutschrank und nach leichten Bewegungen wurde jedoch beobachtet, dass sich die Keratinozyten nicht fest an die Oberfläche der Folien angeheftet hatten. Die Zellen lösten sich leicht von der Folienoberfläche und rutschten in das Zellkulturmedium.

3.3 VORVERSUCHE: HERSTELLUNG VON GELATINESCHÄUMEN

Im Rahmen der Vorversuche wurden Gelatinelösungen mit 1 % bzw. 10 % Gelatine ohne Zusatz von Glycerin hergestellt und verwendet, um Gelatineschäume herzustellen. Eine Stabilisierung der lyophilisierten Schäume erfolgte mittels dehydrothermalen Behandlung im Vakuumtrockenschrank. Hierdurch wurde eine Inkubation der Schäume mit Zellkulturmedium bei 37 °C möglich, was als Voraussetzung für eine Kultivierung von Fibroblasten auf den Schäumen galt.

Die Vorversuche wurden ausgewertet durch eine makroskopische Beurteilung der nach Färbung mit Hemacolor sichtbar gewordenen Mausfibroblasten 3T3 Swiss auf und neben den Gelatineschäumen. Es wurden keine quantitativen Messungen der Zellpopulationen auf den Schäumen durchgeführt.

Die Ergebnisse der Vorversuche zeigten, dass eine Kultivierung von Mausfibroblasten 3T3 Swiss auf Gelatineschäumen über 24 Stunden grundsätzlich möglich ist. Wie erwartet konnte festgestellt werden, dass die Konzentration der Gelatinelösungen zwischen 1 % und 10 % großen Einfluss auf die Stabilität der Schäume hatte. Je konzentrierter die Rezepturlösung, desto stabiler waren die Schäume. Eine Kultivierung der Mausfibroblasten auf den Schäumen über einen Zeitraum länger als 24 Stunden war jedoch nicht möglich, da die Gelatineschäume nach 48 Stunden zerfielen und nur noch eine gallertartige Masse übrig blieb.

3.4 HAUPTVERSUCHE: VERNETZUNG DER GELATINESCHÄUME MIT EDAC

Die Versuche zur Vernetzung der Gelatineschäume mit EDAC dienten der Klärung der Fragen nach der optimalen Art der Anwendung des Vernetzers. Einerseits wurde eine Vernetzung durch direkte Zugabe des EDAC-Pulvers in die Gelatinelösung angestrebt und zum anderen wurden fertig hergestellte lyophilisierte Gelatineschäume durch Behandlung mit einer wässrigen EDAC-Lösung nachträglich vernetzt. Des Weiteren wurde untersucht, welche Konzentration an EDAC notwendig ist, um eine ausreichende Stabilität der Gelatineschäume zu erreichen bei gleichzeitiger Vermeidung von cytotoxischen Effekten.

Anhand der Ergebnisse der nachfolgend beschriebenen Versuche konnte ermittelt werden, inwieweit die Vernetzung der Gelatineschäume mit unterschiedlichen Mengen an EDAC einen Einfluß auf die mechanische Stabilität, Quelleigenschaften, Porenstruktur und

insbesondere auf einen enzymatischen Abbau der Gelatineschäume nach Anwendung einer Kollagenase-Lösung hatte.

3.4.1 Ergebnisse zur chemischen Charakterisierung der Vernetzung

Der Vernetzungsgrad von Gelatineschäumen konnte über die Umsetzung unvernetzter ϵ -Aminogruppen der Aminosäure Lysin mit salpetriger Säure chemisch bestimmt werden. Die Ergebnisse der Versuche sind in der Tabelle 12 aufgelistet und in der Abb. 18 grafisch dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass Gelatineschäume aus einer 10 %-igen Gelatinelösung sowohl durch direkte Zugabe von EDAC-Pulver in die Gelatinelösung als auch durch Behandlung der lyophilisierten Schäume mit einer wässrigen EDAC-Lösung vernetzt werden können, wobei die Art der Anwendung des Vernetzers den Vernetzungsgrad der Gelatineschäume beeinflusst (Abb. 18). So konnte festgestellt werden, dass eine direkte Zugabe von nur 0,07 Gew. % EDAC-Pulver in die Gelatinelösung bereits zu einem Vernetzungsgrad der Gelatineschäume von 9,6 % führte. Im Vergleich hierzu zeigte sich, dass bei einer Behandlung der Schäume mit einer wässrigen Vernetzerlösung, mit einem daraus resultierendem Anteil von EDAC in den Gelatineschäumen von 2 Gew. %, der Vernetzungsgrad nur bei 5,9 % lag .

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei einer Erhöhung der prozentualen Konzentration an EDAC in den Gelatineschäumen, unabhängig von der Art der Verwendung des Vernetzers, der Vernetzungsgrad der Gelatineschäume zunahm.

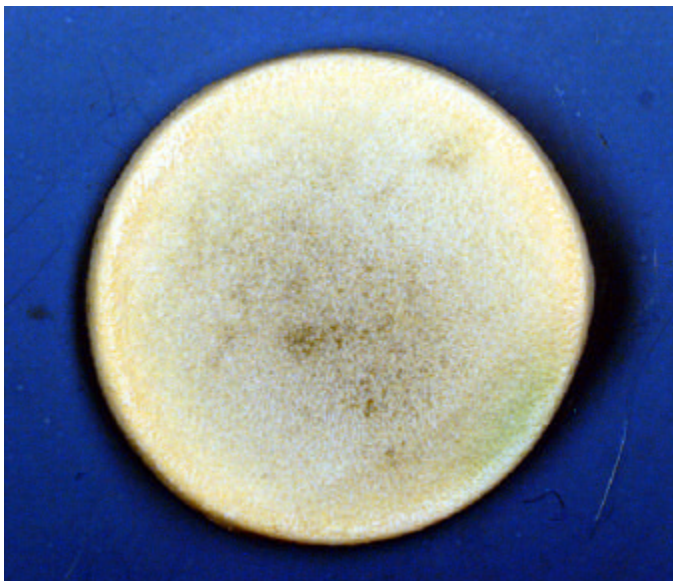


Abb. 17: Lyophilisierter, g-sterilisierter Gelatineschaum mit 0,07 Gew.% EDAC.

Tabelle 12: Vernetzungsgrad in % von mit verschiedenen Methoden und EDAC-Konzentrationen vernetzten Gelatineschäumen

Rezeptur Zusammensetzung	O.D.-Werte	Vernetzungsgrad in %
Gelatineschaum unvernetzt	0,9524	0,0 %
Gelatineschaum mit 0,07 Gew.% EDAC (Pulver)	0,8612	9,6 %
Gelatineschaum mit 2 Gew.% EDAC (Lösung)	0,9013	5,4 %
Gelatineschaum mit 3 Gew.% EDAC (Lösung)	0,8267	13,2 %
Gelatineschaum mit 5 Gew. % EDAC (Lösung)	0,7530	20,9 %
Gelatineschaum mit 7 Gew. % EDAC (Lösung)	0,7030	26,2 %

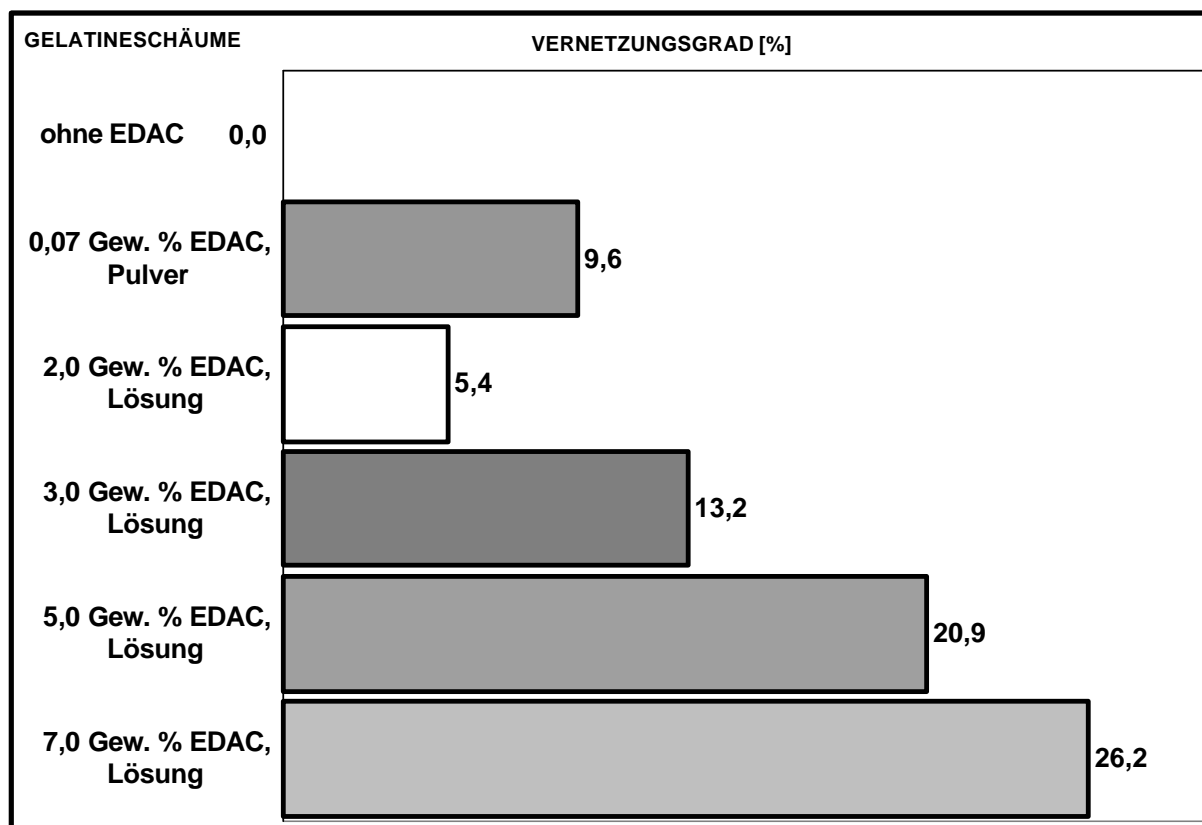


Abb. 18: Unterschiede im Vernetzungsgrad von Gelatineschäumen

3.4.2 Einfluß des Vernetzungsgrades auf die Flüssigkeitsaufnahme und die Quelleigenschaften der Gelatineschäume

Die Flüssigkeitsaufnahme und die Quelleigenschaften von Gelatineschäumen, die durch direkte Zugabe von EDAC-Pulver in die Gelatinelösung oder durch Behandeln der lyophilisierten Gelatineschäume mit einer EDAC-Lösung hergestellt wurden, konnte über die Gewichtszunahme der Gelatineschäume nach 24-stündiger Inkubation mit DMEM Zellkulturmedium bei Raumtemperatur bestimmt werden.

Flüssigkeitsaufnahme

Die Ergebnisse der Versuche zur Aufnahme von DMEM pro mg Gelatineschaum sind in der Tabelle 13 aufgelistet und in der Abb. 19 grafisch dargestellt. Die Art der Anwendung des Vernetzers EDAC beeinflusst die Menge an aufgenommener Flüssigkeit durch die Gelatineschäume. Bei direkter Zugabe von EDAC in die Gelatinelösung, nahmen die Gelatineschäume mit 0,07 Gew.% EDAC $11,38 \pm 1,64$ mg DMEM/mg Schaum auf. Rein makroskopisch konnte festgestellt werden, dass die Gelatineschäume dabei stark und regelmäßig quollen.

Bei Vernetzung der Gelatineschäume durch Anwendung einer EDAC-Lösung zeigte sich, dass bei Zunahme der EDAC-Konzentration in der Lösung die Menge an aufgenommenem DMEM durch die Gelatineschäume abnahm. So zeigten Gelatineschäume mit 7 Gew.% EDAC eine Aufnahme von $5,95 \pm 0,60$ mg DMEM/mg Schaum und im Gegensatz hierzu Gelatineschäume mit 2 Gew.% EDAC $9,72 \pm 0,37$ mg DMEM/mg Schaum. Gelatineschäume, die durch Behandlung mit einer EDAC-Lösung vernetzt worden waren, zeigten eine sehr langsame Quellung bei Aufnahme von DMEM.

Quellungseigenschaften

Die Quellung der Gelatineschäume konnte über die Zunahme der Schaumdurchmesser nach Inkubation in DMEM bestimmt werden. Die Ergebnisse der Versuche sind in der Tabelle 14 aufgelistet und in der Abb. 20 grafisch dargestellt.

Mit EDAC-Pulver vernetzte Gelatineschäume zeigten eine hohe Wasseraufnahme verbunden mit einer sehr starken Quellung bzw. Durchmesserzunahme. Bei den Gelatineschäumen, die mit einer EDAC-Lösung vernetzt wurden, nahm die Flüssigkeitsaufnahme mit steigendem EDAC-Anteil ab. Gleiches gilt für die Quellung bzw. Durchmesserzunahme.

Tabelle 13: Bestimmung der Flüssigkeitsaufnahme von mit EDAC vernetzten Gelatineschäumen nach Inkubation mit DMEM über 24 Stunden bei 37 °C

Gelatine Schaum	Gewicht vorher [mg]	Gewicht nachher [mg]	Gewichts-Differenz [mg]	DMEM Aufnahme [mg / mg]
	(Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung von n = 3)			
0,07 Gew.% EDAC-Pulver, direkt	26,97 ± 0,46	333,40 ± 39,05	306,43 ± 39,51	11,38 ± 1,64
2 Gew.% EDAC, Lsg.	22,37 ± 0,75	240,00 ± 15,95	217,63 ± 15,21	9,72 ± 0,37
3 Gew.% EDAC, Lsg.	24,70 ± 0,95	188,83 ± 9,06	164,13 ± 9,18	6,65 ± 0,47
5 Gew.% EDAC, Lsg.	24,47 ± 1,55	187,93 ± 2,74	163,47 ± 4,15	6,70 ± 0,59
7 Gew.% EDAC, Lsg.	24,40 ± 0,79	169,30 ± 9,40	144,90 ± 10,18	5,95 ± 0,60
Gelatineschaum ohne EDAC	26,40 ± 0,45	Die Schäume haben sich nach 24 Stunden Inkubation in DMEM aufgelöst		

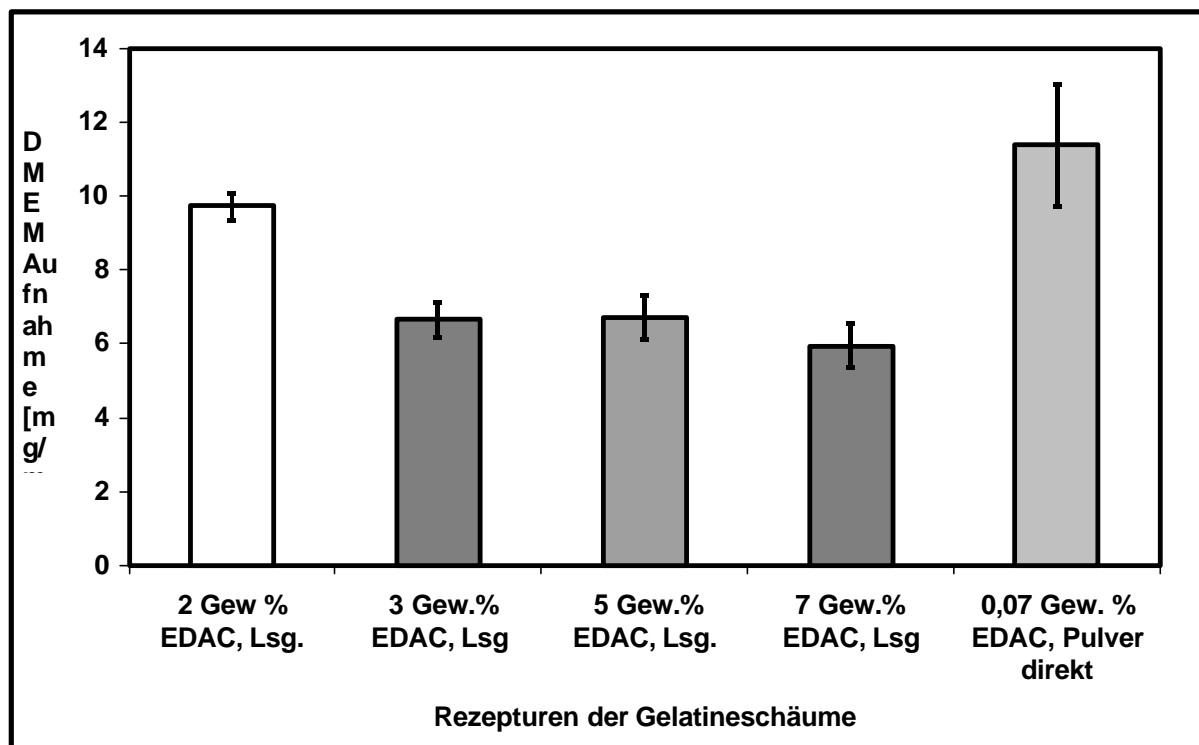


Abb. 19: Mittlere Flüssigkeitsaufnahme [mg/mg] der mit EDAC vernetzten Gelatineschäume nach Inkubation mit DMEM über 24 h bei 37 °C

Tabelle 14: Bestimmung der Quelleigenschaften von mit EDAC vernetzten Gelatineschäumen nach Inkubation mit DMEM über 24 Stunden bei 37 °C

Rezepturen der Gelatine Schäume	Durchmesser vor Inkubation in DMEM [mm]	Durchmesser nach Inkubation in DMEM [mm]	Differenz Durchmesser [mm]
	(Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung von n = 3)		
0,07Gew % EDAC-Pulver, direkt	13,67 ± 0,19	19,02 ± 0,45	5,35 ± 0,35
2 Gew.% EDAC, Lsg.	16,00 ± 0,20	18,65 ± 0,33	2,65 ± 0,05
3 Gew.% EDAC, Lsg.	14,92 ± 0,43	17,15 ± 0,49	2,23 ± 4,93
5 Gew.% EDAC, Lsg.	14,52 ± 0,24	15,63 ± 0,30	1,12 ± 0,51
7 Gew.% EDAC, Lsg.	14,83 ± 0,29	15,77 ± 0,15	0,93 ± 0,35
Schaum ohne EDAC	13,22 ± 0,13	Die Schäume haben sich nach 24 Stunden Inkubation in DMEM aufgelöst	

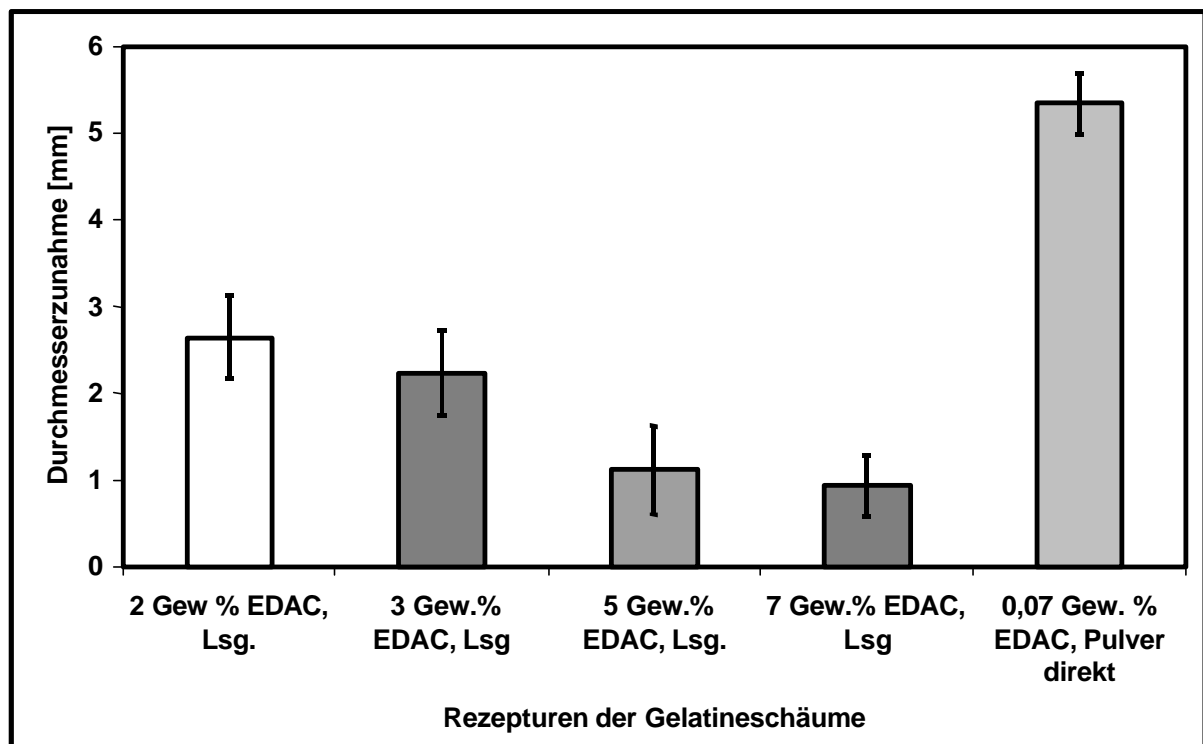


Abb. 20: Mittlere Durchmesserzunahme von Gelatineschäumen nach Inkubation mit DMEM über 24 h bei 37 °C

3.4.3 Einfluß der Vernetzerkonzentration auf die Porenstruktur

Die Art der Anwendung und die hinzugefügte Menge des Vernetzers EDAC übte Einfluß auf die Porenstruktur der Gelatineschäume aus. Dieser Einfluß wurde nicht quantitativ bestimmt,

sondern es wurde versucht, Tendenzen in der Porengröße- und Porenverteilung zu erkennen. Hierzu diente ein Vergleich der Poren unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung. Pro Rezeptur wurden hierzu jeweils 10 Gefrierschnitte der Gelatineschäume untersucht (siehe Abb. 21 bis 25).

In Abhängigkeit von der Art der Vernetzung ergaben sich ausgeprägte Unterschiede in der Porenstruktur. Gelatineschäumen, die durch direkte Zugabe von 0,07 Gew. % EDAC-Pulver in die Gelatinelösung hergestellt wurden, zeigten viele Poren mit einem Durchmesser von 0,1 mm (Abb. 21, Charge AH 02).

Im Gegensatz hierzu wiesen die Gelatineschäume der Charge HS 16, die 2 bis 7 Gew. % EDAC enthielten und durch Anwendung einer EDAC-Lösung vernetzt worden waren, eine sehr unregelmäßige Verteilung von Poren mit einer Größe von 0,2 mm bis 0,3 mm auf.

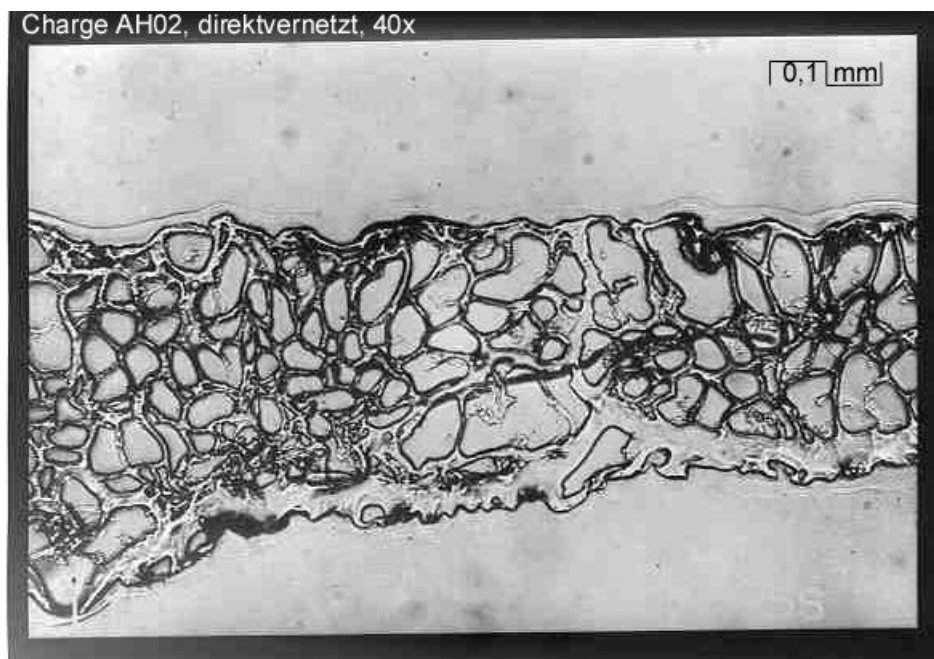


Abb. 21: Porenverteilung in Gelatineschäumen der Charge AH 02 mit 0,07 Gew. % EDAC, die durch Zugabe von EDAC-Pulver in die Gelatinelösung vernetzt wurden.

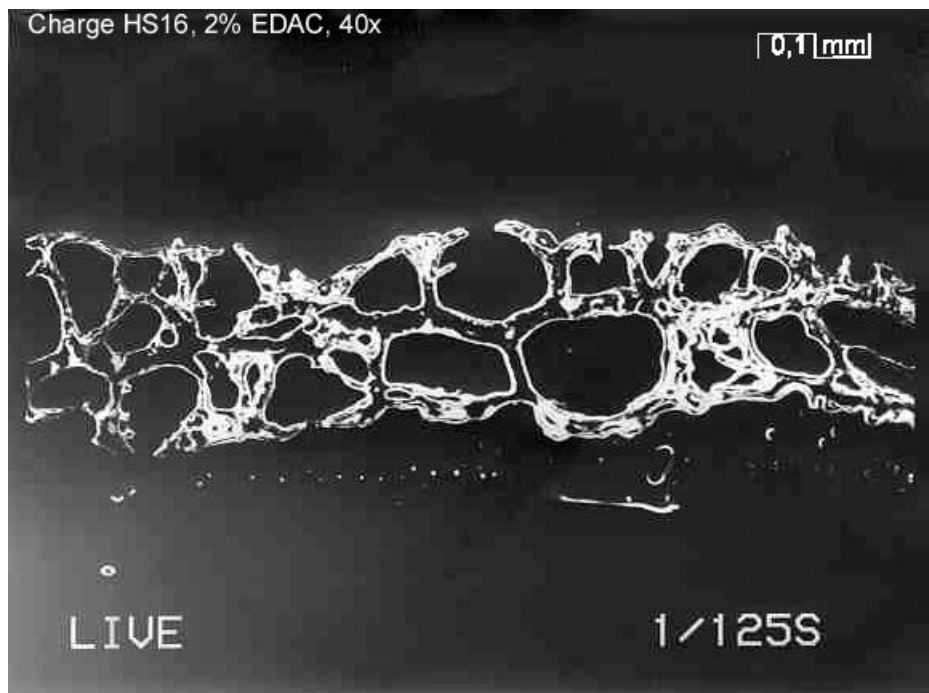


Abb. 22: Porenverteilung in Gelatineschäumen der Charge HS 16 mit 2 Gew. % EDAC, die durch Behandlung mit einer EDAC-Lösung vernetzt wurden.

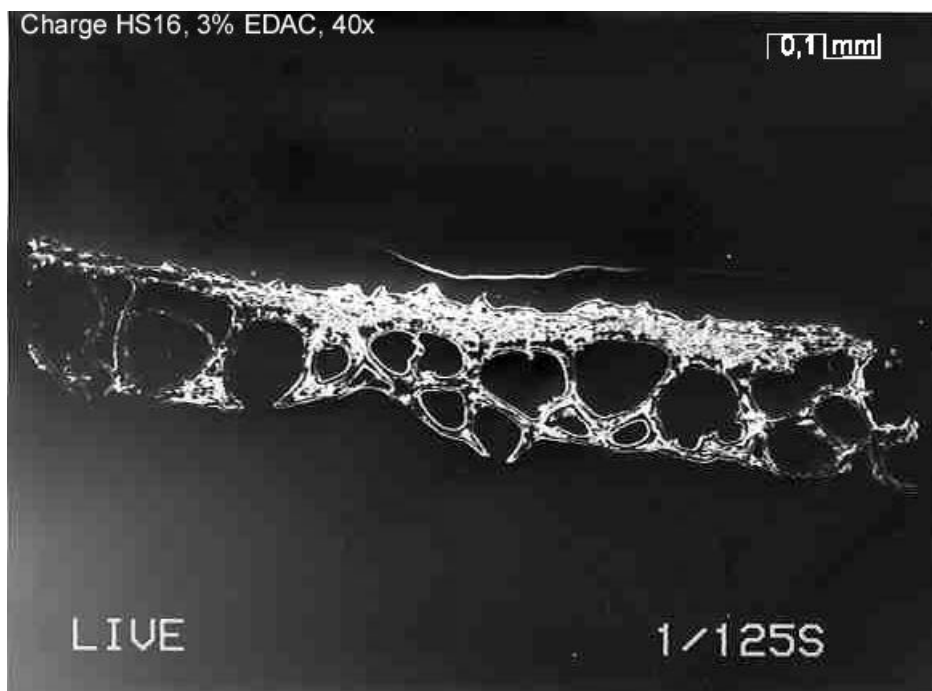


Abb. 23: Porenverteilung in Gelatineschäumen der Charge HS 16 mit 3 Gew. % EDAC, die durch Behandlung mit einer EDAC-Lösung vernetzt wurden.

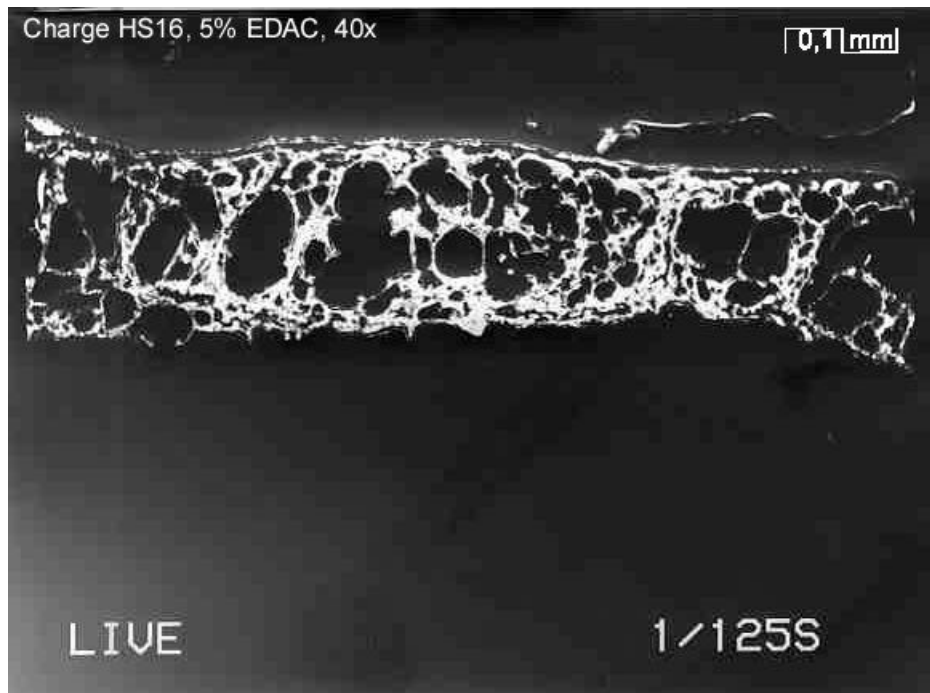


Abb. 24: Porenverteilung in Gelatineschäumen der Charge HS 16 mit 5 Gew.% EDAC, die durch Behandlung mit einer EDAC-Lösung vernetzt wurden.

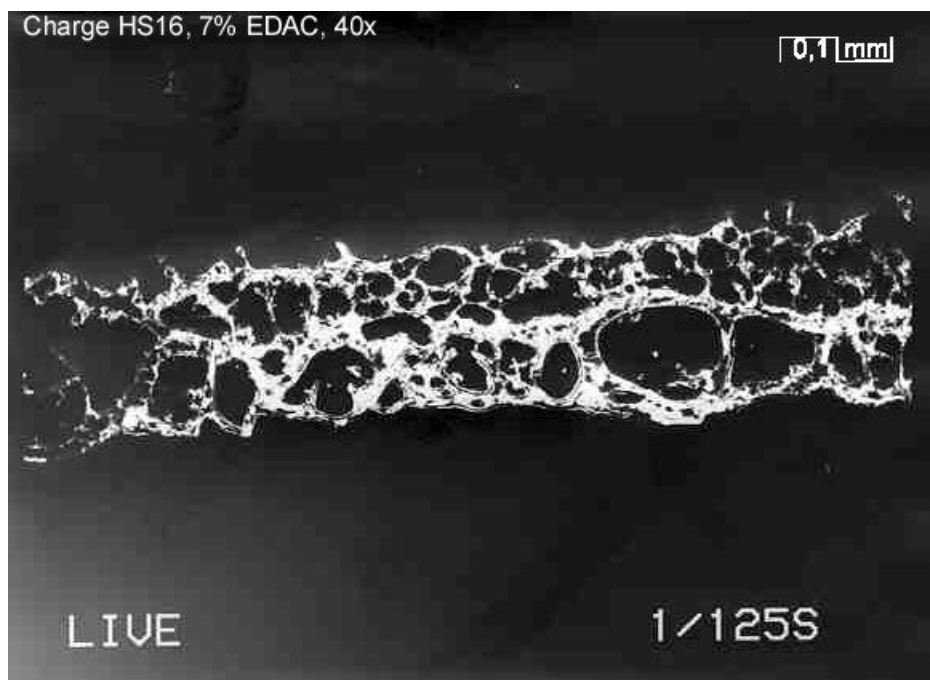


Abb. 25: Porenverteilung in Gelatineschäumen der Charge HS 16 mit 7 Gew. % EDAC, die durch Behandlung mit einer EDAC-Lösung vernetzt wurden.

3.4.4 Einfluß des Vernetzungsgrades auf den enzymatischen Abbau

Die Ergebnisse der Versuche zur Bestimmung des Einflusses des Vernetzungsgrades auf einen enzymatischen Abbau von Gelatineschäumen durch eine Kollagenaselösung sind in der Tabelle 15 aufgelistet und in der Abb. 26 grafisch dargestellt.

Der Einfluß der Menge an verwendetem EDAC und die Art der Vernetzung auf die Stabilität der Schäume nach Inkubation bis zu 4 Stunden bei Raumtemperatur mit einer Kollagenaselösung (100 U/ml) wurde durch Bestimmung der Restgewichte in % der Gelatineschäume ermittelt.

Bei Anwendung einer EDAC-Lösung für die Vernetzung der Gelatineschäume wurde mit Zunahme der EDAC-Konzentration auch eine Zunahme der Stabilität der Schäume erreicht. Nach 0,5 Stunden Inkubation zeigten Gelatineschäume mit 3 Gew. % EDAC noch ein mittleres Restgewicht von $29,69 \pm 9,89$ % und Gelatineschäume mit 5 Gew. % EDAC ein Restgewicht von $63,20 \pm 9,19$ %. Eine weitere Zunahme des EDAC-Gehaltes in der Vernetzerlösung führte zu keiner weiteren Zunahme der Stabilität der Schäume. Bei den Gelatineschäumen mit 7 Gew. % wurde nach 0,5 Stunden ein mittleres Restgewicht von $57,31 \pm 3,65$ % gemessen.

Bei direkter Zugabe von EDAC-Pulver in die Gelatinelösung konnte festgestellt werden, dass die Gelatineschäume mit 0,07 Gew.% EDAC nach 0,5 Stunden Inkubation stabil blieben. Die ermittelten Restgewichte der Schäume lagen bei $27,86 \pm 4,96$ %.

Nach 4 Stunden Inkubation konnten in allen Fällen nur noch kleine Bestandteile der zum Teil vollständig aufgelösten Schäumen detektiert werden.

Tabelle 15 Restgewichte in % der Gelatineschäume mit unterschiedlichem Gehalt an Vernetzer EDAC nach Inkubation mit einer Kollagenase-Lösung mit einer Volumenaktivität von 100 U/ml über bis zu 4 Stunden bei Raumtemperatur.

Rezeptur der Gelatineschäume	Restgewichte der Gelatineschäume nach Inkubation mit der Kollagenase-Lösung [%]		
	nach 0,5 h	nach 1,0 h	nach 4,0 h
	Angabe der Mittelwerte und Standardabweichung (n=3)		
2 Gew.% EDAC, Lsg.	10,93 ±3,56	0,0	0,0
3 Gew.% EDAC, Lsg.	29,69 ±9,89	0,0	0,0
5 Gew.% EDAC, Lsg.	63,20 ± 9,19	16,69 ± 0,75	0,0
7 Gew. % EDAC, Lsg.	57,31 ± 3,65	15,22 ± 10,65	0,0
0,07 Gew.% EDAC-Pulver, direkt	27,86 ± 4,96	3,50 ± 6,07	
Schaum ohne EDAC	6,19 ± 6,23	0,0	

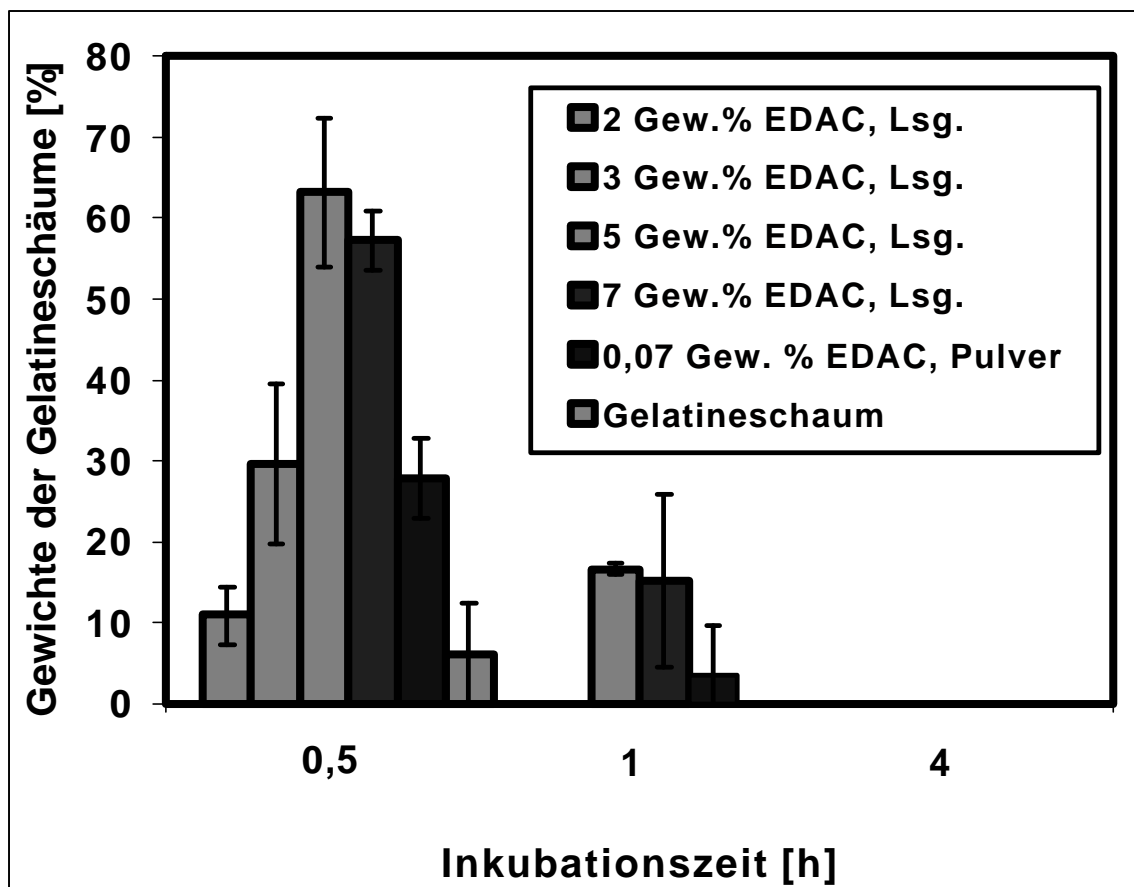


Abb. 27: Zeitliche Stabilität von unterschiedlich vernetzten Gelatineschäume nach Inkubation mit einer Kollagenase-Lösung mit einer Volumenaktivität von 100 U/ml

3.5 ERGEBNISSE DER BESIEDLUNG VON GELATINESCHÄUMEN MIT HUMANFIBROBLASTEN

Für die Besiedlung von mit EDAC vernetzten Gelatineschäumen mit normalen humanen Fibroblasten (NHDF) wurden die Chargen AH02, AH03, AH01 und AH04 verwendet.

Die Gelatineschäume der Chargen AH02 und AH03 enthielten 0,07 Gew.% EDAC und wurden durch direkte Zugabe des EDAC-Pulvers in die Gelatinelösung vernetzt. Die Gelatineschäume der Chargen AH01 und AH04 enthielten 5 Gew.% EDAC und wurden durch Behandlung der Schäume mit einer wässrigen EDAC-Lösung vernetzt.

Durch einen Vergleich der gemessenen Zellzahl pro Gelatineschaum zwischen den Chargen sollte der Einfluss des prozentualen EDAC-Gehaltes der Schäume auf die zeitliche Entwicklung der Fibroblasten festgestellt werden. Zusätzlich wurden Gefrierschnitte der mit Fibroblasten besiedelten Gelatineschäume hergestellt und mit Hemacolor gefärbt, um die Verteilung der Humanfibroblasten auf und innerhalb der Gelatineschäume untersuchen zu können. Unterschiede in der Proliferation der Fibroblasten wurden nach Anwendung des Antikörpers gegen Ki-67 an Gefrierschnitten der Gelatineschäume ermittelt.

3.5.1 Zeitliche Entwicklung der Fibroblasten auf den Gelatineschäumen

Die zeitliche Entwicklung der Fibroblasten über einen Inkubationszeitraum von bis zu 14 Tagen wurde durch Anwendung der MTT Methode und Bestimmung der vitalen Fibroblasten auf den Gelatineschäumen ermittelt. Die gemessenen O.D.-Werte wurden in Anzahl an Fibroblasten pro Gelatineschaum umgerechnet. Hierzu diente die vorab erstellte Eichkurve, über die einer durch Zählung bestimmten Anzahl an Humanfibroblasten ein gemessener O.D.-Wert nach Färbung mit MTT zugeordnet werden konnte.

Zwei Verdünnungsreihen mit 5000 bis 500000 humanen dermalen Fibroblasten wurden hergestellt. Eine Verdünnungsreihe diente der Zählung von Fibroblasten mit der Zählkammer. Die andere diente der Färbung mit MTT. Die Messwerte zur Erstellung der in Abb. 27 grafisch dargestellten Eichkurve sind in Tabelle 17 aufgelistet.

Tabelle 16: Messwerte zur Erstellung der Eichkurve zur Zuordnung der ermittelten Anzahl an Fibroblasten durch Zählung mit der Zählkammer zu einem gemessenen O.D.-Wert nach Färbung der Fibroblasten mit MTT

Mit der Zählkammer ermittelte Zellzahl (n=3 / Verdünnung)	Mittelwerte und Standardabweichung der gemessenen O.D.-Wert bei 550 nm (n=3 / Verdünnung)
500000	2,926 ± 0,022
100000	1,084 ± 0,017
50000	0,647 ± 0,026
10000	0,154 ± 0,008
5000	0,074 ± 0,005

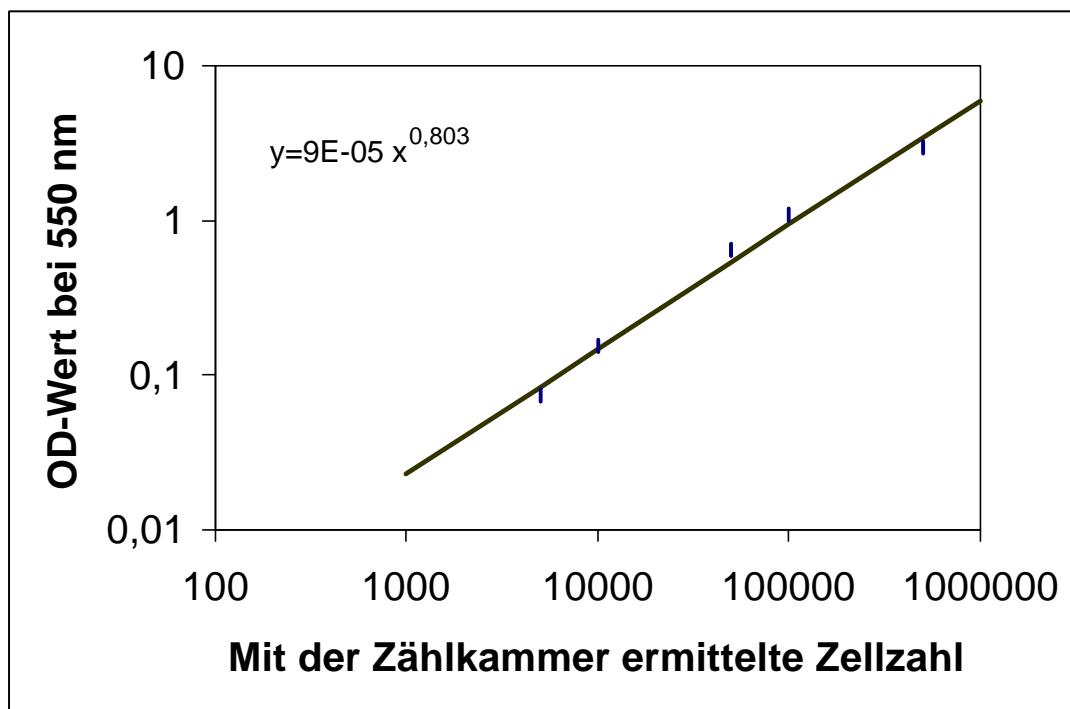


Abb. 27: Relation zwischen ermittelter Anzahl an Fibroblasten und O.D.-Wert nach Färbung der Fibroblasten mit MTT und anschließender Lösung der Formazan Kristalle in DMSO

Als Kontrolle, und um feststellen zu können, wie gut sich die humanen dermalen Fibroblasten der Fa. PromoCell (NHDF'S) unter den gewählten Versuchsbedingungen kultivieren lassen, wurden Fibroblasten ohne Kontakt mit einem Gelatineschaum in den modifizierten Transwell Zellkulturschalen bis zu 14 Tagen kultiviert.

Die Ergebnisse der Kontrollversuche 1 und 2 sind in der Tabelle 17 aufgelistet und in der Abbildung 28 grafisch dargestellt. Die Transwell Zellkulturschalen wurden mit 10000

Fibroblasten beimpft. Nach einem Tag konnte eine sprunghafte Zunahme der Fibroblastenzahl bis auf 118.758 ± 3618 festgestellt werden. Danach blieb die Zellzahl für weitere 4 Tage bei 127.012 ± 18362 und stieg dann exponentiell an. Am 14. Inkubationstag konnten Maximalwerte von 445.569 ± 117574 Fibroblasten gemessen werden. Innerhalb der Wiederholungsansätze (Versuche 1 und 2) und insbesondere nach dem 4. Inkubationstag unterlag die ermittelte Anzahl an Fibroblasten großen Schwankungen.

Tabelle 17: Zeitliche Entwicklung von normalen humanen Fibroblasten (NHDF) auf den Kontrollschalen

Tag	Versuch 1 (n=1/Zeitpunkt)		Versuch 2 (n=1/Zeitpunkt)		Zellzahl Versuche 1 und 2 (n=2/Zeitpunkt) x und s
	O.D.-Werte	Errechnete Zellzahl	O.D.- Werte	Errechnete Zellzahl	
0	Impfmenge: 10000 Fibroblasten				10000
1	1,088	121316	1,051	116200	118758 ± 3618
4	1,0352	114028	1,2206	139996	127012 ± 18362
7	2,1190	2785256	1,2848	149224	213740 ± 91239
11	verkeimt		2,7804	390268	390268
14	3,5480	528706	2,6200	362432	445569 ± 117574

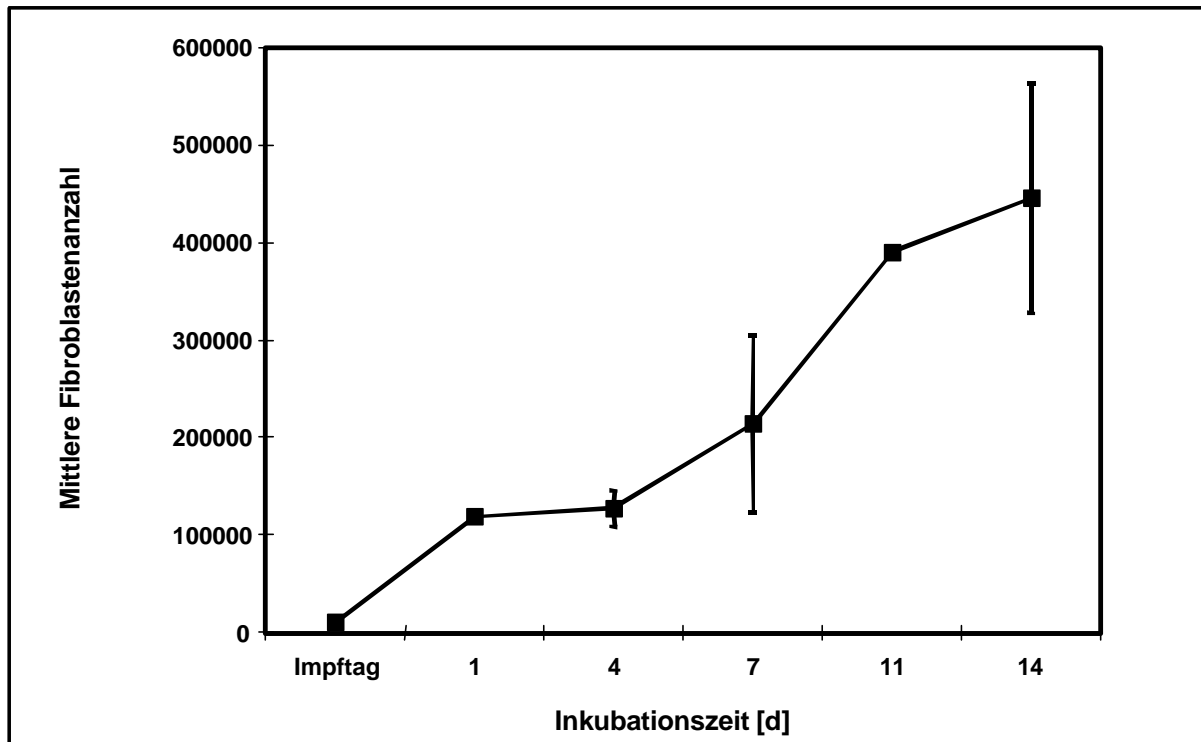


Abb. 28: Mittleres Wachstum von humanen dermalen Fibroblasten auf modifizierten Transwell-Zellkulturschalen ohne Gelatineschaum während der Kontrollversuche 1 und 2

In der Tabelle 18 und in der Abb. 29 sind die Ergebnisse der Versuche der zeitlichen Entwicklung von Fibroblasten nach Inkubation auf Gelatineschäumen der Charge AH 02 und AH 03 mit 0,07 Gew. % EDAC dargestellt. Pro Charge und Zeitpunkt wurden drei Parallelansätze durchgeführt (Versuche 1, 2 und 3). Die Umrechnung der gemessenen O.D.-Werte erfolgte über die Eichkurve.

Tabelle 18: Zeitliche Entwicklung der humanen Fibroblasten auf Gelatineschäumen der Chargen AH 02 und AH 03 mit 0,07 Gew. % EDAC

GELATINESCHÄUME MIT 0,07 GEW.% EDAC (CHARGE AH 02)									
TAG	VERSUCH 1 O.D.-Werte/Zellzahl		VERSUCH 2 O.D.-Werte/Zellzahl		VERSUCH 3 O.D.-Werte/Zellzahl		Versuche 1-3 Zellzahl (n=3) x und s		
0	Impfmenge: 10000 Fibroblasten								
4	0,1200	8020	0,3121	25147	0,2624	20422	17863 ± 8845		
7	0,4423	39379	0,5031	45543	0,3712	31405	38775 ±7088		
11	0,5351	494799	0,4022	34892	0,6221	6586	48319 ± 12885		
14	verkeimt		0,6151	58694	0,6155	58774	58734 ±56		
GELATINESCHÄUME MIT 0,07 GEW.% EDAC (CHARGE AH 03)									
TAG	VERSUCH 1 O.D.- Werte/Zellzahl		VERSUCH 2 O.D.- Werte/Zellzahl		VERSUCH 3 O.D.- Werte/Zellzahl		VERSUCH 4 O.D.- Werte/Zellzahl		Versuche 1-4 Zellzahl (n=4) x und s
0	Impfmenge: 10000 Fibroblasten								
4	0,1344	8224	0,1388	8883	0,2922	23790	0,3254	26392	16822 ± 9610
7	0,4622	41226	0,2055	15054	0,1355	8993	0,2533	19014	21072 ± 1405
11	0,2722	2096	0,1235	8088	0,5133	47451	verkeimt		25500 ± 2007
14	0,3322	27770	0,0724	3793	0,0844	4971	0,2234	16823	13340 ± 11277

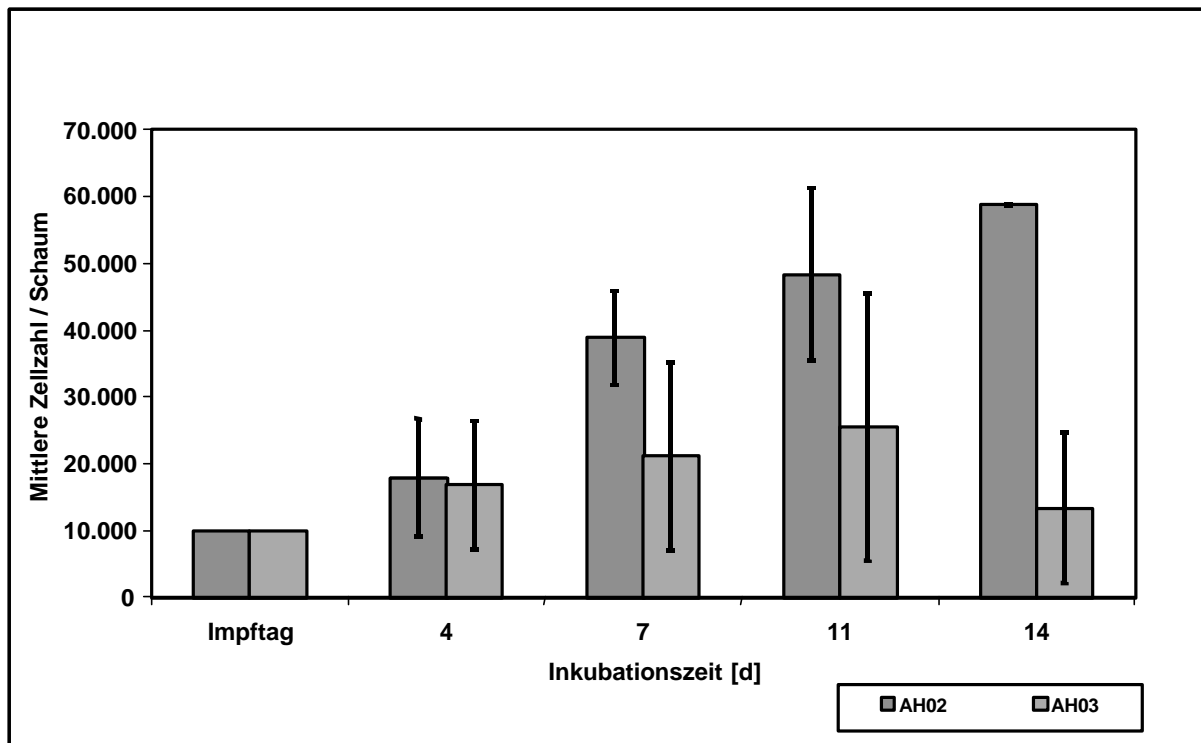


Abb. 29: Zeitliche Entwicklung der Fibroblasten auf Gelatineschäumen mit 0,07 Gew.% EDAC der Chargen AH 02 und AH 03, die durch Zugabe von EDAC-Pulver in die Gelatinelösung vernetzt worden waren

Gelatineschäume der Chargen AH 02 und AH 03, die durch direkte Zugabe von EDAC-Pulver vernetzt wurden, zeigen, dass nach Beimpfung mit Fibroblasten und während der 14 Tage Inkubation die ermittelte Zellzahl pro Gelatineschaum zwischen den Chargen und den Wiederholungsansätzen (Versuche 1 bis 3 bzw. Versuche 1 bis 4) großen Schwankungen unterlag.

Gelatineschäumen der Charge AH 02 zeigten eine kontinuierliche Zunahme der mittleren Zellzahl pro Gelatineschaum während der gesamten Inkubationszeit von bis zu 14 Tagen. Nach Beimpfung der Schäume mit 10000 Fibroblasten nahm nach 4 Tagen die Zellzahl bis auf 17867 ± 8845 und am 7. Tag bis auf 38775 ± 5600 zu. Nach 14 Tagen lag die mittlere Zellzahl pro Gelatineschaum bei 58734 ± 56 .

Bei Beimpfung von Gelatineschäumen der Charge AH 03 mit 10000 Fibroblasten pro Gelatineschaum nahm die Zellzahl pro Gelatineschaum nach 4 Tagen Inkubation geringfügig bis auf 16822 ± 9610 zu. Die Fibroblasten vermehrten sich langsam und unterschiedlich stark innerhalb der Wiederholungsansätze (Versuche 1 bis 4) und während der verbleibenden Inkubationszeit. Nach 14 Tagen konnte ein Absterben der Fibroblasten festgestellt werden. Die mittlere Zellzahl pro Gelatineschaum lag bei 13340 ± 1127 .

In der Tabelle 19 und in der Abb. 30 sind die Ergebnisse der Versuche zur zeitlichen Entwicklung von Fibroblasten auf Gelatineschäumen der Charge AH 01 und AH 04 mit 5,0 Gew. % EDAC dargestellt. Pro Charge und Zeitpunkt wurden drei bzw. vier Parallelansätze durchgeführt (Versuche 1, 2, 3 und 4). Die Umrechnung der gemessenen O.D.-Werte in eine Zellzahl erfolgte über die Eichkurve.

Tabelle 19: Zeitliche Entwicklung der humanen Fibroblasten auf Gelatineschäume der Chargen AH 01 und AH 04 mit 5 Gew. % EDAC

GELATINESCHÄUME MIT 5 GEW.% EDAC (CHARGE AH 01)									
TAG	VERSUCH 1 O.D.-Werte / Zellzahl		VERSUCH 2 O.D.-Werte / Zellzahl		VERSUCH 3 O.D.-Werte / Zellzahl		Versuche 1-3 Zellzahl (n=4) x und s		
0	Impfmenge: 10000 Fibroblasten								
4	0,4132	35682	0,3944	33696	0,4254	37117	35498 ± 1717		
7	0,4544	40813	0,4755	43077	0,5233	48811	44234 ± 4122		
11	0,5754	54710	0,6654	65222	0,4764	42089	54007 ± 11582		
14	0,5355	49731	0,5244	47913	0,6544	63261	53635 ± 8385		
GELATINESCHÄUME MIT 5 GEW. % EDAC (CHARGE AH 04)									
TAG	VERSUCH 1 O.D.- Werte/Zellzahl		VERSUCH 2 O.D.- Werte/Zellzahl		VERSUCH 3 O.D.- Werte/Zellzahl		VERSUCH 4 O.D.- Werte/Zellzahl		Versuche 1 - 4 Zellzahl (n=4) x und s
0	Impfmenge: 10000 Fibroblasten								
4	0,4133	35582	0,4167	35764	0,5033	46491	0,6433	62895	45183 ± 12862
7	0,5344	49498	0,6211	59618	0,5215	48221	0,4205	37262	48650 ± 9145
11	0,4755	42540	0,5722	53644	Verkeimt				48092 ± 7851
14	0,5122	46990	0,4355	38661	0,6433	57214	0,4416	39438	45575 ± 8620

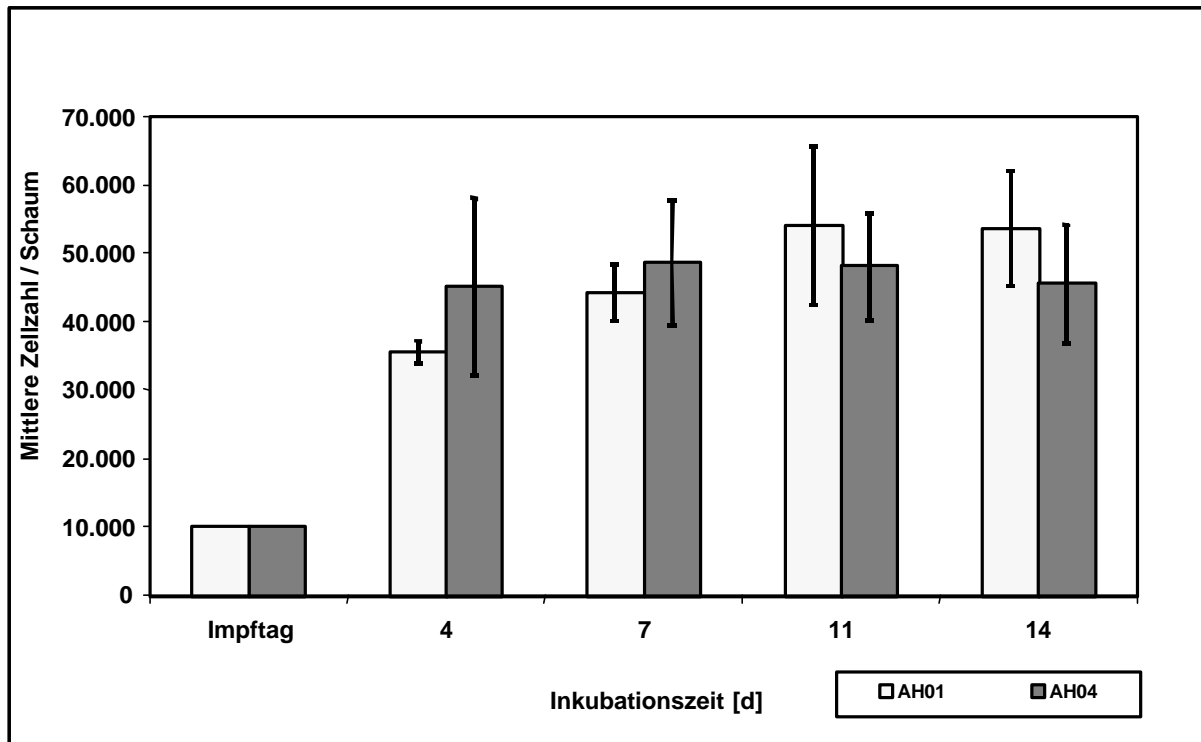


Abb. 30: Zeitliche Entwicklung der Fibroblastenzahl auf Gelatineschäume mit 5,0 Gew. % EDAC, vernetzt durch Behandlung mit einer EDAC-Lösung

Gelatineschäume der Chargen AH 01 und AH 04, die durch Behandeln mit einer EDAC-Lösung vernetzt wurden, zeigten nach Beimpfung mit 10000 Fibroblasten eine kontinuierliche Zunahme der Zellzahl im Verlauf der Inkubation und insbesondere bis zum 11. Tag. Zwischen den Chargen und den Wiederholungsansätzen (Versuche 1 bis 4) wurden geringe Schwankungen zwischen den Werten festgestellt.

In der Abb. 31 ist ein direkter Vergleich der zeitlichen Entwicklung von Fibroblasten auf Gelatineschäumen, die durch direkte Zugabe von EDAC-Pulver in die Gelatinelösung (Charge AH 02 und Charge AH 03) und auf Gelatineschäumen, die durch Behandeln mit einer EDAC-Lösung vernetzt wurden (Charge AH 01 und Charge AH 04), dargestellt. Für die Herstellung der Grafik wurden jeweils zu jedem Inkubationszeitpunkt die Mittelwerte der Fibroblasten-Anzahl/Gelatineschaum aus den Tabellen 18 und 19 mit Angabe der Standardabweichungen verwendet.

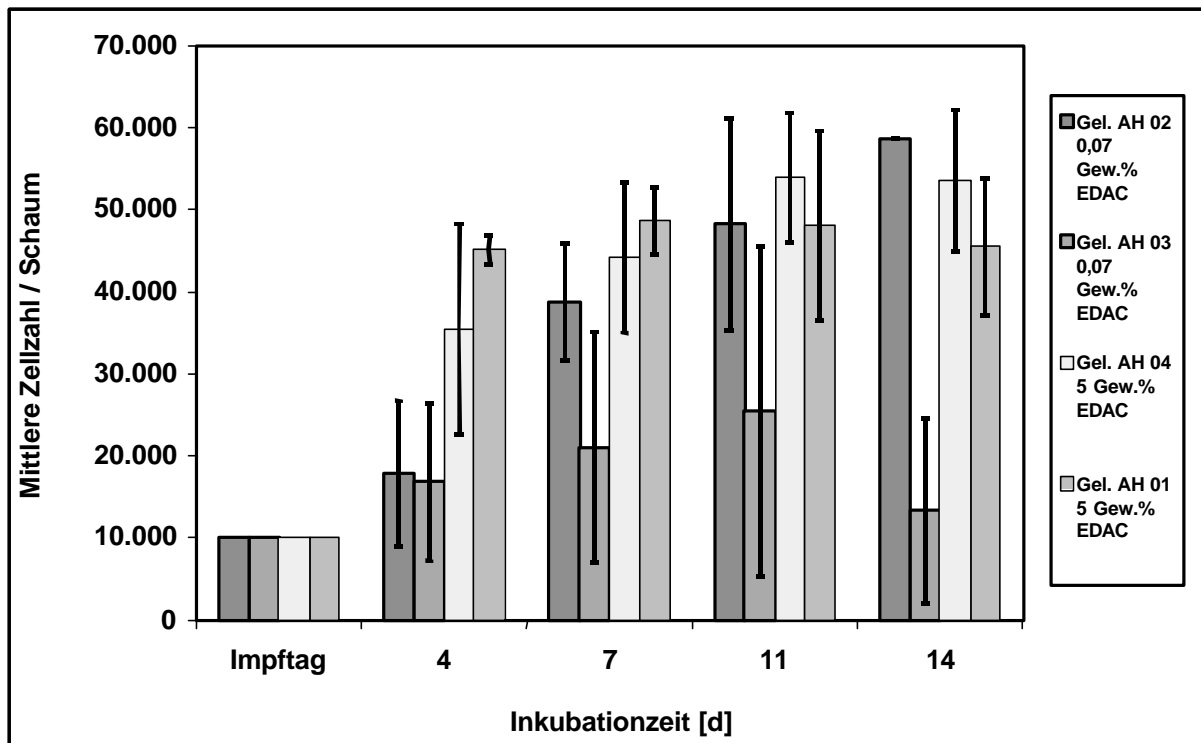


Abb. 31: Vergleich der zeitlichen Entwicklung der Fibroblasten auf verschiedenen vernetzten Gelatineschäumen

3.5.2 Gefrierschnitte der mit Hemacolor gefärbten Gelatineschäume

Die Verteilung der Fibroblasten auf den Gelatineschäumen wurde visuell durch eine Bewertung der mit Hemacolor gefärbten Gefrierschnitte (50 µm) untersucht (Abb. 32 bis Abb. 39). Verglichen wurden Gelatineschäume mit 0,07 Gew. % EDAC (Chargen AH 02 und AH 03) und 5,0 Gew.% EDAC (Charge AH 01 und Charge AH 04). Dabei zeigte sich deutlich, dass die Art der Vernetzung der Gelatineschäume und die Menge an verwendetem EDAC Einfluss auf die Verteilung der Fibroblasten auf und innerhalb der Gelatineschäume hatte.

Beispielhaft sind in den Abb. 32 bis 35 die Ergebnisse der Versuche mit Gelatineschäumen der Charge AH 02 mit 0,07 Gew.% EDAC dargestellt. Grundsätzlich verloren die Gelatineschäume im Verlauf der Inkubationszeit ihre Integrität. Während der Inkubationszeit wurde die Anzahl an Fibroblasten auf den Schäumen immer dichter. Diese mehrschichtige Fibroblasten-Schicht adhärierte fest an die Oberfläche der Gelatineschäume und blieb bei der Herstellung der Gefrierschnitte relativ intakt. Insbesondere am 7. Inkubationstag konnten einige Fibroblasten im Inneren der Gelatineschäume beobachtet werden (Abb. 33).

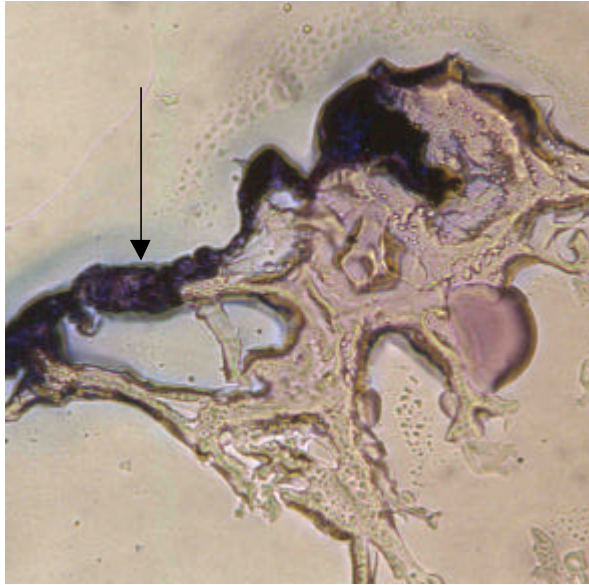


Abb. 32: Gelatineschaum (0,07 Gew.% EDAC) nach 4 Tagen Inkubation und mit einer Fibroblasten-Schicht auf der Oberfläche (→)

Vergrößerung unter dem Mikroskop: 20 x 12,5

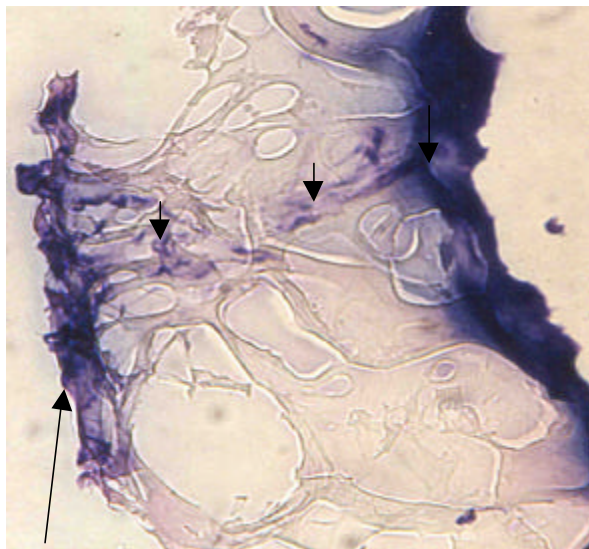


Abb. 33: Gelatineschaum (0,07 Gew.% EDAC) nach 7 Tagen Inkubation: Fibroblasten-Schicht auf dem Gelatineschaum (→), Fibroblasten im Schauminneren (→)

Vergrößerung unter dem Mikroskop: 20 x 12,5

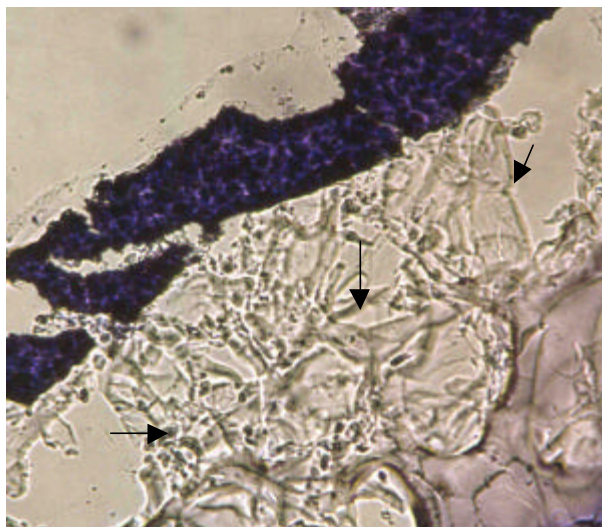


Abb. 34: Leichter Zerfall des Gelatineschaums (0,07 Gew.% EDAC) nach 11 Tagen Inkubation (→)

Vergrößerung unter dem Mikroskop: 20 x 12,5

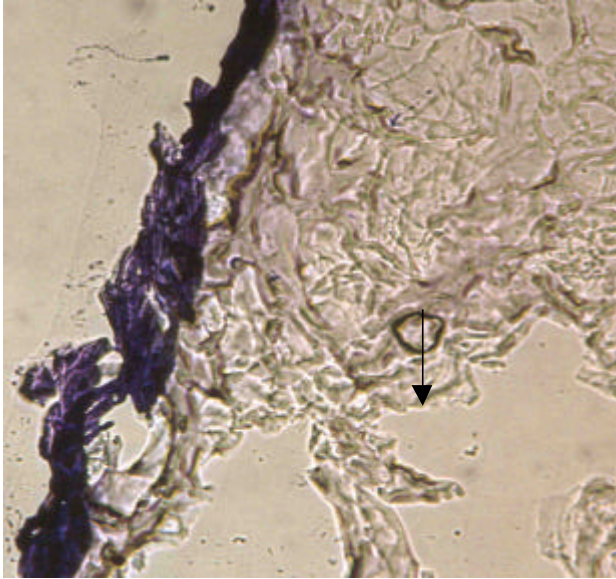


Abb. 35: Verstärkter Zerfall des Gelatineschaums (0,07 Gew.% EDAC) nach 14 Tagen Inkubation (→)

Vergrößerung unter dem Mikroskop: 20 x 12,5

In den Abb. 36 bis 39 sind die Ergebnisse der Versuche mit Gelatineschäumen mit 5,0 Gew.% EDAC der Charge AH 01 dargestellt.

Die Fibroblastenzahl auf den Gelatineschäumen nahm während der Inkubationszeit kontinuierlich zu. Nach 14 Tagen konnte eine dichte Fibroblasten-Schicht auf den Gelatineschäumen beobachtet werden die bei der Herstellung der Gefrierschnitte in einzelne Fragmente zerfiel (Abb. 39).

Es konnten keine Fibroblasten im Inneren der Gelatineschäume beobachtet werden.

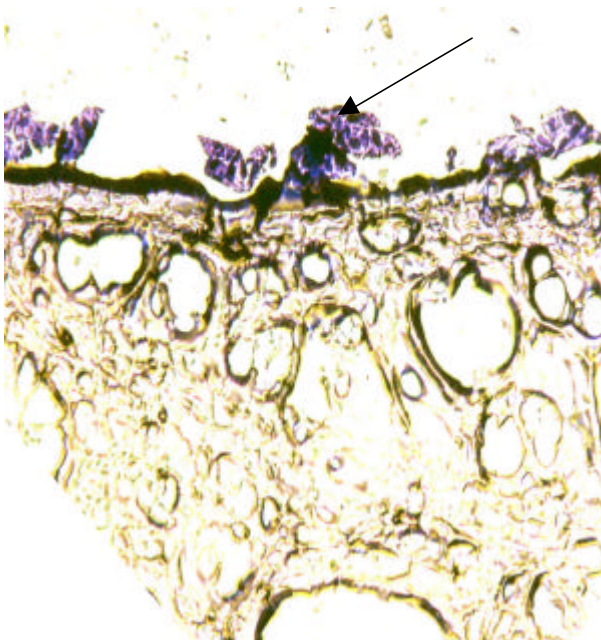


Abb. 36: Gelatineschaum (5 Gew.% EDAC) nach 4 Tagen Inkubation mit einer dünnen Fibroblasten-Schicht auf der Oberfläche (→)

Vergrößerung unter dem Mikroskop: 20 x 12,5

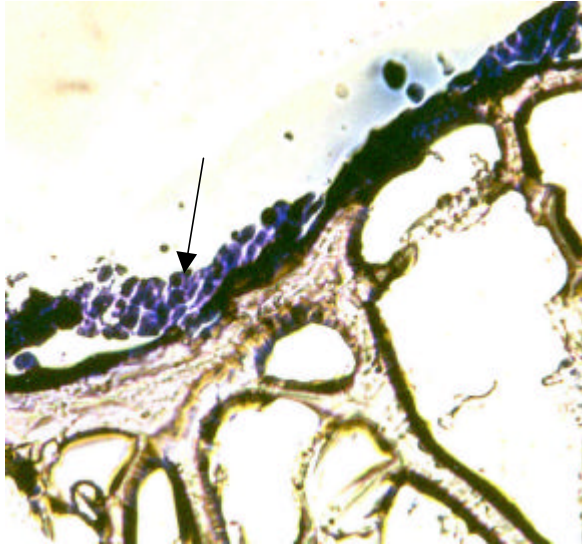


Abb. 37: Gelatineschaum (5 Gew.% EDAC) nach 7 Tagen Inkubation mit einer Fibroblasten-Schicht auf der Oberfläche (→)

Vergrößerung unter dem Mikroskop:
20 x 12,5

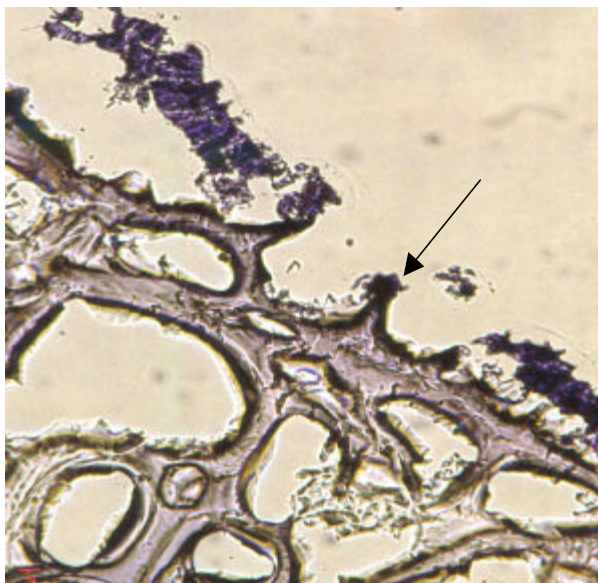


Abb. 38: Gelatineschaum (5 Gew.% EDAC) nach 11 Tagen Inkubation und einer Fibroblasten-Schicht auf der Oberfläche (→)

Vergrößerung unter dem Mikroskop:
20 x 12,5

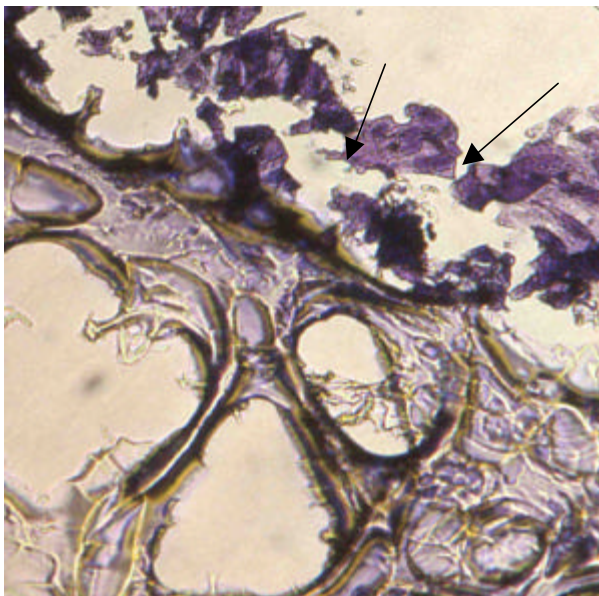


Abb. 39: Gelatineschaum (5 Gew.% EDAC) mit einer dichten Fibroblasten-Schicht (→) nach 14 Tagen Inkubation

Vergrößerung unter dem Mikroskop:
20 x 12,5

3.5.3 Immunhistochemie: Untersuchung zur Proliferation der Fibroblasten mit Hilfe des Antikörpers gegen Ki - 67

Die Proliferation von humanen dermalen Fibroblasten auf Gelatineschäumen wurde mit Hilfe des Antikörpers gegen Ki-67 untersucht. Es zeigten sich Unterschiede zwischen Gelatineschäumen, die durch direkte Zugabe von EDAC-Pulver in die Gelatinelösung vernetzt wurden, mit 0,07 Gew. % EDAC und Gelatineschäumen, die durch Behandlung mit einer EDAC-Lösung vernetzt wurden, mit 5,0 Gew. % EDAC.

Aus den Abbildungen 40 bis 44 ist zu entnehmen, dass durch Behandlung der Gefrierschnitte (50 µm) mit dem Antikörper gegen Ki- 67 und anschließender Gegenfärbung mit Hemacolor eine Proliferation der humanen dermalen Fibroblasten sowohl auf der Oberfläche wie auch im Inneren der Gelatineschäume sichtbar gemacht werden konnte.

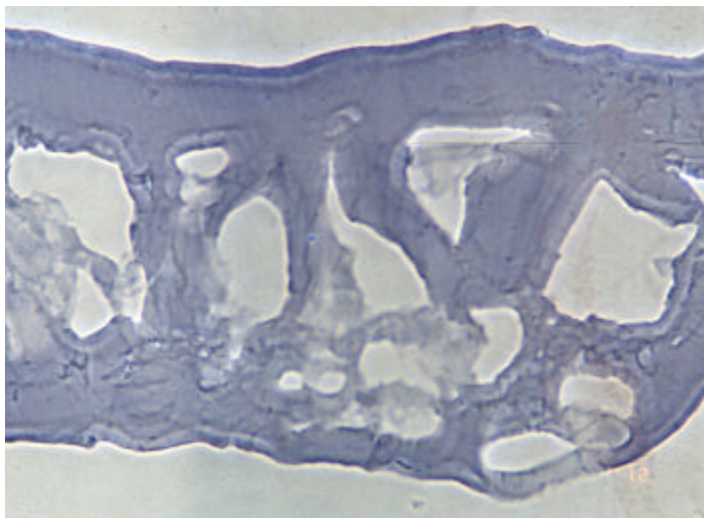


Abb. 40: Gefrierschnitt eines als Kontrolle geführten Gelatineschaumes nach 4 Tagen Inkubation in Zellkulturmedium ohne Fibroblasten

Vergrößerung unter dem Mikroskop: 10 x 12,5.

Deutliche Unterschiede zwischen der Proliferation der Fibroblasten auf Gelatineschäumen der Chargen AH 03 mit 0,07 Gew. % EDAC und auf Gelatineschäumen der Charge AH 04 mit 5 Gew. % EDAC waren schon nach 4 Tagen Inkubation zu erkennen.

Abb. 41 zeigt Gelatineschäume der Charge AH 04 nach 11 Tagen Inkubation mit leichter Proliferation der Fibroblasten auf der Oberfläche und im Inneren der Schaumstruktur.

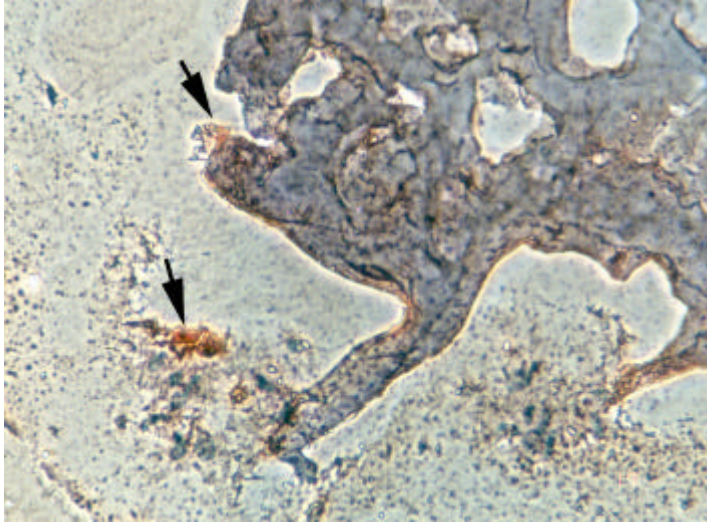


Abb. 41: Diskrete Proliferation von Fibroblasten ins Innere eines Gelatineschaums (5 Gew.% EDAC) nach 11 Tagen Inkubation

Vergrößerung unter dem Mikroskop: 20 x 12,5.

Die Proliferation von Fibroblasten auf Gelatineschäumen der Charge AH 03 konnten schon nach 1 Tag Inkubation sowohl auf der Oberfläche wie auch im Inneren der Gelatineschäume nachgewiesen werden (Abb. 42-44).

Wie aus der Abbildung 42 zu entnehmen ist, konnte nach 1 Tag Inkubation eine diskrete Proliferation auf der Oberfläche detektiert werden. Im weiteren Verlauf der Inkubationszeit, und insbesondere nach 7 Tagen, war eine erhöhte Anzahl an proliferierenden Fibroblasten im Inneren des Gelatineschaumes zu erkennen (Abb. 43 und Abb. 44).

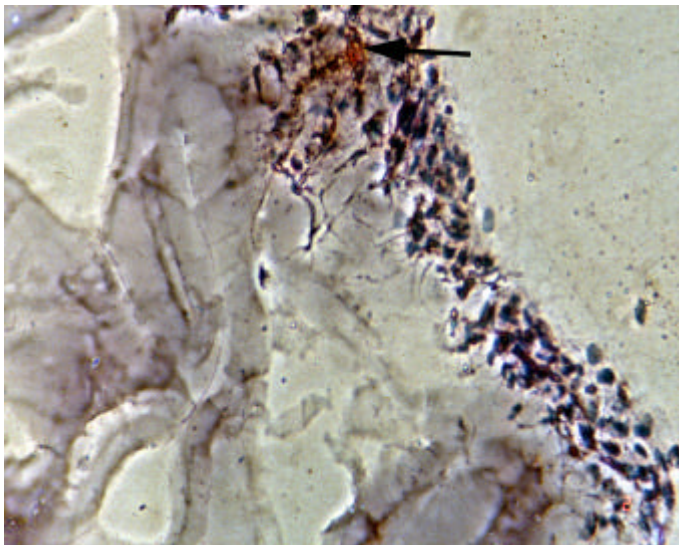


Abb. 42: Diskrete Proliferation von Fibroblasten auf der Oberfläche eines Gelatineschaumes (0,07 Gew.% EDAC) nach 1 Tag Inkubation

Vergrößerung unter dem Mikroskop: 20 x 12,5

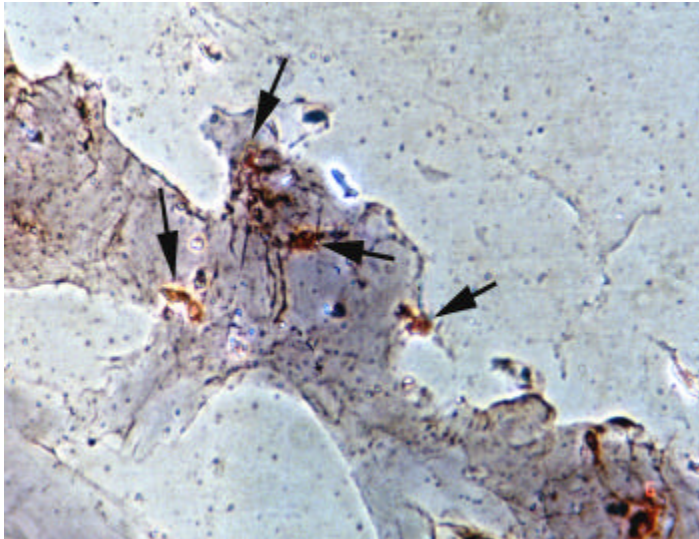


Abb. 43: Vermehrte Proliferation von Fibroblasten auf der Oberfläche eines Gelatineschaumes (0,07 Gew.% EDAC) nach 4 Tagen Inkubation

Vergrößerung unter dem Mikroskop: 20 x 12,5.

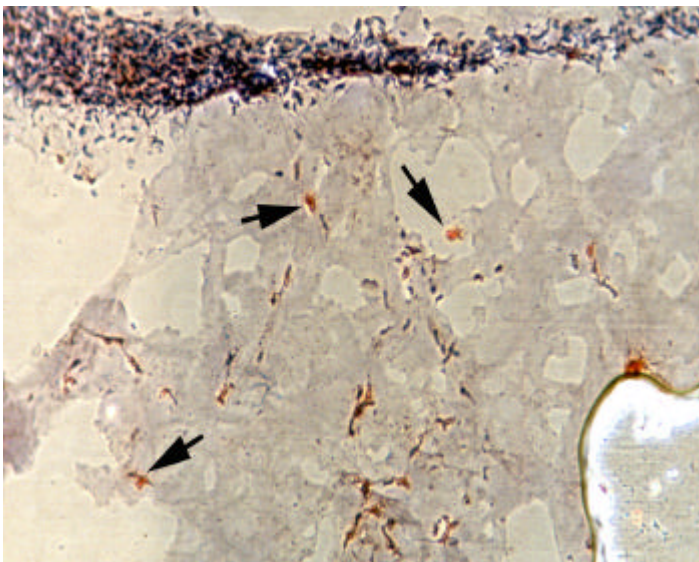


Abb. 44: Vermehrte Proliferation von Fibroblasten insbesondere in der Mitte eines Gelatineschaumes (0,07 Gew.% EDAC) nach 7 Tagen Inkubation

Vergrößerung unter dem Mikroskop: 10 x 12,5.

3.6 ANWENDUNG DES IN-VITRO TESTSYSTEMS

Erste orientierende Versuche dienten der Bewertung der mit Fibroblasten beimpften Gelatineschäume in Hinblick auf ihre mögliche Anwendung als „künstliche Dermis“ in einem in-vitro Testsystem. Für die Versuche wurden Gelatineschäume der Chargen HS 16 und HS 18, mit 5 Gew.% EDAC, die durch Behandeln mit einer EDAC-Lösung vernetzt worden waren, verwendet. Diese wurden mit einem als Standard verwendeten cytotoxischen Material (PVC-Plättchen Portex Positive Control Disc) und mit einem für die Wundversorgung verwendeten Polyurethanschaum über 11 Tage im „in-vitro Testsystem“ inkubiert.

Die Wechselwirkung zwischen den Fibroblasten auf den Gelatineschäumen und den Testmaterialien wurde durch Bestimmung der zeitlichen Entwicklung der Fibroblasten mittels MTT-Test untersucht. Die Ergebnisse wurden mit den Kontrollen, d.h. mit Gelatineschäumen ohne Kontakt zu den Testmaterialien, verglichen.

Die Handhabung des Testsystems, das Verbleiben der mit Fibroblasten beimpften Gelatineschäume auf den Halterungen der Zellkulturschale und vor allem die Auswirkungen des gewünschten Kontaktes zwischen dem Testmaterial und den mit Fibroblasten besiedelten Gelatineschäumen über den Zeitraum der Inkubation wurden dabei bewertet.

3.6.1 Methodische Evaluierung

Während der Durchführung der Versuche mit dem „in-vitro Testsystem“ zeigte sich, dass die gebaute Testapparatur leicht zu handhaben war. Die Gelatineschäume und die als cytotoxisches Testmaterial verwendeten PVC-Plättchen blieben während der Inkubationszeit und insbesondere während des Mediumwechsels, am 4. und 7. Tag, auf den gewünschten Positionen. Hierdurch wurde eine Extraktion der löslichen und cytotoxischen Bestandteile des Testmaterials durch das Zellkulturmedium bei gleichzeitigem permanentem Kontakt mit den Fibroblasten auf den Gelatineschäumen ermöglicht.

Die Versuche mit dem Schaum aus Polyurethan zeigten, dass auch die Verwendung eines stark saugenden und dadurch quellenden Materials im „in-vitro Testsystem“ möglich ist. Nach Zugabe des Zellkulturmediums in die Transwell Zellkulturschale nahm der Schaum die Flüssigkeit rasch auf, quoll und schmiegte sich gleichmäßig an die Wände des Transwell Einsatzes, ohne dass die Fibroblasten auf den Gelatineschäumen beschädigt wurden und der Schaum in der Apparatur verrutschte (Abb. 45). Durch Zugabe von 9 ml DMEM in das Testsystem wurde gewährleistet, dass ausreichend Flüssigkeit vorhanden war, um einerseits

eine Extraktion von löslichen Bestandteilen aus den Schaum zu ermöglichen, und dass andererseits noch genügend DMEM für die Versorgung der Fibroblasten auf den Gelatineschäumen zur Verfügung stand.

Auch bei dieser Versuchsreihe konnte am 4. und 7. Tag problemlos das Zellkulturmedium gewechselt werden.

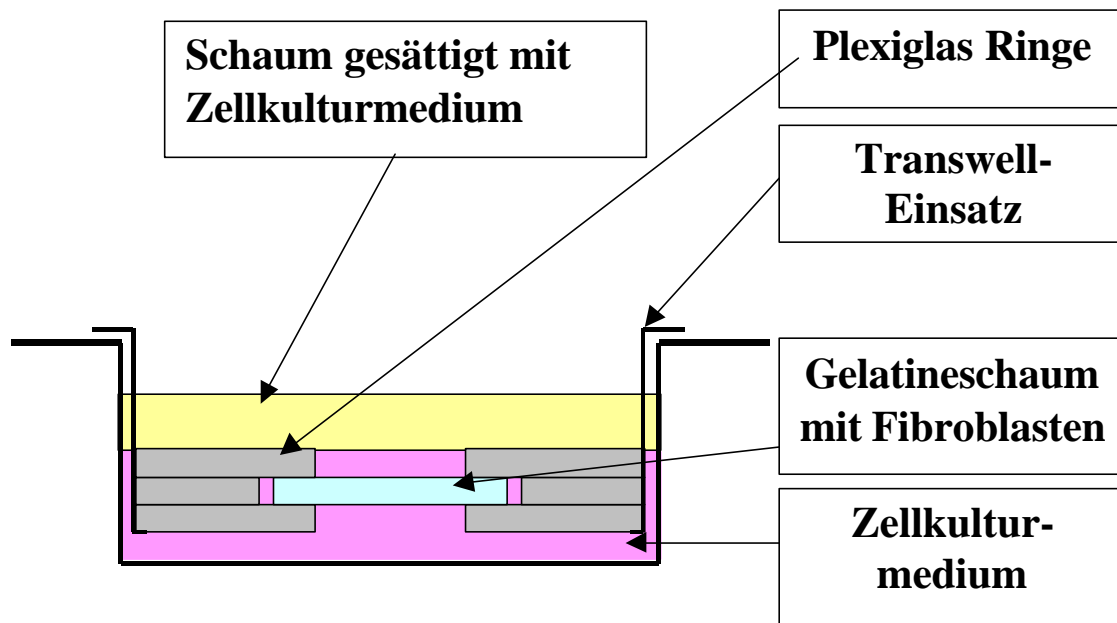


Abb. 45: Anwendung des „in-vitro Testsystems“ am Beispiel eines stark quellenden Schaums aus Polyurethan zur Wundversorgung

3.6.2 Zeitliche Entwicklung der Fibroblasten auf Gelatineschäumen mit und ohne Kontakt mit einem Testmaterial

Die zeitliche Entwicklung von Fibroblasten auf Gelatineschäumen mit 5 Gew.% EDAC der Chargen HS 16 und HS 18 mit und ohne Kontakt mit einem Testmaterial ist in den Tabellen 20 und 21 aufgelistet und in den Abbildungen 46 bis 50 grafisch dargestellt.

Nach Beimpfung der Gelatineschäume mit 10000 Fibroblasten zeigte sich, dass im Verlauf der Inkubation auf Gelatineschäumen der Charge HS 16 und HS 18, die als Kontrollen mitgeführt wurden, die Anzahl der Fibroblasten kontinuierlich zunahm (Tab. 20 und Abb. 46). Bereits nach 4 Tagen konnten 60357 ± 3217 bzw. 52894 ± 1093 Fibroblasten pro Gelatineschaum gemessen werden. Nach 7 Tagen wurden bei Charge HS 16 weniger Fibroblasten mit 53934 ± 567 Fibroblasten pro Schaum als bei Charge HS 18 mit 66778 ± 1024 Fibroblasten pro Schaum festgestellt. Dieser Unterschied glich sich am 11.

Inkubationstag wieder aus. Bei den Gelatineschäumen der Charge HS 16 lag die Fibroblastenzahl pro Schaum bei 80658 ± 987 und bei Charge HS 18 bei 70423 ± 814 Fibroblasten pro Schaum.

Tabelle 20: Zeitliche Entwicklung von Fibroblasten auf den Gelatineschäumen mit 5 Gew.% EDAC Charge HS 16 und HS 18 (n=2 pro Zeitpunkt) und Einfluss eines Cytotoxplättchens (n=1 pro Zeitpunkt) auf die ermittelte Zellzahl/Gelatineschaum nach 4, 7 und 11 Tagen Inkubation.

Inkubationszeit [d]	Kontrollen Gelatineschäume HS 16 / (n=2)		Cytotoxplättchen (PVC Scheibe) (n=1)		Inhibition der Zell Proliferation
	O.D.-Wert	Zellzahl	O.D.-Wert	Zellzahl	
	x und s	x und s	x	x	ICP (%)
Impftag	10000 Fibroblasten/Schaum				
4	$0,8003 \pm 0,04$	60357 ± 3217	0,3828	33029	45 %
7	$0,4383 \pm 0,01$	53934 ± 567	0,0517	2728	94,9 %
11	$0,8093 \pm 0,02$	80658 ± 987	-	-	100 %
Inkubationszeit [d]	Kontrollen Gelatineschäume HS 18 / (n=2)		Cytotoxplättchen (PVC Scheibe) (n=1)		Inhibition der Zell Proliferation
	O.D.-Wert	Zellzahl	O.D.-Wert	Zellzahl	
	x und s	x und s	x	x	ICP (%)
Impftag	10000 Fibroblasten/Schaum				
4	$0,5680 \pm 0,03$	52894 ± 1093	0,5358	50208	5,1 %
7	$0,7453 \pm 0,03$	66778 ± 1024	0,1887	13687	79 %
11	$0,6330 \pm 0,03$	70423 ± 814	0,0223	960	97,8 %

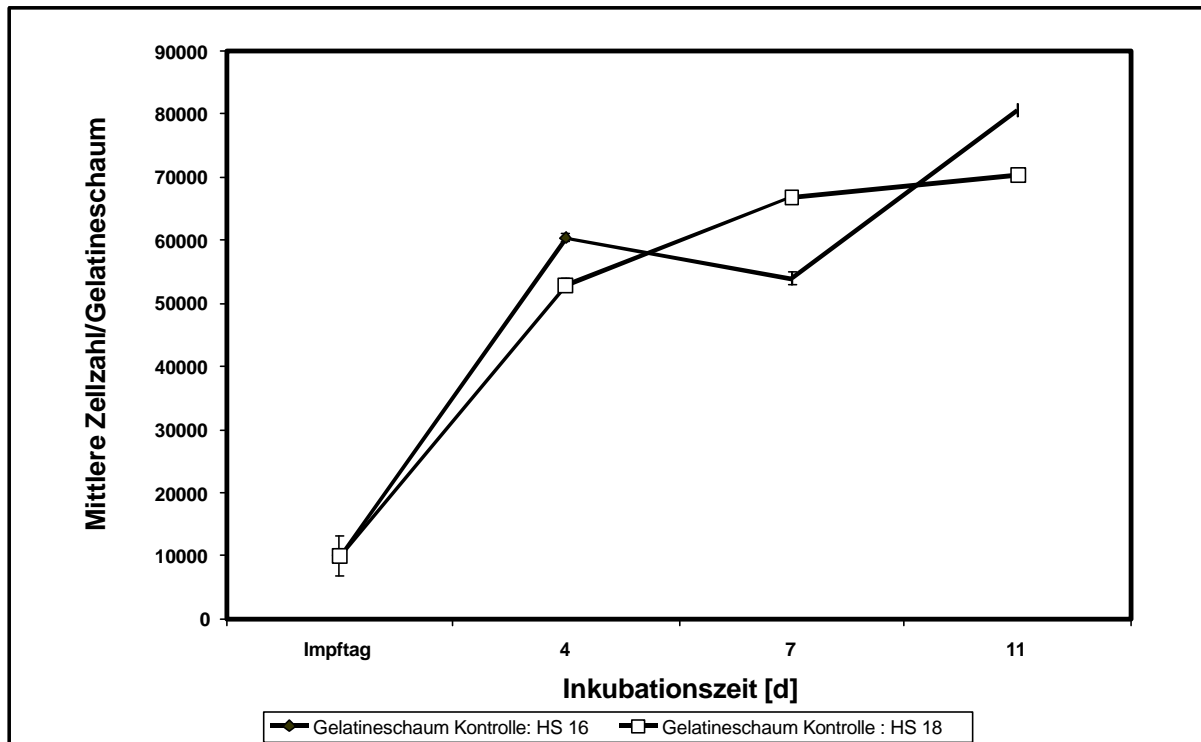


Abb. 46: Zeitliche Entwicklung der Fibroblasten auf Gelatineschäumen der Chargen HS 16 und HS 18, die als Kontrollen mitgeführt wurden.

Der Einfluss der als Standard Cytotoxplättchen verwendeten PVC Scheibe auf das Wachstum der Fibroblasten auf den Gelatineschäumen der Chargen HS 16 und HS 18 ist in der Tabelle 20 aufgelistet und in den Abbildungen 47 und 48 dargestellt.

Bei Anwendung von Gelatineschäumen der Charge HS 16 konnte ein cytotoxischer Effekt der PVC Scheiben auf die darauf wachsenden Fibroblasten nach 4 Tagen Inkubation festgestellt werden (Abb. 47). Im Vergleich zu den Kontrollen mit 60357 ± 3217 Fibroblasten pro Gelatineschaum wurden bei den Gelatineschäumen in Kontakt mit der PVC Scheibe 33029 Fibroblasten pro Gelatineschaum festgestellt. Nach einem Mediumwechsel am 4. Tag und weiterer Inkubation bis auf 7 Tage starben weitere Fibroblasten ab, so dass nur noch 2728 Fibroblasten pro Gelatineschaum gemessen werden konnten. Am Tag 11, und trotz Mediumwechsel auch schon am Tag 7, konnten keine lebende Fibroblasten auf den Gelatineschäumen der Charge HS 16, die in Kontakt mit der PVC Scheibe standen, festgestellt werden. Die Inhibition der Zellproliferation (siehe 2.5.3) nahm vom 4. bis zum 11. Inkubationstag von 45 % bis auf 100 % zu.

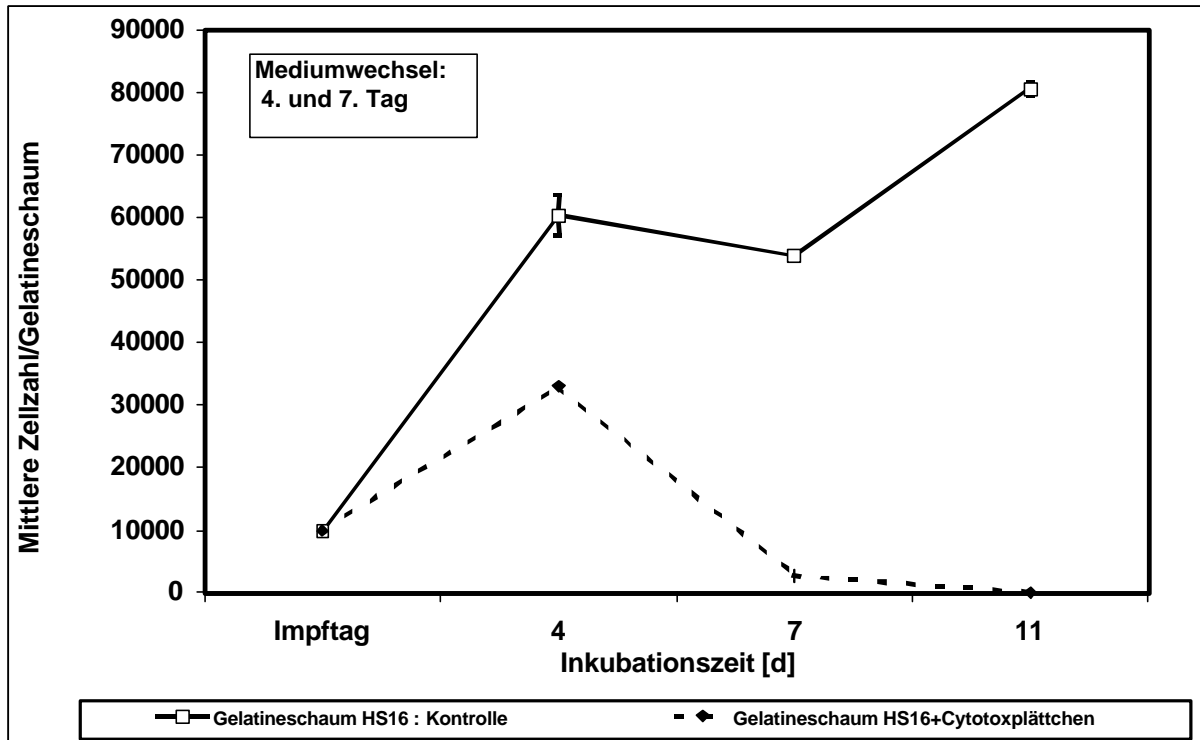


Abb. 47: Einfluss des Cytotoxplättchens (n=1 pro Zeitpunkt) auf die zeitliche Entwicklung von humanen Fibroblasten auf Gelatineschäumen mit 5 Gew. % EDAC der Charge HS 16 (n=2 pro Zeitpunkt) nach 4, 7 und 11 Tagen Inkubation

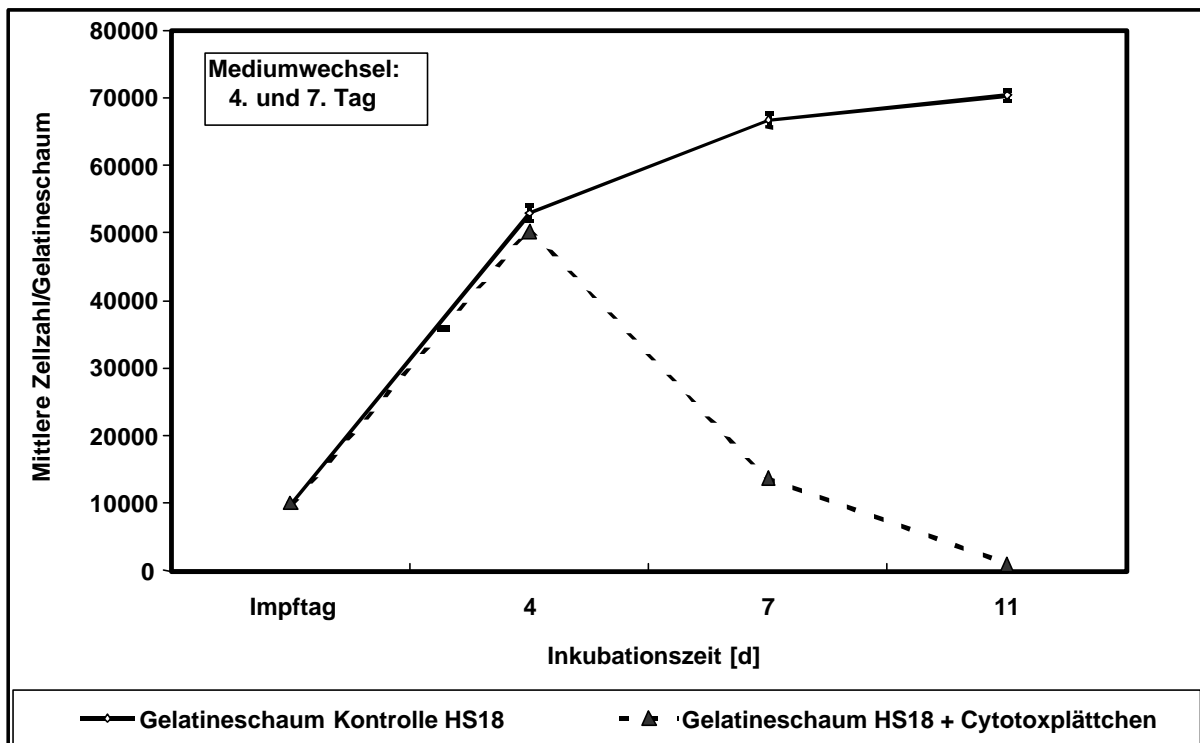


Abb. 48: Einfluss des Cytotoxplättchens (n=1 pro Zeitpunkt) auf die zeitliche Entwicklung von Fibroblasten auf Gelatineschäumen mit 5 Gew. % EDAC der Charge HS 18 (n=2 pro Zeitpunkt) nach 4, 7 und 11 Tagen Inkubation

Bei Anwendung der Charge HS 18 wurde der cytotoxische Effekt der PVC Scheiben auf das Wachstum der Fibroblasten erst zwischen dem 4. und den 7. Inkubationstag sichtbar. Im Vergleich zur Kontrolle mit 66778 ± 1024 Fibroblasten pro Gelatineschaum ging die Anzahl der Fibroblasten auf den Gelatineschäumen in Kontakt mit der PVC Scheibe auf 13687 zurück. Nach 11 Tagen Inkubation konnten dann lediglich 960 Fibroblasten pro Gelatineschaum festgestellt werden (Abb. 48). Die Inhibition der Zellproliferation nahm vom 4. bis zum 11. Inkubationstag von 5,1 % bis 97,8 % zu.

In der Abb. 49 wird der Einfluss der Cytotoxplättchen auf die zeitliche Entwicklung von Fibroblasten auf Gelatineschäumen der Charge HS 16 und Charge HS 18 mit 5 Gew. % EDAC direkt verglichen.

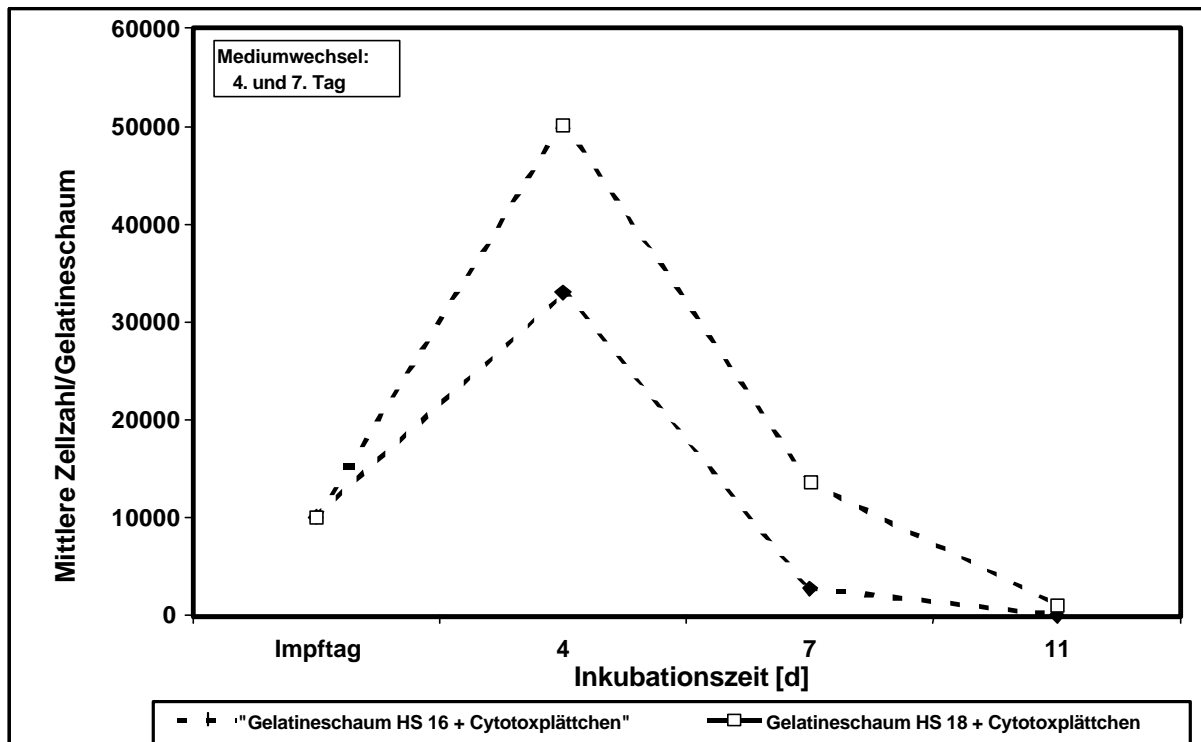


Abb. 49: Direkter Vergleich der zeitlichen Entwicklung von humanen dermalen Fibroblasten auf Gelatineschäumen mit 5 Gew.% EDAC der Chargen HS 16 und HS 18, nach Kontakt mit einem Cytotoxplättchen

Der Einfluss eines stark saugenden Polyurethan Schaumes auf das Wachstum der Fibroblasten auf den Gelatineschäumen der Chargen HS 18 ist in der Tabelle 21 aufgelistet und in der Abb. 50 dargestellt.

Im Vergleich zu den Gelatineschäumen der Charge HS 18, die als Kontrolle mitgeführt wurden, konnte festgestellt werden, dass bei Kontakt mit den Polyurethan Schäumen die

zeitliche Entwicklung der Fibroblasten deutlich gehemmt wurde. Nach 11 Tagen Inkubation konnten Maximalwerte von 20576 ± 1978 Fibroblasten pro Gelatineschaum gemessen werden. Im Vergleich hierzu lag bei der Kontrolle die Fibroblastenzahl bei 70423 ± 814 .

Die Inhibition der Zellproliferation lag während des Inkubationszeitraumes zwischen 62 % und 70 %.

Tabelle 21: Zeitliche Entwicklung von Fibroblasten auf den Gelatineschäumen mit 5 Gew.% EDAC Charge HS 18 (n=2 pro Zeitpunkt), und Einfluss eines Schaumes aus Polyurethan (n=2 pro Zeitpunkt) auf die ermittelte Zellzahl/Gelatineschaum nach 4, 7 und 11 Tagen Inkubation

Inkubationszeit [d]	Kontrollen Gelatineschäume HS 18 /(n=2)		PU Schaum (n=2)		Inhibition der Zell Proliferation
	O.D.-Wert	Zellzahl	O.D.-Wert	Zellzahl	
	x und s	x und s	x und s	x und s	ICP (%)
Impftag	10000 Fibroblasten / Gelatineschaum				
4	$0,5680 \pm 0,03$	52894 ± 1093	$0,2520 \pm 0,01$	20053 ± 146	62 %
7	$0,7453 \pm 0,03$	66778 ± 1024	$0,2416 \pm 0,02$	16658 ± 491	75 %
11	$0,6330 \pm 0,02$	70423 ± 814	$0,2565 \pm 0,04$	20576 ± 1978	70 %

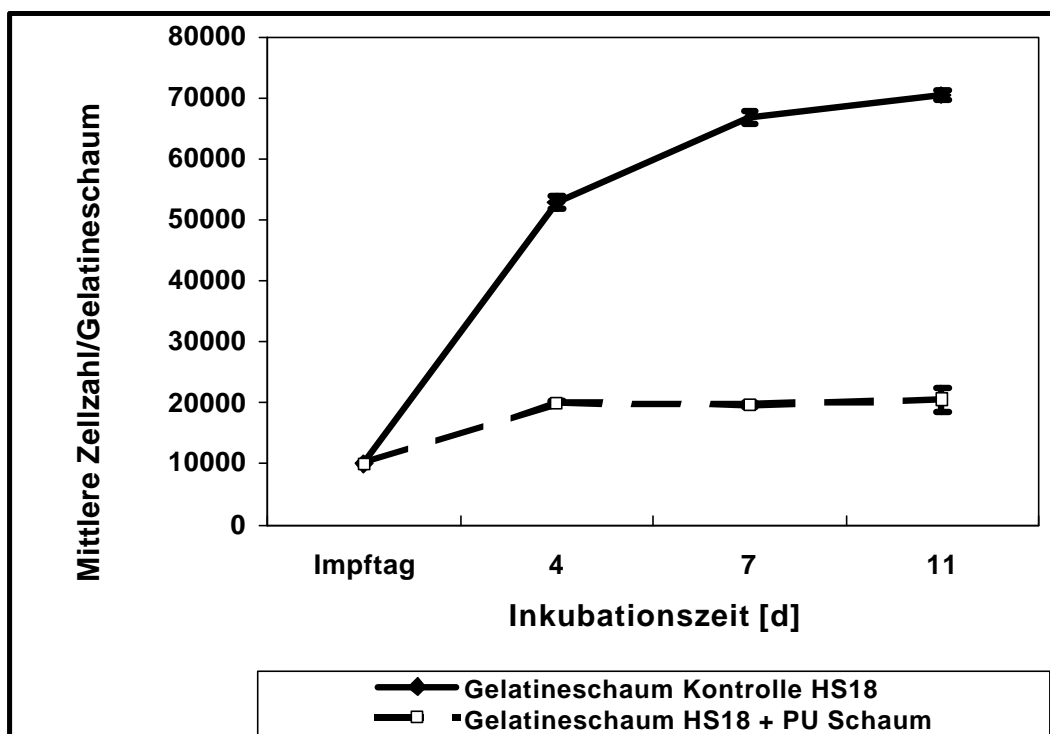


Abb. 50: Vergleich der zeitlichen Entwicklung nach 4, 7 und 11 Tagen Inkubation von humanen dermalen Fibroblasten auf Gelatineschäumen der Charge HS 18 (n=2 pro Zeitpunkt), mit Fibroblasten auf Gelatineschäumen, die in Kontakt mit Schaum aus Polyurethan (n=2 pro Zeitpunkt) standen.

4 DISKUSSION

4.1 AUSWAHL VON BIOMATERIALIEN UND HERSTELLUNG VON FOLIEN

Sowohl Gelatine wie auch Agar sind bekannte Biomaterialien, die eine breite Anwendung insbesondere in der Lebensmittelindustrie aber auch in der Pharmazie und Medizin finden. Im Rahmen dieser Arbeit galt es, eine Matrix herzustellen für die Besiedlung mit Fibroblasten, welche dann als dermales Äquivalent für den Einsatz in einem in-vitro Testsystem verwendet werden kann.

Gelatine

Einer der Hauptbestandteile der Haut ist das Kollagen. Gelatine ist ein gereinigtes Protein, welches durch partielle Hydrolyse aus dem Kollagen hergestellt wird. Der Abbau von Kollagen zu Gelatine hat charakteristische Änderungen der physikalischen und chemischen Eigenschaften des Proteins zur Folge, die Aminosäure-Zusammensetzung bleibt dabei gleich. Sowohl Kollagen als auch Gelatine enthalten einen besonders hohen Anteil an den Aminosäuren Glycin, Prolin und Hydroxyprolin. Eine Anwendung von Gelatine erschien allein aus technologischer Sicht vorteilhaft, denn Gelatine ist, im Gegensatz zu Kollagen, in warmen Wasser leicht löslich (ALTANKOV et al., 1991).

Die Verfahren zur Herstellung der Gelatine können variiert werden, so dass verschiedene Sorten mit definierten Eigenschaften angefertigt werden (KOEPPF-HINRICHS et al., 1974). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Gelatine wird durch saure Hydrolyse aus Kollagen von Schweinehaut und Knochen hergestellt und gehört demnach zum Typ A. Zusätzlich ist diese Gelatine geeignet für die Zellkultur. Gelatine ist ein Hydrokolloid, welches die Eigenschaft der reversiblen Umkehrung vom Sol-Zustand (Lösung) in den Gel-Zustand (Gel) hat. Je nach Festigkeit des Gels wird in der Literatur von dem Bloom-Wert der Gelatine gesprochen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Gelatine mit 300 Bloom, also einer relativ hohen Festigkeit, verwendet.

Die Verwendung von Gelatine als Biomaterial gegenüber Kollagen ist auch deswegen vorteilhaft, weil sich auf Gelatine kultivierte Fibroblasten morphologisch nicht verändern und weil Gelatine die Fibroblasten nicht zur Bildung von Kollagenase anregt. Im Gegensatz hierzu zeigen Fibroblasten, die auf Kollagen kultiviert werden, eine veränderte Morphologie und die Produktion von Kollagenase wird angeregt (BISWAS und DAYER, 1979).

Das Hinzufügen von Weichmachern und Stabilisatoren in die Gelatinelösung ist unproblematisch. Folien aus reiner Gelatine ohne Zusatz von Weichmachern trocknen sehr

schnell, werden dabei spröde und sind dann extrem brüchig (FAKIROV et al., 1996). Um die Flexibilität der Gelatinefolien zu erhalten, wurde den Gelatinelösungen 15 % (Rezeptur 022) bzw. 30 % (Rezeptur 023) Glycerin zugesetzt, ein für die Herstellung von Kollagenfolien von CHVAPIL (1982) empfohlener Weichmacher.

Agar

Agar wurde als zweites Material ausgewählt, weil es wasserlöslich ist und durch seine Eigenschaft, das Wasser zu speichern, bereits für die Herstellung verschiedener Produkte in der Wundversorgung angewendet wird. WICHTERLE und LUN (1960) konnten im Tierversuch zeigen, dass Gele aus Agar genügend Feuchtigkeit spenden, um beispielsweise bei einer Versorgung von chirurgischen Wunden ein feuchtes Milieu aufrecht zu erhalten, was dazu führt, dass der Wundheilungsprozess durch eine schnellere Neubildung des Epithels positiv beeinflusst wird. Die von WOKALEK et al., (1979) gesammelten Erfahrungen bei der Versorgung von Verbrennungswunden mit Geliperm®, einem Produkt auf Basis von Agar, gaben vielversprechende Hinweise darauf, dass Agar als Material verwendet werden könnte für die Herstellung von Folien als Matrix für Fibroblasten.

Inwieweit eine Kultivierung von Fibroblasten auf den Agarfolien gelingen würde, konnte aus den Erfahrungen mit Geliperm® nicht eindeutig abgeleitet werden. Zwar konnten die Migration und Proliferation von Fibroblasten und Keratinozyten unter dem Hydrogel beobachtet werden, jedoch nicht die Adhäsion, Migration und Proliferation der Hautzellen auf der Oberfläche oder im Hydrogel. In der Literatur wird auch über negative Erfahrungen bei Kultivierung von Chondrozyten, Fibroblasten-ähnlichen Zellen, auf und in Agargelen (HOROWITZ und DORFMAN, 1970) berichtet und mit einem Misslingen der Zelladhäsion auf der Oberfläche des Agargels begründet (BUJIA et al., 1993).

Den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Agarlösungen wurden 8 % (Rezeptur 024) bzw. 12,0 % (Rezeptur 025) Glycerin als Weichmacher beigemischt, denn es konnte davon ausgegangen werden, dass anderenfalls nach der Lagerung und der Sterilisation der Agarfolien diese spröde und brüchig werden würden.

Folienstreichanlage

Ein gängiges Verfahren zur Herstellung von Folien ist das Gießen von Lösungen auf mit Teflon beschichtete Schalen. Nach Erkalten der Lösungen werden die fertigen Folien aus den Schalen entnommen. Ein großer Nachteil dieses Verfahren ist, dass viskose Lösungen nur sehr schwer gleichmäßig verteilt werden können. Gelatine- und Agarlösungen gelieren sehr

schnell bei geringen Temperaturschwankungen und insbesondere nach Kontakt mit den Teflon-beschichteten Schalen, so dass die Herstellung gleichmäßiger Folien erschwert wird (SHINDE und ERHAN, 1992). Die Konzeption und Anfertigung einer Folien-Strechanlage im Labormaßstab ermöglichte die Herstellung von gleichmäßigen Folien unter definierten Luftfeuchte- und Temperaturbedingungen. Damit wurde sicher gestellt, dass eine Bewertung der physikalischen und biologischen Eigenschaften der Folien an gleichmäßigen Mustern erfolgen konnte.

FAZIT: Aus den Biomaterialien Gelatine und Agar konnten wässrige Lösungen verschiedener Rezepturen unter Zusatz von Glycerin als Weichmacher hergestellt werden, die dann unter Anwendung der Strechanlage für die Anfertigung gleichmäßiger Folien unter kontrollierten Temperatur- und Luftfeuchtebedingungen im Labor dienten.

4.2 PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN DER FOLIEN

Es konnte gezeigt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Muster an Gelatine- und Agarfolien gleichmäßige Qualität aufwiesen, so dass physikalische Eigenschaften wie Keimdichte, Wasserdampfdurchlässigkeit, Reißfestigkeit, Wassergehalt, Folienstärke und Flächengewicht unter standardisierten Bedingungen bestimmt werden konnten. Die Ergebnisse dieser Messungen konnten mit Daten von Produkten, die für den Hautersatz verwendet werden, sowie mit Literaturdaten für humane Spalthaut und verwundete Haut verglichen werden.

Wie ESCOFFIER et al. (1989) in einer in-vivo Studie am Unterarm von Probanden zeigen konnten, wird die Haut mit zunehmenden Alter immer dünner und weniger elastisch. Elastizität, Dicke und Feuchtegehalt der Haut werden durch Alter, Rasse, Hauttyp, Hautareal, Gehalt an Elastin und Kollagen und durch die Pflege beeinflusst (VOGEL, 1994; OIKARIEN, 1994). Auch die Einnahme von Medikamenten, Veränderungen der Ernährungsgewohnheiten und geringe Flüssigkeitsaufnahme verändern die physikalischen Eigenschaften der Haut, wie BRAZELLI et al. (1994) an einer Langzeitstudie an Patienten zeigen konnten.

Wundversorgungsmaterialien übernehmen zeitweilig einige Funktionen intakter Haut und sollten daher bestimmte physikalische Eigenschaften besitzen wie beispielsweise Flexibilität,

Wasserdampfdurchlässigkeit, Keimdichtigkeit und Aufrechthaltung eines feuchten Mikroklimas (TURNER, 1977).

Keimdichtigkeit

Werden Materialien als keimdicht bezeichnet, dann bilden sie eine Barriere, die den Durchtritt von Keimen verhindert. Für die Untersuchung der Keimdichtigkeit der Gelatine- und Agarfolien konnte die in der Industrie in Anlehnung an DIN 58953/T6 verwendete Methode zur Überprüfung der Sterilgutversorgung angewendet werden. Diese Methode ist auch geeignet für die Überprüfung der Keimdichtigkeit von Produkten, die in der Wundversorgung als Hautersatz Anwendung finden (BARTZOKAS et al., 1983).

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Gelatine- wie auch die Agarfolien gegenüber einem Durchtritt von *Staphylococcus aureus* aus einer auf der Folienoberfläche aufgetragenen Bakteriensuspension keimdicht waren.

Wassergehalt, Folienstärke und Flächengewicht

Die Dermis zeichnet sich durch einen hohen Anteil an gebundenem Wasser aus. Für die Herstellung von dermalen Äquivalenten aus Gelatine- und Agar und insbesondere für die Besiedlung mit Fibroblasten, ist der Wassergehalt der Folien von Bedeutung, denn ein feuchtes Mikroklima begünstigt die Zellmigration und Proliferation (WINTER, 1963). Die hergestellten Agar- und Gelatinefolien wurden über 21 Tage bei 25 °C und 50 % relativer Luftfeuchte gelagert. Während dieser Zeit sind Wassergehalt, Foliendicke und Foliengewicht bestimmt worden. Es konnte davon ausgegangen werden, dass im Verlauf der Lagerung das Wasser aus den Folien an die Umgebung abgegeben wird. Das hat zur Folge, dass die Foliendicke wie auch das Foliengewicht Änderungen unterworfen sind.

Insbesondere bei den Gelatinefolien zeigte sich, dass das enthaltene Wasser schon nach einem Tag Lagerung auf 16,4 % bis 17,9 % reduziert wurde. In der Literatur ist beschrieben, dass vernetzte und unernetzte Gelatine das gebundene Wasser relativ schnell an die Umgebung abgeben. Diese Eigenschaft macht Gelatine zu einem geeigneten Material zur Herstellung von Hydrogelen. Aus diesem Grund und um eine Kultivierung von Fibroblasten auf Hydrogele aus vernetzter Gelatine zu ermöglichen, verpackten, versiegelten und sterilisierten DRAYE et al. (1998) die Hydrogele unmittelbar nach der Herstellung. Hierdurch wurde das Wasser im Hydrogel erhalten, so dass günstige Bedingungen für die Migration und Proliferation der Fibroblasten geschaffen werden konnten.

Auch Materialien auf Basis von Agar zeigen eine schnelle Abgabe von Wasser an die Umgebung. Es konnte festgestellt werden, dass nach 7 Tagen Lagerung der Wassergehalt der Agarfolien bei 28 % bis 42 % lag und nach 21 Tagen bei 18,7 % bzw. 19,4 % lag. Diese Werte liegen deutlich niedriger als die von KICKHÖFEN et al. (1986) für Geliperm® gemessenen Werte. Der Wassergehalt von Geliperm® nach 10 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur liegt bei 50 % und bei weiterer Lagerung von 25 Stunden und länger bleibt der Wassergehalt konstant bei ca. 30 % .

Reißfestigkeit

Die mechanische Funktionalität und die strukturelle Integrität der Haut wird maßgeblich durch das im Bindegewebe vorhandene Kollagen bestimmt, welches charakteristische unlösliche Fasern mit hoher Reißfestigkeit bildet. Die Proteoglykane, die die Grundsubstanz des Bindegewebes bilden und große Mengen an Wasser und Kationen binden, verleihen der Haut ihre elastischen Eigenschaften. BRAZELLI et al. (1994) konnten bei Untersuchungen an Probanden demonstrieren, dass bei höherem Wassergehalt der Dermis, die Elastizität der Haut zunahm.

Um die elastischen Eigenschaften von Agar- und Gelatinefolien bestimmen zu können, wurden die Reißfestigkeiten von Folien gemessen, die 21 Tage bei 25 °C und 50 % relativer Luftfeuchte im Klimaraum gelagert waren.

Es konnte gezeigt werden, dass Folien mit einem geringeren Glycerin-Gehalt höhere Reißfestigkeiten aufweisen. Die für Gelatinefolien 022 mit 7,70 N/mm² und Agarfolien 025 mit 5,60 N/mm² gemessenen Reißfestigkeiten lagen im Bereich der von GHOFRANI (1998) ermittelten mittleren Reißfestigkeit für humane Spalthaut mit 5,41 N/mm².

Dabei zeigten die Längenänderungen der Proben im Augenblick des Reißens, dass Gelatinefolien unabhängig vom Glyzeringehalt wesentlich elastischer waren als Agarfolien, mit Maximalwerten von 204,11 % ± 6,9. Die für Gelatinefolien gemessenen Werte übertrafen die von GHOFRANI (1998) gefundenen Werte der Maximaldehnung für humane Spalthaut (48,19 %) um das vierfache.

Wasserdampfdurchlässigkeit (= WVTR Water Vapor Transmission Rate)

Durch intakte Haut wird regelmäßig Wasserdampf an die Umgebung abgegeben, wodurch die Aufrechterhaltung und die Regulation der Körpertemperatur gesteuert wird. Wird die Haut durch eine Verwundung beschädigt, ist diese regulatorische Funktion gestört, so dass große Mengen an Wasserdampf unkontrolliert an die Umgebung abgegeben werden. LAMKE et al.

(1986), führten eine Studie durch, in der die Wasserdampfdurchlässigkeit (WVTR) intakter und verletzter Haut an Patienten gemessen wurde. Sie konnten feststellen, dass die WVTR intakter Haut bei $204 \text{ g/m}^2 \text{ 24 h}$ lag. Im Vergleich hierzu erhöhte sich die WVTR nach einer Verletzung durch Verbrennungen dritten Grades auf $3436,8 \text{ g/m}^2 \text{ 24 h}$. Maximalwerte wurden bei frischem Granulationsgewebe mit $5133,4 \text{ g/m}^2 \text{ 24 h}$ gemessen, was leicht zu erklären ist durch die besondere Beschaffenheit dieses Gewebes und die hierdurch resultierende Vergrößerung der Oberfläche der Wunde.

Die nach einer Verwundung vermehrt auftretende Wundflüssigkeit sollte idealerweise kontrolliert an die Umgebung abgegeben werden, so dass ein feuchtes Mikroklima aufgebaut werden kann und der Verlauf der Wundheilung beschleunigt wird (WINTER, 1971). Die Dicke und die Zusammensetzung eines Materials beeinflusst die WVTR maßgeblich. QUEEN et al. (1987) und ERASMUS und JONKMAN (1989) untersuchten die WVTR verschiedener Filme, Hydrogele und Hydrokolloide. QUEEN et al. (1987) konnten bei dem aus Agar bestehenden Hydrogel Geliperm® die höchsten Werte mit $10973 \text{ g/m}^2 \text{ 24h}$ messen. Sie vermerkten, dass nach einer Anwendung von Geliperm ® in vivo nicht nur die Gefahr der Austrocknung der Wunde bestehen könnte, sondern dass zusätzlich das im Hydrogel enthaltene Wasser im Verlauf der Anwendung abgegeben wird und das Produkt somit auf der Wunde austrocknen und schrumpfen könnte.

QUEEN et al. empfahlen für Wundversorgungsprodukte grundsätzlich eine WVTR von $2000\text{-}2500 \text{ g/m}^2 \text{ 24 h}$. ERASMUS und JONKMAN (1989) fassten zusammen, dass keine allgemein gültigen und als ideal geltenden Richtwerte der WVTR von Produkten ausgesprochen werden sollten, denn je nach Art der Verwundung und Menge der sezernierten Wundflüssigkeit müssen mehr oder weniger große Mengen an Wasser durch die Produkte an die Umgebung abgegeben werden.

Die folgende Tabelle bietet ein Überblick der in der Literatur gefundenen Werte der WVTR für intakte und verwundete Haut und von ausgewählten Wundversorgungsprodukten im Vergleich zu den Werten für die im Rahmen dieser Arbeit selbst hergestellten Gelatine- und Agarfolien.

Tabelle 22: Wasserdampfdurchlässigkeit von gesunder und verwundeter Haut, sowie von verschiedenen Wundversorgungsprodukten im Vergleich zu den selbst hergestellten Gelatine- und Agarfolien

MATERIAL	WVTR (g/m ² 24h)	MATERIAL STÄRKE (µm)	QUELLE
Intakte Haut	204	–	LAMKE et al., (1986)
Haut nach einer Verbrennung 3. Grades	3436,8	–	LAMKE et al., (1986)
Frisches Granulationsgewebe	5133,4	–	LAMKE et al., (1986)
Geliperm® (Hydrogel)	10973	1130	QUEEN et al., (1987)
Gelatinefolie 15 Gew.% Glycerin	3502,6	232	Eigene Messungen
Gelatinefolie 30 Gew.% Glycerin	3799,6	245	Eigene Messungen
Agarfolie 8 Gew.% Glycerin	4954,9	261	Eigene Messungen
Agarfolie 12 Gew.% Glycerin	4664,1	386	Eigene Messungen

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Gelatine- und Agarfolien sollen als Matrix für Fibroblasten dienen und für die Herstellung eines dermalen Äquivalents verwendet werden. Aus diesem Grund sind die in der Literatur beschriebenen Daten der WVTR von verletzter Haut, bei der die Epidermis keine Barrierefunktion mehr ausübt, von besonderem Interesse. Es konnte gezeigt werden, dass die hergestellten Gelatine- und Agarfolien durchlässig sind gegenüber Wasserdampf. Die ermittelten Werte der WVTR für alle Folienvarianten waren zwischen 17 und 22 x höher als die von LAMKE et al. (1986) gemessenen Werte für intakte Haut. Insbesondere die Agarfolien zeigten ähnlich hohe Werte wie diejenigen, die LAMKE et al. (1986) für Granulationsgewebe bestimmten.

FAZIT: Die physikalischen Eigenschaften der Agar- und Gelatinefolien erfüllen die Anforderungen, die von TURNER (1977) an Materialien für den Hautersatz gestellt wurden. Ein Vergleich mit Daten aus der Literatur zeigt, dass die Wasserdampfdurchlässigkeit der Folien im Bereich der für frisches Granulationsgewebe angegebenen Werte liegt. Die Reißfestigkeit der hergestellten Gelatine- und Agarfolien ist vergleichbar mit der humaner Spalthaut, wobei sowohl Gelatine wie auch Agarfolien flexibler sind als humane Spalthaut. Die WVTR der Agarfolien liegt in den gleichen Größenordnung wie diejenige von frischem Granulationsgewebe.

4.3 INTERAKTION DER FOLIEN MIT BIOLOGISCHEN FLÜSSIGKEITEN UND HAUTZELLEN

VROMAN et al. (1986) konnten demonstrieren, dass Proteine des Humanplasmas nach Kontakt mit verschiedenen Glasoberflächen in einer bestimmten Reihenfolge an die Oberfläche des Materials adhären. Zunächst wird das Albumin adsorbiert, welches den größten Anteil der Proteine des Humanplasmas ausmacht. Danach folgen IgG, Fibrinogen und Fibronectin. Bei einem direkten Kontakt zwischen Biomaterialien und Proteinlösungen beeinflusst die Art und die Menge der an die Materialoberfläche adsorbierten Proteine die Biokompatibilität des Biomaterials und hierdurch insbesondere die Interaktion mit Zellen (ANDRADE und HLADY, 1986; KIRKPATRICK et al., 1997 und MEYLE et al., 1994).

Adsorption von Fibronectin an die Folienoberfläche

Fibronectin ist ein langgestrecktes Protein mit einer linearen Anordnung von Domänen, die an bestimmte Moleküle wie Fibrin binden können. Andere Domänen des Fibronectins binden reversibel an Kollagen, wobei INGHAM et al. (1989) und DANIELS et al. (1997) zeigen konnten, dass Fibronectin an Gelatine effektiver bindet als an Kollagen. Fibronectin ist ein Ligand der extrazellulären Matrix, welcher über das RGDS Peptid (Arg-Gly-Asp-Ser Sequenz) an Integrine, Rezeptoren an der Zelloberfläche der Fibroblasten, bindet (RUOSLAHTI, 1991; HYNES, 1992). Hierdurch wird die Adhäsion und Migration der Fibroblasten insbesondere während der proliferativen Phase der Wundheilung gesteuert (POSTLETHWAITE et al., 1981; CLARK, 1988).

Fibronectin wird insbesondere auf dem Gebiet des Tissue Engineerings genutzt (HUBBEL, 1995), wo beispielsweise Stränge aus Fibronectin in Materialfolien eingearbeitet werden, so dass eine gerichtete Migration von adhären Fibroblasten auf diesen Folien induziert werden kann (UNDERWOOD et al., 1999).

Untersuchungen an Zellkulturen haben gezeigt, dass humane dermale Fibroblasten große Mengen an Fibronectin synthetisieren und an das Zellkulturmedium abgeben (MOSHER, 1984). Wird dieses Fibronectin auf Zellkulturplatten, die mit Kollagen oder Gelatine beschichtet wurden in Kontakt gebracht, adsorbiert das Fibronectin insbesondere an die mit Gelatine beschichteten Zellkulturplatten (ENGVALL und ROUSLAHTI, 1977; YOSHIZATO et al., 1985).

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte ELISA-Assay diente dem Nachweis des an die Folienoberfläche adsorbierten Fibronectins nach Inkubation der Folien mit einer Lösung aus

Fibronectin in PBS. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Gelatine- aber auch Agarfolien Fibronectin an die Foliensoberfläche adsorbieren.

TJIA et al. (1999) konnten an Poly-D,L(lactid-glycolid) Folien, die als temporärer Hautersatz bei der Versorgung von Verbrennungswunden verwendet wurden, feststellen, dass eine Beschichtung der Folien mit $0,058 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Fibronectin zu einer Verbesserung der Adhäsion und Migration von Keratinozyten führt. Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Werte der Fibronectinadsorption auf den Folien liegen deutlich höher, mit $1,2 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bzw. $1,1 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ für Agarfolien und $0,565 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bzw. $0,617 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ für Gelatinefolien, so dass angenommen werden konnte, dass eine Adhäsion von Fibroblasten und Keratinozyten sowohl auf den Gelatine- wie auch auf den Agarfolien grundsätzlich möglich ist.

Adsorption von Albumin an die Foliensoberfläche

Die Innenseite von Blutgefäßen wird von einer gleichmäßigen Endothel-Zellschicht umkleidet. DOMURADO et al. (1978) und SLIMANE et al. (1988) beschrieben die Vorteile einer Beschichtung von Biomaterialien mit Albumin wodurch die Bildung von Fibringerinnsel durch Thrombozyten-Aggregation vermieden werden könnte. Kommen die beschichteten Biomaterialien in Kontakt mit Endothelzellen adhären diese an die mit Albumin beschichtete Oberfläche. Albumin ist in einer durchschnittlichen Konzentration von $0,026 \text{ g/ml}$ in fetalem Kälber-Serum (FKS) enthalten, welches dem Nährmedium bei der Kultur von Fibroblasten zugesetzt wird, um eine optimale Versorgung der Zellen zu ermöglichen. Aus diesem Grund war es von Interesse zu bestimmen, inwieweit Albumin an die Foliensoberfläche adsorbiert wird.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewählten Versuchsbedingungen für den ELISA-Assay waren nicht geeignet um feststellen zu können, ob Albumin aus einer PBS-Albumin Lösung an die Foliensoberfläche adsorbierte. Während der Inkubation mit Proteinlösungen löst sich Glycerin aus den Folien. Möglicherweise lagert sich dieses Glycerin, welches in den Gelatinefolien in einer höheren Konzentration vorliegt (15 Gew. % und 30 Gew. %) als in den Agarfolien (8 Gew. % und 12 Gew. %), an das Albumin in der Proteinlösung an, wodurch die Bindung des Antikörpers an das Substrat behindert wird.

Wundverklebung in-vitro

ROGERS et al. (1999) konnten zeigen, dass Materialien, die Proteine an die Oberfläche adsorbieren, bei einer Anwendung in der Wundversorgung mit der Wundfläche verkleben. DEMLING und de SANTI (1999) verwendeten TransCyte, eine mit Fibronectin beschichtete Membran, in einer Studie an Patienten mit Verbrennungswunden und stellten fest, dass das Fibronectin auf der Innenseite der Membran zu einer Wundverklebung führte durch eine wesentliche Verbesserung der Adhäsion der Membran mit der Wundfläche.

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete in-vitro Test simuliert die erste Phase der Wundverklebung, in der die Proteine im Humanplasma als natürlicher „Kleber“ mit der Oberfläche der Agar- und Gelatinefolien interagieren.

Die Versuche zur Wechselwirkung der Folien mit Proteinlösungen hatten bereits gezeigt, dass sowohl Agar- wie auch Gelatinefolien das Adhäsionsprotein Fibronectin an die Oberfläche adsorbierten, so dass bei Kontakt der Folien mit dem Humanplasma im in-vitro Wundverklebungstest eine Verklebung der Folien mit dem sich bildendem Fibrinnetz erwartet werden konnte.

Es stellte sich jedoch heraus, dass sowohl Agar- wie auch Gelatinefolien keine Wundverklebung zeigten. Die Ursache hierfür kann das aus den Folien herausdiffundierende Glycerin sein, welches eine Trennschicht bildet und den direkten Kontakt zwischen dem sich bildenden Fibrinnetz und der Folienoberfläche verhindert.

Wechselwirkung mit Mausfibroblasten und Keratinozyten

Die Untersuchungen zur Cytotoxizität der Gelatine- und Agarfolien erfolgten sowohl durch Verwendung von Folienextrakten auf Kulturen von Mausfibroblasten, wie auch durch Kultivierung von Mausfibroblasten und Keratinozyten auf Gelatine- und Agarfolien.

Es konnte gezeigt werden, dass die Extrakte der Agarfolien hoch toxisch und die der Gelatinefolien leicht toxisch waren. Eine mögliche Ursache der Toxizität könnte das bei der Herstellung der Folienextrakte extrahierte Glycerin sein, welches in höherer Konzentration in der Rezeptur der Agarfolien beigemischt wurde. Bei der Untersuchung der Cytotoxizität im direkten Zellkontakt wurden die Folien über 24 h mit dem Zellkulturmedium vorinkubiert, um Glycerin zu extrahieren. Auf Agarfolien konnte dann ein geringes Wachstum von Fibroblasten und ein sehr gutes Wachstum von Keratinozyten beobachtet werden. Das geringe Wachstum der Fibroblasten wurde möglicherweise durch eine schlechte Adhäsion der Zellen

auf der Oberfläche der Folien verursacht. Es konnte bei Entnahme der Zellkulturschalen aus dem Brutschrank und bei leichten Bewegungen beobachtet werden, dass die Zellen von der Oberfläche der Folien rutschten. HOROWITZ und DORFMAN, (1970) und BUJIA et al., (1993) machten ähnliche Beobachtungen bei Kultivierung von Fibroblasten auf Agargelen.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Gelatinefolien schon bei der Vorinkubation bei 37 °C im Zellkulturmedium ihre Stabilität verloren, so dass für die Versuche der Zellkultur von Mausfibroblasten und Keratinozyten keine ganzen Folien, sondern nur einzelne Stücke von Gelatinegelen zur Verfügung standen.

FAZIT: Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere Agar- aber auch Gelatinefolien Fibronectin adsorbierten. Das den Folien beigemengte Glycerin verhinderte eine Wundverklebung in-vitro und führte, je nach Konzentration in der Folienrezeptur, zu mittleren bzw. hohen toxischen Auswirkungen im Cytotoxizitätstest. Wurde das Glycerin durch Vorinkubation aus den Folien extrahiert, konnte ein diskretes Wachstum von Fibroblasten und ein vermehrtes Wachstum von Keratinozyten auf den Folien beobachtet werden. Gelatinefolien zeigten bei Inkubation mit Zellkulturmedium bei 37 °C keine ausreichende Stabilität.

Zusammenfassende Bewertung der Versuche zur Herstellung von Gelatine- und Agarfolien als Matrix für die Entwicklung eines dermalen Äquivalents

- Agar und Gelatine sind geeignete Materialien für die Herstellung von Folien.
- Mit der entwickelten Streichanlage können gleichmäßige Folien hergestellt werden.
- Sowohl Gelatine- wie auch Agarfolien erfüllen die von TURNER (1977) gestellten Anforderungen an Materialien für den Hautersatz.
- Fibronectin, ein Zelladhäsionsprotein, wird insbesondere an die Oberfläche von Agar- aber auch von Gelatinefolien adsorbiert.
- Das der Folienrezeptur beigemengte Glycerin führt zu einer toxischen Wirkung gegenüber Mausfibroblasten und Keratinozyten.
- Die Oberfläche von glyzerinfreien Agarfolien ist geeignet für die Kultivierung von Keratinozyten und bedingt geeignet für die Kultivierung von Fibroblasten.
- Gelatinefolien sind bei 37°C und im Kontakt mit Zellkulturmedium nicht stabil genug, um als Matrix für die Kultivierung von Fibroblasten verwendet zu werden.

4.4 HERSTELLUNG VON GELATINESCHÄUMEN MIT UND OHNE CHEMISCHER VERNETZUNG

Vorversuche

Eine physikalische Methode der Vernetzung durch dehydrothermale Behandlung von trockenen Proben wurde erstmalig von WEADOCK et al. (1984) für Kollagen und von KOIDE et al. (1993) für Gelatine beschrieben. Die Angaben in der Literatur über die Stabilität der dehydrothermal behandelten Schäume, insbesondere nach einer mehrtägigen Kultivierung von Fibroblasten auf den Schäumen, sind widersprüchlich. So konnten WEADOCK et al. (1984) und KOIDE et al. (1993) Mausfibroblasten über 6 Tage auf Kollagenschäumen kultivieren, ohne dass diese an Stabilität verloren. Andererseits stellten PIEPER et al. (1999) fest, dass dehydrothermal vernetzte Kollagenschäume bereits nach 24 h Inkubation mit PBS ihre Stabilität verloren.

Der Vorteil der dehydrothermalen Behandlung gegenüber einer chemischen Vernetzung ist, dass dabei keine cytotoxischen Nebenprodukte gebildet werden. GORHAM et al. (1992) konnten zeigen, dass nach der Lyophilisierung und Trocknung von Kollagenfolien bei 120 °C und 11mbar Vakuum die gebildeten Kollagenschäume wesentlich stabiler wurden gegenüber einem proteolytischen Abbau durch Kathepsin und Pepsin. Sie begründeten die Zunahme der Stabilität mit der Bildung von intermolekularen Verbindungen zwischen den Amino- und Carboxylgruppen der Aminosäureseitenketten.

Durch dehydrothermale Behandlung ändert sich die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Struktur der Matrix für humane Fibroblasten. Hierbei werden Folien in Schäume umgewandelt. Da die dehydrothermale Behandlung nur an trockenem Material durchgeführt werden kann, wurden die Folien lyophilisiert, wodurch das Wasser entfernt und eine Schaumstruktur gebildet wurde.

Gelatineschäume erwiesen sich als stabil genug, um Mausfibroblasten über einen Zeitraum von 48 h zu kultivieren; danach verloren sie ihre Stabilität. Außerdem konnten mikroskopische Beobachtungen an mit Hemacolor gefärbten Gelatineschäumen die von YAO et al. (1996) gemachten Untersuchungen bestätigen, dass bei Verwendung verschieden konzentrierter Gelatinelösungen die Schäume aus einer 10 %-igen Gelatinelösung stabiler waren und von einer größeren Menge an Fibroblasten besiedelt wurden als die Schäume aus einer 1 %-igen Gelatinelösung.

FAZIT: Fibroblasten können auf Gelatineschäumen, insbesondere auf solchen, die aus einer 10 %-igen Gelatinelösung hergestellt werden, kultiviert werden. Die Gelatine kann durch dehydrothermale Behandlung erfolgreich vernetzt werden. Bei einer Kultivierung von Mausfibroblasten auf den Schäumen blieben die Schäume jedoch nur über 48 h stabil.

Chemische Vernetzung der Gelatine durch Anwendung eines wasserlöslichen Carbodiimids

Für die chemische Vernetzung der Gelatine wurde 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid hydrochlorid (EDAC) gewählt. Dieses Carbodiimid ist wasserlöslich, und, wie OLDE DAMINK et al. (1996) bereits für Kollagen zeigen konnten, führt EDAC zu einer Vernetzung durch Bildung von Isopeptidbindungen nach Verknüpfung der Carboxyl- und Aminogruppen von Aminosäuren. Der überschüssige Anteil an EDAC wird ausgewaschen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass bei einer Besiedlung der mit EDAC vernetzten Gelatine der cytotoxische Effekt gegenüber Fibroblasten gering bleibt.

Um möglichst viele gleichmäßige Schäume herstellen zu können, wurden spezielle Förmchen gebaut, in denen nach Pipettieren der Gelatinelösung kreisrunde Gelatinefolien entstanden, die dann lyophilisiert werden konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit kamen zwei Verfahren zur Vernetzung der Gelatine zur Anwendung. Bei dem ersten Verfahren wurde Gelatine durch direkte Zugabe von EDAC-Pulver in die Gelatinelösung vernetzt. Bei dem zweiten Verfahren erfolgte die Vernetzung durch Behandeln von fertig hergestellten Gelatineschäumen mit EDAC-Lösungen verschiedener Konzentrationen.

Das Ziel dieser Arbeiten lag in der Herstellung möglichst gleichmäßiger Schäume mit relativ geringem Arbeitsaufwand und unter Verwendung einer geringen EDAC-Konzentration.

Als zweites Vernetzungsverfahren wurde die Behandlung fertiger Gelatineschäume mit einer EDAC-Lösung gewählt. Diese Art der Vernetzung ist arbeitsintensiver und erfordert einen längeren Zeitraum bis zur Herstellung von vernetzten Gelatineschäumen. Andererseits können Vernetzerlösungen mit einer relativ hohen EDAC-Konzentration verwendet werden.

Einfluss des Vernetzungsverfahrens auf den Vernetzungsgrad

Eine erfolgreiche Vernetzung der Gelatine durch direkte Zugabe von EDAC-Pulver in eine Gelatinelösung wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Untersuchungen von

NAKAJIMA und IKADA (1995) zur Stabilität des EDAC in wässrigen Lösung haben gezeigt, dass bei 25°C und bei neutralen und hohen pH Werten das Carbodiimid bis zu 5 h stabil bleibt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das EDAC-Pulver bei 40 °C zugegeben, denn bei dieser Temperatur war die Gelatinelösung gerade noch flüssig. Es konnte gezeigt werden, dass bei direkter Zugabe von EDAC-Pulver in die Gelatinelösung das EDAC-Pulver reaktiv blieb, so dass eine Vernetzung der Gelatine erfolgte. Gelatineschäume mit einem EDAC-Gehalt von 0,07 Gew.% zeigten einen Vernetzungsgrad von 9,6 %.

Die Vernetzungsreaktion verlief dabei innerhalb von Sekunden ab. Nach Zugabe des Pulvers in das Reaktionsgefäß nahm die Viskosität der Gelatinelösung fast schlagartig zu, so dass diese schnell in die Förmchen pipettiert werden musste. Ein Nachteil dieser Art der Vernetzung lag an der Limitierung der Menge EDAC, die verwendet werden konnte. Vorversuche hatten gezeigt, dass die Gelatinelösung nach Zugabe von mehr als 0,07 Gew.% EDAC-Pulver sofort und vollständig im Reaktionsgefäß geliert.

LEE et al. (1996) und FEIJEN et al. (1996) hatten gezeigt, dass Carbodiimide nach Kontakt mit wässrigen Lösungen sehr leicht ihre Stabilität und somit ihre Aktivität als Vernetzer verlieren. CHOI et al. (1999) konnten zeigen, dass durch Verwendung eines 9:1 Aceton/Wasser-Gemisches die Stabilität des EDAC in der Lösung erhöht wird. Eine EDAC-Konzentration von 0,1 Gew.% reichte aus, um eine Vernetzung von 27 % bei reinen Gelatineschäumen und von bis zu 35 % bei Gelatine-Hyaluronat-Schäumen zu erzielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Gebrauch von Aceton als Lösungsmittel aus labortechnischen Gründen vermieden, das verwendete EDAC wurde in Wasser gelöst.

Es konnte gezeigt werden, dass auch bei Verwendung einer wässrigen Lösung mit verschiedenen Konzentrationen an EDAC die Gelatineschäume vernetzt wurden, wobei der Vernetzungsgrad direkt proportional zu dem EDAC-Gehalt der Lösung zunahm. Bei einer Konzentration an EDAC in der Lösung von 7,0 Gew.% zeigten die Gelatineschäume einen Vernetzungsgrad von 26,2 %.

Einfluss des Vernetzungsverfahrens auf Flüssigkeitsaufnahme und Quelleigenschaften

Bei vernetzten Materialien, insbesondere Kollagen, kann davon ausgegangen werden, dass bei Zunahme der verwendeten Menge an Vernetzer die Flüssigkeitsaufnahme und somit auch die Quellung des Materials abnimmt (CHVAPIL, 1982).

Es konnte gezeigt werden, dass Gelatineschäume mit 0,07 Gew.% EDAC, die durch direkte Zugabe von EDAC-Pulver in die Lösung vernetzt wurden, nach Kontakt mit dem Zellkulturmedium die Flüssigkeit rasch aufnehmen und gleichmäßig quellen. Eine maximale Flüssigkeitsaufnahme von $11,4 \pm 1,6$ mg DMEM/mg Schaum und eine maximale Durchmesser Zunahme von $5,4 \pm 0,4$ mm wurden dabei festgestellt. Diese Werte liegen deutlich niedriger als die von CHOI et al. (1999) gemessenen Werte für Gelatine Hyaluronat-Schäume die mit 0,1 Gew.% EDAC vernetzt wurden. Hier lag die Flüssigkeitsaufnahme bei 30 bis 40 mg H₂O/mg Schaum. Eine mögliche Erklärung hierzu ist in den hygroskopischen Eigenschaften des in den Schäumen enthaltenem Hyaluronats zu sehen, welches Wasser in großen Mengen speichern kann.

Demgegenüber konnte beobachtet werden, dass die mit Hilfe von EDAC-Lösung vernetzten Gelatineschäume nach Kontakt mit dem Zellkulturmedium zunächst auf der Oberfläche schwammen und erst nach 8 bis 10 Stunden langsam zu Boden sanken. Dieser Effekt war besonders deutlich bei einer EDAC-Konzentration zwischen 2 und 7 Gew.% in der Lösung, wobei die Gelatineschäume zwischen 5,9 und 6,7 mg/mg DMEM aufnahmen.

Einfluss des Vernetzungsverfahrens auf die Porenstruktur

Durch die Lyophilisierung der Gelatinefolien entsteht eine poröse Schaumstruktur. Die Poren sind z.T. miteinander verbunden und vergrößern die innere Oberfläche des Gelatineschaumes. Die Porengröße und die Porenverteilung in Kollagenschäumen beeinflusst die Aufnahme und die Retention von Flüssigkeit. Wird die Oberfläche von Kollagenschäumen mit Fibroblasten besiedelt, wird einerseits durch die Porosität der Schäume die Zufuhr von Nährstoffen erleichtert und andererseits die Migration der Fibroblasten in das Innere der Kollagenschäume ermöglicht. CHVAPIL (1982) konnte zeigen, dass ein Porendurchmesser größer als 80 µm benötigt wird, um eine Einwanderung von Fibroblasten in Kollagenschäume zu ermöglichen. DAGALAKIS et al. (1980) steuerten die Porengröße von Kollagenschäumen durch Einbindung von Glycosaminoglycanen und Regulierung des pH der Kollagenlösung. Es zeigte sich, dass bei direkter Zugabe von EDAC in die Gelatinelösung die vernetzten Gelatineschäume mit 0,07 Gew.% EDAC eine recht gleichmäßige Porenstruktur aufwiesen. Die Hauptmenge der Poren hatte einen Durchmesser von 100 µm. Der Durchmesser der Poren konnte mit der für die Lyophilisierung gewählten Temperatur von -20 °C erklärt werden. BOYCE et al. (1988) demonstrierten an Kollagenschäumen, dass mit zunehmender Temperatur der Lyophilisierung die Porengröße der Schäume zunahm. So wurden im

Durchschnitt Poren von $32 \pm 1 \mu\text{m}$ bei einer Temperatur von $-50 \text{ }^\circ\text{C}$ und Poren von $105 \pm 5 \mu\text{m}$ bei einer Temperatur von $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gebildet.

Die Gelatineschäume, die durch eine Behandlung mit EDAC-Lösungen mit einer Konzentration von 2 bis 7 Gew. % EDAC vernetzt worden waren, wiesen eine sehr unregelmäßige Porenverteilung auf wobei insbesondere in der Schaummitte die Größe der Poren überwiegend bei 200 bis 300 μm lag.

Einfluss des Vernetzungsverfahrens auf den enzymatischen Abbau durch Kollagenase

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Gelatineschäume sollten als Matrix für humane Fibroblasten dienen. Hierfür ist es nötig, dass die Gelatineschäume über eine ausreichende Stabilität gegenüber einem enzymatischen Abbau verfügen. Fibroblasten sind die Hauptproduzenten von Kollagenase, einer Matrixmetalloprotease (MMP-1), die die Kollagenträge des Bindegewebes abbaut. Der enzymatische Abbau beruht auf einer Spaltung der Kollagenpolypeptidkette an Verbindungen zwischen X- und -Gly-Pro-Y.

Bereits 1972 beschrieben HARPER et al. die Verwendung von Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* in in-vitro Untersuchungen zur Stabilität von Kollagenschäumen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vernetzte und unernetzte Gelatineschäume in einer Kollagenaselösung mit 100 U/ml (dies entspricht einer Kollagenase Konzentration von 10 U/mg Gelatineschaum) über 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der enzymatische Abbau wurde durch Berechnung der Gewichtsunterschiede bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Vernetzung der Gelatineschäume durch die dehydrothermale Behandlung und insbesondere durch eine Behandlung mit einer EDAC-Lösung zu einer Stabilisierung der Gelatine gegenüber einem enzymatischen Abbau durch die Kollagenaselösung führte. Ab einer bestimmten Konzentration war keine weitere Zunahme der Stabilität mehr festzustellen, so dass Gelatineschäume mit 5 bzw. 7 Gew.% EDAC keinen wesentlichen Unterschied in ihrer Stabilität aufwiesen.

Im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen, mit EDAC vernetzten Kollagenmembranen (OLDE DAMNIK et al., 1996), Kollagen/Elastinmembranen (GHOFrani, 1998), Kollagen/Chondroitinsulfat Membranen (PIEPER et al., 1999) und Gelatine Hyaluronat Schäumen (CHOI et al., 1999) zeigten die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Gelatineschäume eine geringe Stabilität gegenüber einem enzymatischen Abbau. Allerdings ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse nur bedingt möglich, da die

Versuchsbedingungen und die Konzentration der verwendeten Kollagenase sehr unterschiedlich sind. Eine Übersicht der Literaturdaten ist in Tabelle 23 aufgelistet.

Tabelle 23: Zusammensetzung und Eigenschaften verschiedener in der Literatur beschriebener Membranen und Schäume

Material	Vernetzer	Vernetzungsgrad [%]	Kollagenase lösung	Restgewicht in %	Quelle
Kollagen/Elastin Membran	EDAC + NHS*	17,8 %	100U/ml 5U/mg Membran	81 % nach 24h bei 37°C	GHOFRANI (1998)
Kollagen/Elastin Membran	EDAC +NHS*	69,18 %	100U/ml 5U/mg Membran	90 % nach 24h bei 37°C	GHOFRANI (1998)
Gelatine/Alginat Schäume	EDAC	22,5 bis 33,0%	13 U/ml	50% nach 50h bei 37°C	CHOI et al. (1999)
Kollagen Membran	EDAC + NHS*	?	100 U/ml 10U/mg Schaum	100% nach 24h bei 37°C	OLDE DAMINK (1996)
Kollagen/ GAG** Membran	EDAC + NHS*	?	100 U/ml 10U/mg Schaum	87%	PIEPER et al. (1999)
Gelatineschaum	EDAC	5,4 bis 26,2 %	100 U/ml 20U/mg Schaum	10 % bis 63% nach 24h bei RT	Eigene Unter- suchungen

*NHS = N-hydroxysuccinimide

** GAG = Glycosaminoglykane

FAZIT: Eine Vernetzung von Gelatine kann sowohl durch direkte Zugabe von EDAC in Pulverform als auch durch Verwendung einer EDAC-Lösung erzielt werden. Je nach Art der Vernetzung zeigen die Gelatineschäume Unterschiede hinsichtlich Flüssigkeitsaufnahme, Quellung, Porenstruktur, Vernetzungsgrad und Stabilität gegenüber einem enzymatischen Abbau. Insbesondere Gelatineschäume, die durch eine Zugabe von EDAC-Pulver in die Gelatinelösung vernetzt wurden, zeigen eine schnelle und hohe Aufnahme von Flüssigkeit bei gleichzeitiger Quellung der Schäume und eine gleichmäßige Verteilung von Poren mit ca. 100 µm Durchmesser.

4.5 BESIEDLUNG VERNETZTER GELATINESCHÄUME MIT HUMANEN FIBROBLASTEN

Es konnte gezeigt werden, dass humane dermale Fibroblasten der Fa. PromoCell für eine Besiedlung der mit EDAC vernetzten Gelatineschäume geeignet sind. Bei Kultivierung auf Zellkulturschalen adhärten die Fibroblasten auf dem Boden der Schalen und die Zellzahl nahm insbesondere zwischen dem 4. und 14. Inkubationstag exponentiell zu.

Für die Bestimmung der Vitalität der Fibroblasten auf den Gelatineschäumen wurde die von BORENFREUND et al. (1998) beschriebene MTT Methode in leicht modifizierter Form verwendet. DMSO wurde als Lösungsmittel für die Lösung der Formazan Kristalle gewählt, basierend auf der von SGOURAS und DUNCAN (1990) gemachten Erfahrung, dass im Gegensatz zu anderen Lösungsmitteln die Verwendung von DMSO zu einer Stabilisierung der Farblösung über einen relativ langen Zeitraum führt.

Bei Anwendung der MTT Methode zur Bestimmung der zeitlichen Entwicklung von Zellpopulationen werden üblicherweise nach bestimmten Zeitintervallen Färbungen durchgeführt und die gemessenen O.D.-Werte aufgetragen. Die Zuordnung der gemessenen O.D.-Werte zu einer tatsächlich vorhandenen Anzahl an Zellen ist spezifisch für die verwendete Zellart (MILLER et al., 1991).

Es konnte eine Eichkurve erstellt werden, mit Hilfe derer die Fibroblasten-Konzentration zwischen 10^3 und maximal 10^6 Fibroblasten/Well (nach MTT Färbung und anschließender Bestimmung der O.D.-Werte) der durch Zählung bestimmten Zahl an Fibroblasten direkt zugeordnet werden konnte. In diesem Bereich ist die durch Zählung bestimmte Anzahl an Zellen direkt proportional zu dem nach Formazan Färbung gemessenen O.D.-Wert (CIAPETTI et al., 1993).

CHEVALLAY et al. (2000) kultivierte Fibroblasten auf diversen Materialien über einen Zeitraum von über 12 Tagen und stellte dabei fest, dass die durch Zählung bestimmte Anzahl an Fibroblasten direkt mit dem mittels MTT Färbung bestimmten O.D.-Wert korrelierte. Diese Methode konnte deshalb für die Bestimmung der Proliferation von Fibroblasten auf Materialien auf Basis von Kollagen verwendet werden (VAISSIERE et al, 2000).

GHOFRANI (1998) zeigte, dass obwohl bei industriell hergestellten Kollagen/Elastin Membranen die verschiedenen Chargen nur geringe Unterschiede in den physikalischen und chemischen Eigenschaften aufwiesen, die Entwicklung von Fibroblasten auf den Membranen trotzdem größeren Schwankungen sowohl innerhalb der Muster wie auch innerhalb der

Chargen, unterlag. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit für jede Art der Vernetzung jeweils zwei Chargen Gelatineschäume hergestellt und für die Versuche verwendet.

Vorversuche, in denen nach einer MTT Färbung die Ausbreitung der Fibroblasten auf den Gelatineschäumen makroskopisch beobachtet wurde, zeigten, dass insbesondere innerhalb der ersten 7 Tage die Fibroblasten-Ausbreitung sehr inhomogen war. Aus diesem Grund wurden für jede Charge und pro Inkubationszeitpunkt drei bis vier Wiederholungsansätze durchgeführt, bei denen die Fibroblastenanzahl auf einem ganzen Gelatineschaum und nicht nur auf einem ausgestanzten Probenstück bestimmt wurde.

Fibroblastenanzahl auf Gelatineschäumen, die durch direkte Zugabe von EDAC vernetzt wurden

Fibroblasten entwickelten sich auf Gelatineschäumen der beiden Chargen AH 02 und AH 03, die durch Zugabe von EDAC-Pulver in die Gelatinelösung vernetzt worden waren, sehr unterschiedlich. Insgesamt, und insbesondere nach 4 Tagen Inkubation, konnten deutlich weniger Fibroblasten auf den Gelatineschäumen der Charge AH 03 im Vergleich zu Charge AH 02 festgestellt werden. Auch innerhalb der Wiederholungsansätze der Charge AH 03 konnten deutliche Unterschiede festgestellt werden. Eine mögliche Ursache der Unterschiede innerhalb der Chargen kann in der ungleichmäßigen Verteilung des EDAC-Pulvers in der Gelatinelösung liegen, was dazu geführt haben könnte, dass die Gelatineschäume nicht gleichmäßig vernetzt wurden. Beim Kontakt der Gelatineschäume mit dem Zellkulturmedium können dann nach Flüssigkeitsaufnahme und Quellung veränderte Topographien der Gelatineschäume die Adhäsion der Fibroblasten beeinflussen, wie Untersuchung von VAN DORP et al. (1999) an mit Fibroblasten besiedelten Schäumen aus Polyethylenglycol zeigen konnten.

Des Weiteren können die Unterschiede der Fibroblastenanzahl innerhalb der Wiederholungsansätze der Charge AH 03 auch dadurch erklärt werden, dass bei einer geringeren Vernetzung der Schäume diese stärker quellen, wodurch die adhärennten Fibroblasten besseren Zugang zum Inneren des Gelatineschaumes erhalten. NISHIYAMA et al. (1989) konnten feststellen, dass bei Kultivierung von Fibroblasten in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix die Proliferation im Vergleich zu einer Kultivierung auf oder unter der Matrix reprimiert wurde. Möglicherweise waren nach 4 Tagen die Gelatineschäume so weit gequollen, dass die Fibroblasten in das Innere der Gelatineschäume

migrieren und proliferieren konnten und gleichzeitig durch Nährstoffe aus dem Zellkulturmedium ausreichend versorgt wurden. Untersuchung an mit Hemacolor gefärbten, sowie mit dem Antikörper gegen Ki-67 behandelten Gefrierschnitten der Gelatineschäume unterstützten diese Vermutung. Insbesondere nach 7 Tagen Inkubation konnten Fibroblasten auf der Oberfläche bis hin zur Mitte der Gelatineschäume detektiert werden.

Fibroblastenzahl auf Gelatineschäumen, die durch Behandlung mit einer EDAC-Lösung vernetzt wurden

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auf Gelatineschäumen, die durch Behandlung mit einer EDAC-Lösung vernetzt worden waren, die Fibroblastenzahl gleichmäßig und über den Inkubationszeitraum kontinuierlich zunahm. Die Unterschiede zwischen den Wiederholungsansätzen und innerhalb der Chargen waren gering, was auf eine homogene Struktur der Schäume durch die gleichmäßige Vernetzung der Gelatine zurückgeführt werden kann. Nach Färbung mit Hemacolor konnte eine dichte Fibroblastenschicht auf der Oberfläche der Schäume sichtbar gemacht werden. Möglicherweise adhärierte diese Zellschicht nicht sehr stark an die Oberfläche der Schäume was zur Folge hatte, dass sie durch die mechanische Belastung des Gefrierschneidens an mehreren Stellen brach und sich von der Schaumoberfläche trennte. Weiterhin zeigten die mit Hemacolor gefärbten Gefrierschnitte sowie die zusätzlichen Untersuchungen mit Hilfe des Antikörpers gegen Ki-67 erst nach 11 Tagen eine diskrete Anzahl an proliferierenden Fibroblasten im Inneren der Gelatineschäume.

Vergleich der Ergebnisse mit Literaturdaten

Ein Vergleich eigener Ergebnisse mit Literaturdaten, bei denen die MTT Methode verwendet wurde, um die zeitliche Entwicklung von Fibroblasten auf verschiedenen Trägermaterialien zu bestimmen, ist nur bedingt möglich. Sowohl die Beschaffenheit, wie auch die Zusammensetzung der Materialien und auch die Menge an Fibroblasten/cm², die für die Besiedlung verwendet wurden, ist recht unterschiedlich.

Es konnte gezeigt werden, dass obwohl die Gelatineschäume mit nur 6×10^3 Fibroblasten/cm² beimpft wurden, diese schnell und gut proliferierten, so dass nach 11 Tagen O.D.-Werte von 0,54 bzw. 0,6 gemessen werden konnten. Demgegenüber zeigen die mit 500×10^3 Fibroblasten/cm² beimpften Kollagen/Elastin Membranen (GHOFRANI, 1998) eine recht langsame und geringe Proliferation der Fibroblasten, so dass nach 11 Tagen die O.D.-Werte bei 0,21 lagen. Ein Vergleich mit GELITA®, einem in der Zahnmedizin verwendeten hämostyptischer Gelatineschaum, zeigt dass nach Beimpfung mit 150×10^3 Zellen /cm² die

O.D.-Werte nach 14 Tage bei 0,7 lagen, also vergleichbar mit den nach Beimpfung der Gelatineschäume gemessenen O.D.-Werte. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass bei der Beimpfung der GELITA® Schäume Mausfibroblasten und keine humanen Fibroblasten verwendet worden waren.

Tabelle 24: Zeitliche Entwicklung von Fibroblasten auf verschiedenen Trägermaterialien (Literaturangaben und eigene Messungen)

Impfmenge Fibroblasten/cm²	Trägermaterial	O.D.-Werte nach 4 Tagen	O.D.-Werte nach 14 Tagen	Quelle
500 x 10 ³ (Humane Fibroblasten)	Kollagen/Elastin Membran	ca. 0,11	ca. 0,21	GHOFRANI (1998)
200 x 10 ³ (Humane Fibroblasten)	Kollagen-GAG-Chitosan Schäume	ca. 0,30	ca. 0,80	VAISSIERE et al. (2000)
150 x 10 ³ (Mausfibroblasten)	GELITA® Hämostyptischer Gelatineschaum	ca. 0.8	ca. 0.7	BERSCHT et al. (1995)
6 x 10 ³ (Humane Fibroblasten)	Gelatineschaum 0.07 Gew. % EDAC	ca. 0,23	ca. 0,62	Eigene Messungen
6 x 10 ³ (Humane Fibroblasten)	Gelatineschaum 5 Gew. % EDAC	ca. 0,46	ca. 0,54	Eigene Messungen

FAZIT: Die mit EDAC vernetzten Gelatineschäume eignen sich als Matrix für die Besiedlung mit humanen dermalen Fibroblasten. Insbesondere bei Kultivierung von Fibroblasten auf Gelatineschäumen, die durch direkte Zugabe von EDAC vernetzt worden waren wanderten die Fibroblasten auch ins Innere des Gelatineschaums und proliferierten. Allerdings wurden bei diesen Gelatineschäumen chargenspezifische Unterschiede festgestellt, die sie für eine Verwendung in einem in-vitro Testsystem ungeeignet machen. Gelatineschäume dagegen, die durch Behandlung mit einer EDAC-Lösung vernetzt worden waren, zeigen eine vermehrte und gleichmäßige Proliferation der Fibroblasten, zuerst nur auf der Oberfläche und nach 11 Tagen auch im Inneren der Gelatineschäume. Diese Gelatineschäume lassen sich gut standardisieren und wurden deshalb als Dermis-Äquivalente für erste orientierende in-vitro Versuche verwendet.

Zusammenfassende Bewertung der Versuche zur Herstellung von mit EDAC vernetzten Gelatineschäumen

- Eine 10 %-ige Gelatinelösung eignet sich für die Herstellung von Gelatineschäumen.
- Die chemische Vernetzung der Gelatine ist sowohl durch direkte Zugabe von EDAC-Pulver in die Gelatinelösung, wie auch durch Behandlung von Gelatineschäumen mit einer EDAC-Lösung möglich.
- Die Art der Verwendung des EDAC beeinflusst Flüssigkeitsaufnahme, Quellung, Porenstruktur, Vernetzungsgrad und Stabilität gegenüber einem enzymatischen Abbau der Gelatineschäume.
- Eine Besiedlung der vernetzten Gelatineschäume mit humanen Fibroblasten ist möglich, wobei insbesondere die Gelatineschäume, die durch direkte Zugabe von EDAC-Pulver vernetzt wurden, chargenspezifische Unterschiede zeigen.
- Die Vernetzung der Gelatineschäume durch Behandlung mit einer EDAC-Lösung führt zu gleichmäßigen Chargen und zu gleichmäßigerer Proliferation der angesiedelten Fibroblasten.

4.6 EIGNUNG DER GELATINESCHÄUME ALS DERMAL ÄQUIVALENTE FÜR EIN IN-VITRO TESTSYSTEM

Fibroblasten Kulturen in dreidimensionalen Systemen dienen der Untersuchung einzelner Fragestellungen der in-vivo stattfindenden Interaktionen zwischen Zellen untereinander sowie zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (ECKES et al., 1995).

Während der Wundheilung werden einzelne Vorgänge durch die Adhäsion und Interaktion der Zellen mit der extrazellulären Matrix gesteuert. Nach Entstehung einer akuten Wunde migrieren zwischen dem 2. und dem 4. Tag Fibroblasten aus dem der Wunde angrenzenden Gewebe unter Einfluss chemotaktischer Cytokine in die provisorische extrazelluläre Matrix (LAWRENCE, 1998).

Im in-vitro Testsystem wurde die extrazelluläre Matrix der verletzten Dermis durch Gelatineschäume ersetzt, die sich als Matrix für Fibroblasten eigneten. Für die Versuche wurden durch Behandlung mit einer EDAC-Lösung vernetzte Gelatineschäume verwendet, weil sie den Vorteil der Gleichmäßigkeit der Chargen boten. Allerdings hatten sie den Nachteil, dass Fibroblasten zumindest in den ersten 11 Tagen fast ausschließlich auf der Oberfläche der Schäume wanderten und proliferierten.

In vereinfachter Form wird hierbei die Migration und Proliferation von Fibroblasten in den ersten 2 bis 11 Tagen nach Entstehung einer akuten Wunde nachgestellt. Durch das dem Zellkulturmedium beigefügte FKS werden den Fibroblasten u.a. Hormone, Bindungsproteine, zur Synthese benötigten Aminosäuren, anorganische Salze und Spurenelemente angeboten. Anstelle der Zufuhr von Wundflüssigkeit, die normalerweise die Wunde versorgt, wurde in-vitro das Medium am 4. und am 7. Tag gewechselt.

Wundversorgungsprodukte, wie Hydrokolloide und Alginat, zeichnen sich durch eine hohe Aufnahmekapazität für Wundflüssigkeit aus. In-vitro Versuche, über den Einfluß dieser Materialien auf Proliferation und Migration von Fibroblasten und/oder Keratinozyten bei direktem Kontakt der Wundversorgungsprodukte mit den Hautzellen, sind schwierig. Die Hydrokolloide und Alginat nehmen das Zellkulturmedium rasch und in großen Mengen auf, so dass es in der Zellkultur zu einer mangelnden Versorgung mit Nährstoffen und Flüssigkeit und demzufolge zu einem Absterben der Zellen kommt. Dabei spielen cytotoxische Effekte durch extrahierbare Bestandteile dieser Materialien eine vergleichsweise geringe Rolle wie ROSDY und CLAUS (1990) in vergleichenden Untersuchungen zur Cytotoxizität unter Anwendung von Extrakten und nach direktem Kontakt der Produkte mit den Fibroblasten und Keratinozyten zeigen konnten.

Das entwickelte Testsystem dient zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Materialien, die für die Wundversorgung verwendet werden, und humanen Fibroblasten, die bereits für 24 h auf den Gelatineschäumen kultiviert wurden. Bei einer akuten Verwundung befinden sich in den ersten 24 h kaum Fibroblasten im Wundgebiet. Die Migration und Proliferation vom Wundrand her beginnt erst nach 48 h. Aus diesem Grund wurden die Materialien erst 24 h nach der Beimpfung der Gelatineschäume in Kontakt mit den Fibroblasten gebracht.

Bei Anwendung eines festen, nicht quellenden Testmaterials (PVC-Cytotoxplättchen) konnten am 4. Inkubationstag keine eindeutigen cytotoxischen Effekte gemessen werden. Allerdings unterschieden sich die Resultate der beiden Wiederholungsansätze sehr voneinander. Bei einem Versuchsansatz lag die Inhibition der Fibroblasten-Proliferation bei 45 % und bei dem anderen bei 5,1 %. Erst zwischen dem 4. und 7. Inkubationstag (und dazwischen liegendem Mediumwechsel) konnte ein eindeutiger cytotoxischer Effekt mit einer Inhibition der Fibroblasten Proliferation von 94,9 % bzw. 79 % festgestellt werden. Eine Erklärung für

diesen verzögerten cytotoxischen Effekt liegt möglicherweise darin, dass die extrahierbaren toxischen Bestandteile des PVC-Plättchens durch die Gelatine gefiltert oder sogar blockiert wurden, so dass erst nach 4 Tagen ein verzögerter cytotoxischer Effekt auftrat.

Orientierende Versuche mit Materialien zur Herstellung von Wundversorgungsprodukten konnten zeigen, dass das in-vitro Testsystem auch für eine Bewertung von stark absorbierenden und quellenden Materialien (z.B. Polyurethan) geeignet ist. Mechanische Verletzungen der Fibroblasten, verursacht durch das Quellen des Materials wie von DOVER et al. (1995) beschrieben, konnten vermieden werden durch die kleinen Plexiglasscheiben in dem Transwell Einsatz, die zwischen dem Gelatineschaum und dem Polyurethan angebracht wurden.

VAN LUYN et al. (1992) beobachteten, dass Hydrokolloide in einem in-vitro Testsystem nach 4 bis 5 Tagen dem Carboxymethylcellulose-Gel die Flüssigkeit entzogen, so dass nicht nur die Diffusion von Nährstoffen, sondern auch der Austausch von O₂ und CO₂ in das Zellkultursystem für die im Gel und auf dem Boden der Zellkulturschale proliferierenden Fibroblasten behindert wurde. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Versuchsanordnung gewährleistet, dass nach dem vorsichtigen Platzieren des Polyurethans auf die Oberfläche der Gelatineschäume das Zellkulturmedium innerhalb weniger Minuten absorbiert wird, wobei das Polyurethan gleichmäßig quillt und sich im Einsatz der Transwell-Zellkulturschale gleichmäßig ausbreiten kann. Dabei werden während der gesamten Inkubationszeit sowohl die Fibroblasten wie auch das Polyurethan und der Gelatineschaum mit ausreichend DMEM versorgt.

Bei Einsatz von Polyurethanschäume, verringerte sich die Proliferation der Fibroblasten schon während der ersten 4 Inkubationstage und reduzierte sich z.T. um 70 % nach dem 11. Inkubationstag. Kontrollversuche mit dem cytotoxischen PVC Plättchen hatten gezeigt, dass cytotoxische Effekte durch extrahierbare Bestandteile verzögert, erst nach dem 4. Inkubationstag auftreten können. Die bereits während der ersten 4 Tage Inkubation auftretende Inhibition der Proliferation der Fibroblasten auf den Gelatineschäumen nach Kontakt mit den Polyurethanschäumen ist möglicherweise nicht nur auf die Auswirkung der aus dem Polyurethan extrahierbaren Bestandteile zurückzuführen. Nach Aufnahme des DMEM's könnte die sehr rasche Quellung des Polyurethans, welches sich dann wie ein dichtes Polster auf den Gelatineschäumen ausbreitete, den Austausch von O₂ und CO₂ in der Kultur behindert haben.

FAZIT: Die mit EDAC vernetzten und mit humanen dermalen Fibroblasten besiedelten Gelatineschäume können als dermale Äquivalente für den Aufbau eines in-vitro Testsystems verwendet werden. Das als cytotoxische Kontrolle verwendete PVC-Plättchen zeigte nach Kontakt mit den besiedelten Gelatineschäumen erst zwischen dem 4. und 7. Tag eine Inhibition der Fibroblasten-Proliferation und hierdurch eine toxische Wirkung.

Die Fibroblasten besiedelten hauptsächlich die Oberfläche der Gelatineschäume, so dass bei Untersuchung von stark quellenden Polyurethanschäumen die festgestellte Inhibition der Zellproliferation möglicherweise nicht nur durch die extrahierbaren Bestandteile des Polyurethans verursacht wurden sondern auch, durch eine Behinderung des Gasaustausches in der Kultur.

Zusätzliche vergleichende Untersuchungen müssen durchgeführt werden, um die Vorteile des in-vitro Testsystems in vollem Umfang herausarbeiten zu können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der Entwicklung einer Matrix für Fibroblasten zur Anwendung als dermales Äquivalent für den Aufbau eines in-vitro Testsystems wurden zunächst wässrige Gelatine- und Agarlösungen verschiedener Konzentrationen hergestellt, denen unterschiedliche Mengen an Glycerin als natürlicher Weichmacher beigemischt wurde. Die Herstellung von Folien unter definierten Luftfeuchte- und Temperaturbedingungen erfolgte mit einer Streichanlage im Labormaßstab, die im Rahmen dieser Arbeit konzipiert und gebaut wurde. Es wurden gleichmäßige Muster von Gelatine- und Agarfolien angefertigt, an denen die biologischen und physikalischen Eigenschaften nach einer Sterilisierung mit γ -Bestrahlung bestimmt wurden. Keimdichtigkeit, Wasserdampfdurchlässigkeit, Elastizität, Wundverklebung, Dicke, Gewicht und Wassergehalt der Gelatine- und Agarfolien wurden untersucht und die Ergebnisse wurden mit Literaturdaten von Wundversorgungsprodukten auf Basis von Gelatine oder Agar sowie von humaner Spalthaut und verletzter Haut verglichen. Zusätzlich wurde die Adsorption von Fibronectin, einem Zelladhäsionsprotein, an die Folienoberfläche bestimmt.

Des Weiteren wurden die Wechselwirkung der Folien insbesondere mit Mausfibroblasten untersucht. Die geringe Stabilität der Gelatinefolien verhinderte anfänglich ihre Verwendung als Matrix für die Besiedlung mit Keratinozyten und Fibroblasten. Auf Basis einer 10 %-igen Gelatinelösung wurde dann nach geeigneten Verfahren für die Vernetzung der Gelatine gesucht. Die dehydrothermale Behandlung als Vernetzungsmethode führte zu einer geringen Stabilisierung und änderte die Struktur der Matrix von Folie auf Schaum. Um Fibroblasten jedoch bis zu 14 Tagen auf den Gelatineschäumen kultivieren zu können, musste eine zusätzliche Vernetzung der Gelatine erfolgen. Dies konnte durch Anwendung eines wasserlöslichen Carbodiimids (EDAC) erreicht werden. Für die gleichmäßige Herstellung von Gelatineschäumen wurden spezielle Förmchen gebaut, die eine serienmäßige Herstellung von Mustern ermöglichten. Orientierende Versuche dienten der Klärung nach der optimalen Konzentration und dem optimalen Verfahren zur Vernetzung. Dabei wurden zwei Optionen untersucht: 1) die direkte Zugabe des EDAC in Pulverform in die Gelatinelösung, und 2) die Behandlung der fertig hergestellten Gelatineschäume mit wässriger Vernetzerlösung verschiedener Konzentrationen.

Untersuchungen der physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften der vernetzten Gelatineschäume dienten der Charakterisierung der Muster im Rahmen der

Optimierung der Rezepturen und des Herstellungsverfahrens. Als Matrix für humane Fibroblasten wurden schließlich Gelatineschäume mit 5 Gew.% EDAC (vernetzt mit EDAC-Lösung) sowie Schäume mit 0,07 Gew.% EDAC (vernetzt durch direkte Zugabe von EDAC-Pulver in die Gelatinelösung) verwendet. Die zeitliche Entwicklung der Fibroblasten auf und in den Schäumen wurde durch Anwendung der MTT Methode ermittelt. Zusätzlich wurde mit Hilfe des Antikörpers gegen Ki-67 die Proliferation der Fibroblasten an Gefrierschnitten der Gelatineschäume untersucht.

Gelatineschäume, die durch Behandlung mit einer 5 Gew.% EDAC-Lösung vernetzt wurden, zeigten hohe Stabilität. Sie wurden deshalb mit humanen Fibroblasten beimpft und als dermales Äquivalent für den Aufbau eines in-vitro Testsystems verwendet. Der Bau einer geeigneten Versuchsapparatur ermöglichte, dass die mit Fibroblasten beimpften Gelatineschäume zusammen mit den zu prüfenden Materialien eingespannt, mit ausreichend Zellkulturmedium versorgt und über 11 Tagen kultiviert werden konnten. Aus orientierenden Versuchen mit einem als Negativ-Kontrolle in Cytotoxizitätstest verwendeten Material und mit einem für die Wundversorgung verwendeten Polyurethan wurden Hinweise über die Eignung des in-vitro Testsystems zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen verschiedenen Materialien und den Fibroblasten auf den Gelatineschäumen abgeleitet.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Achterberg, V., Welling, C., Meyer-Ingold, W. (1996) Hydroactive dressings and serum proteins: an in vitro study. *J Wound Care*, 5 (2): 81-84
- Adams, G.A., Feuerstein, I.A. (1981) How much fibrinogen or fibronectin is enough for platelet adhesion? *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, 27: 219-221
- Altankov, G., Brodvarova, I., Rashkov, I. (1991) Synthesis of protein-coated gelatin microspheres and their use as microcarriers for cell culture. Part I. Derivatization with native collagen. *J Biomater Sci Polymer Edn*, 2: 81-89
- Andrade, J.D., Hlady, V. (1986) Protein adsorption and materials biocompatibility: a tutorial review and suggested hypotheses. *Adv Polym Sci*, 1-63
- Arumugam, S., Jang, Y., Chen-Jensen, C., Gibran, N., Isik, F. (1999) Temporal activity of plasminogen activators and matrix metalloproteinase during cutaneous wound repair. *Surgery*, 125: 587-593
- ASTM E 96 – 80 Standard test methods for water vapor transmission of materials (July 1984)
- Augustin, C., Frei, V., Perrier, E., Huc, A., Damour, O. (1997) A skin equivalent model for cosmetological trials: an in vitro efficacy study of a new biopeptide. *Skin Pharmacol*, 10: 63-70
- Autian, J. (1979) Approches to toxicity evaluation of biomaterials with emphasis on preliminary acute toxicity test. *Adv Med Toxicol New Concept Safety*, 1:119-149
- Balduini, C.L., Sinigaglia, F., Salvini, P., Balduini, C.(1984) The role of plasma fibronectin in platelet adhesion to collagen. *Haemostasis*, 14: 158-164
- Bartzokas, C.A., Corkill, J.E., Makin, T. (1983) Microbiological studies on Geliperm. In: Woods, H.F. and Cotter, D. (eds), (Proc. Conf. John Radcliff Hospital, Oxford), 391
- Bell, E., Ehrlich, H.P., Buttle, D., Nakatsuji, T. (1981) Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science*, 211: 1052-1054
- Bell, E., Sher, S., Hull, B., Merrill, C., Rosen, S., Chamson, A., Asselineau, D., Dubertret, L., Coulomb, B., Lapiere, C., Nusgens, B., Neveux, Y. (1983) The reconstitution of living skin. *J Invest Dermatol*, 81: 2s-10s

- Berscht, P.C., Nies, B., Liebendörfer, A. (1995) In vitro evaluation of biocompatibility of different wound dressing materials. *J Mater Sci: Mat in Med*, 6: 201-205
- Berthod, F., Auger, F.A. (1997) In vitro applications of skin substitutes for dermatological purposes. In Roubhia, M. (Ed.): *Skin substitute production by tissue engineering: clinical and fundamental applications*. Landes Bioscience, Austin 211-237
- Biswas, Ch., Dayer, J.M. (1979) Stimulation of collagenase production by collagen in mammalian cell cultures. *Cell*, 18: 1035-1041
- Body, S.C. (1996) Platelet activation and interactions with the microvasculature. *J Cardiovasc Pharmacol*, 27: 13-19
- Borenfreund, E., Babich, H., Martin-Alguacil, N. (1988) Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxic in Vitro*, 2 (1) : 1-6
- Bowers, W., Blaha, M., Alkhyat, A., Sankovich, J., Kohl, J., Wong, G., Patterson, D. (1999) Artificial human skin: cytokine, prostaglandin, Hsp70 and histological responses to heat exposure. *J Dermatol Sci*, 20: 172-182
- Boyce, S.T., Christianson, D.J., Hansbrough, J.F. (1988) Structure of a collagen-GAG dermal skin substitute optimized for cultured human epidermal keratinocytes. *J Biomed Mater Res*, 22: 939-957
- Brazelli, V., Borroni, G., Vignoli, G.P., Rabbiosi, G., Cavagnino, A., Berardesca, E. (1994) Effects of fluid volume changes during hemodialysis on the biophysical parameters of the skin. *Dermatology*, (188), 2: 113-116
- Bubnis, W.A., Ofner, C.M. (1992) The determination of e- aminogroups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal Biochem*, 207: 129-133
- Bujía, J., Sittinger, M., Pitzke, P., Wilmes, E., Hammer, C. (1993) Synthesis of human cartilage using organotypic cell culture. *ORL*, 55: 347-351
- Calderon, M., Lawrence, W.T., Banes, A.J. (1996) Increased proliferation in keloid fibroblasts wounded in vitro. *J Surg Res*, 61: 343-347
- Carver, N., Leigh, I.M. (1992) Synthetic dressings. *Int J Dermatol*, 31: 10-18

- Chevallay, B., Abdul-Malak, N., Herbage, D. (2000) Mouse fibroblasts in long-term culture within collagen three-dimensional scaffolds: matrix reorganization, growth, biosynthetic and proteolytic activities. *J Biomed Mater Res*, 49: 448-459
- Choi, Y.S., Hong, R.S., Lee, Y.M., Song, W.K., Park, H.M. Nam, Y.S. (1999) Studies on gelatin-containing artificial skin: II. Preparation and characterization of cross-linked gelatin-hyaluronate sponge. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)*, 48: 631-639
- Choi, Y.S., Hong, S.R., Lee, M.Y., Song, K.W., Park, H.M., Nam, S.Y. (1999) Study on gelatin-containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge. *Biomaterials*, 20: 409-417
- Chvapil, M. (1977) Collagen sponge: theory and practice of medical applications. *J Biomed Mater Res*, 11: 721-741
- Chvapil, M. (1982) Considerations on manufacturing principles of a synthetic burn dressing: A review. *J Biomed Mater Res*, 16: 245-263
- Ciapetti, G., Cenni, E., Pratelli, L., Pizzoferrato, A. (1993) In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials*, 14 (5) : 359-364
- Clark, R.A. (1993) Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci*, 306: 42-47
- Clark, R.A.F. (1988) Potential roles of fibronectin in cutaneous wound repair. *Arch Dermatol*, 124: 201-206
- Clark, R.A.F. (1996) *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. New York: Plenum Press
- Cohen, I.K., Diegelmann, R.F., Lindblad, W.J. (1992) *Wound Healing: Biochemical & Clinical Aspects*. Philadelphia: Saunders Co.
- Coulomb, B., Dubertret, L., Bell, E., Merrill, C., Fosse, M., Breton-Gorius, J., Prost, C., & Touraine, R. (1983a) Endogenous peroxidases in normal human dermis: a marker of fibroblast differentiation. *J Invest Dermatol*, 81: 75-78
- Coulomb, B., Dubertret, L., Merrill, C., Touraine, R., Bell, E. (1984) The collagen lattice: a model for studying the physiology, biosynthetic function and pharmacology of the skin. *Br J Dermatol*, 27: 83-87
- Dagalakis, N., Flink, J., Stasikelis, P., Burke, J.F., Yannas, I.V. (1980) Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure. *J Biomed Mater Res*, 14: 511-528

- Daniels, J.T., Kearney, J.N., Ingham, E. (1997) An investigation into the potential of extracellular matrix factors for attachment and proliferation of human keratinocytes on skin substitutes. *Burns*, 23 (1): 26-31
- Davies, J.W.L. (1983) Synthetic materials for covering burn wounds: Progress towards perfection. Part I. Short term dressing materials. *Burns*, 10: 94-103
- Demling, R.H., deSanti, L. (1999) Management of partial thickness facial burns (Comparison of topical antibiotics and bio-engineered skin substitutes). *Burns*, 25: 256-261
- DIN 53 815 „Prüfung von Textilien: Begriffe für den einfachen Zugversuch“ (5/1989)
- DIN 58 953 Teil 6 „Sterilgutversorgung Sterilisationspapier für Beutel und Schlauchverpackungen: Prüfung“ (1/1987)
- Domurado, D., Guidoin, R., Marois, M., Martin, L., Gosselin, C., Awad, J. (1978) Albuminated Dacron prostheses as improved blood vessels substitutes. *J Bioeng*, 2: 79-91
- Dover, R., Otto, W.R., Nachahal, J., Riches, D.J. (1995) Toxicity testing of wound dressing materials *in vitro*. *Br J Plast Surg*, 48:230-235
- Draye, J.P., Delaey, B., Van de Voorde, A., Van Den Bulke, A., De Reu, B., Schacht, E. (1998) In vitro and in vivo biocompatibility of dextran dialdehyde cross-linked gelatin hydrogel films. *Biomaterials*, 19: 1677-1687
- Draye, J.P., Delaey, B., Voorde, van de A., Bulcke, van den A., Bogdanov, B., Schacht, E. (1998) In vitro release characteristics of bioactive molecules from dextran dialdehyde cross-linked gelatin hydrogel films. *Biomaterials*, 19: 99-107
- Dyson, M., et al. (1998) Comparison of the effects of moist and dry conditions on dermal repair. *J Invest Dermatol*, 91 (5): 434-439
- Eckes, B., Krieg, T., Nusgens, B.V., Lapière, Ch. M. (1995) In vitro reconstructed skin as a tool for biology, pharmacology and therapy: a review. *Wound Rep Reg*, 3:248-257
- Engvall, E.; Ruoslahti, E. (1977) Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int J Cancer*, 20: 1-5
- Erasmus, M.E.; Jonkman, M.F. (1989) Water vapour permeance. A meaningful measure for water vapour permeability of wound coverings. *Burns*, 15 (6): 371-375

- Escoffier, C., de Rigal, J., Rochefort, A., Vasselet, R., Léveque, J.L., Agache, P.G. (1989) Age-related mechanical properties of human skin: an in vivo study. *J Invest Dermatol*, 93: 353-357
- Fakirov, S., Sarac, Z., Anbar, T., Boz, B., Bahar, I., Evstatiev, M., Apostolov, A.A., Mark, J.E., Kloczkowski, A. (1996) Mechanical properties and transition temperatures of cross-linked oriented gelatin: 1. Static and dynamic mechanical properties of cross-linked gelatin. *Colloid Polym Sci*, 274: 334-341
- Falanga, V. (1988) Occlusive wound dressings. *Arch Dermatol*, 124: 872-877
- Falanga, V. (1998) Occlusive wound dressings: why, when, which? *Arch Dermatol*, 124: 872-876
- Feijen, J. et al. (1996) In vitro degradation of dermal sheep collagen crosslinked using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials*, 17: 679-684
- Gabiani, G., Ryan, G.B., Majno, G. (1971) Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and possible role of wound contraction. *Experientia*, 27: 549-552
- Gay, R., Swiderek, M., Nelson, D., Ernesti, A. (1992) The living skin equivalent a model in vitro for ranking the toxic potential of dermal irritants. *Toxic in Vitro*, 6 (4): 303-315
- Genever, P.G., Wood, E.F., Cunliffe, W.J. (1993) The wounded dermal equivalent offers a simplified model for studying wound repair in vitro. *Exp Dermatol* 3: 266-273
- Ghofrani, K. (1998) Entwicklung eines Äquivalents für autogene Spalthaut -Charakterisierung und Modifizierung einer vom Schwein gewonnenen Kollagen-Elastin-Membran. Dissertation RWTH Aachen
- Gorham, S.D., Light, N.D., Diamond, A.M., Willins, M.J., Bailey, A.J., Wess, T.J., Leslie, N.J. (1992) Effect of chemical modifications on the susceptibility of collagen to proteolysis. II. Dehydrothermal crosslinking. *Int J Biol Macromol*, 14: 129-138
- Grando, S.A., Crosby, A.M., Zelickson, B.D., Dahl, M.V. (1993) Agarose gel keratinocyte outgrowth system as a model of skin re-epithelization: requirement of endogenous acetylcholine for outgrowth initiation. *J Invest Dermatol*, 101: 804-810
- Grinell, F., Phan, T.V. (1985) Platelet attachment and spreading on polystyrene surfaces: dependence on fibronectin and plasma concentration. *Thromb Res*, 39: 165-169
- Gundersen, J. (1980) Improved hemostasis in vascular surgery by the use of Spongostan. *Folia Angiologica*, 28: 121-123

- Hansbrough, J.F., Franco, E.S. (1998) Skin Replacements. *Clinics in Plastic Surgery*, 25: 407-420
- Hansbrough, J.F., Zapata-Sirvent, R., Carroll, W.J., Dominic, W.J., Wang, X.W., Wakimoto, A. (1984) Clinical experience with Biobrane ® biosynthetic dressing in the treatment of partial thickness burns. *Burns*, 10:415-419
- Harper, E., Berger, A., Katchalski, E. (1972) The hydrolysis of poly(L-prolyl-glycyl-L-prolyl) by bacterial collagenase. *Biopolymers*, 11: 1607-1612
- Hay, E.D. (1991) *Cell Biology of Extracellular Matrix*. New York: Plenum Press
- Horowitz, A., Dorfman, A. (1970) The growth of cartilage cells in soft agar and liquid suspension. *J Cell Biol*, 45: 434-438
- Hubbel, J.A. (1995) Biomaterials in Tissue Engineering. *Biotechnology (N Y)*, 13: 565-576
- Hunt, T.K., Knighton, D.R., Thakral, K.K., Goodson, W.H., Andrews, W.S. (1984) Studies in inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. *Surgery*, 96: 48-52
- Hynes, R. O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69: 11-25
- Ingham, K. C., Brew, S.A., Migliorini, M.M. (1989) Further localization of the gelatin-binding determinants, within fibronectin. Active fragments devoid of type II homologous repeat modules. *J Biol Chem*, 264: 16977-16980
- Iruela-Arispe, M.L., Dvorak, H.F. (1997) Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haem*, 78: 672-675
- ISO-10993-5 bzw. EN-30993-5 "Biologische Prüfung von Medizinprodukten, Teil 5: Prüfungen auf Cytotoxizität: in vitro Methoden" (8/1994)
- Jürgens, C., Beuchel, M., Bisgwa, F., Dekker, A., Hafemann, B., Kortmann, H., R., Niendorf, A., Partecke, B.-D., Porte, T., Schulz, J.H. (1995) In-vitro und In-vivo Untersuchungen einer absorbierbaren temporären Wundabdeckung. *Unfallchirurg*, 98: 241-247
- Keisari, Y. (1992) A colorimetric microtiter assay for the quantification of cytokine activity on adherent cells in tissue culture. *J Immunol Methods*, 146: 155-161
- Kickhoefer, B., Wokalek, H., Scheel, D. Ruh, H. (1986) Chemical and physikal properties of a hydrogel wound dressing. *Biomaterials*, 7: 67-72

- Kim, K.Y., Min, D.S., Chun H.J. (1987) Synthesis and properties of polymeric skin substitute (I) evaluation of bilayer membrane composed of crosslinked gelatin and polyurethane. *Polymer (Korea)*, 11: 246-253
- Kirkpatrick, C.J., Wagner, M., Köhler, H., Bittinger, F., Otto, M. (1997) The cell and molecular biological approach to biomaterial research: a perspective. *J Mater Sci: Mat in Med*, 8: 131-141
- Kirsner, R.S., Falanga, V., Eaglestein, W.H. (1998) The development of bioengineered skin. *Trends Biotechnol*, 16: 246-248
- Klein, C.L, Wagner, M., Kirkpatrick, C.J., Van Kooten, T.G. (2000) A new quantitative test method for cell proliferation based on detection of the Ki-67 protein. *J Mater Sci: Mat in Med*, 11: 125-132
- Koepff-Hinrichs, K., Koepff, P. (1974) Gelatine in Pharmazie und Medizin. *Pharm Ind*, 36 (2): 104-107
- Koide, M., Osaki, K., Konishi, J., Oyamada, K., Katakura, T., and Takahashi, A. (1993) A new type of biomaterial for artificial skin: dehydrothermally cross-linked composites of fibrillar and denatured collagens. *J Biomed Mater Res*, 27: 79-87
- Konstantinova, N.V., Duong, D.M.T., Remenyik, E. et al. (1996) Interleukin-8 is induced in skin equivalents and is highest in those derived from psoriatic fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 107: 615-621
- Lamke, L.O., Nilsson, G.E. Reithner, H.L. (1986) The evaporative water loss from burns and the water-vapor permeability of grafts and artificial membranes used in the treatment of burns. *Burns*, 3: 159-165
- Laska, D.A., Poulsen, R.G., Horn, J.W., Meador, V.P., Hoover, D.M. (1992) An Evaluation of TESTSKIN™: An alternative dermal irritation model. *In Vitro Toxicol*, 5: 177-189
- Lawrence, W.T. (1998) Physiology of the acute Wound. *Clin Plast Surg*, 25 (3): 321-340
- Lee, J.M., Edwards, H.H.L., Pereira, C.A. Samii, S.I. (1996) Crosslinking of tissue-derived biomaterials in 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC). *J Mater Sci: Mat in Med*, 7: 531-541
- Leigh, I.M., Lane, B., Wath, F.M. (1994) Kapitel 1 in: *The keratinocyte handbook*. Cambridge: Cambridge University Press

- Meyle, J., Gültig, K., Brich, M., Hämmerle, H., Nish, W. (1994) Contact guidance of fibroblasts on biomaterial surfaces. *J Mater Sci: Mat in Med*, 5: 463-466
- Mignatti, P., Rifkin, D.B., Welgus, H.G., Parks, W.C. (1996) Proteinases and tissue remodeling. In: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Edited by Clark, R. A. F. New York, Plenum Press, p: 427-474
- Miller, R.R., McDevitt, C.A. (1991) A quantitative microwell assay for chondrocyte cell adhesion. *Anal Biochem*, 92: 380-383
- Moll, I., Houdek, P., Schmidt, H., Moll, R. (1998) Characterization of epidermal wound healing in a human skin organ culture model: acceleration by transplanted keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 111: 251-258
- Mosher, D.F. (1984) Physiology of fibronectin. *Ann Rev Med*, 35: 561-575.
- Moulin, V., Castilloux, G., Jean, A., Garrel, D.R., Auger, F.A., Germain, L. (1996) In vitro Models to study wound healing fibroblasts. *Burns*, 5:359-362
- Nakajima, N., Ikada, J. (1995) Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjugate Chem*, 6: 123-130
- Nangia, A., Hung, C.T. (1990) Preclinical evaluation of skin substitutes. *Burns*, 16: 358-367
- Neumann, P.M., Zur, B., Ehrenreich, Y. (1981) Gelatin-based sprayable foam as a skin substitute. *J Biomed Mater Res*, 15: 9-18
- Odland, G. (1958) The fine structure of the interrelationship of cells in the human epidermis. *J Biophys Biochem Cytol*, 4: 529-535.
- Odland, G., Ross, R. (1968) Human wound repair. I. Epidermal regeneration. *J Cell Biol*, 39: 135-157
- Oikarién, A. (1994) Aging of the skin connective tissue: how to measure the biochemical and mechanical properties of aging dermis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 10 (2): 47-52
- Olde Damink, L.H.H., Dijkstra, P.J., van Luyn, M.J.A., van Wachem, P.B., Nieuwenhuis, P., Feijen, J. (1996) In vitro degradation of dermal sheep collagen cross-linked using a water soluble carbodiimide. *Biomaterials*, 17: 679-684
- Osborne, C.S., Reid, W.H., Grant, M.H. (1997) Investigation into cell growth on collagen/chondroitin-6-sulphate gels: the effect of crosslinking agents and diamines. *J Mater Sci: Mat in Med*, 8: 179-184

- Pachence, J.M. (1996) Collagen-based devices for soft tissue repair.
J Biomed Mater Res, 33: 35-40
- Packham, M.A., Evans, G.Glyn, M.F., Mustard, M.F. (1969) The effect of plasma proteins on the interaction of platelets with glass surfaces. *J Lab Clin Med*, 73: 686-670
- Petersen, J.K., Krogsgaard, J., Nielsen, K.M., Norgaard E.B. (1984) A comparison between 2 absorbable hemostatic agents: gelatin sponge (Spongostan) and oxidized regenerated cellulose (Surgicel). *Int J Oral Surg*, 13: 406-410
- Pieper, J.S., Oostrehof ,A., Dijkstra, P.J., Veerkamp, J.H., Van Kupperfelt, T.H. (1999) Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. *Biomaterials*, 20: 847-858
- Postlethwaite, A.E, Keski-Oja, J., Balian G., Kang, A.H. (1981) Induction of fibroblast chemotaxis by fibronectin: localization of the chemotactic region to a 140,000 MW non-gelatin-binding-fragment. *J Exp Med*, 153: 494-499
- Queen, D., Gaylor, J.D.S., Evans, J.H., Courtney, J.M., Reid, W.H. (1987) The preclinical evaluation of the water vapour transmission rate through burn wound dressings. *Biomaterials*, 8: 367-371
- Rogers, A.A., Walmsley, R.S., Rippon, M.G., Bowler, P.G. (1999) Adsorption of serum-derived proteins by primary dressings: implications for dressing adhesion to wounds. *J Wound Care*, 8 (8): 403-406
- Roguet, R., Régnier, M., Cohen, C., Dossou, K.G., Rougier, A. The use of in-vitro reconstructed human skin in dermatotoxicity testing. *Toxic In Vitro*, 8 (4): 635-639
- Rosdy, M., Clauss, L-C. (1990) Cytotoxicity testing of wound dressings using normal human keratinocytes in culture. *J Biomed Mater Res*, 24: 363-366
- Ruggeri, Z.M. (1997) Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haem*, 78: 611-628
- Ruoslahti, E. (1991) Integrins. *J Clin Invest*, 87: 1-5
- Saiag, P., Bell, E. (1985) Psoriatic fibroblasts induce hyperproliferation of normal keratinocytes in a skin equivalent model in vitro. *Science*, 230: 669-672
- Schroder, M., Willumsen, H., Hansen, J.P., Hansen, O.H. (1982) Peritoneal adhesion formation after the use of oxidized cellulose (Surgicel) and gelatin sponge (Spongostan) in rats. *Acta Chir Scand*, 148: 595-596

- Schwick, von G., Freund U. (1962) Immunologische Untersuchungen mit Hemacel®. Dtsch Med Wochenschr, 15: 737-742
- Sgouras, D., Duncan, R. (1990) Methods for the evaluation of biocompatibility of soluble synthetic polymers which have potential for biomedical use: 1 – Use of the tetrazolium-based colorimetric assay (MTT) as a preliminary screen for evaluation of in vitro cytotoxicity. J Mater Sci: Mat in Med, 1: 61-68
- Shinde, B.G., Erhan, S. (1992) Flexibilized gelatin film-based artificial skin model: II. release kinetics of incorporated bioactive molecules. Biomed Mater Eng, 2: 127-131
- Shinde, B.G., Nithianandam, V.S., Kaleem, K., Erhan S. (1992) Flexibilized gelatin film-based artificial skin model: I. Preparation and properties of the films. Biomed Mater Eng, 2: 123-126
- Sieber, V.K., Otto, W.R., Riches, D.J. (1995) Cytotoxicity of wound dressing materials assessed using cultured skin equivalents. Burns, 21 (4): 249-254
- Singer, A., Clark, R. (1999) Cutaneous wound healing. N Engl J Med, 341: 738-746
- Slimane, B.S., Guidoin, R., Marceau, D., Merhi Y., King, M.W., Sigot-Luizard, M.F. (1988) Characteristics of polyester arterial grafts coated with albumin: the role and importance of the cross-linking chemicals. Eur Surg Res, 20: 18-28
- Stenn, K.S., Malhotra, R. (1992) Epithelialization: In Wound Healing Biochemical and Clinical Aspects. Edited by Cohen, I., Diegelman, R.F., Lindblad, W.J. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p: 115-127.
- Stephens, P., Wood, E.J., Raxworthy, M.J. (1996) Development of a multilayered in vitro model for studying events associated with wound healing. Wound Rep Reg, 4: 393-401
- Stirk, C.M., McNALLY, S., Naito, M., McCallion, D., Thompson, W.D., Melvin, W.T. (1996) Modulation of cell proliferation by fibrin degradation products. Biochem Soc Trans, 24: 300-304
- Tabata, Y., Ikada, Y. (1987) Macrophage activation through phagocytosis of muramyl dipeptide encapsulated in gelatin microspheres. J Pharm Pharmacol, 39: 698-704
- Tabata, Y., Ikada, Y. (1989) Synthesis of gelatin microspheres containing interferon. Pharm Res, 6: 422-427
- Tavis, M.J., Thornton, J., Danet, R. Bartlett, M.D. (1978) Current status of skin substitutes. Surg Clin North Am, 58: 1233-1247

- Tavis, J. M., Thornton, W. J., Harney, H. J., Woodroof, A. E., Bartlett, M. D. (1977) Mechanism of skin graft adherence: collagen, elastin, and fibrin interactions. Surg Forum, 523-524
- Tavis, J. M., Thornton, W., J., Harney, H. J., Woodroof, A., E., Bartlett, M. D. (1976) Graft adherence to de-epithelialized surfaces: a comparative study. Ann Surg, 594-600
- Thomas, S., Loveless, P. (1988) Moisture vapour permeability of hydrocolloid dressings. Pharm J, 241: 806
- Thomas, S., Loveless, P., Hay, N.P. (1988) Comparative review of the properties of six semipermeable film dressings. Pharm J, 240: 785-787
- Tjia, J.S., Aneskievich, J., Moghe, V.P. (1999) Substrate-absorbed collagen and cell secreted fibronectin concertedly induce cell migration on poly(lactide-glycolide) substrates. Biomaterials, 20: 2223-2233
- Turner, T.,D. (1979a) Proc Symp Wound Healing Helsinki. Ed by Sundell, 75-84
- Turner, T.,D. (1979b) Hospital usage of absorbent dressings. Pharm J, 22: 421-426
- Turner, T.D. Absorbents in surgery. (1977) Proc Guild Public Pharm Conf York, 56-59
- Uitto, J., Mauviel, A., McGrath, J. (1996) The dermal-epidermal basement membran zone in cutaneous wound healing : In The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair Edited by Clark, R.A.F. New York, Plenum Press, p: 513-560
- Underwood, S., Afoke, A., Brown, R.A., MacLeod, A.J., Dunnill, P. (1999) The physical properties of a fibrillar fibronectin-fibrinogen material with potential use in tissue engineering. Bioprocess Engineering, 20: 239-248
- Vaalamo, M., Leivo, T., Saarialho, K. (1999) Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP-1, -2,-3 and-4) in normal and aberrant wound healing. Hum Pathol, 30:795-802
- Vaissiere, G., Chevally, B., Herbage, D., Damour, O. (2000) Comparative analysis of different collagen-based biomaterials as scaffolds for long-term culture of human fibroblasts. Med Biol Eng Comput, 38: 205-210
- Van Dorp, A.G.M., Verhoeven, M.C.H., Koerten ,H.K., Van Blitterswijk, C.A. (1999) Bilayered biodegradable poly(ethylene glycol)/ poly(butylene terephthalate) copolymer (Polyactive™) as substrate for human fibroblasts and keratinocytes. J Biomed Mater Res, 47: 292-300

- Van Luyn, M.J. A., Van Wachem, P.B., Niewenhuis, P., Olde Damink, L., Ten Hoopen, H., Feijen, J. (1991) Methylcellulose cell culture as a new cytotoxicity test system for biomaterials. *J Mater Sci: Mat in Med*, 142-148
- Vogel, H.G. (1994) Mechanical Measurements of skin. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, 185: 39-43
- Von Castelberg, B. Pochon, J.P., Hahn, A. (1985) In-vitro Versuche mit Geliperm Dry als Träger für Antibiotika und Antiseptika in der lokalen Verbrennungstherapie. *Handchirurgie*, 17: 69-72
- Vroman, L., Adams, A.L. (1986) Adsorption of proteins out of plasma and solutions in narrow spaces. *J Colloid Interface Sci*, 111 (2): 391-422
- Wahl, L., Wahl, S. (1992) Inflammation. In: *Wound Healing Biochemical and Clinical Aspects*. Edited by Cohen, I., Diegelman, R.F., Lindblad, W.J. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p: 40-60.
- Weadock, K., Olson, R.M., Silver, F.H. (1983-1984), Evaluation of collagen crosslinking techniques. *Biomater Med Dev Art Org*, 11: 293-318
- Welling, C. (1991) Wundaufgaben: In-vitro-Verfahren zur Prüfung der Wundverklebung. *Dtsch Apoth Ztg*, 41: 2092-2094
- Wheater, P.R., Burkitt, G.H., Daniels, V.D., Deakin, Ph. J. (1987) *Funktionelle Histologie: Lehrbuch und Atlas*. München; Wien; Baltimore: Urban und Schwarzenberg
- Wichterle, O., Lun, D. (1960) Hydrophilic gels for biological use. *Nature*, 185: 117-118
- Williams, D.F. (1987) Summary of Definitions in Progress in Biomedical Engineering, Chapter 4. Ed: D.F. Williams, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, p: 66-71
- Winter, G.D. (1964) Movement of epidermal cells over the wound surface. *Dev Biol Skin*, 5: 113-127
- Winter, G.D. (1971) Healing of skin wounds and the influence of dressings on the repair process. In Harkins K.J. (ed): *Surgical Dressings and Wound Healing*. London Crosby Lockwood, p: 46-60
- Winter, G.D., Scales, J., T. (1963) Effect of air drying and dressings on the surface of a wound. *Nature*, 197: 91-92
- Winter, G.D., Scales, J.T. (1963) Effect of air drying and dressings on the surface of a wound. *Nature*, 197: 91-92

- Wokalek, H., Schöpf, E., Vaubel, E., Kickhöfen, B., Fischer, H. (1979) Erste Erfahrungen mit einem Transparent-Flüssigkeits-Gel bei der Behandlung frischer Operationswunden und chronischer Epitheldefekte der Haut. *Akt Dermatol*, 5: 255-265
- Wollina, U., Knöll, B., Prüfer, K., Barth, A., Müller, D., Huschenbeck, J. (1996) Synthetic wound dressings-evaluation of interactions with epithelial and dermal cells in vitro. *Skin Pharmacol*, 9: 35-42
- Woodley, D.T. (1996) Reepithelialization: In *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* Edited by Clark, R. A. F. New York, Plenum Press, 339-354
- Yancey, K.B., Hammer, C.H., Harwath, L., Renfer, L., Frank, M.M., Lawley, T.J. (1985) Studies of human C5a as a mediator of inflammation in normal human skin. *J Clin Invest*, 75: 486-495
- Yannas, I. V., Burke, J. F., Gordon, P. L., Huang, C., R. H., Rubenstein (1980) Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. *J Biomed Mater Res*, 14: 65-81
- Yao, Ch.H., Sun, J.S., Lin, F.H., Liao, Ch. J., Huang, Ch. W. (1996) Biological effects and cytotoxicity of tricalcium phosphate and formaldehyde cross-linked gelatin composite. *Materials Chemistry and Physics*, 45: 6-14
- Yoshizato, K., Yoshikawa, E. (1994) Development of bilayered gelatin substrate for bioskin: a new structural framework of the skin composed of porous dermal matrix and thin basement membrane. *Materials Science and Engineering*, C1: 95-105
- Yoshizato, K., Taira T., Yamamoto, N. (1985) Growth inhibition of human fibroblasts by reconstituted collagen fibrils. *Biomedical research*, 6 (2): 61-71

