

Aus dem Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Die Entwicklung und Charakterisierung von
Kollagenlaminaten mit proangiogenen, proosteogenen sowie
antimikrobiellen Eigenschaften**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Joy Braun

geboren am 10.07.1991 in Backnang

Mainz, November 2021

1. Betreuer:

2. Betreuer:

Tag der Promotion: 15.02.2022

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Joy Braun, dass ich meine Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen schriftlichen und elektronischen Quellen sowie andere Hilfsmittel benutzt habe. Alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, habe ich kenntlich gemacht.

Mainz, 11.11.2022

Joy Braun

Für meine Familie
in Liebe und Dankbarkeit

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht oder präsentiert:

PUBLIKATIONEN

Braun J. et al. (2021) Mechanical Characterization of Rose Bengal and Green Light Crosslinked Collagen Scaffolds for Regenerative Medicine. *Regenerative Biomaterials*, Akzeptiert

Braun J. et al. (2020) Toxic effect of Vancomycin on Viability and Functionality of Different Cells Involved in Tissue Regeneration. *Antibiotics* 9(5)238

Eckes E., **Braun J. et al. (2020)** Rose Bengal Crosslinking to Stabilize Collagen Sheets and Generate Modulated Collagen Laminates. *Int. J. Mol. Sci.* 21(19)7408

PRÄSENTATIONEN

Braun J., Activity of Biomolecules and Vancomycin on Collagen Scaffolds after RGX treatment. 6th EuroBioMAT

Braun J., Evaluation of the effect of Vancomycin on the viability and the functionality of different cells involved in Tissue Regeneration, 23. Chirurgische Forschungstage Aachen

POSTER

Braun J., Collagen Laminates – Effect of layering through photochemical crosslinking on the mechanical stability, Annual Meeting of German Society of Biomaterials (2021)

Inhaltsverzeichnis

FORMEL- UND ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
KURZFASSUNG	VI
ABSTRACT	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Knochen und ihre Rolle in der Orthopädie und Unfallchirurgie	1
1.2 Gründe für eine gestörte Frakturheilung	3
1.3 Das „Diamond Concept“	4
1.4 Ansätze zur Behandlung von Frakturen.....	5
1.4.1 Biomaterialien und Drug Delivery – ein anderer Ansatz	6
1.4.1.1 Drug Delivery – ein kleiner Einschub	7
1.5 Behandlungsansätze zur Infektionsprävention.....	8
1.6 Drug Delivery zur verbesserten Angiogenese und Osteogenese	9
1.7 Kollagen als Biomaterial.....	11
1.8 Quervernetzung – ein Überblick	12
1.9 Photochemisches Quervernetzen als Mittel der Wahl	13
2 ZIEL DER ARBEIT	14
3 MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 Material	18
3.1.1 Verwendete Kollagene	18
3.1.2 Verwendete Zelllinien	18
3.1.3 Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze.....	19
3.1.4 Verwendete Materialien für die Mikrobiologie.....	20
3.1.5 Verwendete Chemikalien	20
3.1.6 Verwendete Antikörper	22
3.1.7 Verwendete Verbrauchsmaterialien	23
3.1.8 Verwendete Geräte.....	24
3.1.9 Verwendete Software	25
3.2 Methoden	26
3.2.1 Zellkulturen	26
3.2.1.1 Isolierung primärer humaner Osteoblasten.....	28
3.2.1.2 Isolierung primärer humaner Myoblasten	28
3.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl.....	29
3.2.1.4 Kryokonservierung	29
3.2.2 Toxizität von Vancomycin	29

3.2.2.1 Viabilitätsassay	29
3.2.2.2 Angiogeneseassay	30
3.2.2.3 Immunfluoreszenz	30
3.2.2.4 Alkalische Phosphatase Aktivität	30
3.2.3 Kollagenpräparation	31
3.2.3.1 Präparation der Kollagene für die Zellkultur	31
3.2.3.2 Quervernetzung der Kollagene	31
3.2.4 Kollagenuntersuchungen	33
3.2.4.1 Einfluss der Laminatausrichtung auf die Zellviabilität	33
3.2.5 Aktivitätstestungen	34
3.2.5.1 Untersuchung der Aktivität von Vancomycin nach Behandlung mit RGX	34
3.2.5.1.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	34
3.2.5.1.2 Bestimmung der bakteriziden Wirkung von Vancomycin nach RGX Behandlung	35
3.2.5.1.2.1 Einfluss der Kollagene auf die Vancomycin-Freisetzung	35
3.2.5.2 Untersuchung der Aktivität von SDF-1 α nach Behandlung mit RGX	36
3.2.5.3 Untersuchung der Aktivität von BMP-7 nach Behandlung mit RGX	36
3.2.6 Mechanische Charakterisierung	36
3.2.6.1 Laserkonfokal Mikroskopie	36
3.2.6.2 Mikrozugversuche	37
3.2.6.3 Dickenmessungen	38
3.2.6.3.1 Viabilitätstestung auf den Kollagenlaminaten	39
3.2.6.3.2 <i>In vitro</i> -Zytotoxizitätsuntersuchungen	39
3.2.7 Statistische Auswertung	40
4 ERGEBNISSE	41
4.1 Toxizität von Vancomycin	41
4.1.1 Viabilitätsassay nach Vancomycin Kontakt	41
4.1.2 Angiogenese-Assay	46
4.1.3 Immunfluoreszenz	48
4.1.4 Alkalische Phosphatase Aktivität (ALP)	50
4.2 Kollagenuntersuchungen	51
4.2.1 Übersicht der verwendeten Kollagene	51
4.2.2 Einfluss der Bengalrosakonzentration auf die Zellviabilität	52
4.2.3 Einfluss der Bestrahlungsdauer auf die Proliferation	53
4.2.4 Einfluss der Kollagene und deren Vernetzung auf die Proliferation	55
4.2.4.1 Einfluss der Laminatausrichtung auf die Zellviabilität	56
4.3 Aktivitätstestungen	58
4.3.1 Aktivität von Vancomycin nach RGX-Behandlung	58
4.3.1.1 Bestimmung des MHK-Werts	58
4.3.1.2 Aktivitätsbestimmung	59

4.3.1.2.1	Einfluss der Kollagene auf die Vancomycin-Freisetzung.....	61
4.3.2	Aktivität von SDF-1 α nach RGX-Behandlung	62
4.3.3	Aktivität von BMP-7 nach RGX-Behandlung	63
4.4	Mechanische Charakterisierung	65
4.4.1	Einfluss der Quervernetzung auf die Oberflächentopografie	65
4.4.2	Einfluss der Quervernetzung und der Laminatstruktur auf das mechanische Verhalten	67
4.4.3	Einfluss der Zellen auf die mechanische Stabilität.....	71
4.4.3.1	Viabilität der Zellen auf den Laminaten.....	74
4.4.3.2	<i>In vitro</i> -Zytotoxizitätsuntersuchungen der Lamine	75
5	DISKUSSION.....	77
5.1	Toxizität von Vancomycin.....	77
5.2	Einfluss der Kollagene sowie der Quervernetzungsparameter auf die Zellviabilität..	80
5.2.1	Einfluss der Quervernetzungsparameter.....	80
5.2.2	Biokompatibilität der verschiedenen Kollagene	82
5.2.2.1	Einfluss der Ausrichtung der Kollagene.....	83
5.3	Einfluss der Quervernetzung auf die Wirkungsweise von Vancomycin, BMP-7 und SDF-1 α	83
5.3.1	Antimikrobielle Aktivität von Vancomycin nach Quervernetzung.....	83
5.3.2	Osteogene und angiogene Aktivität von BMP-7 und SDF-1 α nach Quervernetzung	85
5.4	Mechanische Charakterisierung der Kollagene	87
5.4.1	Einfluss der Quervernetzung auf die Oberflächentopografie.....	87
5.4.2	Einfluss des Quervernetzens sowie des Schichtens der Kollagene auf das mechanische Verhalten.....	88
5.4.2.1	Einfluss auf die Bruchdehnung und die max. ertragbare Spannung.....	88
5.4.2.2	Einfluss auf den E-Modul.....	89
5.4.3	Zellinduzierte Destabilisierung der Lamine – Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften	91
5.4.3.1	Zellviabilität auf den Laminaten und deren zytotoxische Wirkung	92
6	SCHLUSSFOLGERUNG.....	95
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	96
8	TABELLENVERZEICHNIS.....	99
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	100

Formel- und Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Atelokollagen
ALP	Alkalische Phosphatase
BMP	Knochenmorphogenetisches Protein
bspw.	Beispielsweise
BSA	Rinderserumalbumin
C	Collagen Solutions
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC/NHS	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und N-hydroxysuccinimid
E-Modul	Elastizitätsmodul
et al.	et alia (und andere)
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal calf serum
FDA	Food and Drug Administration
GA	Glutaraldehyde
h	hora (Stunde)
HMDI	Hexamethylendiisocyanat
hOB	humane Osteoblasten
HUVEC	Human Umbilical Endothelial Cell
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KBE	koloniebildende Einheiten
MeOH	Methanol
MHK	Minimale Hemmkonzentration

MSC	Mesenchymale Stammzellen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NHDF	Normal Human Dermal Fibroblasts
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Pen. Strep.	Penicilin Streptomycin
PFA	Paraformaldehyde
PMMA	Polymethylmetacrylat
RB	Bengalrose
RGX	Bengalrosa + grünes Licht
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SaOS-2	Human Bone Osteosarcoma Cell Line
SDF-1α	<i>Stromal cell-derived factor 1 α</i>
SkMc	humane Myoblasten
TGF β	<i>Transforming growth factor β</i>
V	Viscofan
VEGF	Vaskulärer endotheliale Wachstumsfaktor
x g	relative centrifugal force
z. B.	zum Beispiel
ü. N.	über Nacht

Kurzfassung

Knochenbrüche kritischer Größe stellen in der Orthopädie und Unfallchirurgie ein großes Problem dar. Dabei kommt es häufig zu einer gestörten Frakturheilung, bei der sich der Knochen selbst nicht wieder vollständig regeneriert. Bleibt eine Heilung für länger als 6 Monate aus, spricht man von einer Pseudarthrose. Gründe dafür können neben bestimmten Lebensumständen wie Rauchen vor allem Infektionen sein. Außerdem gehen solche Komplikationen oft mit einer fehlenden Osteogenese und einer mangelnden Angiogenese einher.

Als Goldstandard zur Behandlung solcher Brüche zählt das autologe Knochentransplantat. Bei diesem Ansatz gibt es allerdings nicht zu vernachlässigende Nachteile wie beispielsweise eine zweite Operation, Donormorbidität und begrenztes Knochenmaterial.

Abhilfe hierfür können Biomaterialien mit definierten mechanischen Eigenschaften schaffen, welche durch das Einbringen verschieden wirksamer Komponenten zur Infektionsprävention beitragen und gleichzeitig die Knochenregeneration fördern. Dafür wurden in dieser Arbeit Kollagenlamine entwickelt, die mithilfe des Antibiotikums Vancomycin die Ausbildung einer Infektion verhindern und über den osteogen wirkenden Faktor BMP-7, sowie über den angiogen wirkenden Faktor SDF-1 α zu einer verbesserten Frakturheilung führen sollen.

Vancomycin ist ein in der Orthopädie häufig eingesetztes Antibiotikum. Dennoch ist wenig über dessen Toxizität bei lokaler Gabe bekannt. Die Toxizität wurde in dieser Arbeit zunächst an verschiedenen Zellen, welche an der Knochen- und Gewebsregeneration beteiligt sind, untersucht. Dabei zeigte sich bereits bei Konzentrationen von 0,01 mg/mL ein negativer Effekt auf die Viabilität von primären humane Myoblasten und den osteoblasten-ähnliche Zellen SaOS-2. Weiterhin konnte eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Vancomycin bei den Funktionalitätstests der humanen primären Osteoblasten und der Myoblasten festgestellt werden.

Die Herstellung der Lamine erfolgte mittels photochemischer Quervernetzung mit Bengalrosa (RB) und grünem Licht (RGX). Die drei käuflich erworbenen Kollagenmembranen Collagen Solutions (C), Atelokollagen (A) und Viscofan (V) sollten hierbei zur Herstellung genutzt werden. Zunächst wurde der Einfluss der RB-Konzentration (0,1 % und 0,01 %) und der Belichtungsdauer (10 min und 60 min) auf das Proliferationsverhalten von humanen primären Osteoblasten und Fibroblasten bzw. Myoblasten auf C als Modellkollagen untersucht. Dabei zeigt die Dauer der Belichtung keinen Einfluss auf die Zellviabilität, wohingegen bei einer RB Konzentration von 0,1 % ein negativer Einfluss auf die primären Osteoblasten gemessen werden konnte.

Die verschiedenen Kollagene wurden weiter anhand eines Proliferationsassays bezüglich ihrer Biokompatibilität untersucht. Dabei zeigte sich auf C eine Viabilität der humanen Osteoblasten nahe der Kontrolle, welche durch RGX-Behandlung weiter steigt und von A zu V abnimmt. Auf Grundlage dessen wurde V für die weitere Entwicklung exkludiert.

Da sowohl das Antibiotikum als auch die Biomoleküle direkt am Vernetzungsprozess teilnehmen, wurden deren Aktivitäten nach RGX-Behandlung untersucht. Diese Aktivitätstestung erfolgte bei Vancomycin über die Bildung eines Hemmhofs, bei SDF-1 α anhand eines Proliferationsassays und bei BMP-7 durch seine osteogene Aktivität. Dabei zeigt sich, dass die Aktivität erhalten bleibt und die Behandlung mit RGX, einen vom Kollagen abhängigen Einfluss ausübt.

Abschließend wurden C und A (+/- RGX) und die daraus hergestellten Lamine über Zugversuche und Dickenmessungen nach Zellkontakt (24 h und 72 h) mechanisch charakterisiert. Proliferationsversuche und *in vitro*-Zytotoxizitätsassays sollten zu einem besseren Verständnis der zellabhängigen Destabilisierung führen.

In den Zugversuchen zeigte sich für C wie auch für A eine Abnahme in verschiedenen mechanischen Parametern nach RGX-Behandlung. Diese Werte konnten über Laminatherstellung mit einer zweiten Kollagenschicht verbessert werden. Bei einer weiteren dritten Schicht war keine lineare Zunahme erkennbar. Die Dickenmessungen zeigten eine zellabhängige wie auch eine kompositionsabhängige Destabilisierung der Lamine. Weiter konnte ein Zusammenhang zwischen Proliferationsverhalten und *in vitro*-Zytotoxizität hergestellt werden.

Die in der Arbeit dargelegten Ergebnisse zeigen deutlich, dass das photochemische Quervernetzen mit RGX eine vielversprechende Methode zur Herstellung der Kollagenlamine ist. Durch das Einbringen verschieden aktiver Moleküle besteht die Möglichkeit, eine beschleunigte Frakturheilung zu initiieren. Dabei können Materialien mit maßgeschneiderten mechanischen Eigenschaften hergestellt werden. Über die Anzahl der Schichten besteht die Möglichkeit die Freisetzungskinetik durch die Laminatstabilität und der davon abhängigen Degradierung einzustellen. Generell zeigt dieser Ansatz eine vielversprechende zukünftige Methode zur Behandlung von Knochenbrüchen kritischer Größe.

Abstract

Bone fractures of critical size are frequent complications in the orthopaedic field and trauma surgery. Often an impaired fracture healing occurs and the bone cannot regenerate itself. If the bone does not heal within 6 month it is called a non-union. Beside various risk factors such as smoking and diabetes, the other important key factors for an improper healing are infections as well as a missing osteogenesis and a lack of angiogenesis.

Autologous bone grafts represents the gold standard for treatment even though they have many disadvantages like a second surgery, donor morbidity and limited bone material to remove. To avoid these drawbacks, the use of biomaterials is a promising concept. Through insertion of the respective active compounds, infections could be prevented, and bone regeneration could improve.

For this purpose, Collagen Laminates with defined mechanical properties were developed in this work. By using those, the above mentioned key factors for an improper healing should be avoided through the incorporation of certain molecules. Therefore, vancomycin was used to prevent infection. Furthermore, for an accelerated bone healing the osteogenic factor BMP-7 and the angiogenic factor SDF-1 α were used.

The glycopeptide antibiotic vancomycin is often used in the orthopaedic field. However, little is known about its toxicity when administered locally. This was initially examined in this work on various cells, which are involved in bone and tissue regeneration. Thereby, a negative effect on the viability of primary myoblast cells and the osteoblast-like cells SaOS-2 was found at concentrations as low as 0.1 mg/mL. Compared to the viability tests, an increased sensitivity was found when functionality tests of primary human osteoblasts and myoblast cells were performed.

The Collagen Laminates were produced by means of photochemical cross-linking with rose bengal (RB) and green light (RGX). The three commercially acquired collagen membranes called Collagen Solutions (C), Atelocollagen (A) and Viscofan (V) were be used for the laminate production.

For this purpose, the influence of the RB concentration (0.1 % and 0.01 %) as well as the exposure time (10 min and 60 min) on the cell proliferation of primary osteoblasts and fibroblasts as well as myoblasts on C as model collagen was investigated. Thereby the duration of light exposure showed no influence on the cell viability, whereas a negative effect was measured at the higher RB concentration of 0.1 %.

The different collagens were additionally examined regarding to their biocompatibility by using a proliferation assay. The viability of the primary osteoblasts on C was close to that of the control and increased when the membranes were crosslinked. Further, a decrease was measured from A to V, which is why V was excluded for further development of the laminates.

Since both, the antibiotic and the biomolecules, participate directly in the crosslinking process, their activity after RGX treatment was examined. This was done by the inhibition zone of vancomycin, for SDF-1 α a proliferation assay was made and the osteogenic activity of BMP-7 after RGX treatment was investigated by an ALP Assay. The results show that the molecules remain active after RGX treatment. Nevertheless, a collagen dependent effect was measured.

Finally, C and A (+/-RGX) as well as the laminates made of these collagens were mechanically characterized by tensile tests and the destabilization through thickness measurements after cell contact (24 h and 72 h). Additionally, proliferation assays and *in vitro* cytotoxicity assays were performed to lead to a better understanding of the cell-dependent destabilization.

Tensile tests showed a decrease in various mechanical parameters for C and A after RGX treatment. These values could be improved through an additional collagen layer. In case of a third layer, no linear increase could be observed. Thickness measurements showed that the destabilization through cell contact was not only dependent on the laminate composition but also on the proliferation behaviour of the cells. Furthermore, a relation between the proliferation behaviour and the *in vitro* cytotoxicity was exhibited. This finding enables, for further applications, the target release of biomolecules through the laminate structure.

The presented results clearly highlight that photochemical crosslinking by RGX treatment is a promising approach to produce collagen laminates. By incorporating different active molecules it is possible to initiate accelerated fracture healing. Thereby materials with tailored mechanical properties can be prepared. Additionally the amount of collagen layers enables to control the release kinetic through the laminate stability and its degradation rate. Generally the results show that this approach is a promising future method for the treatment of bone fractures.

1 Einleitung

1.1 Knochen und ihre Rolle in der Orthopädie und Unfallchirurgie

Schon Karl Julius Weber sagte einst: „Charakter ist in der moralischen Welt, was in der physischen das Knochengebäude.“ Kaum einer, der sich nicht mit Knochen als Organ beschäftigt hat, wird das Ausmaß dieses Zitates verstehen. So kann man sagen, dass die Eigenschaften des Knochens in der breiten Gesellschaft deutlich unterschätzt werden.

Jeder Mensch kennt die Wichtigkeit von Herz, Leber und Niere. Betrachtet man den Knochen, liegt die Annahme nahe, dass das Skelett Organe schützt. Dennoch ist kaum einem bewusst, dass der Knochen beispielsweise auch an der Bildung von Blutzellen mitwirkt oder bei der Regulation des Blut-pH-Wertes eine Rolle spielt [1]. Weiter besitzt er die einzigartige Fähigkeit, sich selbst nach Verletzung bei richtiger Behandlung ohne Bildung von fibrösem Narbengewebe zu heilen [2, 3]. Diese Knochenregeneration ist ein hochkomplexer, zeitlich regulierter Prozess, bei dem eine Vielzahl von Zellen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen eine maßgebliche Rolle spielen.

Generell lässt der Prozess sich in eine reaktive Phase, eine reparative Phase und eine Umbauphase einteilen, auf die hier aber nur kurz eingegangen werden soll [4]. Durch den Bruch kommt es zur Ruptur des lokalen Weichgewebes und der Blutgefäße, wodurch eine Entzündungskaskade ausgelöst wird. Zunächst kommt es zum Einstrom kurzlebiger polymorphonukleäre Neutrophile, gefolgt von Lymphozyten und Makrophagen [5]. Schon ab Beginn der Entzündungsphase werden Zytokine wie Interleukin-1 und -6 (IL-1, IL-6) sowie Mitglieder der *transforming growth factor β superfamily* (knochenmorphogenetischem Protein (BMP) 2,4,5,6 und 7) freigesetzt, die die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) zu Osteoblasten induzieren und auch die Angiogenese fördern [6-10]. In der reparativen Phase spielen je nach Heilungsmechanismus Osteoklasten, Osteoblastenvorläuferzellen, MSC und Monozyten eine wichtige Rolle [6, 11]. Die abschließende Umbauphase dauert mehrere Jahre. Dabei wird der Ausgangszustand des Knochens unter mechanischer Belastung von Osteoklasten und Osteoblasten wiederhergestellt [5].

Speziell in der Orthopädie und der Unfallchirurgie spielt die gestörte Knochenregeneration eine große Rolle. Hochenergetische Verletzungen z. B. durch einen Unfall können zu offenen Trümmerfrakturen führen, welche wiederum mit schweren Weichteilschädigungen einhergehen.

Bei ungefähr 10 % der Frakturen bleibt eine Heilung für länger als 6 Monate aus, was als Pseudarthrose bezeichnet wird [12].

Dabei spielen Faktoren wie die anatomische Lage der Verletzung, Trauma-Mechanismus (Hochenergie-Trauma oder Niedrigenergie-Trauma) und die Größe des Frakturspaltes eine entscheidende Rolle [13-15]. Claes *et al.* konnten zeigen, dass der Heilungsprozess ab einer Spaltgröße von über 2 mm negativ beeinflusst wird [15]. Humerus, Tibia und Femur sind für eine höhere Inzidenzen zur Ausbildung einer Pseudarthrose bekannt [16]. Diese ist mit 0-15 % bei Tibiafrakturen [17-19] am höchsten, gefolgt von Frakturen des Femurs (1–11 %) [20, 21] und des Humerus (0–13 %) [22, 23].

Weiterhin gehen etwa 13 % der Tibia Frakturen mit einer verspäteten oder ausbleibenden Heilung einher [24]. Die Inzidenz ist abhängig von der Schwere des Traumas und den Lebensumständen der Patienten [12, 25, 26]. Gründe für einen gestörten Regenerationsprozess können neben einer fehlerhaften Stabilisierung und einer kritischen Größe des Knochenbruchs vor allem Infektionen sein. Auch eine mangelnde Vaskularisierung und eine schlechte Osteogenese beeinträchtigen den Heilungsprozess maßgeblich [1, 3, 26-28].

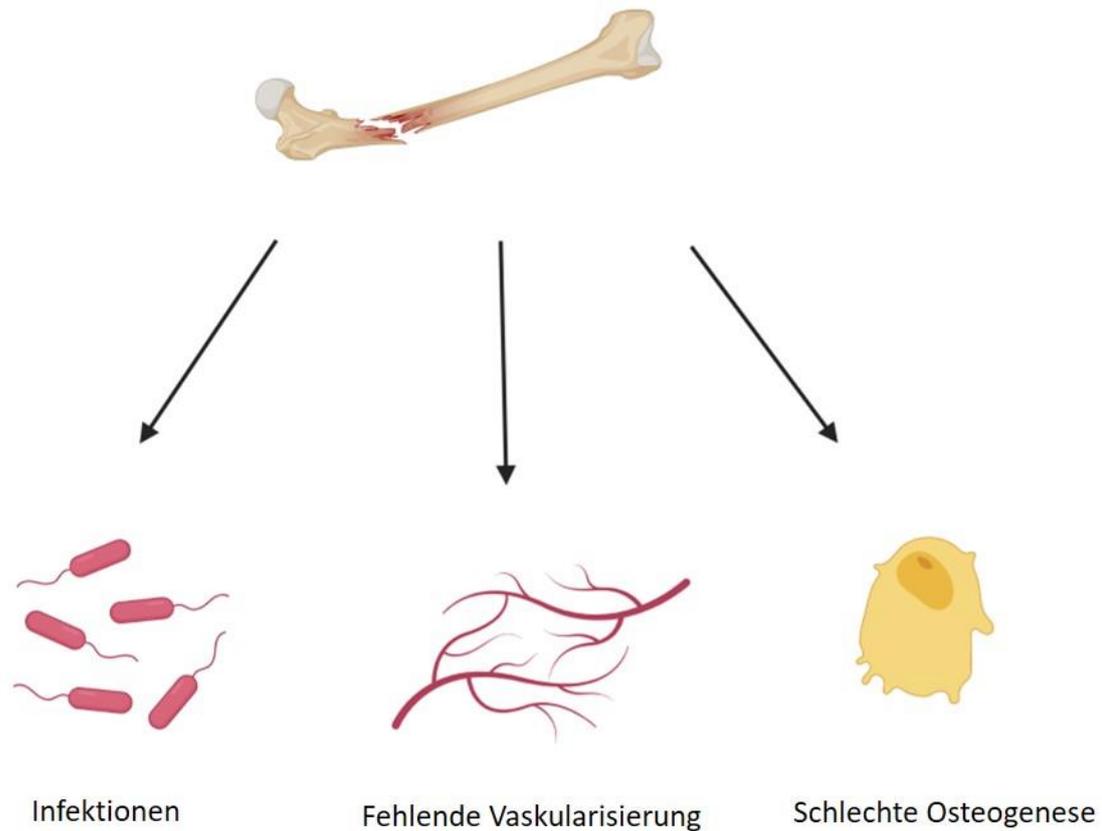


Abbildung 1: Mögliche Gründe für eine gestörte Frakturheilung (Die Grafik wurde mit Biorender.com erstellt).

1.2 Gründe für eine gestörte Frakturheilung

Infektionen stellen einen der Hauptgründe für eine gestörte Frakturheilung dar. Diese können durch eine mikrobielle Kontamination einer offenen Fraktur, oder nach einer chirurgischen Behandlung einer geschlossenen Fraktur auftreten und so zur Entstehung einer Pseudarthrose beitragen [14, 29]. Es wird geschätzt, dass die Infektionshäufigkeit bei geschlossenen Frakturen bei 0-1 % und bei offenen Frakturen zwischen 0 und 11 % liegt [27, 30].

Die Inzidenz von chronischer Osteomyelitis, einer durch Bakterien hervorgerufenen Entzündung des Knochenmarks, steigt vor allem in den Industrieländern. Als Grund hierfür wird eine Kombination verschiedener Faktoren angenommen, darunter eine gesteigerte Lebenserwartung, erhöhte Prävalenz von Traumata und eine Verbesserung in der Diagnosestellung [31]. Das Mittel der Wahl zur Behandlung solcher Infekte ist die Kombination von systemischer und lokaler Antibiotikagabe. Auf die jeweiligen Vor- und Nachteile wird in Kapitel 1.5 genauer eingegangen

Knochen stellt ein stark vaskularisiertes Gewebe dar. Dabei dienen die Blutgefäße nicht nur der Nahrungs- und Sauerstoffversorgung, sondern auch der Einwanderung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Osteoblasten sowie deren Vorläuferzellen, welche zu Osteoblasten differenzieren können [12, 32-34]. Daher liegt es nahe, dass eingeschränkte Gefäßfunktionen während eines Bruchs zu einer gestörten Frakturheilung beitragen. Die Wahrscheinlichkeit, eine Pseudarthrose auszubilden, ist hier um das Vierfache erhöht [35]. Besonders offene Frakturen gelten als großes Risiko, da mit Weichteilschäden eine gestörte Blutversorgung einhergeht [36]. Osteoblasten sind für den Knochenaufbau verantwortlich, indem sie Osteoid produzieren, welches anschließend mineralisiert wird. Diese nicht terminal differenzierten Zellen werden anschließend entweder in die Knochenmatrix als Osteozyten eingebettet oder gehen in Apoptose. Generell wird angenommen, dass die Osteogenese und die Angiogenese gleichermaßen relevant für die Knochenregeneration sind. So konnten Studien zeigen, dass die Entwicklung von Blutgefäßen und die Osteogenese gekoppelt sind. Eine fehlende oder gehemmte Angiogenese wird als einer der Hauptgründe für eine gestörte Frakturheilung bezeichnet. Hausmann *et al.* [37] konnten beispielsweise zeigen, dass es zu einer verhinderten Frakturheilung kommt, wenn Ratten mit dem Angiogenese-Inhibitor TNP-470 behandelt werden. Auch Holstein *et al.* [38] zeigten im Mausmodell einen negativen Effekt von immunsuppressivem Rapamycin (besitzt anti-angiogene Eigenschaften) auf die Frakturheilung. Auf Grundlage dessen liegt es nahe, sowohl osteogene als auch angiogene Faktoren zur Beschleunigung einer Frakturheilung zu nutzen.

1.3 Das „Diamond Concept“

Der Erfolg bei der Behandlung von Knochenbrüchen, unabhängig von Infektionen, hängt von fünf wesentlichen Faktoren ab, die als „diamond concept“ 2007 von Giannoudis *et al.* das erste Mal beschrieben und später ergänzt wurden [28, 39]. Demnach spielen neben der mechanischen Stabilisierung des Bruchs durch ein geeignetes, im besten Fall osteokonduktives Gerüst, auch biologische Faktoren eine wichtige Rolle. So ist eine gute Vaskularisierung unerlässlich, da diese das Einwandern von MSC ermöglicht, welche dann zu knochenbildenden Zellen differenzieren können. Dieser Prozess wird als Osteogenese bezeichnet. Auch die Präsenz von osteoinduktiven Wachstumsfaktoren, welche die Proliferation und Differenzierung von Stammzellen stimulieren, ist unerlässlich. Abbildung 2 zeigt die fünf Säulen des „diamond concepts“.

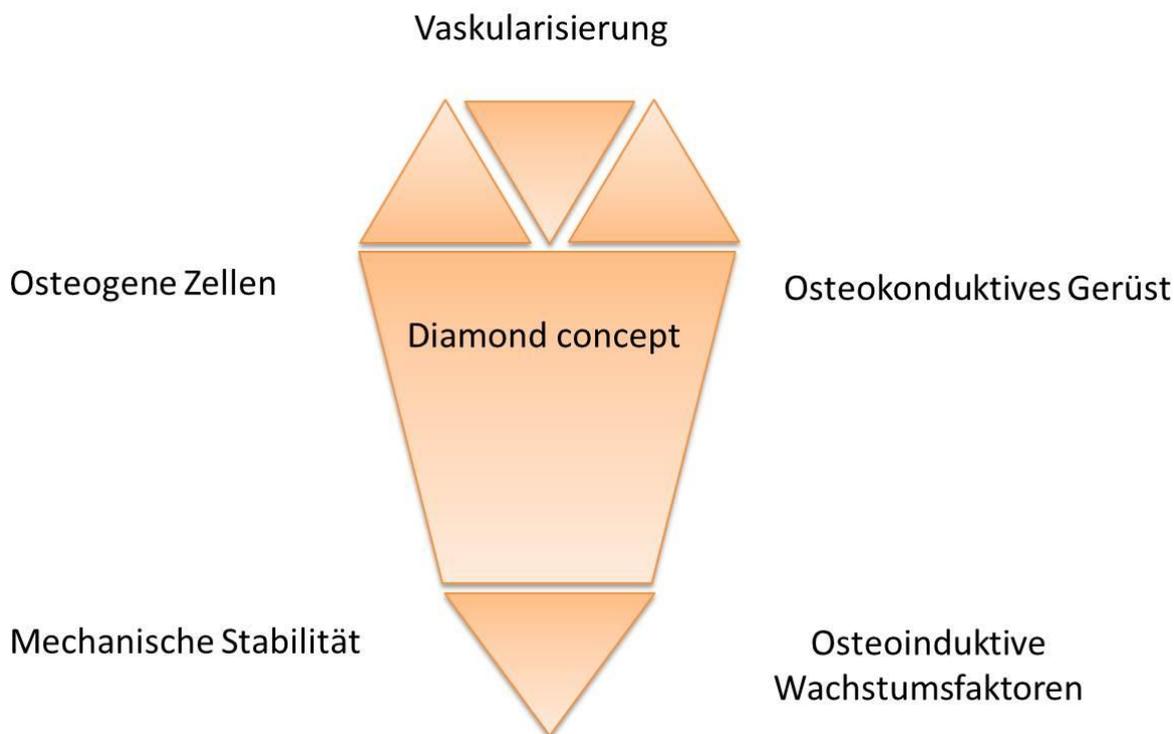


Abbildung 2: Diamond concept nach Giannoudis *et al.* zur Knochenregeneration.

1.4 Ansätze zur Behandlung von Frakturen

Den Goldstandard zur Behandlung der aufgeführten Knochendefekte stellen autologe Knochentransplante dar. Diese bieten ein osteokonduktives Gerüst, osteogene Zellen und osteoinduktive Wachstumsfaktoren [40] und entsprechen somit dem „diamond concept“. Hierbei wird Knochen an einer anderen Stelle entnommen (typischerweise Becken oder Beckenkamm) und genutzt, um den Defekt zu füllen. Dabei beträgt die Komplikationsrate 30 %, wobei die Methode zusätzlich noch andere Nachteile zeigt. Dazu gehören die Notwendigkeit einer zweiten Operation, eingeschränkte Verfügbarkeit des Knochenmaterials, Donormorbidität und das Risiko einer Infektion [1, 41] [42-45].

Einen anderen Ansatz bieten allogene Knochentransplantate, wobei es auch hier nicht vernachlässigbare Komplikationen geben kann. So besteht die Möglichkeit einer Immunantwort des Wirts auf das implantierte Fremdmaterial [46]. Außerdem kann es zur Krankheitsübertragung zwischen Spender und Empfänger kommen [47]. Die Inzidenzrate für die Übertragung einer Infektion vom Spender zum Empfänger beträgt 13 % [48].

1.4.1 Biomaterialien und Drug Delivery – ein anderer Ansatz

Eine weitere Möglichkeit zur Behandlung von Frakturen bietet der Einsatz von Biomaterialien. Diese finden ihren Anfang in den 1960er Jahren. Zu den erst genutzten Materialien zählen neben Metallen wie Titanverbindungen und rostfreiem Stahl auch synthetische Polymere (z.B. Polymethylmethacrylat) und Keramiken [49-52]. Diese Materialien sind biologisch inert, d.h. sie interagieren nur minimal mit dem umliegenden Gewebe [53]. Auch wenn sie dadurch nicht zu 100 % dem „diamond concept“ entsprechen, zeichnen sie sich doch vor allem durch ihre lange Lebensdauer und ihre hohe mechanische Stabilität aus.

Alternativen hierzu bietet die zweite Generation an Biomaterialien, zu denen sowohl synthetische als auch natürliche Materialien zählen. Diese bieten den Vorteil, dass sie nicht nur biokompatibel sind, sondern oft auch biodegradierbar. Darunter fallen natürliche wie auch synthetische Calciumphosphate, bioaktive Gläser und natürlich gewonnene Polymere wie Kollagen [54-56]. Neben der intrinsischen Biokompatibilität kann durch das Einbringen bzw. Aufbringen aktiver Biomoleküle oder Medikamente der Heilungsprozess beschleunigt werden. Dieser Ansatz wird als Drug Delivery bezeichnet und findet im klinischen Alltag vor allem in der Tumorthherapie vielseitig Anwendung, da so die Freisetzung an der betroffenen Stelle ermöglicht wird [57, 58]. Als Meilenstein zählt hier Doxil®, welches das erste von der U.S Food and Drug Administration (FDA) zugelassene Nano-Arzneimittel war und zur Behandlung von AIDS-assoziierten Kaposi-Sarkomen und Ovarialkarzinomen genutzt wird [57, 59]. Ein weiteres sehr bekanntes Beispiel ist der Nuvaring™ zur Empfängnisverhütung [57]. Dieser gibt über einen gewissen Zeitraum kleine Mengen der weiblichen Sexualhormone Etonogestrel und Ethinylestradio ins Blut ab, um so einer Schwangerschaft vorzubeugen.

1.4.1.1 Drug Delivery – ein kleiner Einschub

Drug Delivery Systeme bieten eine Vielzahl von Vorteilen gegenüber herkömmlichen Behandlungsmethoden. So können die Freisetzungsdauer verlängert, geringere Dosen eingesetzt, systemische Toxizität umgangen und die Bioverfügbarkeit besser kontrolliert werden. Außerdem besteht die Möglichkeit der Wirkstoffkombination [60] (Abbildung 3).

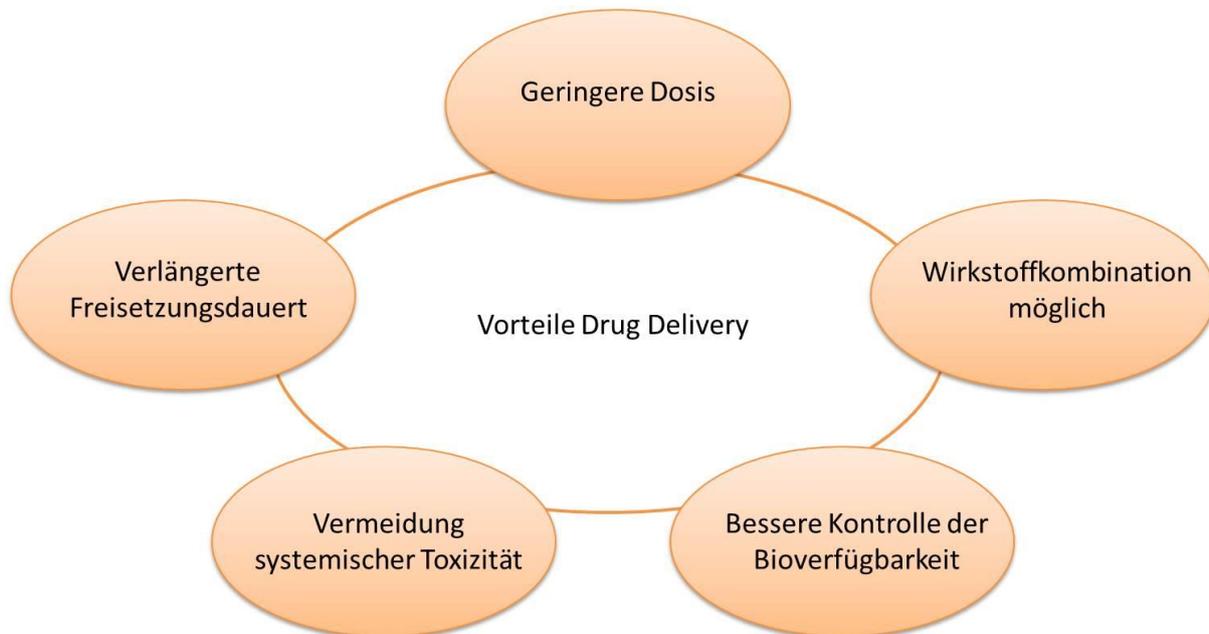


Abbildung 3: Übersicht über die Vorteile von Drug Delivery Systemen.

Drug Delivery Systeme stellen nicht nur bei der Behandlung von Tumoren einen verbesserten Therapieansatz dar. Auch bei der Knochenregeneration kann das Einbringen von Wirkstoffen oder Biomolekülen in ein entsprechendes Biomaterial zur beschleunigten Heilung führen. Um einen positiven Effekt auf den Regenerationsprozess auszuüben müssen allerdings eine Reihe von Anforderungen erfüllt werden. Die Knochenregeneration ist ein zeitlich regulierter Prozess, bei dem in jedem Abschnitt bestimmte Zellen, Wachstumsfaktoren und Zytokine miteinander wechselwirken [2, 12]. Zur Unterstützung der Heilung muss die Freisetzungskinetik der inkorporierten Biomoleküle dem des natürlichen Prozesses gleichen umso zu einer Verbesserung beitragen zu können. Das Ziel besteht hierbei darin, über eine therapeutische Zeitspanne hinweg kontinuierlich wirksame Dosen aufrechtzuerhalten.

Dabei gibt es verschiedene Wege, wie diese Moleküle an das Scaffold gebunden werden können, um die Freisetzung zu kontrollieren. Oftmals werden die Moleküle während des Herstellungsprozesses in das Material eingearbeitet, sodass es durch dessen Degradierung zur

Freisetzung kommt [61-63]. Die direkte Teilnahme am Herstellungsprozess bspw. an der Polymerisation kann dabei Einfluss auf die Aktivität nehmen. In der Orthopädie werden oft mit Antibiotika versetzte Polymethylmethacrylat (PMMA)-Knochenzemente genutzt [64]. Der Polymerisationsprozess läuft dabei exotherm ab, sodass es bei hitzeinstabilen Antibiotika zum Wirkungsverlust kommt [65].

Eine weitere Methode, mit der Biomoleküle auf das Biomaterial aufgebracht werden können, stellt die Adsorption dar. Dies ist eine einfache und schnelle Methode, welche oft einen „burst release“ (schnelle Freisetzung eines Moleküls) zeigt [66, 67]. Eine Möglichkeit hier die Freisetzung zu kontrollieren, bietet das Schichten verschiedener Materialien. Durch variable Eigenschaften und individuelle Zusammensetzung kann die Freisetzungskinetik der in den unterschiedlichen Schichten befindlichen Moleküle gesteuert und verändert werden [68-70].

Ein Drug Delivery System, welches ein Antibiotikum, einen osteogen und einen angiogen wirkenden Faktor beinhaltet kann zu einer verbesserten Knochenregeneration führen. Über die kombinierte Wirkstofffreisetzung können Infektionen vorgebeugt und die Knochen,- sowie die Blutgefäßbildung gefördert werden, wodurch eine beschleunigte Heilung stattfindet.

1.5 Behandlungsansätze zur Infektionsprävention

Infektionen der Knochen stellen neben mangelnder Angiogenese und Osteogenese eines der Haupthindernisse in der Frakturheilung dar. So können hochenergetische Verletzungen leicht zu einer Osteomyelitis führen [61], welche speziell bei großen Knochendefekten schwer zu behandeln ist. Therapiert werden solche Infektionen häufig mit systemischer Antibiotikagabe [71, 72], welche neben einer systemischen Toxizität auch noch weitere Nachteile wie einen verlängerten Krankenhausaufenthalt oder schlechte Penetration in nekrotisches Gewebe birgt [73]. Über 30 % der Patienten brechen die antimikrobielle Behandlung aufgrund von Nebenwirkungen wie Nieren- oder Lebertoxizität vorzeitig ab [31]. Durch die lokale Gabe mithilfe eines geeigneten Drug Delivery Systems können geringere Konzentrationen genutzt werden, wodurch eine verminderte Anfälligkeit zur Ausbildung von Antibiotikaresistenzbildung besteht [60, 74].

Die Infektionsprävention über das Einbringen eines Antibiotikums in ein Biomaterial wurde bereits in den 1970er-Jahren von Buchholz und Engelbrecht ins Leben gerufen und findet bis heute vielseitig Einsatz [75]. Dabei wurden nur sehr selten Fälle von systemischer Toxizität in Verbindung mit einer lokalen Antibiotikatherapie gemeldet. Die Fallberichte, die Nierenversagen

und Ototoxizität beschreiben, fallen dabei allerdings meist auf Revisionseingriffe bei älteren Menschen zurück, welche bereits im Vorfeld an Niereninsuffizienz litten [65, 76, 77].

Mit Gentamycin beladene Knochenzemente stellen das wahrscheinlich meistgenutzte Biomaterial dar. Daneben werden auch häufig beladene Calciumphosphate oder auch Hydroxyapatite genutzt [31, 78, 79]. Mit welchem Antibiotikum beladen wird und in welchen Konzentrationen ist nicht nur vom Operateur selbst und den Herstellerinformationen abhängig, sondern auch vom zu erwartenden Keim. In 80 % der Fälle wird die Osteomyelitis durch das Bakterium *Staphylococcus aureus* ausgelöst [80]. Vancomycin, ein Antibiotikum aus der Gruppe der Glycopeptide, wirkt effektiv gegen die grampositiven Bakterien, indem es den Aufbau der bakteriellen Zellwand hemmt. Aufgrund dessen ist es ein in der Orthopädie häufig eingesetztes Antibiotikum [65, 81, 82]

1.6 Drug Delivery zur verbesserten Angiogenese und Osteogenese

Generell basieren viele Drug Delivery Systeme auf der Freisetzung einzelner Wachstumsfaktoren. Dabei konnte die Studie von Kakudo *et al.* [83] zeigen, dass die duale Gabe des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), einem potenten angiogenen Faktor, und des osteogen wirkenden BMP-2 zu einem verbesserten Effekt führt. So konnte hier einer gesteigerten Knochenregeneration und Kapillardichte verglichen zu BMP-2 allein festgestellt werden. Auch konnte ein synergistischer Effekt zwischen VEGF und BMPs gezeigt werden, was zu einer signifikant verbesserten Knochenbildung und Knochenheilung führte [84, 85]. Peng *et al.* zeigten in ihre Studie beispielsweise, dass die alleinige Verwendung von VEGF nicht zu einer verbesserten Knochenregeneration führt, wohingegen der zusätzliche Einsatz von BMP-4 diese fördert [84].

Es ist allgemein bekannt, dass die Knochenregeneration mit dem Prozess der Angiogenese beginnt, gefolgt von dem eigentlichen Knochenaufbau [86]. Auf Grundlage dessen fokussieren sich verschiedene Studien auf die sequentielle Freisetzung verschiedener Wachstumsfaktoren [70, 87]. Dabei wird der angiogen wirkende Faktor über einen „burst release“ (initial sehr schnelle Freisetzung eines Moleküls) freigesetzt und der osteogen wirkende über einen „sustained release“ (retardierte Freisetzung eines Moleküls). Um eine maximal verbesserte und beschleunigte Frakturregeneration zu erzielen, soll auch in dieser Arbeit ein duales Drug Delivery System mit einem osteogen und angiogen wirkenden Molekül entwickelt werden.

Der *stromal-cell-derived factor 1 α* (SDF-1 α) und sein Rezeptor CXCR-4 spielen auf mehreren Ebenen eine wichtige Rolle bei der Frakturheilung. SDF-1 α ist bekannt dafür, eine tragende Rolle

in der Angiogenese zu spielen [88-90]. Außerdem führt es zur Mobilisierung CXCR-4+ proangiogener Zellen, welche sowohl direkte als auch indirekte proangiogene Eigenschaften besitzen. Darunter fallen neben reifen und unreifen hämatopoetischen Zellen auch Vorläufer der Endothelzellen [91]. SDF-1 α hat außerdem Einfluss auf die Aktivierung, die Migration und Proliferation von Endothelzellen [88].

Neben dem positiven Einfluss auf die Angiogenese fördert SDF-1 α auch den Einstrom von MSCs [92], welche in knochenformende Osteoblasten differenzieren. Ho *et al.* konnten an einem Defekt kritischer Größe im Rattenmodell den positiven Einfluss von SDF-1 auf die Frakturheilung zeigen [93]. Dabei wurden SDF-1 sezernierende MSCs in einen Kollagenschwamm eingesät und dieser dann in den Frakturspalt eingebracht. Anschließend konnte in der SDF-1-Gruppe eine signifikant höhere Knochenformation verglichen zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Nichtsdestotrotz ist der genaue Mechanismus zur proangiogenen Wirkungsweise von SDF-1 α noch nicht exakt geklärt.

Die zur TGF- β Superfamilie gehörenden BMPs wurden 1965 von Urist entdeckt [94]. Bis heute wurden 20 identifiziert, von denen allerdings nicht alle osteogene Eigenschaften besitzen. Dabei können die osteogen wirkenden BMPs beispielsweise die Knochenregeneration beschleunigen, indem sie die Differenzierung und Proliferation osteogener Zellpopulationen fördern [12, 95]. BMP-2 und BMP-7 stellen dabei die wohl potentesten dar. Beide sind seit 2004 bzw. 2001 von der FDA zur Anwendung im Menschen zugelassen [12]. Trotz der Zulassung gibt es auch hier noch deutlichen Verbesserungsbedarf in der Freisetzungskinetik, welche schlussendlich zu einer Reduktion der eingesetzten Menge führen kann.

Beispielsweise lässt sich aus 1 kg humanem Knochen 1 μ g BMP isolieren. Betrachtet man den Inhalt an BMP-7 in den von Stryker Biotech entwickelten Implantaten zur Behandlung von Pseudarthrosen, werden die hier verwendeten supraphysiologischen Mengen deutlich. In einem Vial zur Behandlung befinden sich 3,5 mg an rhBMP-7 was der Menge zweier kompletter humaner Skelette entspricht [96]. Durch die Verwendung solch hoher Konzentrationen steigen die Therapiekosten extrem. So lassen sich 40 % der entstandenen Kosten zur Behandlung von Pseudoarthrosen in Tibiafrakturen auf die Verwendung von BMP-7 zurückführen [97]. Diese würden sich über verbesserte Freisetzungskinetiken durch angepasste Drug Delivery Systeme reduzieren lassen.

Weiter zeigen verschiedene Studien, dass supraphysiologische Mengen an BMP zu verschiedensten Komplikationen wie erhöhtem Krebsrisiko oder heterotropher Ossifikation führen

können [98, 99]. Auch solche Nebenwirkungen könnten durch angepasste Drug Delivery Systeme umgangen werden.

Generell ist die genaue Bedeutung von BMP-7 im Regenerationsprozess noch nicht genau verstanden. Dennoch zeigen verschiedene Tiermodelle weiterhin den positiven Einfluss auf die Frakturheilung auf [100, 101].

1.7 Kollagen als Biomaterial

Wie schon erwähnt kann die Freisetzung von Biomolekülen oder Medikamenten über Schichten gleicher oder unterschiedlicher Biomaterialien kontrolliert werden. Oft werden hierfür synthetische Biomaterialien wie Poly(D,L-Lactide) und Polylactid-co-Glycolid genutzt [68, 70].

Zahlreiche synthetische Biomaterialien finden im klinischen Alltag Einsatz [102]. In Tabelle 1 sind drei Klassen von Polymeren sowie Beispiele für deren Verwendungsgebiete aufgezeigt.

Tabelle 1: Beispiele für synthetische Biomaterialien im klinischen Alltag und deren Anwendungsgebiete.

Polymer	Anwendungsgebiet
Silikone	Brustimplantate [103, 104]
	Intraokularlinse [105, 106]
Polyamide	Ballonkatheter [107, 108]
	Nahtmaterial [109, 110]
Polymethylmethacrylat	Knochenzement [81, 111]
	Dentalprothese [112, 113]

Trotz des breiten Anwendungsspektrums bergen diese Materialien eine Vielzahl von Nachteilen wie beispielsweise mangelnde Biokompatibilität und -aktivität [114, 115].

Eine bessere Alternative bieten natürliche Biomaterialien wie Alginat, Chitosan und Kollagen. Im Gegensatz zu synthetischen Biomaterialien sind diese sowohl biokompatibel als auch bioaktiv. Sie finden bereits in einem breiten Spektrum in biomedizinischen Anwendungen Einsatz. Alginat beispielsweise wird zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung im Drug Delivery, zur *in-situ*-Gelformation und als Wundauflage genutzt [116-119]. Auch Kollagen und Chitosan werden vielseitig für das Drug Delivery eingesetzt [120-123]. Dennoch bietet jedes Material für sich

eigene Vor- und Nachteile. Alginat ist für das Fehlen von Adhäsionsstellen zur Proteinadsorption und Zellanheftung bekannt, sodass dieses vor Einsatz oftmals zunächst kovalent modifiziert werden muss [124-126]. Eine Möglichkeit zur Förderung der Zelladhäsion besteht darin, Kollagen an das Alginat zu koppeln und die Zellanheftung so zu verbessern [127, 128].

Kollagen macht 20-30 % der Gesamtproteinmenge im Körper aus und ist somit das am häufigsten vorkommende Protein [129]. Es lässt sich leicht modifizieren und kann so in diversen physikalischen Formen (Pulver, Schwamm, Membran etc.) genutzt werden. In der Medizin findet es nicht nur im Drug Delivery, sondern auch als Wundauflage, Nahtmaterial oder in Kontaktlinsen Einsatz [130]. Aufgrund seiner zahlreichen Vorteile wie der guten Zell/Gewebekompatibilität und geringen Immunogenität sowie seinen vielseitigen Einsatzmöglichkeiten speziell im Knochen Tissue Engineering stellt Kollagen das optimale Biomaterial dar. [131-133].

Dennoch zeigt auch Kollagen eine Reihe nicht zu vernachlässigender Nachteile wie ein hohes Quellvermögen, zu schnelle Biodegradation und eine geringe mechanische Festigkeit [134-137].

1.8 Quervernetzung – ein Überblick

Durch Quervernetzung können die eben erläuterten Nachteile leicht umgangen werden. Weiter besteht dadurch die Möglichkeit, Kollagenmaterialien mit den Anforderungen entsprechenden Eigenschaften herzustellen [131, 138].

In der Literatur wird eine Vielzahl von Methoden zur Quervernetzung beschrieben. Dabei zeigt jeder Ansatz einen unterschiedlichen Grad an struktureller Veränderung und mechanischer Stabilität [139, 140]. Dies lässt sich auf die unterschiedlichen Vernetzungsmechanismen, Konzentrationen, Zeitspannen etc. zurückführen [136, 141, 142]. Über solche Unterschiede in den mechanischen Eigenschaften kann beispielsweise die Richtung, in welche Stammzellen differenzieren, beeinflusst werden. Engler *et al.* konnten auf kollagenbeschichteten Polyacrylamidgelen eine von der Materialsteifigkeit abhängige Differenzierungsrichtung von humanen MSCs feststellen [143]. Mit Zunahme der Steifigkeit fand eine Differenzierung in Richtung Neuronalerzellen, Muskelzellen und Knochenzellen statt. Auch Zhao *et al.* konnten eine von der Substratsteifigkeit abhängige Differenzierung humaner MSCs in Osteoblasten feststellen. Diese nahm auf Hydrogelen höherer Steifigkeit signifikant zu [144].

Zu den am häufigsten verwendeten Methoden zählen das chemische Quervernetzen mit Glutaraldehyd (GA) [145-147], mit Hexamethylendiisocyanat (HMDI) [148, 149] und mit 1 Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und N-hydroxysuccinimid (EDC/NHS) [150-

152]. Dabei stellt die Vernetzung mit GA die effizienteste Methode in der Verbesserung der mechanischen Eigenschaften dar [139]. Diese Verbesserung geht allerdings mit einer gesteigerten Zytotoxizität durch unvollständige Entfernung der toxischen Rückstände einher [153]. Die Nutzung von EDC/NHS kann diese zwar vermindert, allerdings ist der Prozess selbst sehr zeitaufwendig [154, 155].

Weiter gibt es auch die Möglichkeit der physikalischen Quervernetzung, doch auch viele dieser Ansätze benötigen eine längere Reaktionsdauer und nicht triviale Laborbedingungen wie hohe Temperaturen und ein Vakuum [156].

1.9 Photochemisches Quervernetzen als Mittel der Wahl

Ein vielversprechender Ansatz bietet das Quervernetzen mit Bengalrosa und anschließender Bestrahlung mit grünem Licht, kurz RGX. Der genaue Mechanismus dieser Vernetzungsmethode ist noch nicht vollständig verstanden. Zum einen wird angenommen, dass spezielle Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin, Histidin, Cystein und Methionin anfälliger für photochemische Vernetzung sind [157-160], und zum anderen, dass die Vernetzung unspezifisch ist [158]. Allgemein lässt sich sagen, dass die Methode auf der Ausbildung kovalenter Bindungen beruht. Trotz fehlendem Detailwissen findet photochemisches Quervernetzen mit Bengalrosa und grünem Licht bereits in einem breiten Spektrum in der Medizin Einsatz, zum Beispiel zur nahtlosen Wundversorgung [161] und zur Reparatur von Hornhautschäden [162]. Vorarbeiten konnten zeigen, dass das hohe Quellvermögen speziell bei dem in dieser Arbeit verwendeten Atelocollagen durch RGX Behandlung um 64 % reduziert werden konnte [163].

Die Kollagenvernetzung mit RGX bietet zahlreiche Vorteile, da viele kontrollierbare Parameter damit einhergehen. Dazu zählen die Konzentration des Photosensibilisators, die Laserenergie und die Leistungsdichte. Des Weiteren lässt sich die Reaktion beispielsweise durch eine Maske räumlich begrenzen.

2 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Dissertation war die Entwicklung neuartiger mehrschichtiger Biomaterialien bestehend aus Kollagen zur verbesserten und beschleunigten Frakturheilung. Diese sollen durch das Einbringen einer definierten Konzentration eines antimikrobiellen Medikaments (Vancomycin), eines osteogen (BMP-7) sowie angiogen (SDF-1 α) wirkenden Faktors gewährleistet werden. Aufgrund der zahlreichen Vorteile gegenüber herkömmlicher Vernetzungsmethoden erfolgte die Herstellung der sogenannten Kollagenlamine über photochemische Quervernetzung mit Bengalrosa und grünem Licht (RGX). Der Schichtaufbau sowie die Zusammensetzung ermöglichten dabei die Einstellung der mechanischen Eigenschaften und dadurch gleichzeitig die Stabilität der Lamine. Abbildung 4 gibt einen Überblick über diesen Herstellungsprozess und die Wirkungsweise, über die Lamine zu einer verbesserten Frakturheilung führen sollen.

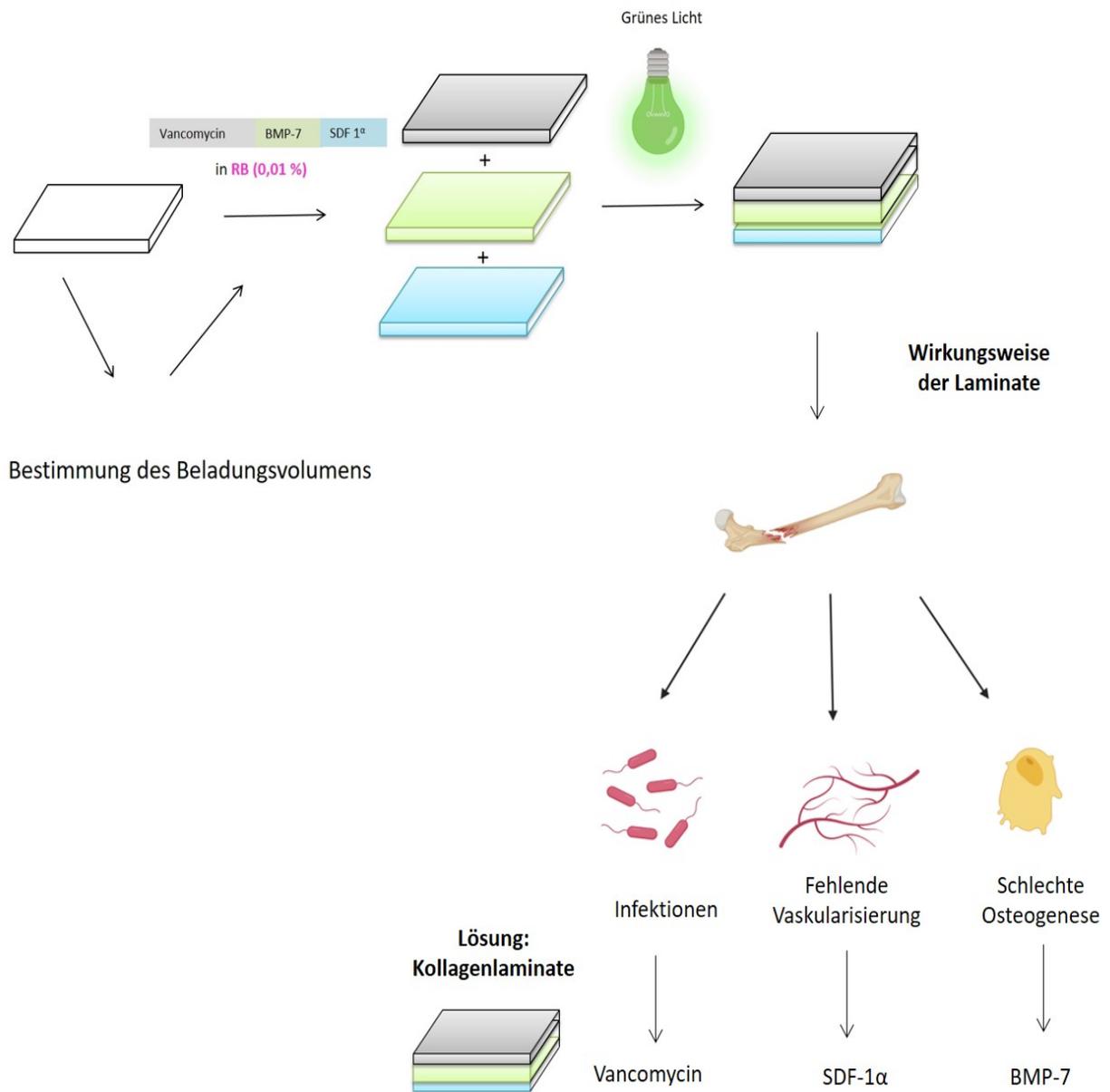


Abbildung 4: Überblick über den Herstellungsprozess und die Wirkungsweise der Lamine. Über die Beladungsvolumina lassen sich definierte Konzentrationen an Biomolekülen (gelöst in RB) auf die Kollagene aufbringen, bevor diese anschließend zusammen quervernetzt werden. Die Lamine sollen mithilfe von Vancomycin Infektionen vorbeugen. Mithilfe von SDF-1 α soll die Angiogenese und mit BMP-7 die Osteogenese verbessert werden (Die Grafik wurde mithilfe von Biorender.com erstellt).

Um solche funktionsfähigen Lamine zu entwickeln, musste zunächst eine Reihe verschiedener Fragestellungen beantwortet werden:

Der erste Teil beschäftigte sich dafür ausgiebig mit der Evaluation der Toxizität von Vancomycin:

- Einen der Hauptgründe für eine gestörte Frakturheilung stellen Infektionen dar. Aufgrund dessen soll Vancomycin in eine der Schichten der Kollagenlamine eingebracht werden. Hierzu musste zunächst die minimale Hemmkonzentration verschiedener *Staphylococcus aureus*-Stämme bestimmt werden.
- Aufgrund des angestrebten klinischen Einsatzes und den damit einhergehenden veränderten Umgebungsbedingungen (z. B. Blutfluss) ist davon auszugehen, dass für die spätere Anwendung höhere Konzentrationen als die zuvor bestimmte *in vitro*-Menge nötig sind. Da der Einsatz von Vancomycin keinen negativen Einfluss auf die Frakturheilung nehmen soll, wurden zunächst verschiedene Vancomycin-Konzentrationen hinsichtlich ihrer Toxizität auf die Viabilität sowie die Funktionalität verschiedener, an der Knochenregeneration beteiligter Zellen untersucht (Abbildung 5).

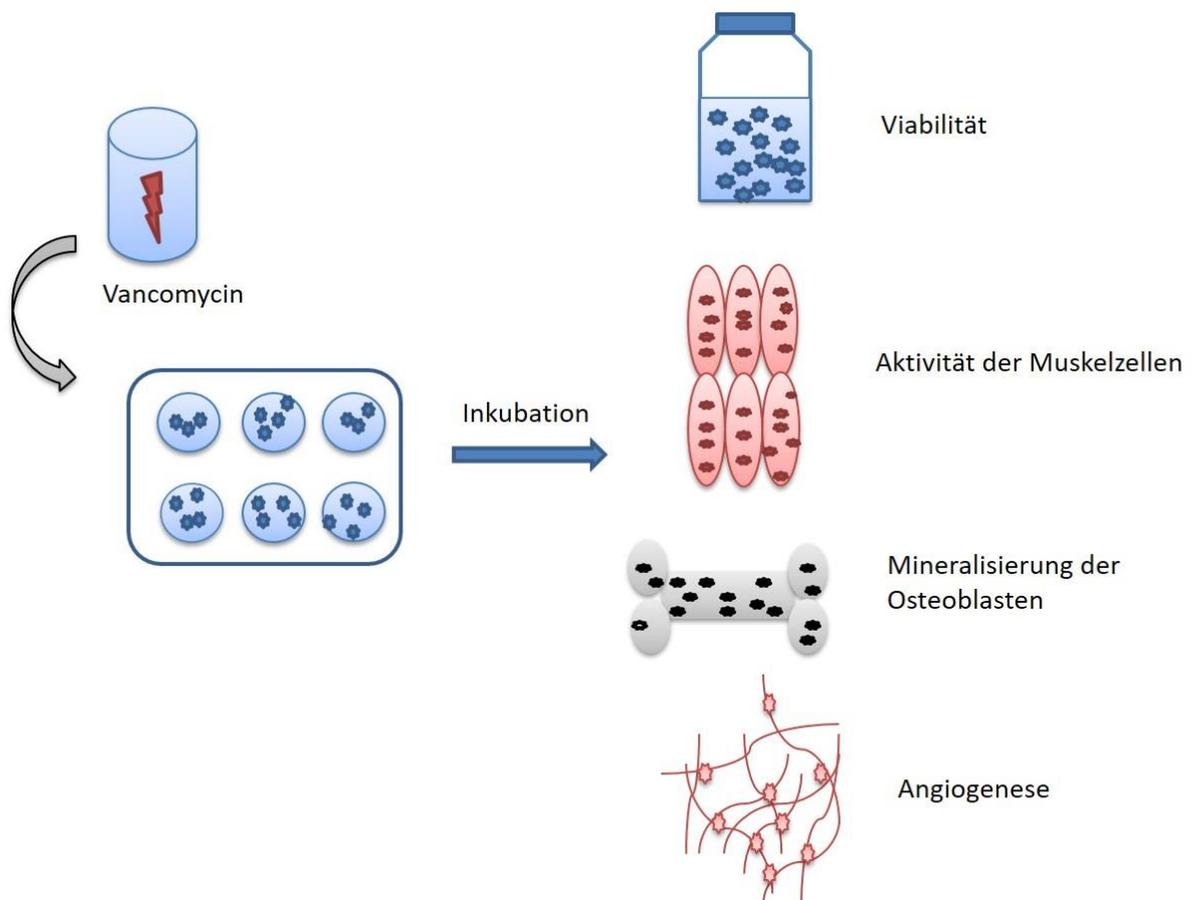


Abbildung 5: Überblick über die Untersuchungen, welche zur Bestimmung der Toxizität von Vancomycin durchgeführt wurden.

Der zweite Teil beschäftigte sich mit der Entwicklung der Kollagenlamine. Abbildung 6 gibt einen Überblick über die dafür vorgesehenen Arbeitspakete.

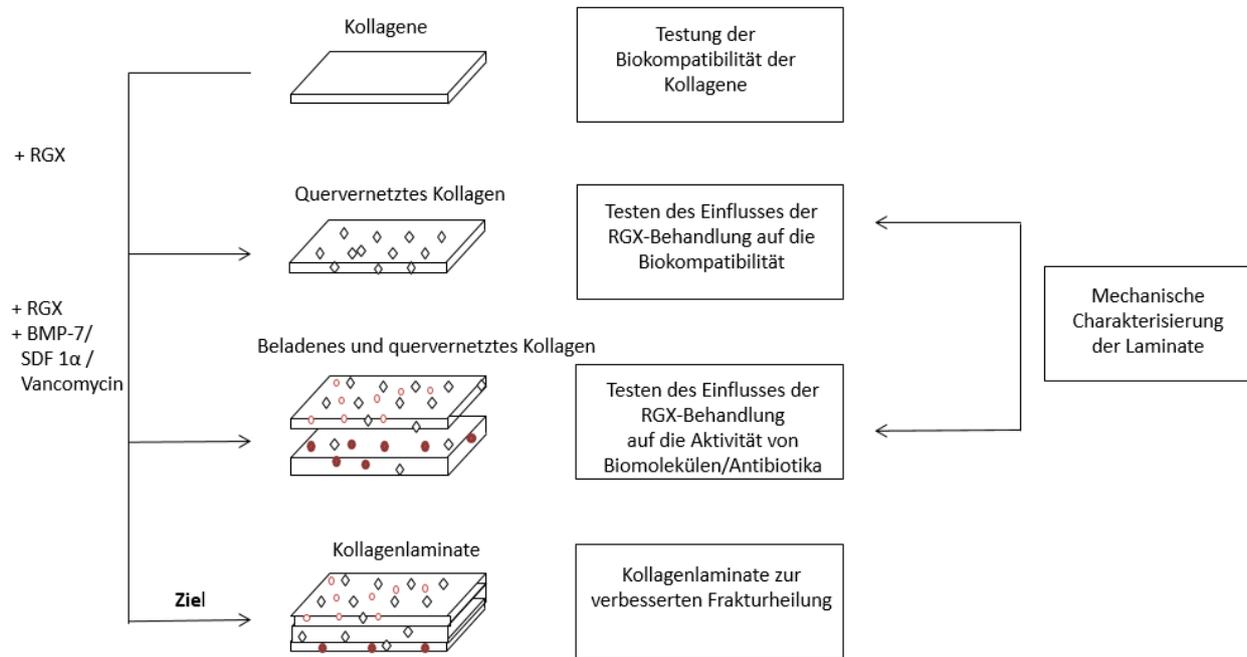


Abbildung 6: Überblick über die einzelnen Arbeitspakete und Entwicklungsschritte der Kollagenlamine.

- Um optimale Umgebungsbedingungen für die beteiligten Zellen zu schaffen, mussten die käuflich erworbenen Kollagene zunächst auf ihre Biokompatibilität getestet werden. Außerdem erfolgte die Herstellung der Lamine mittels photochemischer Quervernetzung, sodass hier verschiedene Parameter evaluiert und optimiert werden mussten.
- Da Vancomycin, BMP-7 sowie SDF-1 α direkt am Vernetzungsprozess teilnehmen, musste deren Aktivität nach der RGX-Behandlung gewährleistet sein und entsprechend getestet werden.
- Da über das Schichten der Kollagene Lamine mit definierten mechanischen Eigenschaften hergestellt werden sollen, wurden diese hinsichtlich ihrer Zellstabilität und verschiedener mechanischer Kennwerte untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Im folgenden Abschnitt werden die in der Arbeit verwendeten Materialien aufgeführt.

3.1.1 Verwendete Kollagene

In Tabelle 2 werde die in der Arbeit verwendeten Kollagene aufgeführt.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Kollagene

Kollagene	Hersteller
Atelocollagen Schwamm	CLS-01, Koken Co. Ltd., Tokyo, Japan
Collagen Solutions Non-Perforated Film Sample	Collagen Solutions, Ltd., Glasgow, UK
Kollagen Membran 140 μ 10 x 10	Viscofan BioEngineering, Weinheim, Deutschland

3.1.2 Verwendete Zelllinien

In Tabelle 3: werden die in der Arbeit verwendeten Zelllinien aufgeführt.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Zelllinien

Zellen	Hersteller
Humane Bone osteosarcoma cell line (SaOS-2)	ATCC, Manassas, USA
Human Vein Endothelial Cells (HUVEC)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Normal human dermal fibroblasts (NHDF)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Mausfibroblasten (L929)	ATCC, Manassas, USA

3.1.3 Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze

In Tabelle 4 werden die in der Arbeit verwendeten Zellkulturmedien sowie deren Zusätze aufgeführt

Tabelle 4: Liste der verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze

Zellkulturmedien/Zusätze	Hersteller
Accutase®Solution	Sigma-Aldrich ® GmbH, St. Louis, USA
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich ® GmbH, St. Louis, USA
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich ® GmbH, St. Louis, USA
Dexamethason	Sigma-Aldrich ® GmbH, St. Louis, USA
DMEM/F-12(1:1)(1x) + GlutaMAX™ -I	Gibco® Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, USA
Endothelial Cell Growth Medium MV	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Human Basis Fibroblast-Growth Factor	BPS Bioscience, San Diego, USA
Penicilin-Streptomycin Solution Hybri-Max™	Sigma-Aldrich® GmbH, St. Louis, USA
Pferdeserum	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Supplement Mix, Endothelial Cell Growth Medium MV	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trypsin/EDTA Solution; 0,25 %/0,02 %	Bio-Rad Laboratories, INC., Hercules, USA

3.1.4 Verwendete Materialien für die Mikrobiologie

In Tabelle 5 werden die in der Arbeit verwendeten Materialien für die Mikrobiologie aufgeführt.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Materialien für die Mikrobiologie

Materialien	Hersteller
0,5 Mc Farland Standard	Carl-Roth® GmbH, Karlsruhe, Deutschland
BD BBL™ Prepared Plate Media: Trypticas™ Soy Agar	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Müller Hinton Agar	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, Deutschland
Thermo Scientific™ Culti-Loops™ <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. Aureus ATCC®6538P™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Thermo Scientific™ Culti-Loops™ <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. Aureus ATCC®29213™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Thermo Scientific™ M.I.C Evaluator- Teststreifen (M.I.C.E.™) für Vancomycin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

3.1.5 Verwendete Chemikalien

In Tabelle 6 werden die in der Arbeit verwendeten Chemikalien aufgeführt.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
AlamarBlue® cell viability reagent	Gibco® Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, USA
AlamarBlue® cell viability reagent	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland

Chemikalien	Hersteller
Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP) Liquid Substrate System for ELISA	Sigma-Aldrich® GmbH, St. Louis, USA
Bovine Serum Albumin (30 %)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Collagen Type I, Rat tail, 3,59 mg/mL	Corning®, Discovery Labware, Amsterdam, Niederlande
Collagenase Type I	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA
Collagenase Type II	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO) Hybrid-Max	Sigma-Aldrich® GmbH, St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (ohne CaCl ₂ und MgCl ₂)	Sigma-Aldrich® GmbH, St. Louis, USA
Fluorometric Cell Viability Kit I	PromoKine, Heidelberg, Deutschland
Hoechst Färbelösung	Sigma-Aldrich® GmbH, St. Louis, USA
Human BMP-7 research grade	Milteny Biotec B.V. Co. KG, Bergisch Glatbach, Deutschland
Human SDF-1 α	Peprtech Inc., Rocky Hill, USA
Isopropanol	Carl-Roth® GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Matrigel	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Methanol	Carl-Roth®GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NaCl 0,9 % Spüllösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Chemikalien	Hersteller
Paraformaldehyd	Gibco® Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, USA
p-Nitrophenol Standard Solution 10mM	Sigma-Aldrich® GmbH, St. Louis, USA
Bengalrosa	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	Sigma-Aldrich® GmbH, St. Louis, USA
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich® GmbH, St. Louis, USA
Trypanblau, Trypan Blue Stain (0,4%)	Gibco® Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, USA
Vancomycin Hydrochloride	Carl-Roth® GmbH, Karlsruhe, Deutschland

3.1.6 Verwendete Antikörper

In Tabelle 7 werden die in der Arbeit verwendeten Antikörper aufgeführt.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Hersteller
Alexa-Fluor 488® goat antimouse IgG (H+L), A11001	Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, USA
Skeletal Muscle Myosin (F59): sc-32732	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA

3.1.7 Verwendete Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 8 werden die in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Einmalpipetten COSTAR®, 2 mL/5 mL/10 mL/25 mL	Corning Inc., Corning, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße, 0,5 mL/1,5 mL/2 mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplatte, 96 Well, F-bottom	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Nalgene® Kyroröhrchen	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA
Pasteurpipetten 150 mm/230 mm	Carl-Roth®GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen TipOne® 10 µL/200 µL/1000 µL	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
Spritzen Discard™ II, 5 mL/ 10mL	Becton Dickinson S.A., Fraga, Spanien
Sterilfilter, 70 µm Nylon Filter	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Zellkulturflasche, 25cm ² /75cm ² /175cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturplatte, Cellstar® 6 Well/24 Well/48 Well/ 96 Well	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellzählkammer, Luna™ Cell Counting Slide	Nexcelom Bioscience LLC, Lawrence, USA

3.1.8 Verwendete Geräte

In Tabelle 9 werden die in der Arbeit verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 9: Liste der verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller
5804 R, 5810 R, 5415 C, Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Autoklav Systec DX-45	Systec GmbH, Wettengel, Deutschland
Compact Power Meter Console PM100A	ThorLabs, Newton, USA
Eismaschine, 083817	ZIEGRA Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland
EVOS® Digital Inverted Microscope	Life Technologies, Carlsbad, USA
Faserzugmodul	Kammrath & Weiss GmbH, Schwerte, Deutschland
GloMax® Multidetektion System	Promega, Madison, USA
Heißluftsterilisator: Typ FD 115	WTC-Binder, Tuttlingen. Deutschland
Höhenmeßgerät, DIGMAR CX1	Hoffmann Group, München, Deutschland
Inkubator, HERAcell 240	Heraeus Thermo Scientific, Waltham, USA
Inkubator, B6 Function Line	Heraeus Thermo Scientific, Waltham, USA
Kryoboxen, Cyro 1C	NUNC International, Rochester, USA
Lext OLS5000 3D Laser-Scanning-Mikroskop	Olympus, Tokio, Japan
Mikroliterpipetten, 10 µL, 200 µL, 1000 µL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mounted LED M56L3, 565 nm, 800 mW, 1000 mA	ThorLabs, Newton, USA
Schieblehre	Orthland, Guangdong, China
Sicherheitswerkbank, NuAIRE™ Biological safety cabinets, NU-440-600E, class II	NuAire, Plymouth, USA

Geräte	Hersteller
Standard Photodiode Power Sensor, S120VC, SI, 200-1100 nm, 50mW	ThorLabs, Newton, USA
Stickstofftank, Container, Argpeg 110	Air Liquide S.A., Paris, Frankreich
Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
Waage SI-234	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad E100	LAUDA Scientific GmbH, Lauda Königshofen, Deutschland
Cell Counter, Luna™ automated cell counter, L1001	Nexcelom Bioscience LLC, Lawrence, USA

3.1.9 Verwendete Software

In Tabelle 10 wird die in der Arbeit verwendete Software aufgeführt.

Tabelle 10: Liste der verwendeten Software

Software	Hersteller
Endnote X9	Clarivate, London, UK
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ	Open Source, Entwickler: Wayne Rasband
SPSS Statistics Software Version 24	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland

3.2 Methoden

Im Folgenden werden die in der Arbeit genutzten Methoden beschrieben.

3.2.1 Zellkulturen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank. Sofern nicht schon steril geliefert, wurden alle angesetzten Lösungen vor Verwendung steril filtriert.

In der Arbeit wurde mit den Zelllinien NHDF (humane Fibroblasten), SaOS-2 (humane Osteosarkom-Zelllinie), L929 (Mausfibroblasten) sowie mit den folgenden primären Zellen gearbeitet: humane Osteoblasten (hOB) (aus Knochen isoliert), humane Myoblasten (SkMc) (aus Muskelgewebe isoliert) und den *human umbilical vein endothelial* Zellen (aus Nabelschnur isoliert). Die verwendeten Medien sind in Tabelle 11 aufgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂.

Bei ca. 80 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Medium abgenommen, mit PBS gewaschen und 3-5 min mit 2 mL Acctuase inkubiert. Die Reaktion wurde mit 6 mL Medium abgestoppt und ein Teil der Zellen in eine neue Kulturflasche überführt.

Tabelle 11: Liste der für die verschiedenen Zellen genutzten Medien

Zellen	Medium
NHDF	DMEM/F-12(1:1)(1x) + GlutaMAX™ -I + 10 % FCS + 1 % PenStrep
SaOS-2	DMEM/F-12(1:1)(1x) + GlutaMAX™ -I + 10 % FCS + 1 % PenStrep
HUVEC	Endothelial Cell Growth Medium MV + Supplement Mix (Endothelial Cell Growth Medium MV)
hOB	<u>Wachstumsmedium:</u> DMEM/F-12(1:1)(1x) + GlutaMAX™ -I + 10 % FCS + 1 % PenStrep <u>Differenzierungsmedium:</u> DMEM/F-12(1:1)(1x) + GlutaMAX™ -I + 10 % FCS + 1 % PenStrep + 3,5 mM β- Glycerophosphat + 10 ⁻⁸ M Dexamethason + 50 μg/mL Ascorbinsäure
L929	DMEM/F-12(1:1)(1x) + GlutaMAX™ -I + 10 % FCS + 1 % PenStrep
SkMc	<u>Wachstumsmedium</u> DMEM/F-12(1:1)(1x) + GlutaMAX™ -I + 10 % FCS + 1 % PenStrep + 2,5 ng/mL bFGF <u>Differenzierungsmedium:</u> DMEM/F-12(1:1)(1x) + GlutaMAX™ -I + 1 % PenStrep + 5 % Pferdeserum (Kulturflasche wurde 1h mit Kollagen (1:100) Beschichtet (Stock 3,59 mg/mL))

3.2.1.1 Isolierung primärer humaner Osteoblasten

Die Isolierung primärer humaner Osteoblasten erfolgte nach einem etablierten Verfahren aus Knochenfragmenten, welche ansonsten als Überschussmaterial einer Hüftoperation verworfen worden wären [164, 165]. Seitens der Patienten lag eine Einverständniserklärung vor. Zudem besteht eine Übereinkunft der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz mit der Universitätsmedizin Mainz. Nachdem die Fragmente von Faser-, Blut- und Gefäßresten befreit wurden, wurde sie in 3–4 mm große Stücke zerkleinert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Knochenfragmente mit Kollagenase Typ I für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden zwei bis drei Fragmente in eine 6-Well-Platte überführt und mit Medium inkubiert. Dabei fand zwei Mal pro Woche ein Medienwechsel statt. Bei Konfluenz der 6-Well-Platte wurden die Zellen in eine Kulturflasche überführt.

3.2.1.2 Isolierung primärer humaner Myoblasten

Die Isolierung der primären humanen Myoblasten erfolgte aus Skelettmuskelgewebe aus der Lendenwirbelsäule und war Überschussmaterial aus Wirbelsäulenoperationen. Wie auch bei den primären humanen Osteoblasten lag seitens der Patienten eine Einverständniserklärung vor. Außerdem besteht auch hier eine Übereinkunft zwischen der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz und der Universitätsmedizin Mainz.

Bevor die Muskelprobe in 1mm² große Fragmente zerteilt wurde, wurden das Perimysium, der Zelldebris und das unspezifische Gewebe entfernt. Nachdem diese gewaschen wurden, wurden die Muskelfragmente für 1 h unter Rühren im Wasserbad bei 37 °C mit Kollagenase Typ II inkubiert (470 U/ml in DMEM/F-12). Anschließend wurde zentrifugiert (7 min, 1600 rpm) und der Überstand verworfen, bevor für 20 min im Wasserbad mit Trypsin/EDTA (0,25 %/0,02 %) inkubiert wurde. Zur Beendigung der Trypsinierung wurde Medium zugegeben, anschließend fand eine Filtration der Zellsuspension mit einem 70 µm Zellsieb statt. Daraufhin wurde zentrifugiert (1400 rpm, 5 min), resuspendiert und die Zellen in einem Kulturgefäß für 2 h im Brutschrank inkubiert. Dies sollte zu einer Aufteilung zwischen Fibroblasten und den Myoblasten führen, da erst genannte auf dem unbeschichteten Kulturboden adhäreren. Nach Ablauf der 2 h wurde das Medium in ein kollagenbeschichtetes Kulturgefäß überführt.

3.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die mithilfe von Accutase abgelösten Zellen in Medium aufgenommen und zentrifugiert (1400 rpm für 5 min, außer HUVEC hier 220 x g für 3 min). Das Zellpellet wurde in 1 mL Medium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mithilfe des Luna™ Automated Cell Counter. Hierfür wurden 10 µL einer 1:2 Verdünnung aus Zellsuspension und Trypanblau (0,4 %) in eine dafür vorgesehene Zählkammer pipettiert und anschließend die Zellzahl bestimmt.

3.2.1.4 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden diese mit 2 mL Accutase gelöst und zentrifugiert. Nach Abnahme des Mediums erfolgte die Aufnahme des Zellpellets in 1 mL Einfriermedium (10 % DMSO in FCS). Nach 24 h bei -80 °C wurden die Zellen bei -180 °C kryokonserviert.

3.2.2 Toxizität von Vancomycin

Zur Bestimmung der potentiellen Toxizität von Vancomycin wurden NHDF, SaOS-2, HUVECs, hOBs sowie SkMc mit dem Antibiotikum über verschiedene Zeiträume kultiviert. Hierfür wurde zunächst eine Stocklösung von 100 mg/mL Vancomycin in Wasser angesetzt und diese dann steril filtriert. Anschließend wurden die einzelnen Verdünnungen (2, 1, 0,5, 0,2, 0,1 und 0,01 mg/mL) in den jeweiligen Kulturmedien hergestellt.

3.2.2.1 Viabilitätsassay

Zur Bestimmung der Viabilität der Zellen unter Einfluss von Vancomycin wurde ein alamarBlue® Assay durchgeführt. Hierzu wurden in eine 48-Well-Platte $2,5 \times 10^3$ Zellen/Well ausgesät und je 500 µL der verschiedenen Vancomycin-Verdünnungen zugegeben. Als Kontrolle diente das Medium ohne Vancomycin. Die Durchführung des Assays erfolgte an den Tagen 1, 3, 5, und 10 mit einem Wechsel des Antibiotikums alle 4 Tage. Hierzu wurde das Medium abgesaugt bzw. abgenommen und aufbewahrt, 320 µL einer 1:10 Verdünnung des alamarBlue® Reagenz zugegeben und für 4 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit erfolgte die Messung der Absorption in Triplikaten (je 100 µL in einer 96-Well Platte) bei 560/600 nm. Der Versuch wurde zweimal mit verschiedenen Spendern bzw. Passagen im Triplikat durchgeführt.

3.2.2.2 Angiogeneseassay

Der Einfluss von Vancomycin auf die *in vitro*-Angiogenese von HUVECs wurde mithilfe eines Angiogeneseassays durchgeführt. Hierzu wurde Matrigel zunächst für 2 h auf Eis aufgetaut, bevor 50 µL einer 1:2 Vermengung aus Matrigel und Zellsuspension (5×10^4 HUVECs/Well) in eine 96-Well-Platte pipettiert wurden. Die Polymerisation erfolgte bei 37 °C im Inkubator für 30 min. Anschließend wurden 150 µL der Vancomycin-Verdünnungen in jedes Well gegeben und nach 24 h Inkubation mithilfe des EVOS® Digital Inverted Microscope mikroskopiert. Von jeder Konzentration wurden fünf Aufnahmen gemacht, welche mithilfe von ImageJ und des Angiogenese Analyzer von Gilles Carpentier quantifiziert wurden [166]. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.

3.2.2.3 Immunfluoreszenz

Um den Effekt von Vancomycin auf die Differenzierung primärer Muskelzellen zu bestimmen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen auf einer mit Kollagen beschichteten 24-Well-Platte inkubiert. Nachdem eine Konfluenz von 80% erreicht war, wurde das Medium durch Differenzierungsmedium (mit und ohne Vancomycin) ersetzt. Nach 5 Tagen Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 20 min mit eiskaltem Methanol fixiert. Nach einem weiteren Waschschriff, bei dem 20 min mit PBS inkubiert wurde, wurden 300 µL des 1. Antikörpers (skeletal muskel Myosin (F59) anti Maus, 1:200 in 0,5% BSA/PBS) pipettiert und ü. N. inkubiert. Anschließend folgte ein weiterer Waschschriff mit 0,5 % BSA/PBS bevor 300 µL des 2. Antikörpers (Alexa 488 goat anti-Maus IgG 1:200 in 0,5 % BSA/PBS) pipettiert und für 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert wurden. Nach zwei weiteren Waschschriffen erfolgte die Zugabe von 300 µL Hoechst-Färbelösung und eine 15 min Inkubationsperiode. Anschließend wurde mithilfe des EVOS® Digital Inverted Microscope mikroskopiert. Der Versuch wurde dreimal mit verschiedenen Spendern im Duplikat durchgeführt.

3.2.2.4 Alkalische Phosphatase Aktivität

Zur Bestimmung des Einflusses von Vancomycin auf die Mineralisierungskapazität von humanen Osteoblasten wurde ein Assay zur Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) durchgeführt. Hierzu wurden die Osteoblasten in Wachstumsmedium bis zu 80 %-iger Konfluenz in einer 48-Well-Platte gehalten, bevor das Medium gegen Differenzierungsmedium mit und ohne Vancomycin getauscht wurde. Der Assay fand an Tag 5 nach Medienwechsel statt. Hierzu wurde zunächst mit PBS gewaschen, bevor zur Zellyse für 30 min 250 µL 0,1 % Triton X-100 (in aqua

bide.) zugegeben wurde. Anschließend wurden 200 μL p-Nitrophenylphosphat in jedes Well pipettiert, 30 min bei 37 °C inkubiert und die Reaktion mithilfe von 50 μL 5 M NaOH abgestoppt. Die Messung der Absorption erfolgte in Triplikaten (je 100 μL in einer 96-Well-Platte) bei 405/600 nm. Zur Quantifizierung wurde eine Kalibriergerade aus einem 10 mM p-Nitrophenol Standard hergestellt. Der Versuch wurde dreimal mit verschiedenen Spendern im Duplikat durchgeführt.

3.2.3 Kollagenpräparation

Im folgenden Abschnitt wird die Handhabung sowie die Quervernetzung und Herstellung der Kollagenlamine beschrieben.

3.2.3.1 Präparation der Kollagene für die Zellkultur

Alle in der Zellkultur genutzten Kollagene wurden in Kreise mit einem Durchmesser von 1 cm geschnitten und UV-sterilisiert. Hierzu wurden die Sheets zunächst für 2 h in PBS gequollen und im Anschluss für 45 min mit UV-Licht (230 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) unter der Sicherheitswerkbank bestrahlt. Die feuchten Sheets wurden anschließend in die jeweilige Well-Platte platziert und über Nacht (ü. N.) unter der Sicherheitswerkbank für die weiteren Versuche getrocknet.

3.2.3.2 Quervernetzung der Kollagene

Das Quervernetzen der Kollagene sowie die Herstellung der Lamine erfolgten mit Bengalrosa (RB) und anschließender Bestrahlung mit grünem Licht (RGX). Hierzu wurden die Kollagene mit 0,01 % bzw. 0,1 % RB (in PBS) für 2 h gequollen. Das Volumen an RB entsprach dabei 100 % des Quellvolumens für das jeweilige Kollagen. Dieses wurde von den Kooperationspartnern an der Technischen Universität in Darmstadt zuvor für jede Charge bestimmt [163]. Nach Ablauf der Quellzeit fand das Quervernetzen mit grünem Licht für 10 bzw. 60 min. statt. Zur Herstellung der Lamine wurde nach zweistündiger Quellung noch eine zusätzliche Schicht von 20 μL RB (bezogen auf 1 x 1 cm^2) auf die Kollagene gegeben und diese dann anschließend aufeinander platziert. Abbildung 7 gibt eine Übersicht zur Vorbereitung und Herstellung der Kollagene und deren Lamine für die Zellkultur.

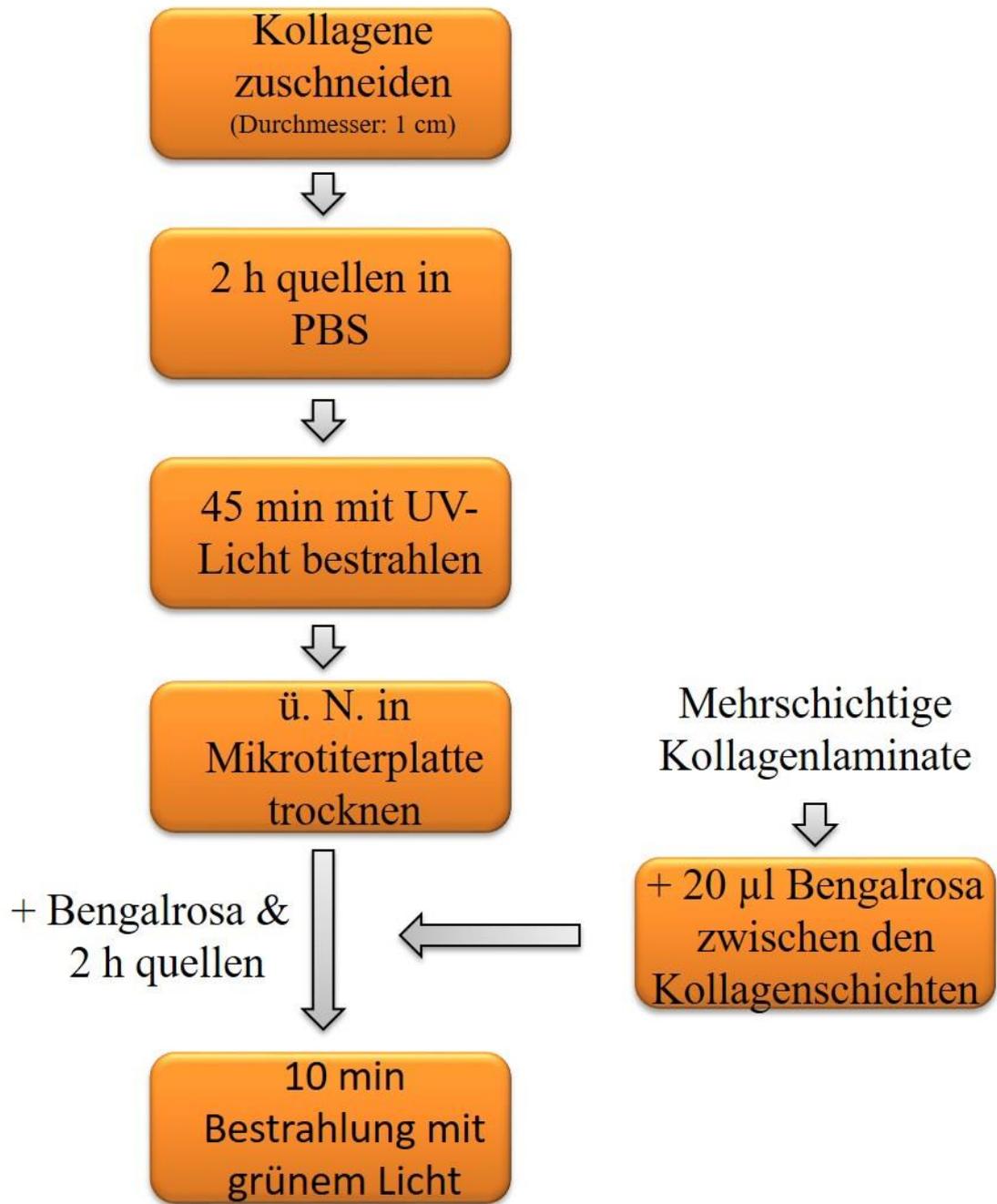


Abbildung 7: Übersicht zur Vorbereitung und Herstellung von einzelschichtigen Kollagenen sowie von Kollagenlaminaten für die Zellkultur.

3.2.4 Kollagenuntersuchungen

Die Kollagene wurden hinsichtlich verschiedener Parameter, welche in Tabelle 12 aufgeführt sind, auf ihre Biokompatibilität untersucht.

Tabelle 12: Übersicht über die Untersuchungen, welche bezüglich der Biokompatibilität der Kollagene durchgeführt wurden

Untersuchung	Kollagene	Zellen
Einfluss der Kollagene selbst auf die Zellviabilität	C, A, V	hOB, SkMc
Einfluss der Bengalrosakonzentration auf die Zellviabilität	C	NHDF, hOB
Einfluss der Belichtungsdauer auf die Zellviabilität	C	hOB, SkMc
Einfluss der Quervernetzung auf die Zellviabilität	C,A,V	hOB, SkMc

Die Testung erfolgte mit dem in Abschnitt 3.2.2.1 beschriebene alamarBlue® Assay an Tag 1, 3, 7 und 10. Für die Untersuchungen den Einfluss der Kollagene selbst, die Belichtungsdauer und die Quervernetzung betreffend wurde die Absorption gemessen, und für den Einfluss der Bengalrosakonzentration die Fluoreszenzintensität (Extinktion 525 nm; Emission 580-649 nm). Die Versuche wurden dreimal mit verschiedenen Spendern bzw. verschiedenen Passagen im Duplikat durchgeführt.

3.2.4.1 Einfluss der Laminatausrichtung auf die Zellviabilität

Um den Einfluss der Ausrichtung der Lamine in den Mikrotiterplatten auf hOB zu untersuchen, wurde ein alamarBlue® Assay durchgeführt. Hierzu wurden zunächst heterologe Bilayerlamine aus A und C hergestellt. Dabei wurden jeweils Duplikate genutzt, bei denen entweder C in indirektem Kontakt zu den Zellen stand (fixiert am Boden der Mikrotiterplatte) oder A (siehe Abbildung 8). Anschließend wurden $7,5 \times 10^3$ Zellen/Well pipettiert und an Tag 3 die Fluoreszenz (Extinktion 525 nm; Emission 580-649 nm) gemessen. Der Versuch wurde dreimal mit verschiedenen Spenderzellen im Duplikat durchgeführt.

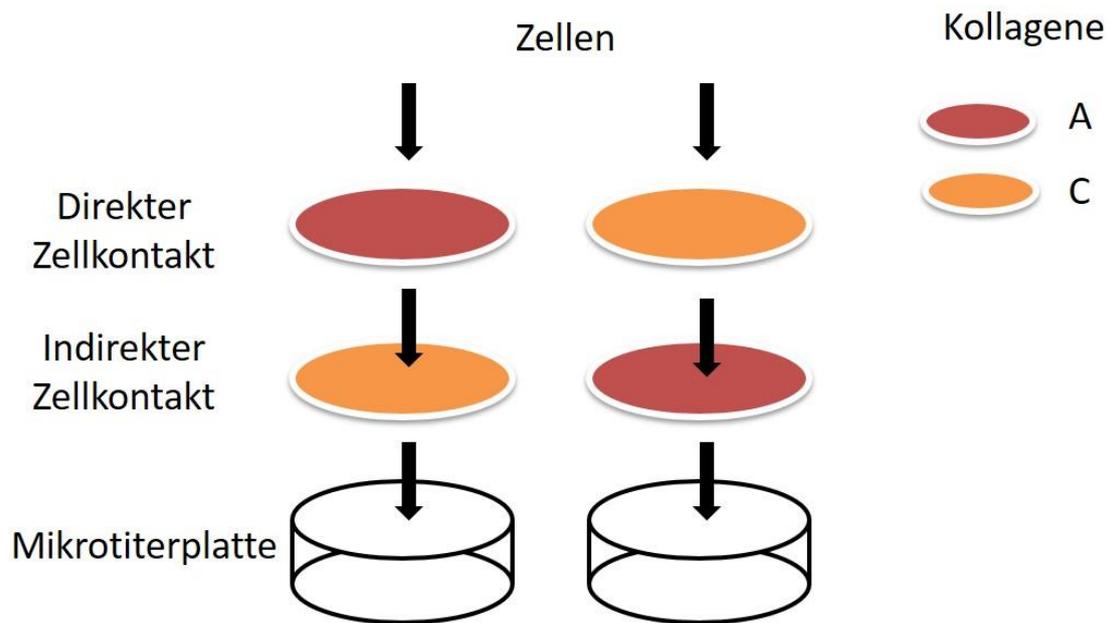


Abbildung 8: Schematischer Versuchsaufbau zur Untersuchung der Laminatausrichtung auf die Zellproliferation

3.2.5 Aktivitätstestungen

Die Aktivitätstestungen wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob das RB bzw. die RGX-Behandlung Einfluss auf die Bioaktivität des verwendeten Vancomycins, SDF-1 α und BMP-7 hat.

3.2.5.1 Untersuchung der Aktivität von Vancomycin nach Behandlung mit RGX

Um zu testen, ob RB bzw. RGX einen Einfluss auf die bakterizide Wirkung von Vancomycin hat, wurden die Kollagene in kleine Kreise (d: 0,5 cm) geschnitten, sterilisiert und diese dann mit 10, 50 und 100 μ g Vancomycin beladen. Dieses wurde hier direkt in einer 0,01 % RB-Lösung gelöst.

3.2.5.1.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Zunächst wurde der MHK-Wert von zwei unterschiedlichen *Staphylococcus aureus*-Stämmen (ATCC 29213 und ATCC 6538 P) bestimmt. Hierzu wurden der Inhalt der Kultiloops in 1 mL NaCl herausgelöst und mit dem Dreiösenausstrich auf Trypton-Soja-Agar ausplattiert. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurden Einzelkolonien abgeimpft und in 2 mL NaCl gegeben. Die dadurch verursachte Trübung soll dem 0,5 McFarland-Standard entsprechen. Nach gleichmäßiger Beimpfung eines Mueller-Hinton Agar wurde der Vancomycin-Teststreifen aufgelegt und der MHK Wert nach 24 h abgelesen. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt.

3.2.5.1.2 Bestimmung der bakteriziden Wirkung von Vancomycin nach RGX Behandlung

Zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung von Vancomycin nach RGX Behandlung wurde nur mit dem resistenteren ATCC 29213 Stamm weitergearbeitet. Hierzu wurden wie eben beschrieben Einzelkolonien des Stammes abgeimpft, gegen den 0,5 McFarland-Standard eingestellt und mit der Suspension eine Müller-Hinton-Platte beimpft. Auf diese Platten wurden die Kollagene mit den verschiedenen Vancomycin-Konzentrationen (in PBS, RB und RGX) platziert und die Hemmhöfe nach 24 h betrachtet. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt.

3.2.5.1.2.1 Einfluss der Kollagene auf die Vancomycin-Freisetzung

Um weitere Erkenntnisse hinsichtlich der bakteriziden Wirkung von Vancomycin, welches aus den Kollagenen diffundieren soll, zu gewinnen, wurde dies bezüglich weitere Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurden die Kollagene in einer 48-Well-Platte mit Vancomycin beladen (10, 50 und 100 µg) und quervernetzt. Nachdem die *Staphylococcus aureus*-NaCl-Lösung gegen den 0,5 McFarland-Standard eingestellt wurde, wurden 0,5 µL dieser Bakteriensuspension in die 48-Well-Platte gegeben, in die zuvor 500 µL DMEM/F-12 pipettiert wurden. Nach einer 24 h Inkubation, wurden eine 1:10, eine 1:100 und eine 1:1000 Verdünnung mit NaCl hergestellt und je 100 µL davon auf einen Mueller-Hinton-Agar ausplattiert. Am Tag darauf wurde das Bakterienwachstum hinsichtlich ihrer kolonienbildenden-Einheiten (KBE) untersucht. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt (Abbildung 9).

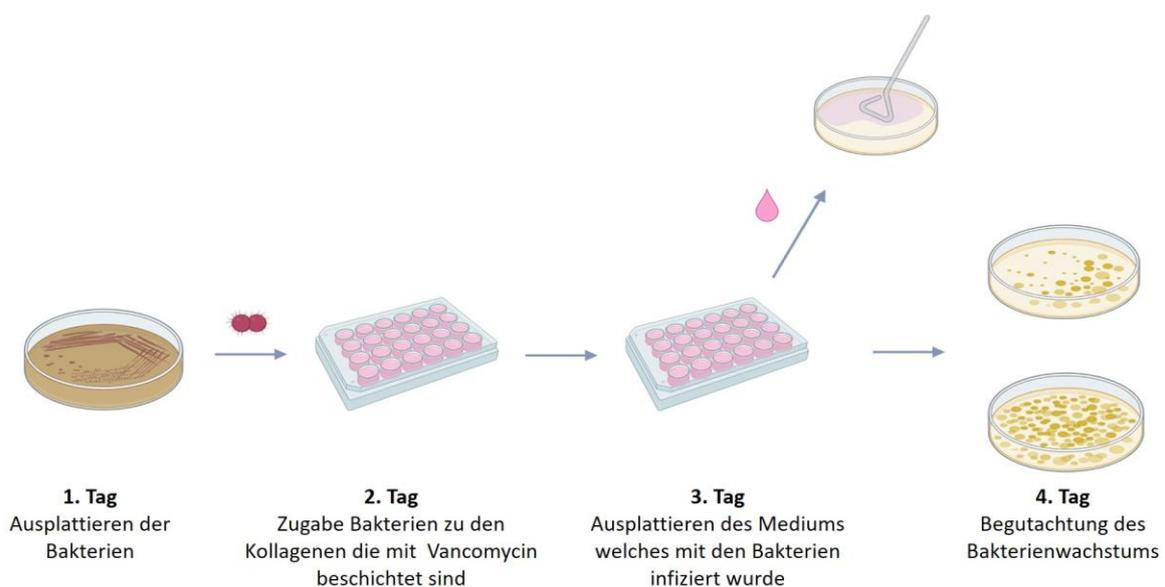


Abbildung 9: Schematischer Versuchsaufbau zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung von Vancomycin nach RGX-Behandlung (Die Grafik wurde mit Biorender.com erstellt).

3.2.5.2 Untersuchung der Aktivität von SDF-1 α nach Behandlung mit RGX

Die Untersuchung der Aktivität von SDF-1 α nach RGX Behandlung erfolgte anhand des Proliferationsverhaltens von HUVECs. Die in eine 48-Well-Platte platzierten Kollagene wurden mit SDF-1 α beladen. Hierzu wurde das SDF-1 α mit RB verdünnt, sodass die SDF-1 α -Konzentration 500 ng betrug. Dabei wurden die RB-Lösungen so angesetzt, dass nach Zugabe des SDF-1 α die Endkonzentration des RB wieder bei 0,01 % lag. Anschließend wurde der alamarBlue® Assay wie in Abschnitt 3.2.2.1 mit $7,5 \times 10^3$ eingesäten Zellen an Tag 3 durchgeführt. Gemessen wurde die Fluoreszenz (Extinktion 525 nm; Emission 580-649 nm). Der Versuch wurde dreimal im Duplikat durchgeführt.

3.2.5.3 Untersuchung der Aktivität von BMP-7 nach Behandlung mit RGX

Die Testung der Aktivität des verwendeten BMP-7 nach RGX-Behandlung erfolgte anhand der Expression der Alkalischen Phosphatase (ALP) in hOB. Die in einer 48-Well-Platte platzierten Kollagene wurden mit 100 bzw. 500 ng BMP-7 beladen. Die Verdünnung erfolgte in RB, dabei wurde die RB-Lösung so angesetzt, dass die finale RB-Konzentration auf den Kollagenen bei 0,01 % lag. Für den ALP Assay wurden 1×10^4 Zellen/Well pipettiert. An Tag 3 erfolgte ein Medienwechsel, bevor der Assay wie in Abschnitt 3.2.2.4 beschrieben an Tag 6 durchgeführt wurde. Der Versuch wurde dreimal mit verschiedenen Spendern im Duplikat durchgeführt.

3.2.6 Mechanische Charakterisierung

Der Einfluss der Quervernetzung sowie der der Laminierung wurden mithilfe verschiedener mechanischer Untersuchungen bestimmt.

3.2.6.1 Laserkonfokal Mikroskopie

Zur Visualisierung der Oberflächentopografie wurden Aufnahmen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop gemacht. Diese erfolgten im Stitchingmodus mit einer Flächengröße von 4×4 für A und 5×5 für C. Untersucht wurden unbehandelte sowie RGX-behandelte Proben.

3.2.6.2 Mikrozugversuche

Um den Einfluss der Quervernetzung und der Laminierung auf das mechanische Verhalten zu charakterisieren, wurden Zugversuche durchgeführt. Die Probengröße betrug hier ca. 0,5 x 0,1 cm und die Messlänge 1 mm. Das Faserzugmodul wurde vor Beginn der Messung mit Endmaßen justiert (siehe Abbildung 10 a).

Nachdem die Probe für 15 min bei Raumtemperatur in PBS equilibriert wurde, wurde sie in die Kavität der Greifvorrichtung des Faserzugmoduls gelegt und befestigt. Für C wurde zusätzlich Sandpapier eingesetzt, sodass dieses sandwichartig in der Mitte lag (Abbildung 10 b). Die Messung erfolgte weggesteuert (10 $\mu\text{m/s}$) mit einem maximalen Verfahrweg von 5 mm (einseitig). Gemessen wurde solange, bis die maximale Zugkraft von 1000 mN bzw. der max. Verfahrweg erreicht oder bis es zur Zerstörung der Probe gekommen war. Aus den erhaltenen Kraft-Weg-Diagrammen wurden Spannungs-Dehnungs-Diagramme erstellt, mit welchen der Elastizitätsmodul (E-Modul), die max. ertragbare Spannung sowie die Bruchdehnung bestimmt wurden. Für diese Transformation sind Breite und Dicke der Probengröße von Relevanz. Die genaue Breite wurde mithilfe einer Schieblehre bestimmt und die Dicke wurde nach 10 min Equilibrierung in PBS wie in Abschnitt 3.2.6.3 bestimmt. Für C war eine Vorverschiebung der Kurve nötig. Folgende Proben wurden bis zu dreimal gemessen: C, A, C_{RGX}, A_{RGX}, CC, AA, CCC, AAA.

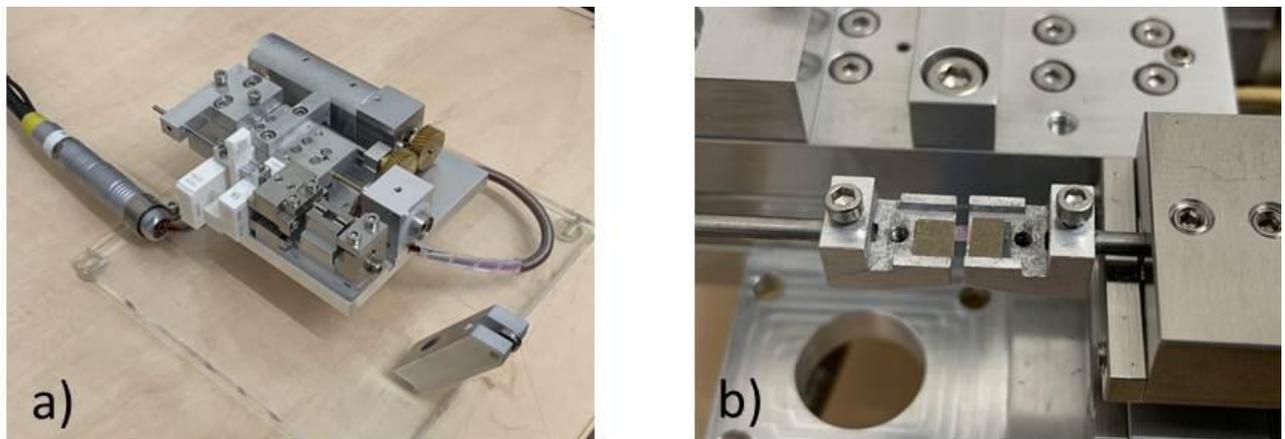


Abbildung 10: Apparatur für die Zugversuche während der Justierung mit den Endmaßen (a) sowie die Einspannung der C Probe mithilfe von Sandpapier (b).

Generell mussten heterologe Laminats aus den Messungen ausgeschlossen werden, da diese durch die großen Unterschiede im mechanischen Verhalten nicht möglich war. Während A duktiler Verhalten zeigte, entzog sich C dem Halterungssystem (siehe Abbildung 11). Somit konnten keine verlässlichen Aussagen bezüglich der mechanischen Eigenschaften getroffen werden.

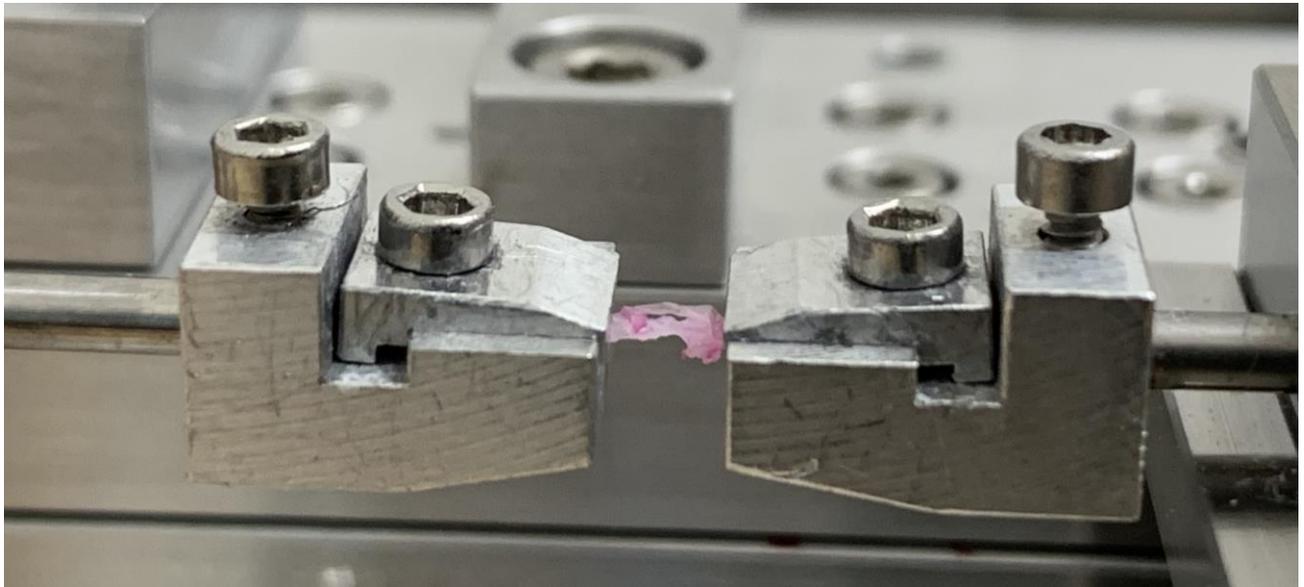


Abbildung 11: Versuch einer Messung des heterologen AC Laminats

3.2.6.3 Dickenmessungen

Um den Einfluss von NHDFs auf die Stabilität der Kollagene und Laminats zu untersuchen, wurde deren Dicke gemessen. Abbildung 12 zeigt den Versuchsaufbau. Hierzu wurden 1×10^4 Zellen/Well auf den Kollagenen/Laminats ausgesät und für 1 bzw. 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Proben aus den 48-Well-Platten entfernt, mit PBS gewaschen und für 15 min mit 3,7 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Für die Dickenmessungen wurden die Proben einer Kraft von $1 \text{ N} \pm 0,2 \text{ N}$ ausgesetzt und nach 15-minütiger Equilibrierung der Proben in PBS erfolgte dann die Messung. Die Geometrie des Probenmesskörpers war dabei rund und betrug einen Durchmesser von 1 cm. Als Entprellzeit wurden 5 Sekunden gewählt und die Antastgeschwindigkeit wurde auf 3 mm/s gesetzt. Die folgenden Proben wurden zwei bis drei Mal hergestellt und ihre Dicke mindestens fünf Mal hintereinander gemessen: C, A, C_{RGX}, A_{RGX}, CC, AA, AC, CCC, AAA und CAC. ACA wurde aufgrund seiner Instabilität im Handling ausgeschlossen.

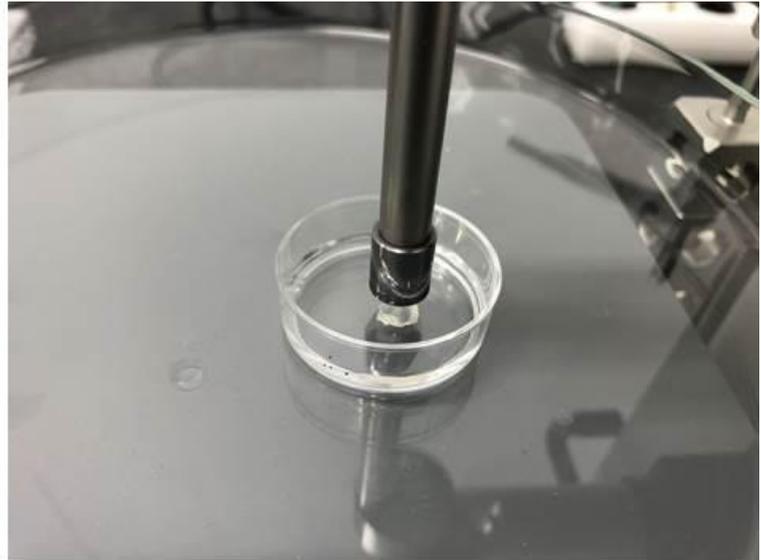
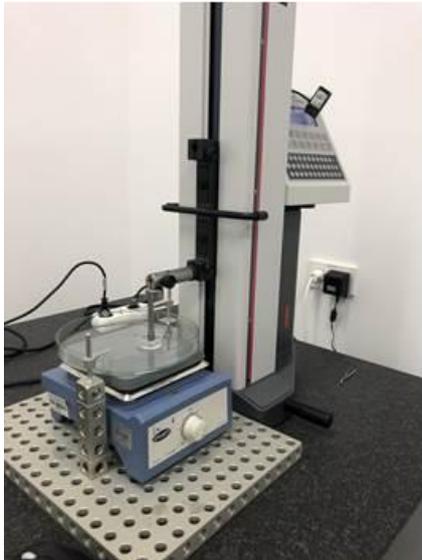


Abbildung 12: Versuchsaufbau der Dickenmessungen der Kollagene mit einem Digmar CX1 Höhenmessgerät

3.2.6.3.1 Viabilitätstestung auf den Kollagenlaminaten

Zur besseren Interpretation der Ergebnisse aus den Dickenmessungen wurde die Proliferation der NHDF auf den Laminaten untersucht. Hierzu wurden äquivalent zu der Dickenmessung 1×10^4 Zellen/Well ausgesät und ein alamarBlue® Assay an Tag 1 und Tag 3 durchgeführt. Gemessen wurde die Fluoreszenz (Extinktion 525 nm; Emission 580-649 nm). Der Versuch wurde dreimal im Duplikat durchgeführt.

3.2.6.3.2 *In vitro*-Zytotoxizitätsuntersuchungen

Neben den Proliferationsversuchen wurde außerdem mithilfe von L929 Zellen untersucht, ob die Lamine zytotoxisch wirken. Hierfür wurden 1×10^4 Zellen/Well für 24 h in einer 96-Well-Platte ausgesät. Parallel dazu wurde Zellkulturmedium für 24 h auf die Lamine gegeben. Nach Ablauf der Zeit wurde das Medium der Zellen mit dem getauscht, welches in Kontakt mit den Laminaten stand. Nach weiteren 24 h wurde ein MTT-(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Assay durchgeführt. Dieser bestimmt wie der alamarBlue™ Assay die Zellviabilität. Hierfür wurde mit serumfreiem Medium eine 1 mg/mL MTT-Lösung hergestellt und 100 μ L/Well pipettiert. Nach 2 h wurden 100 μ L Isopropanol pipettiert und die Absorption gemessen (570/650 nm). Der Versuch wurde dreimal im Triplikat durchgeführt.

3.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der verschiedenen Experimente erfolgte mithilfe von SPSS Statistics Software. Ob signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen, wurde mithilfe eines One-Way-ANOVA untersucht. Dabei wurde ein Tukey Post-hoc durchgeführt, wenn Varianzhomogenität gegeben war. War dies nicht der Fall, wurde ein Games-Howell Test durchgeführt. Bei zwei unabhängigen Gruppen wurde der Mann-Whitney-U Test gewählt. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der durchgeführten Versuche beschrieben.

4.1 Toxizität von Vancomycin

Die folgenden Ergebnisse zeigen den Einfluss von Vancomycin auf die an der Knochenregeneration beteiligten Zellen. Hierbei wurde nicht nur deren Proliferationsverhalten unter Einfluss verschiedener Vancomycin-Konzentrationen untersucht, sondern auch dessen Einfluss auf die Funktionalität der Zellen.

4.1.1 Viabilitätsassay nach Vancomycin Kontakt

Der Einfluss verschiedener Vancomycin-Konzentrationen (0,01-2 mg/mL) auf die Viabilität von humanen Myoblasten (SkMc), humanen Osteoblasten (hOB), einer humanen Osteosarkomzelllinie (SaOS-2), *human umbilical vein endothelial*-Zellen (HUVEC) und humanen Fibroblasten (NHDF) wurde mithilfe des alamaBlue® Assays untersucht. Die folgenden Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Medium ohne Vancomycin) dargestellt.

Die sensitivsten Zellen waren die primären SkMc mit einer signifikanten Verringerung der Proliferation um 20 % ab einer Vancomycin Konzentration von 0,5 mg/mL nach 24 h Inkubation. Nach 3 Tagen konnte bereits ab der geringsten Konzentration nur noch eine Viabilität von 85 % in der geringsten bis hin zu 63 % in der höchsten Konzentration gemessen werden. Nach 5 Tagen in dem Antibiotikum verhielten sich die Zellen wieder wie an Tag 1, wohingegen nach 10 Tagen kein negativer Effekt auf die Proliferation mehr gemessen werden konnte (Abbildung 13).

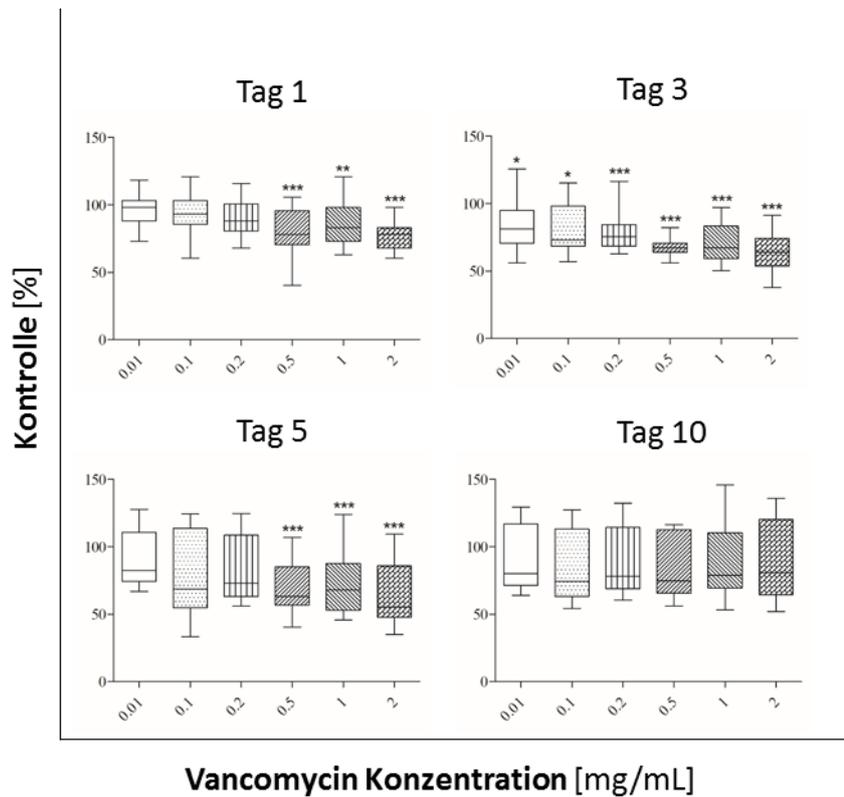


Abbildung 13: Proliferation humaner SkMc unter Einfluss von Vancomycin mit einem Wechsel des Antibiotikums alle 4 Tage (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$ zur Kontrolle). Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Medium ohne Vancomycin) dargestellt.**

Nachdem die primären hOB für 24 h in Medium mit Vancomycin inkubiert wurden, war ab der höchsten Konzentration von 2 mg/mL eine signifikante Verringerung in der Zellproliferation um 10 % verglichen mit der Kontrolle messbar. Nach 72 h in Vancomycin war eine Reduktion der Viabilität von 20–30 % mit steigender Konzentration ab 0,2 mg/mL messbar, wohingegen keine signifikanten Unterschiede mehr an den letzten beiden Zeitpunkten detektierbar waren (Abbildung 14).

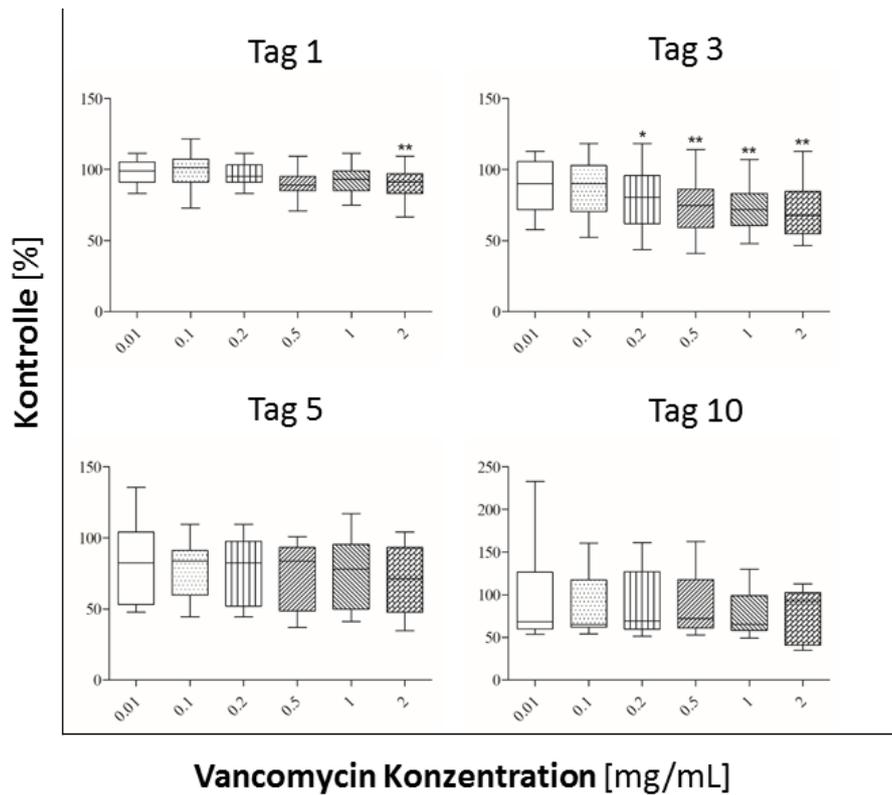


Abbildung 14: Proliferation humaner hOB unter Einfluss von Vancomycin mit einem Wechsel des Antibiotikums alle 4 Tage (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$ zur Kontrolle). Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Medium ohne Vancomycin) dargestellt.**

Des Weiteren wurde das Verhalten der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie SaOS-2 auf Vancomycin untersucht. Hierbei konnte ein deutlicher Unterschied zu den primären Osteoblasten festgestellt werden. Während bei den hOB in höchster Konzentration ein negativer Effekt nach einem Tag Inkubation gemessen wurde, zeigten die Osteoblasten-ähnlichen Zellen diesen nicht. Ab Tag 3 reagierten die SaOS-2 sensitiver mit einer um 20 % verringerten Viabilität ab einer Konzentration von 0,1 mg/mL. Während bei den hOB in den folgenden Tagen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle gemessen werden konnten, zeigten die SaOS-2 an Tag 5 eine um > 20 % gesenkte Viabilität bei jeder eingesetzten Konzentration. Am letzten Messzeitpunkt, an Tag 10, war ebenfalls noch eine verminderte Proliferation ab Konzentrationen von 0,2 mg/mL messbar (Abbildung 11).

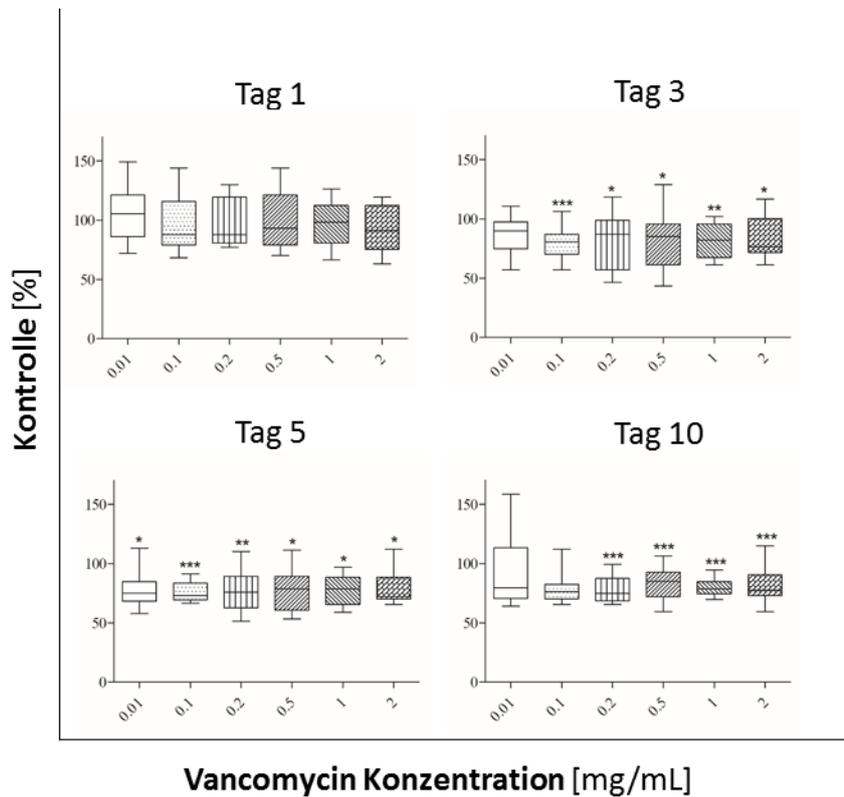


Abbildung 15: Proliferation von SaOS-2 unter Einfluss von Vancomycin mit einem Wechsel des Antibiotikums alle 4 Tage (* p < 0.05; ** p < 0.01; *p < 0.001 zur Kontrolle). Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Medium ohne Vancomycin) dargestellt.**

Bei den getesteten HUVECs konnten bis zu Tag 5 keine signifikanten Unterschiede gemessen werden, wenn die Zellen mit Vancomycin inkubiert wurden. Ab Tag 10 reagierten diese stark sensitiv. Lediglich in der geringsten Konzentration von 0,01 mg/mL konnte kein negativer Effekt gemessen werden. Alle anderen genutzten Vancomycin Konzentrationen zeigten eine Verringerung der Proliferation im Bereich zwischen 23 und 44 % (Abbildung 16).

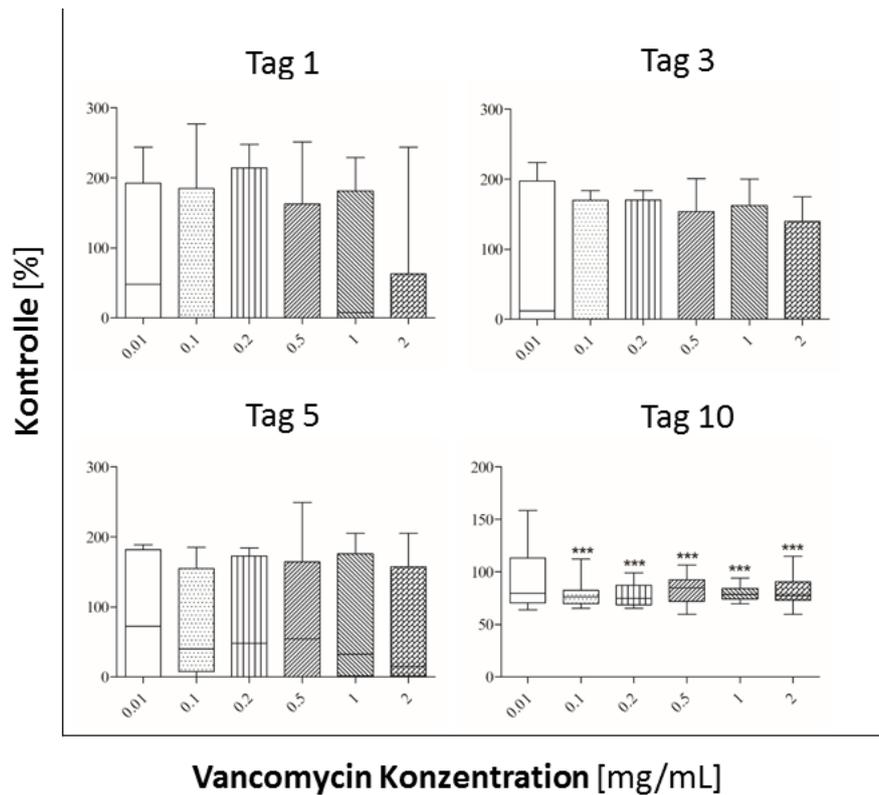


Abbildung 16: Proliferation von HUVECs unter Einfluss von Vancomycin mit einem Wechsel des Antibiotikums alle 4 Tage (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$ zur Kontrolle). Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Medium ohne Vancomycin) dargestellt.**

Des Weiteren wurden die NHDF auf ihr Verhalten unter Einfluss von Vancomycin untersucht. Nach 24 h in Vancomycin verhielt sich diese Zelllinie wie die hOB Zellen und zeigte eine Viabilität von lediglich 80 % bei einer Antibiotikakonzentration von 2 mg/mL. Zu den folgenden Zeitpunkten (Tag 3 und 5) zeigte sich eine Zunahme der Sensitivität, wobei eine um 20 bis 30 % verminderte Zellviabilität ab einer Vancomycin Konzentration von 0,1 mg/mL messbar war. An Tag 10 verringerte sich diese Sensitivität wieder, wobei ab 1 mg/mL noch immer ein negativer Effekt auf die Zellen gezeigt werden konnte (Abbildung 17).

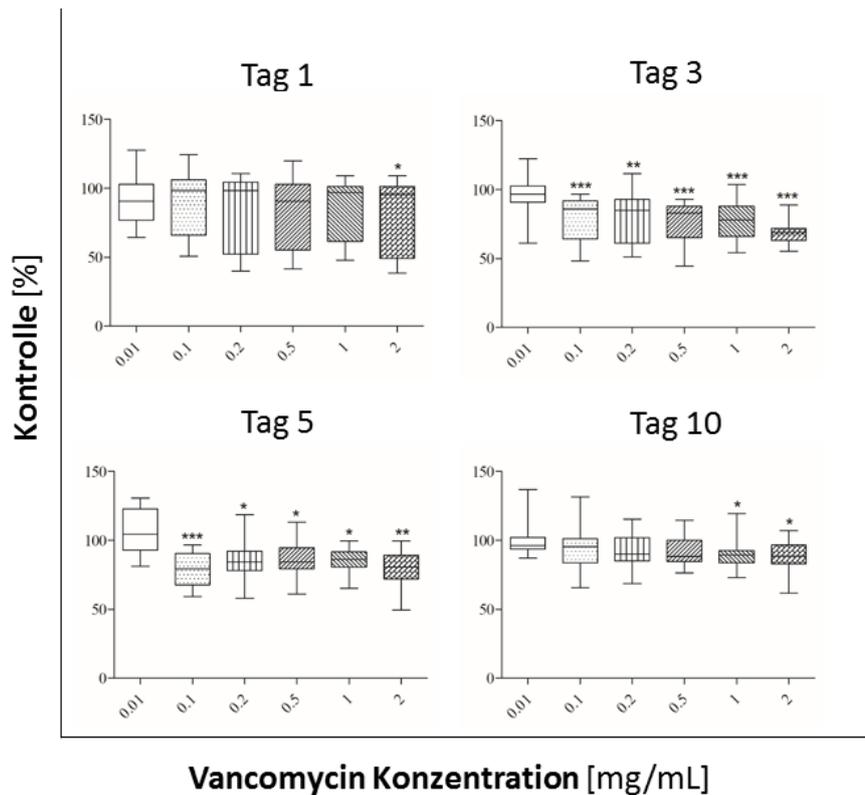


Abbildung 17: Proliferation von NHDF unter Einfluss von Vancomycin mit einem Wechsel des Antibiotikums alle 4 Tage (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$ zur Kontrolle). Die Ergebnisse sind dargestellt als % bezogen auf die Kontrolle ohne Vancomycin (100 %).**

4.1.2 Angiogenese-Assay

Die Wirkung von Vancomycin auf die Angiogenese wurde mithilfe einer in Matrigel kultivierten 3D-Kultur von HUVECs untersucht. Die Analyse der Aufnahmen erfolgte in ImageJ mit dem Angiogenese-Analyser von Gilles Carpentier [166] (Abbildung 18). Die Ergebnisse sind dargestellt als % bezogen auf die Kontrolle ohne Vancomycin (100 %).

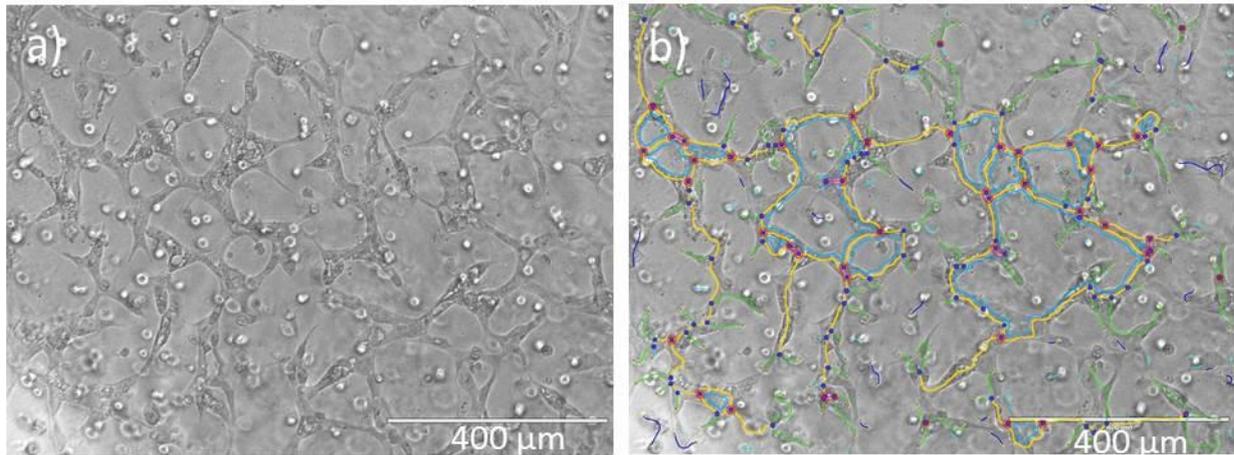


Abbildung 18: Beispiel eines Angiogenese-Assays mit HUVECS nach Inkubation mit 0.1 mg/mL Vancomycin. Mikroskopische Aufnahme der Gefäßbildung in Matrigel a) und deren Auswertung mithilfe des Angiogenese Analyser b) in ImageJ von Gilles Carpentier. Dabei repräsentieren verschiedene Farben unterschiedliche Parameter.

Um die Ergebnisse zu quantifizieren, wurden folgende Parameter ausgewählt: die Anzahl der junctions, die totale Segmentlänge sowie die totale Länge. In der Anzahl der junctions gab es eine signifikante Steigerung im Bereich geringer Vancomycin Konzentrationen (0,01–0,2 mg/mL) verglichen mit der Kontrolle. Die totale Segmentlänge verhielt sich analog zu diesen Ergebnissen. Bei beiden Parametern sind die Werte um 40–50 % höher als in den unbehandelten Kontrollen. In der totalen Länge der Tubes („Röhren“) Bildung lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen (Abbildung 19).

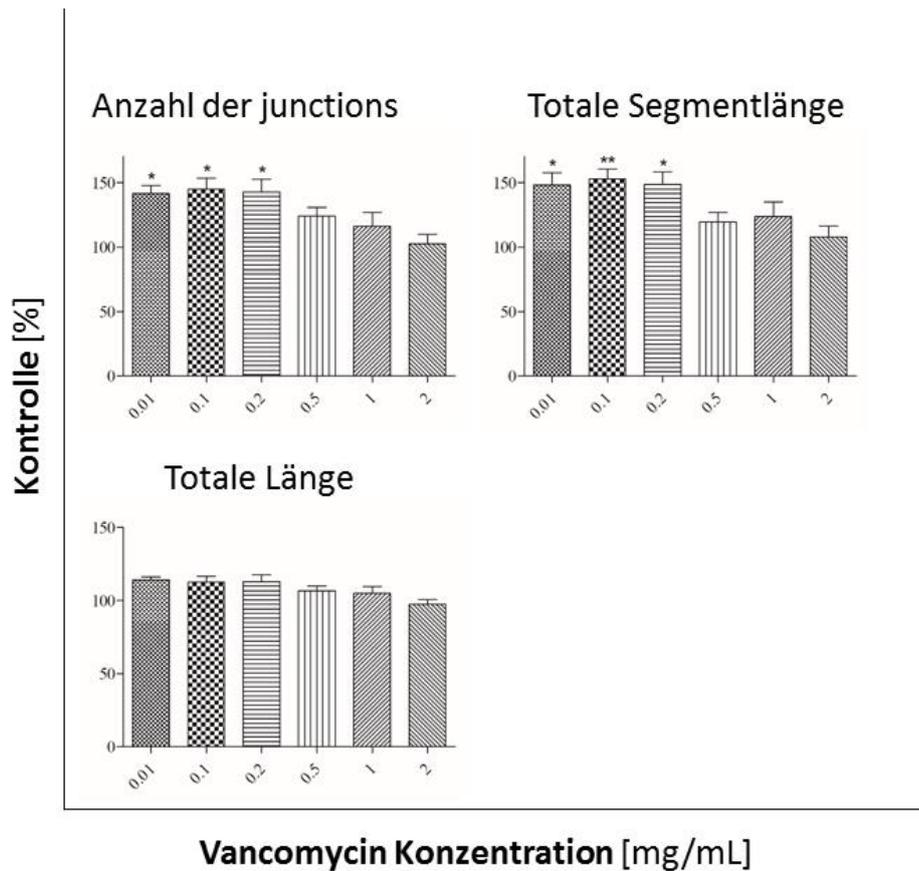


Abbildung 19: Angiogenese-Assay von HUVECS nach Inkubation mit Vancomycin. Parameter zur Quantifizierung der Ergebnisse sind die Anzahl der junctions, die totale Segmentlänge und die totale Länge (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$ zur Kontrolle). Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Medium ohne Vancomycin) dargestellt.**

4.1.3 Immunfluoreszenz

Eine Immunfluoreszenzfärbung wurde durchgeführt, um den Einfluss von Vancomycin auf die Differenzierung primärer Muskelzellen zu untersuchen. Zur Detektion der Formation von Myotuben wurde das Muskelmarker Protein Myosin genutzt und anschließend die totale Fläche an Myotuben mithilfe von ImageJ und den Binärbildern der Mikroskopie-Aufnahmen bestimmt (Abbildung 20).

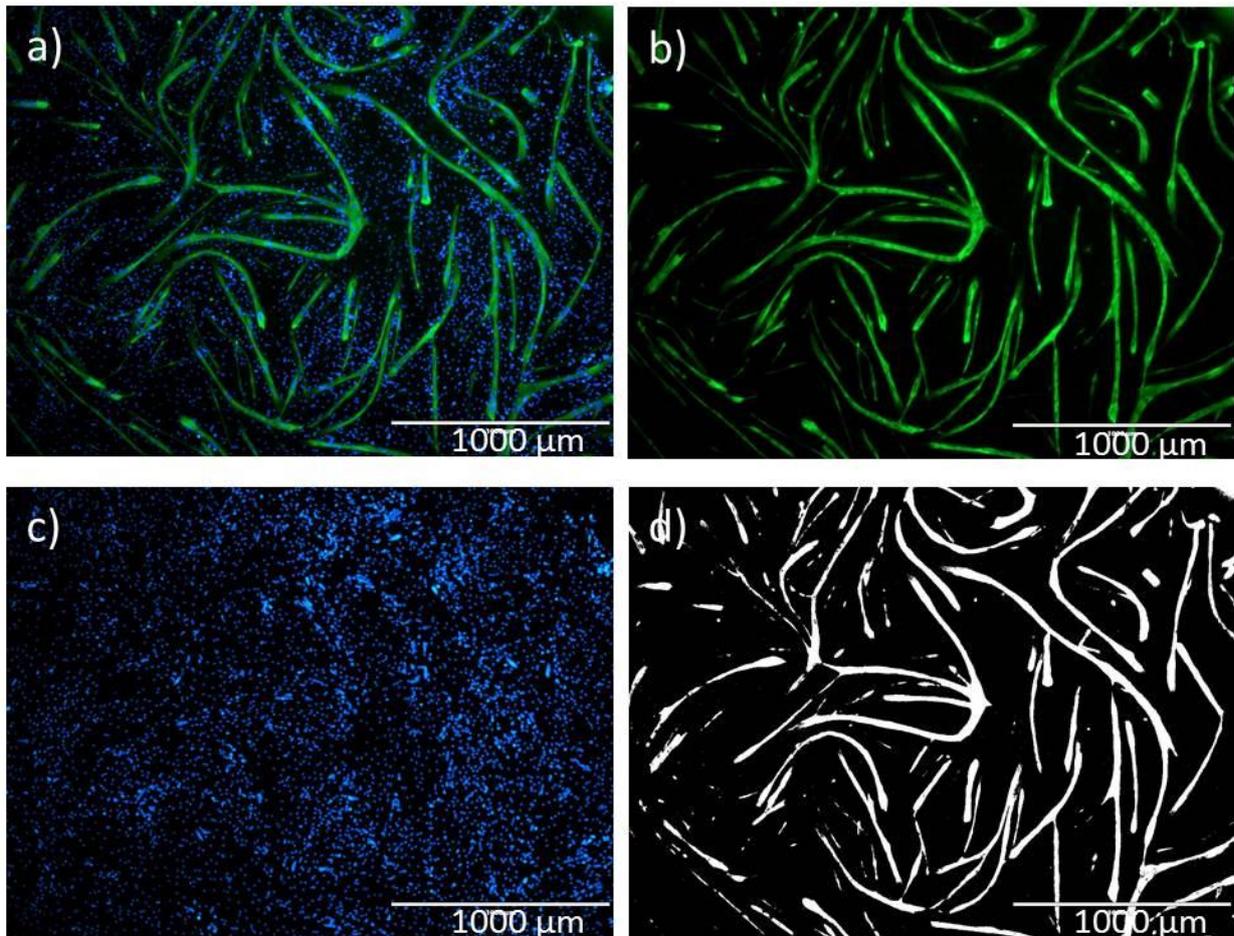


Abbildung 20: Beispiel für die Auswertung der Immunofluoreszenz humaner Myoblasten nach fünftägiger Differenzierung a) Überlagerungsbilder, b) Myosin Färbung, c) Zellkernfärbung und d) Binärbild zur Quantifizierung des Einflusses von Vancomycin auf die Myotubenbildung

Ab einer Konzentration von 0,1 mg/mL Vancomycin konnte eine signifikante Inhibierung der Myotubenformation festgestellt werden. Diese steigt mit zunehmender Vancomycin-Menge. Während bei einer Konzentration von 0,1 mg/mL noch 87 % an Myotubenformation bezogen auf die Kontrolle gemessen wurde, fand bei der höchsten Konzentration nur noch eine 48 %ige und somit eine um > 50 % reduzierte Formation statt (Abbildung 21).

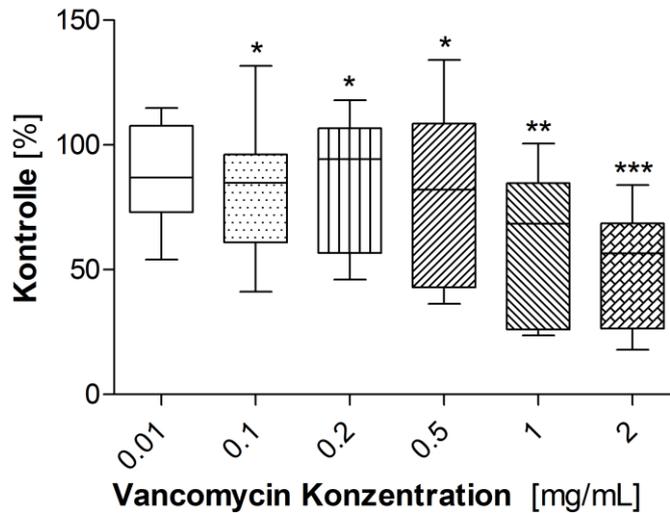


Abbildung 21: Auswertung der Immunfluoreszenz zur Myotubenformation humaner Myoblasten unter Einfluss verschiedener Vancomycin-Konzentrationen (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ zur Kontrolle). Die folgenden Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Medium ohne Vancomycin) dargestellt.

4.1.4 Alkalische Phosphatase Aktivität (ALP)

Die ALP ist ein spezifischer Marker während der frühen Phase der osteogenen Differenzierung [167] mit dessen Hilfe der Einfluss von Vancomycin auf diesen Prozess untersucht wurde. Während in geringen Konzentrationen (0,01 – 0,5 mg/mL) kein Einfluss von Vancomycin auf die Aktivität von ALP festgestellt werden konnte, zeigte sich eine signifikante Verringerung in den hohen Konzentrationen (ab 1 mg/mL). Im Vergleich zur Kontrolle war die ALP-Aktivität bei den betroffenen Konzentrationen um über 50 % reduziert (1 mg/mL, 53,39 %; 2 mg/mL, 51,51 %) (Abbildung 18).

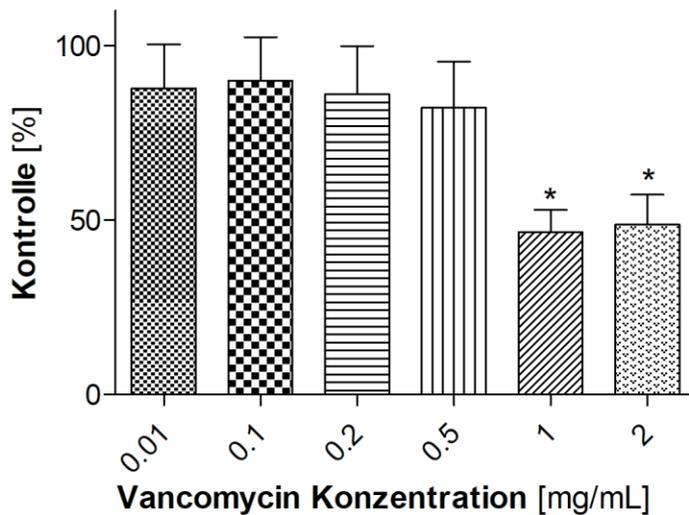


Abbildung 22: ALP Aktivität humaner Osteoblasten, nachdem diese unter Einfluss von Vancomycin für fünf Tage ausdifferenziert wurden (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ zur Kontrolle). Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Medium ohne Vancomycin) dargestellt.

4.2 Kollagenuntersuchungen

Die folgenden Ergebnisse zeigen den Einfluss der Kollagene sowie deren Quervernetzungsparameter auf die Viabilität verschiedener Zellen. Vorversuche konnten bereits zeigen, dass die Quervernetzung Einfluss auf mechanische Eigenschaften wie das Quellvermögen und die Dicke der Kollagene nimmt [163]. Weitere mechanische Charakterisierungen fanden deshalb nach der biologischen Evaluation der Kollagene und der Bestimmung des Einflusses der Vernetzung auf die Zellen statt.

Dabei wurden die Biokompatibilität der Kollagene selbst sowie der Einfluss der Quervernetzung betrachtet. Die Quervernetzung sollte mithilfe der im Versuchsaufbau variablen Parameter (Bengalrosakonzentration und Bestrahlungsdauer) optimiert werden. Für nachfolgende Versuche, welche den Aufbau der Laminate betreffen, wurde zudem noch der Einfluss der Ausrichtung der Laminate in der Mikrotiterplatte bestimmt.

4.2.1 Übersicht der verwendeten Kollagene

Abbildung 23 zeigt eine makroskopische Übersicht der in der Arbeit verwendeten Kollagene. Collagen Solutions (C) ist ein sehr dünnes, kompaktes Kollagen, welches wiederholende Einprägungen aufweist. Auch Viscofan (V) zeigt eine kompakte Struktur. Diese ist deutlich dichter, was sich auch durch seine starre Struktur zeigt. Im Gegensatz dazu hat das verwendete

Atelokollagen (A) eine offene, schwammartige Struktur, welche deutlich weicher und weniger kompakt ist als die der zuvor aufgeführten Kollagene.

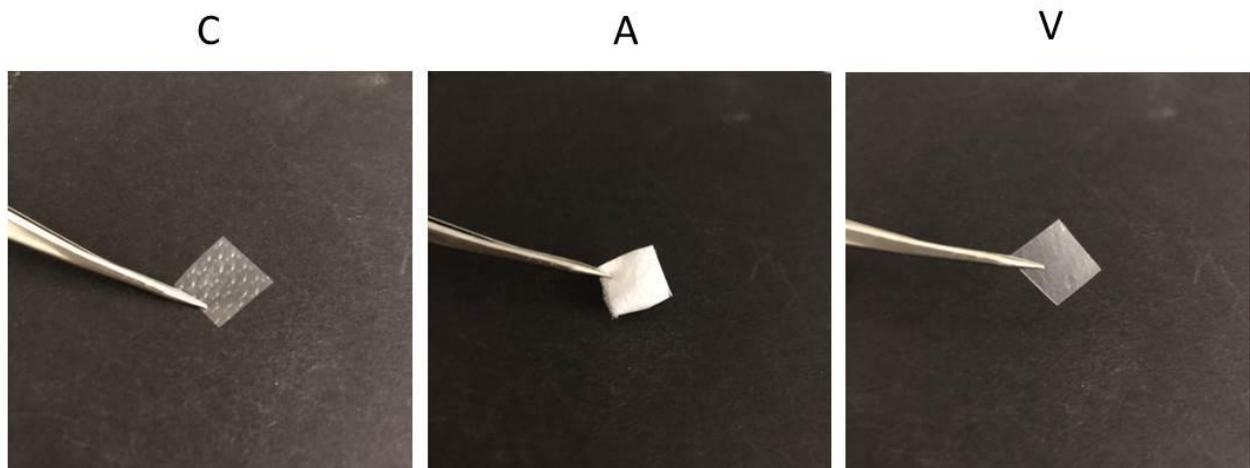


Abbildung 23: Makroskopische Aufnahmen der verwendeten Kollagene: Collagen Solutions (C), Atelocollagen (A) und Viscofan (V).

4.2.2 Einfluss der Bengalrosakonzentration auf die Zellviabilität

Um den Einfluss der Bengalrosakonzentration (RB) auf die Zellviabilität zu bestimmen, wurde ein alamarBlue® Assay mit NHDF und hOB durchgeführt. Da es hier primär um die Wirkung der RB-Konzentration auf die Zellen ging, wurde exemplarisch nur mit C gearbeitet. Die folgenden Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Kulturplatte) dargestellt. NHDFs (Abbildung 24 a) zeigten keinen signifikanten Unterschied im Proliferationsverhalten zwischen den RB-Konzentrationen. Bei den hOB (Abbildung 24 b) war an allen gemessenen Tagen eine signifikant schlechtere Proliferation zu messen, wenn die Quervernetzung mit einer 0,1 %igen statt einer 0,01 %igen RB Lösung stattfand. Der prozentuale Anteil an viablen Zellen lag bei mit 0,01 % igen RB-behandelten Sheets mit > 95 % im Bereich der Kontrolle und ohne signifikante Unterschiede zu dieser. Im Gegensatz hierzu lagen die Werte für die mit 0,1 % RB quervernetzten Proben zwischen 81 und 88 %.

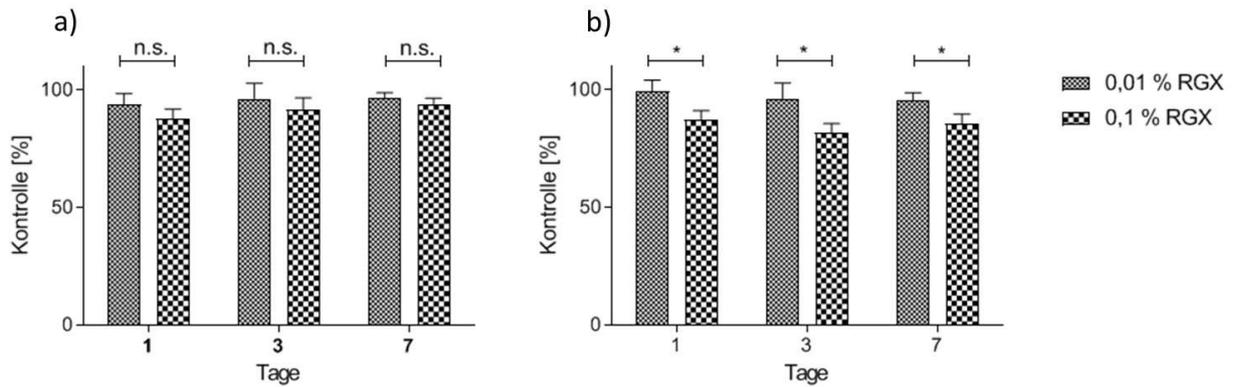


Abbildung 24: Einfluss der Bengalrosakonzentration auf die Zellproliferation von NHDF (a) und hOB (b) auf C (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$). Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Kulturplatte) dargestellt.**

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde im Folgenden nur noch mit einer 0,01 %igen RB-Lösung gearbeitet.

4.2.3 Einfluss der Bestrahlungsdauer auf die Proliferation

Der Einfluss der Bestrahlungsdauer auf das Proliferationsverhalten der Zellen wurde mithilfe von hOB und SkMc untersucht (Abbildung 25). Hierzu wurde ein alamarBlue® Assay an den Tagen 1, 3, 7 und 10 nach Bestrahlung durchgeführt. Sowohl bei den hOB als auch bei den SkMc zeigten sich nahezu identische Kurvenverläufe bei unterschiedlicher Bestrahlungsdauer. Diese waren unabhängig von der Art des Kollagens. Hierbei konnten kaum Unterschiede zwischen den Tagen gemessen werden. Vergleicht man beispielsweise die Werte für C_{RGX} und C an Tag 1 ließen sich keine Differenzen in den Viabilitäten messen. An Tag 10 lagen die Werte lediglich 2,5 % voneinander entfernt.

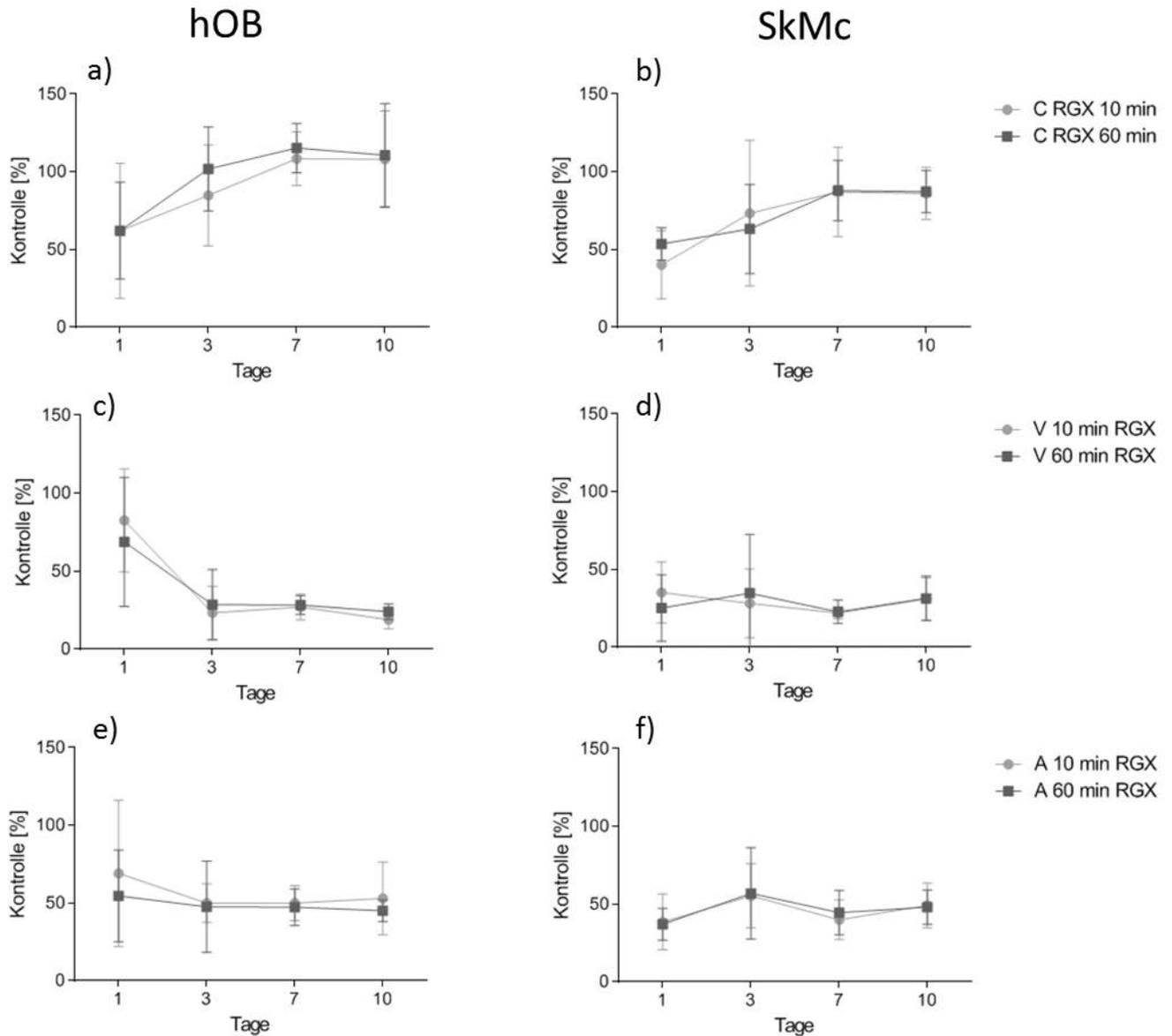


Abbildung 25: Einfluss der Belichtungsdauer der RGX Behandlung auf hOb und SkMc. Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Kulturplatte) dargestellt.

Auf Grundlage der minimalen und zu vernachlässigenden Unterschiede zwischen den beiden RB-Konzentrationen und des Mehraufwands bei einer Bestrahlungsdauer von 60 min, wurde auf eine statistische Auswertung in diesem Versuch verzichtet und für alle nachfolgend Experimente eine Belichtungsdauer von 10 min gewählt.

In diesem Versuch zeigten sich jedoch klare Unterschiede im Kurvenverlauf, zwischen den verschiedenen Kollagenen. Auf diese wurde im folgenden Versuch näher eingegangen.

4.2.4 Einfluss der Kollagene und deren Vernetzung auf die Proliferation

Im folgenden Versuch sollte neben dem Einfluss der Kollagene auf die Proliferation auch die Auswirkung der Quervernetzung auf die Viabilität verschiedener Zellen bestimmt werden (Abbildung 26). Hierzu wurde an den Tagen 1, 7 und 10 nach Aussaat ein alamarBlue® Assay mit hOB und SkMc durchgeführt. Die Werte werden dargestellt in Prozent bezogen auf die Kontrolle (Zellkulturplatte). Betrachtet man die Kurvenverläufe der Viabilität der hOB auf den einzelnen Kollagenen, zeigt sich ein deutlicher Unterschied. Sowohl für das unbehandelte als auch für das quervernetzte A und V zeigt sich eine sinkende Viabilität der Zellen über die gemessene Zeit. Auf A bleibt diese nahezu identisch, woraus sich schließen lässt, dass eine geringfügige Proliferation stattfindet, wohingegen die Werte für V abnehmen und die Zellen darauf entweder sterben oder nicht proliferieren. Im Gegensatz hierzu steigt die Viabilität der Zellen auf C. Nach Quervernetzung liegt der Wert an Tag 7 bei 101 % und damit signifikant über dem der unbehandelten Probe (75 %). Dieser positive Effekt lässt sich auch für die SkMc erkennen. Generell fällt auf, dass diese Zellen auf den Kollagenen weniger viabel sind als die hOB. Dennoch zeigt sich eine analoge Reihenfolge in der Viabilität abhängig vom verwendeten Kollagen: Unabhängig von der Behandlung ist diese sowohl bei hOB als auch bei den SkMc $C > A > V$.

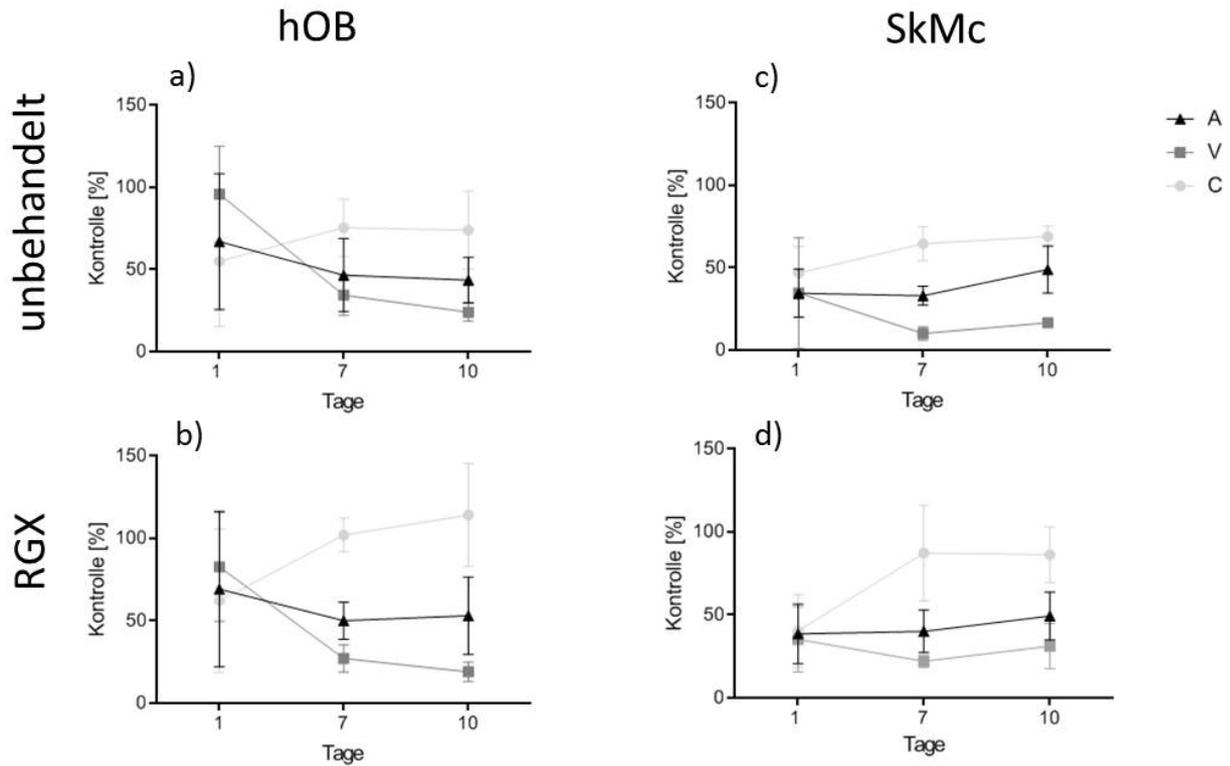


Abbildung 26: Einfluss der RGX-Behandlung auf das Proliferationsverhalten von hOB und SkMc. Die Ergebnisse sind dargestellt als % bezogen auf die Kontrolle (Kulturplatte 100%).

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde V für die weitere Entwicklung der Laminare ausgeschlossen.

4.2.4.1 Einfluss der Laminatausrichtung auf die Zellviabilität

In Abhängigkeit vom Versuchsaufbau der Laminatherstellung für die Zellkultur sind die Kollagene entweder in direktem oder indirektem Kontakt zu den Zellen. Indirekt heißt in diesem Fall, dass das Kollagen an der Mikrotiterplatte durch Trocknung fixiert wurde. Direkt heißt, dass das zweite Kollagen auf dem fixierten Kollagen platziert wurde und darauf die Zellen ausgesät wurden (Abbildung 6).

Tabelle 13: Bezeichnung der Zweierlaminare und deren Ausrichtung in der Kulturplatte.

Bezeichnung	Indirekter Zellkontakt	Direkter Zellkontakt
AC	A	C
CA	C	A

Da A und C unterschiedlichen Einfluss auf die Proliferation der Zellen haben, soll hier untersucht werden, wie sich die Ausrichtung der Laminare auf diese auswirkt. Hierzu wurde ein alamarBlue® Assay mit hOB an Tag 3 durchgeführt. Aufgrund der großen Schwankungen in der Fluoreszenzintensität und der damit einhergehenden Verfälschung der Ergebnisse wurden diese nicht gemittelt, sondern einzeln dargestellt (Abbildung 27).

Alle drei hOB-Kulturen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation abhängig von der Ausrichtung des Laminats in der Mikrotiterplatte.

Für weitere Versuche wurde es als nicht wichtig erachtet, welches der Kollagene direkt bzw. indirekt mit den Zellen in Kontakt steht. Aufgrund der einfacheren Handhabung wurde, wenn A vorhanden war, dieses am Boden der Wellplatte fixiert.

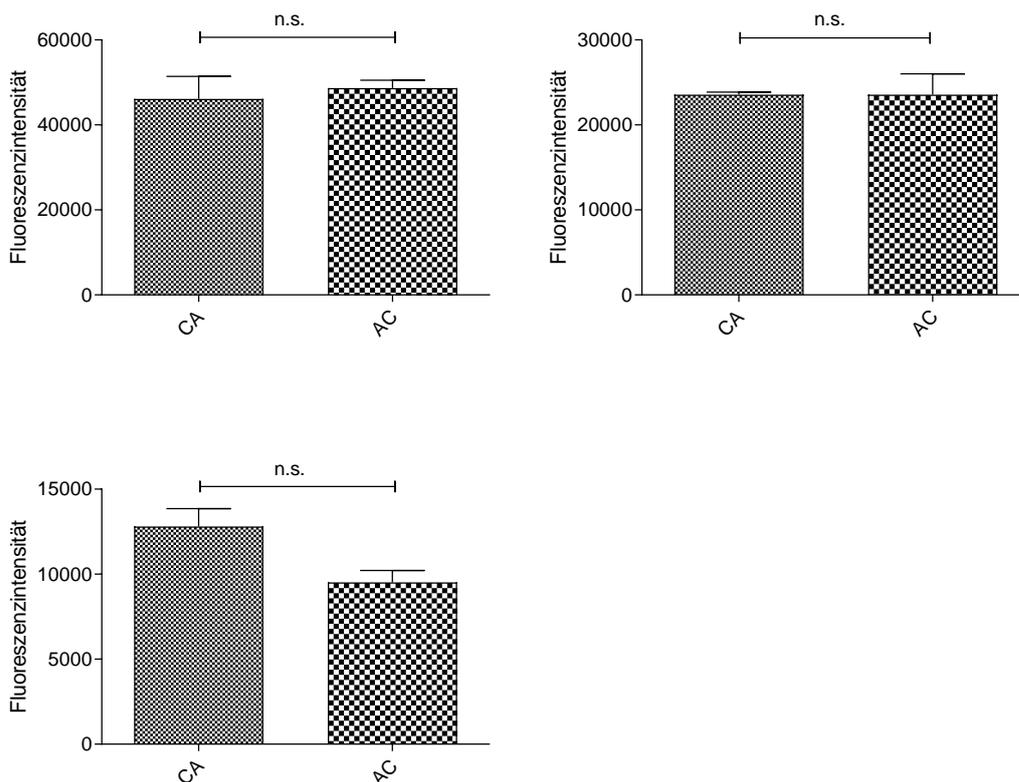


Abbildung 27: Einfluss der Ausrichtung der Laminare in der Mikrotiterplatte auf hOB (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$; n.s. nicht signifikant). Aufgrund der hohen Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten wurden die Ergebnisse nicht gepoolt.**

4.3 Aktivitätstestungen

Aktivitätstestungen wurden durchgeführt, um den Einfluss der Quervernetzung auf die bakterizide Wirkung von Vancomycin sowie die Bioaktivität von BMP-7 bzw. SDF-1 α zu bestimmen.

4.3.1 Aktivität von Vancomycin nach RGX-Behandlung

Zur Bestimmung der Aktivität von Vancomycin und zur Dosisfindung für die Lamine wurde zunächst die minimale Hemmkonzentration bestimmt. Anschließend wurden die Kollagene mit einer bestimmten Menge beschichtet, quervernetzt und schließlich die potenzielle Hemmung des Bakterienwachstums untersucht.

4.3.1.1 Bestimmung des MHK-Werts

Um die minimale in den Laminen benötigte Vancomycin-Konzentration zu bestimmen, wurde die Minimale-Hemm-Konzentration (MHK) mithilfe von Vancomycin-Teststreifen bestimmt.

Der MHK-Wert wurde an dem Punkt abgelesen, an dem der Bakterienstamm auf den Vancomycin Teststreifen trifft (siehe Abbildung 28, rote Pfeile). Die zur Hemmung des Wachstums des in der Arbeit verwendeten *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P benötigte Konzentration beläuft sich auf 1 $\mu\text{g/mL}$ (Abbildung 28 a), wohingegen die des Stammes ATCC 29213 bei 2 $\mu\text{g/mL}$ (Abbildung 28 b) liegt. Der zuletzt genannte Stamm zeigt somit eine größere Resistenz gegenüber Vancomycin. Aus diesem Grund wurde in weiterführenden Experimenten mit dem *Staphylococcus aureus*-Stamm ATCC 29213 gearbeitet.

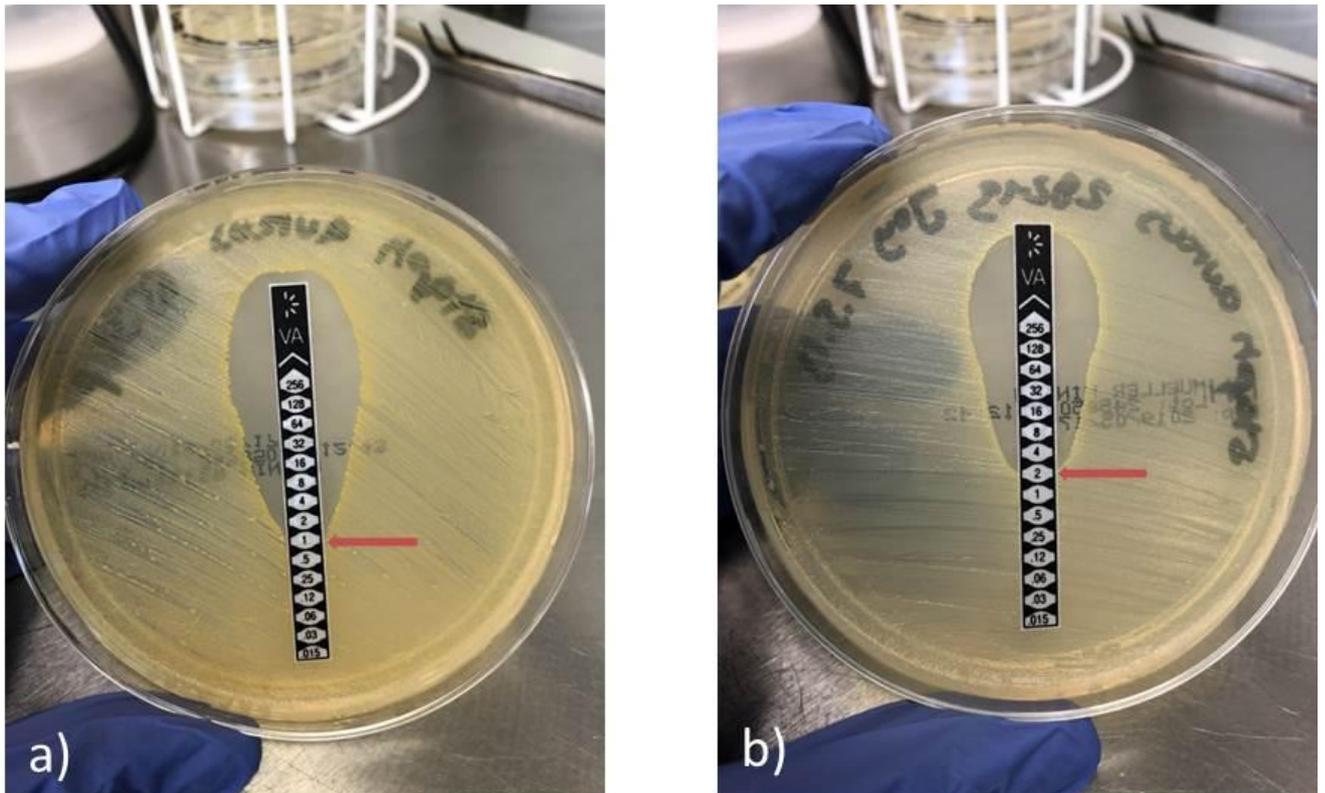


Abbildung 28: Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Vancomycin auf *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 P und ATCC 29213).

4.3.1.2 Aktivitätsbestimmung

Um den Einfluss des RB bzw. der RGX-Behandlung auf die bakterizide Wirkung von Vancomycin zu untersuchen, wurden die Membranen mit verschiedenen Mengen (10, 50 und 100 µg) beladen, vernetzt und dann hinsichtlich ihrer wachstumshemmenden Eigenschaften untersucht. Als Kontrolle wurden die Sheets mit Vancomycin in PBS beladen.

Vergleicht man die Hemmhöfe der mit Vancomycin beladenen Sheets, fällt auf, dass diese unabhängig von ihrer Behandlungskonzentration ungefähr gleich groß sind. Somit beeinflusst weder das RB noch die anschließende Quervernetzung mit grünem Licht die Aktivität des Antibiotikums. Weiter fällt auch auf, dass kein maßgeblicher Unterschied zwischen den eingesetzten Vancomycin Mengen innerhalb der Kollagene besteht. Vergleicht man allerdings die Hemmhöfe von C und A mit einer Vancomycin-Menge von beispielsweise 10 µg zeigt sich, dass der Radius der Hemmung bei C deutlich über dem des A liegt. Diese Beobachtung kann auch bei 50 und 100 µg Vancomycin gemacht werden (Abbildung 29).

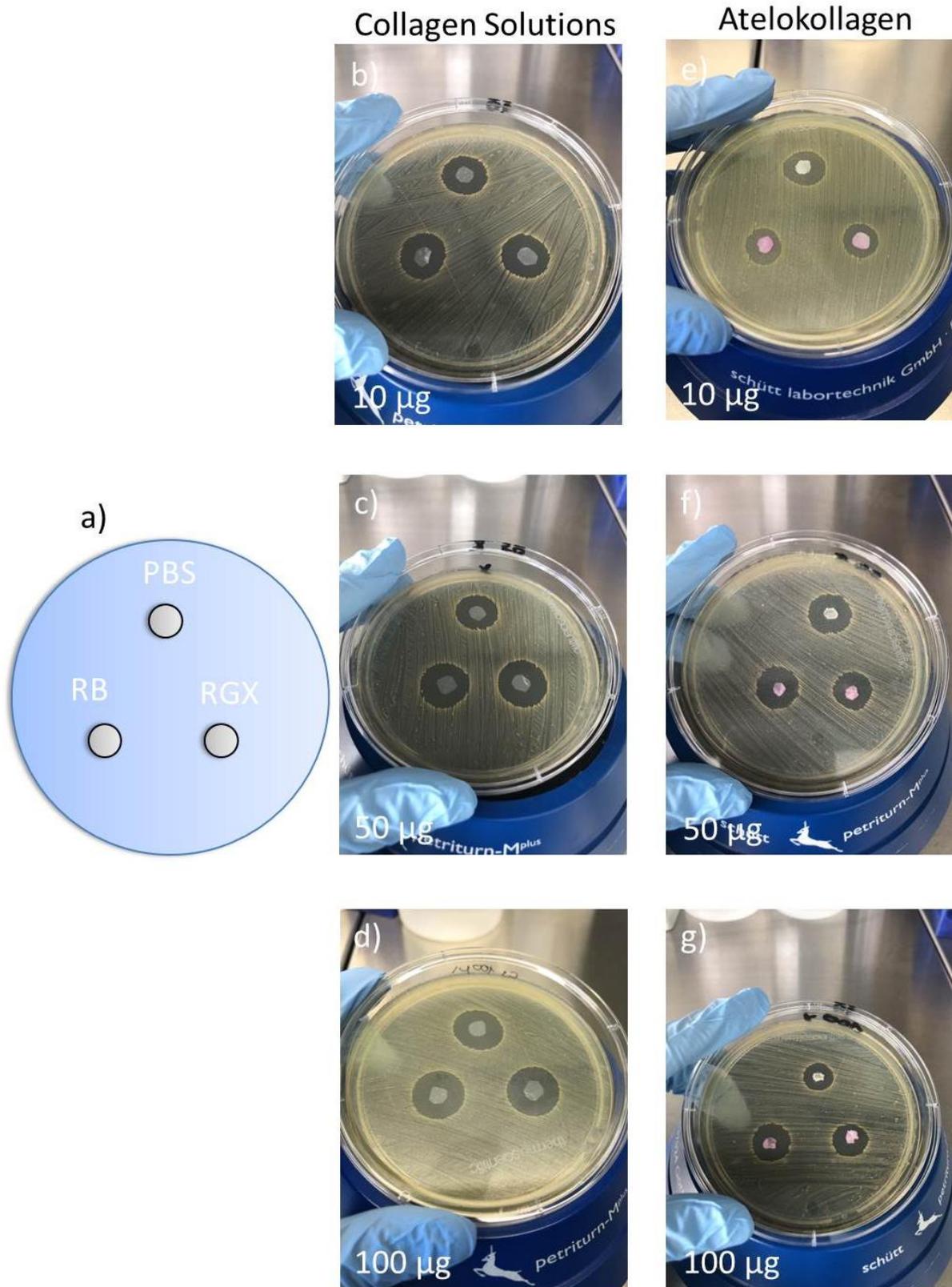


Abbildung 29: Assay zur Bestimmung des Hemmhofes von *Staphylococcus aureus*, wenn die Kollagene mit verschiedenen Konzentrationen an Vancmoycin beschichtet und RGX behandelt wurden. Als Kontrolle dient Vancmoycin, welches in PBS bzw. in RB ohne Bestrahlung gelöst wurde.

4.3.1.2.1 Einfluss der Kollagene auf die Vancomycin-Freisetzung

Da der vorherige Versuch minimale Unterschiede in der Größe der Hemmhöfe zwischen den Kollagenen aufwies, wurde eine zusätzliche Untersuchung mit einem anderen Versuchsaufbau durchgeführt. Im vorhergegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass Kollagene, welche mit 10 µg beladen sind, für eine Hemmung des Bakterienwachstums ausreichen. Um ein tieferes Verständnis bezüglich der Kollagenunterschiede zu erhalten, sollte das Bakterienwachstum über koloniebildende Einheiten (KBE) quantifiziert werden. Hierzu wurde Zellkulturmedium infiziert, welches in Kontakt mit den Vancomycin-beschichteten-Kollagenen ist. Nach 24 h wurde dieses Medium in verschiedenen Verdünnungen auf Agar-Platten ausplattiert (Abbildung 9). Dabei konnte bei beiden Kollagenen kein Wachstum auf den Platten, welche mit Medium der 50-µg- und 100- µg- Vancomycin-Kollagen-Proben beimpft wurden, festgestellt werden. Sowohl bei C als auch bei A konnte in der kleinsten Konzentration (10 µg) ein Bakterienwachstum festgestellt werden. Aufgrund der visuell deutlichen Ergebnisse wurde auf das Auszählen der KBE verzichtet. Abbildung 30: zeigt die Ergebnisse für die 1:10 Verdünnung auf C (a) und A (b). Während sich bei C deutliche KBE bildeten, war dies bei A nicht der Fall. Hier ist die Agar-Platte nahezu komplett mit den Bakterien bedeckt.



Abbildung 30: Test zur Bestimmung des Einflusses der Kollagene auf die Freisetzung von Vancomycin. Dafür wurden die Kollagene mit 10 µg Vancomycin beschichtet und RGXbehandelt. Anschließend wurde Medium mit *Staphylococcus aureus* beimpft und nach 24 h ausplattiert. Während sich bei einer 1:10 Verdünnung von C (a) KBE bilden ist dies für A (b) nicht der Fall.

4.3.2 Aktivität von SDF-1 α nach RGX-Behandlung

Der Einfluss der Quervernetzung auf die Aktivität von SDF-1 α wurde mithilfe des Proliferationsverhalten von HUVECs bestimmt. Hierzu wurden HUVEC auf den vernetzten, nicht beladenen Kollagenen mit den quervernetzten und SDF-1 α beladenen Kollagenen nach einer dreitägigen Inkubation ausgesät und das Proliferationsverhalten verglichen. Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Kulturplatte) dargestellt (Abbildung 31).

Wurden die HUVECs auf mit SDF-1 α beladenen C und A ausgesät, konnte bei beiden Kollagenen eine signifikant erhöhte Proliferation der Zellen verglichen zu den ungeladenen Kollagenen gemessen werden. Dabei lag die Zunahme für C bei 19 % und für A bei 93 %. Die Viabilität der HUVECs auf A konnte, wenn dieses mit SDF-1 α beschichtet war, nahezu verdoppelt werden. Auch dieser Versuch zeigt den in Abschnitt 4.2.4 bestimmten Unterschied in der Viabilität der Zellen auf den verschiedenen Kollagenen. Generell zeigt SDF-1 α auch nach Quervernetzung einen positiven Effekt und wird somit nicht durch die RGX-Behandlung beeinflusst. Speziell auf A kommt es zu einer deutlich gesteigerten Zellviabilität der Endothelzellen unter Einfluss von SDF-1 α .

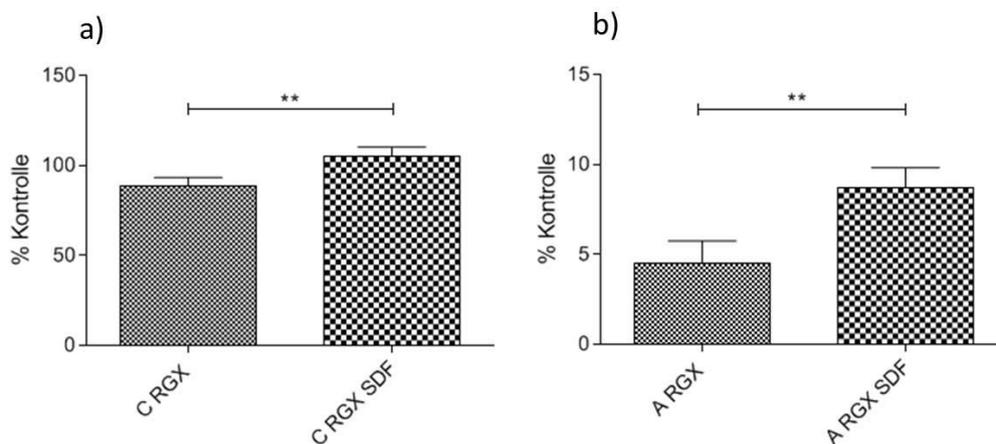


Abbildung 31: Assay zur Aktivität von SDF-1 α nach RGX Behandlung. Hierfür wurde nach drei Tagen ein alamarBlue™ Assay mit HUVECs durchgeführt (* p < 0.05; ** p < 0.01; *p < 0.001; n.s. nicht signifikant). Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Kulturplatte) dargestellt.**

4.3.3 Aktivität von BMP-7 nach RGX-Behandlung

Ob sich die Quervernetzung mit Bengalrosa und grünem Licht auf die osteogene Aktivität von BMP-7 auswirkt, wurde mittels eines ALP Assays und hOB untersucht. Es wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen eingesetzt. Abbildung 32 und Abbildung 33 zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen der osteogenen Aktivität von BMP-7 auf hOB, nachdem dieses in PBS verdünnt und adsorbiert wurde bzw. in RB mit anschließender Quervernetzung der Kollagene. Die Ergebnisse der verschiedenen Spender wurden einzeln dargestellt, da die ALP Aktivitäten stark voneinander abweichen.

Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der BMP-7-Aktivität auf, wenn dieses auf C adsorbiert bzw. quervernetzt wurde. Sowohl bei den in PBS verdünnten als auch auf den quervernetzten Proben kommt es zu einer signifikant gesteigerten ALP-Aktivität der hOB, wenn die Kollagene mit BMP-7 beladen wurde. Werden die einzelnen BMP-7 mit der jeweiligen unbeladenen Kontrolle verglichen, ist ein signifikanter Unterschied messbar. Vergleicht man die einzelnen Konzentrationen untereinander, bestehen keine signifikanten Unterschiede in der ALP Aktivität. Generell zeigt sich eine leichte Abnahme in der ALP-Aktivität von BMP-7 nach Quervernetzung. Diese ist allerdings vernachlässigbar, da dennoch eine erhöhte osteogene Aktivität festgestellt werden konnte.

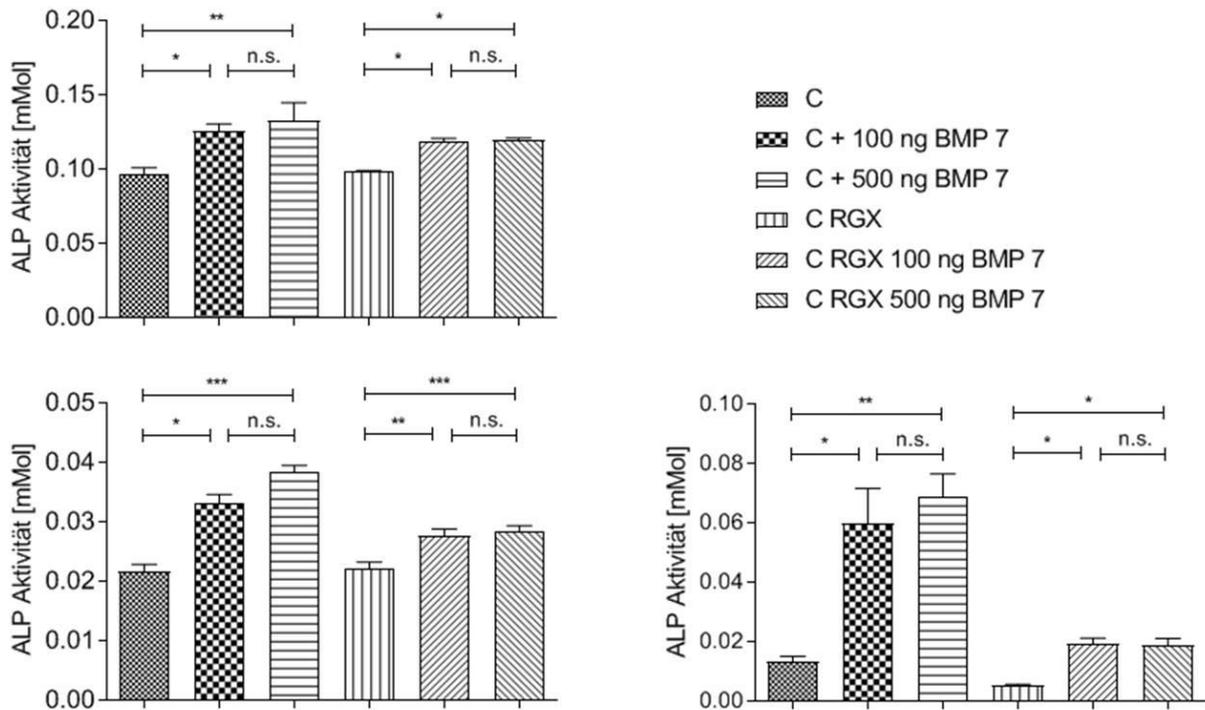


Abbildung 32: Osteogene Aktivität von BMP-7 nach Adsorption auf C in PBS und RB (mit anschließender Quervernetzung mit grünem Licht) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$; n.s. nicht signifikant). Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Kulturplatte) dargestellt.**

Betrachtet man die ALP-Aktivität der hOB auf A, wenn BMP-7 in PBS verdünnt und auf dem Kollagen adsorbiert ist, zeigen sich die gleichen Ergebnisse wie für C. Auch hier können signifikanten Unterschiede zwischen den Konzentrationen gemessen werden, wenn diese mit der unbeladenen Probe verglichen werden. Im Gegensatz zu C kann bei allen drei Spendern nach RGX Behandlung kein positiver Effekt mehr auf die Ausdifferenzierung von hOB gemessen werden (Abbildung 33).

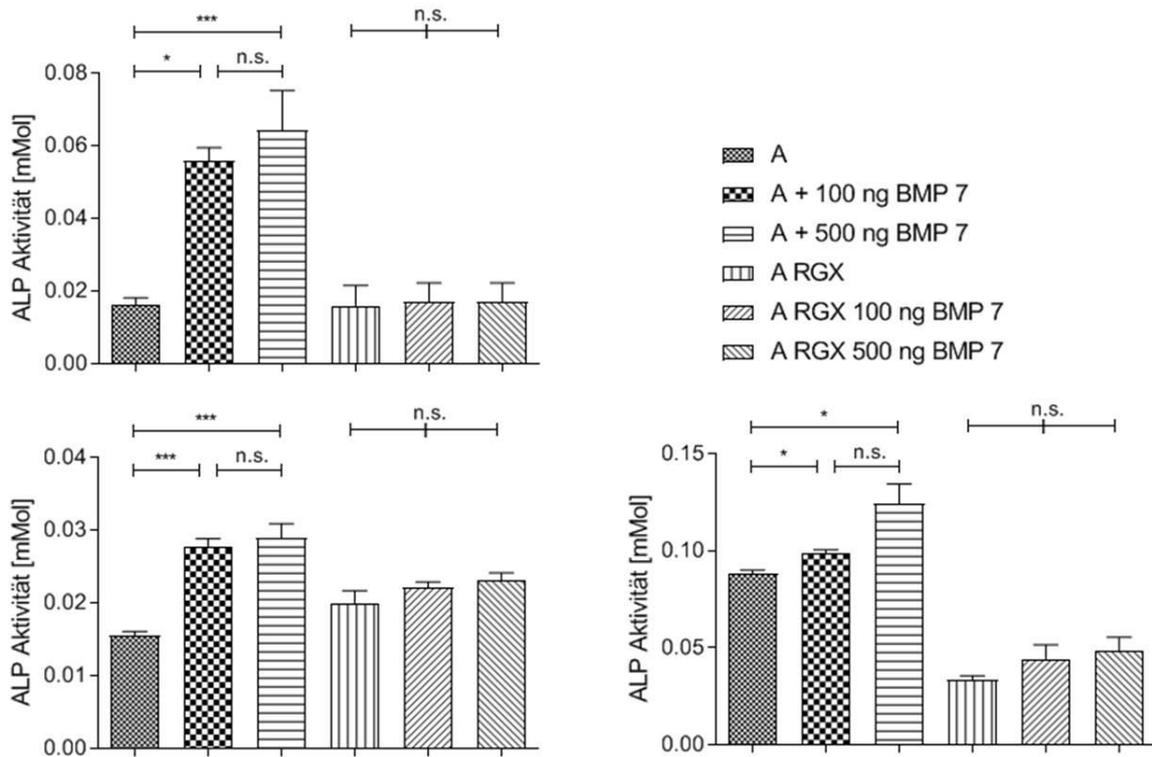


Abbildung 33: Osteogene Aktivität von BMP-7 nach Adsorption auf A in PBS und RB (mit anschließender Quervernetzung mit grünem Licht) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n.s. nicht signifikant). Aufgrund der großen Unterschiede in der ALP Aktivität wurden die Ergebnisse nicht gepoolt sondern einzeln dargestellt.

4.4 Mechanische Charakterisierung

Zum besseren Verständnis des Einflusses der RGX-Behandlung und der Laminierung auf die Eigenschaften der Kollagene sowie deren Zellverhalten wurden diese hinsichtlich verschiedener mechanischer Parameter untersucht.

4.4.1 Einfluss der Quervernetzung auf die Oberflächentopografie

Der Einfluss der Quervernetzung auf die Oberflächentopografie wurde mittels der Konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie untersucht (Abbildung 34). Dabei zeigte C eine dichte und feste Struktur mit Prägungen, wohingegen A großporig und schwammartig wirkte. Sowohl bei C als auch bei A entstand nach RGX-Behandlung ein verändertes Höhenprofil, welches deutlich flacher ausfiel. Bei beiden minimierte sich die max. Höhe sowie die max. Tiefe um mehr als die Hälfte. C zeigte nach RGX-Behandlung eine Abnahme in der Tiefe der Prägungen. Die Schwammstruktur von A kollabierte hierbei völlig. Diese Beobachtung stimmt mit früheren Ergebnissen überein, welche zeigen, dass die Struktur auch nach Kontakt mit PBS in sich zusammenfällt [163].

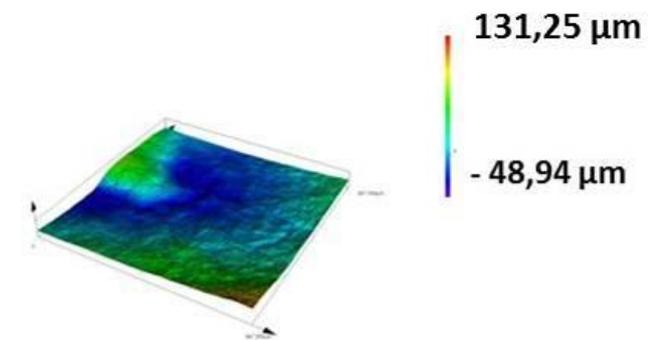
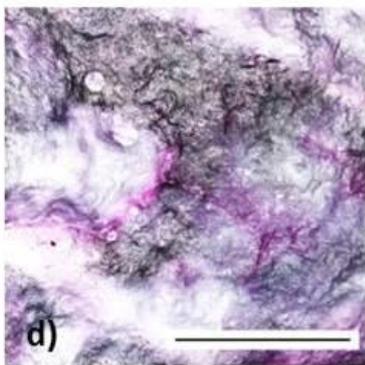
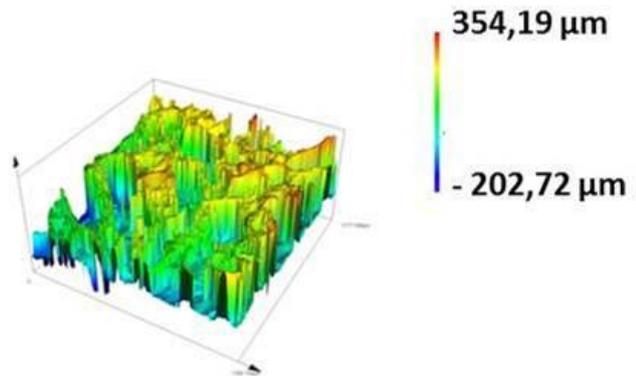
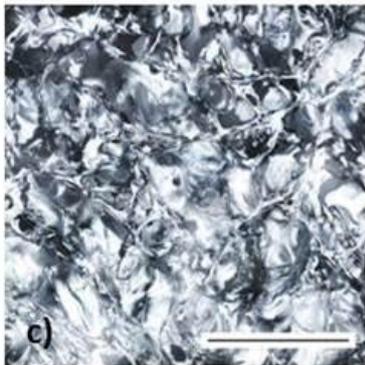
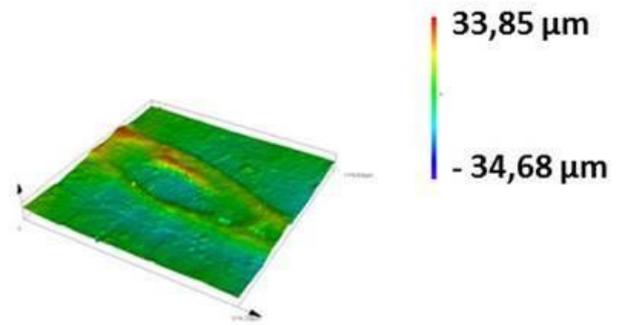
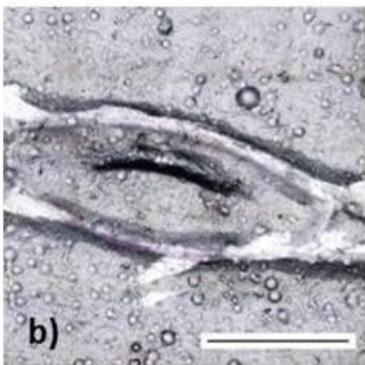
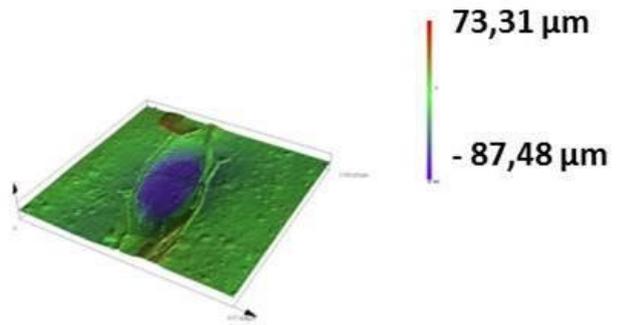
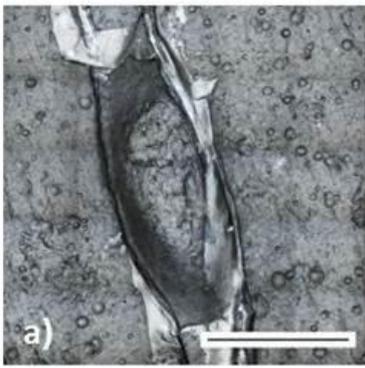


Abbildung 34: Konfokale Lasermikroskopie-Aufnahmen von C (a), (b) und A (c), (d) bevor (a), (c) und nachdem (b), (d) diese quervernetzt wurden (Vergrößerung 50x, die Maßstabsbalken betragen 100 nm).

4.4.2 Einfluss der Quervernetzung und der Laminatstruktur auf das mechanische Verhalten

Um die Kollagene sowie die Lamine hinsichtlich ihres mechanischen Verhaltens zu charakterisieren, wurden Zugversuche durchgeführt. Aufgrund der Komplexität des Versuchsaufbaus und der eingeschränkten Möglichkeit, heterologe Lamine zu messen, wurde nur mit homologen Laminen gearbeitet. Ein Überblick über die getesteten Proben gibt Tabelle 14.

Tabelle 14: Probenübersicht der bei den Zugversuchen genutzten Kollagene bzw. Lamine

Monolayer	Bilayer	Multilayer
A _{unbehandelt}	AA	AAA
A _{RGX}	CC	CCC
C _{unbehandelt}		
C _{RGX}		

Zur Bestimmung der Bruchdehnung, dem E-Modul sowie der maximal ertragbaren Spannungen wurden die in der Messung erhaltenen Kraft-Weg-Diagramme mithilfe der Dicke der Probe sowie deren Breite an der Greifvorrichtung in die jeweiligen Spannungs-Dehnungs-Diagramme überführt. Mithilfe dieser Diagramme konnten die entsprechenden mechanischen Kennwerte wie in Abbildung 35 berechnet bzw. abgelesen werden.

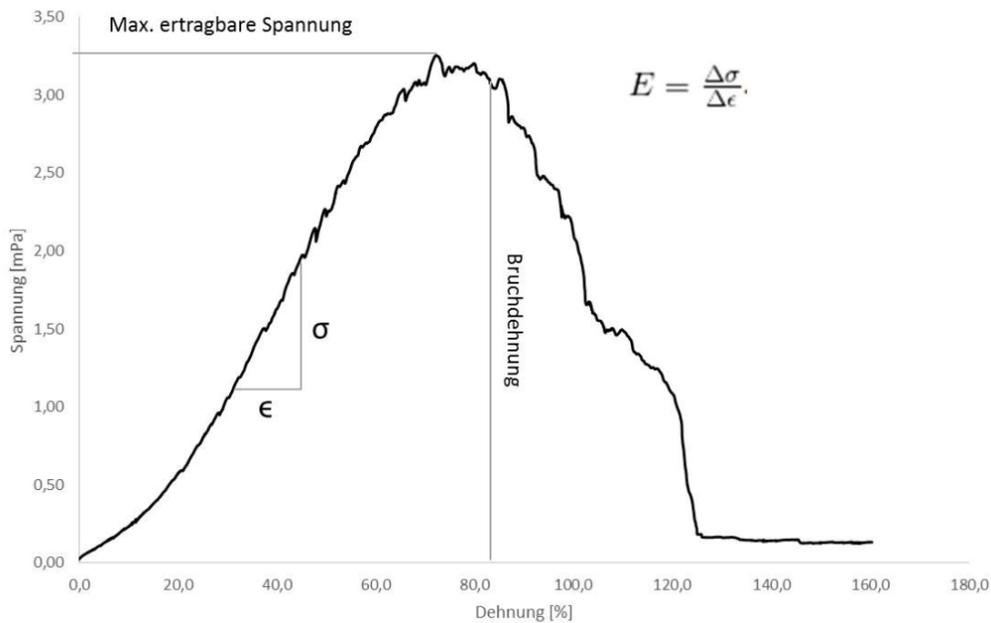


Abbildung 35: Beispiel einer Spannungs-Dehnungskurve und der daraus ermittelten mechanischen Parameter (max. ertragbare Spannung, Bruchdehnung und E-Modul) zur Charakterisierung der Lamine.

Sowohl C als auch A zeigten in sich charakteristische Kurvenverläufe, welche am Beispiel von RGX behandelten Proben in Abbildung 36 a) und b) dargestellt sind. Während für A die Messung bis zur Zerstörung der Probe realisierbar war, wurde die Messung für C vorher abgebrochen, da die maximale Zugkraft von 1000 mN erreicht war. Aufgrund dessen ließ sich für C nur der E-Modul bestimmen. Trotzdem verdeutlichen gerade diese unterschiedlichen Abbruchkriterien die Unterschiede in den mechanischen Eigenschaften. Während es bei A zur irreversiblen Materialverformung kam, endete die Kurve von C im linearen Bereich, d.h. das Material wurde reversibel elastisch verformt. Weiter konnten speziell für C zwei unterschiedliche Kurventrends beobachtet werden (siehe Abbildung 36 c). Da angenommen wurde, dass sich das wahre mechanische Verhalten zwischen den dargestellten Verläufen befindet, wurden die Werte gemittelt.

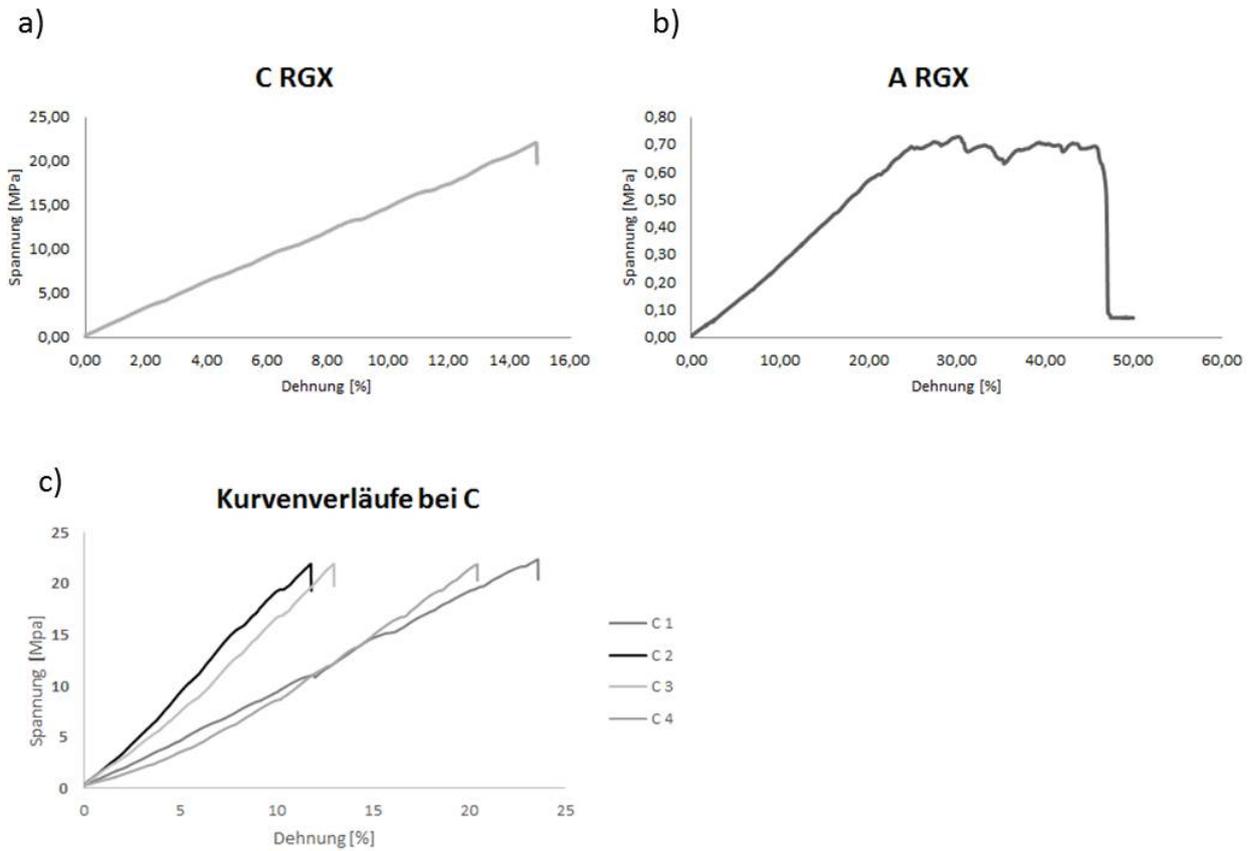


Abbildung 36: a) und b) zeigen typische Spannungs-Dehnungs Diagramme von C und A am Beispiel von RGX-behandelten Proben. c) zeigt die für C unterschiedlichen Kurvenverläufe verschiedener Messungen. Aus diesen wurden die mechanischen Kennwerte gemittelt.

Abbildung 37 zeigt die duktile Verformung von A während des Zugversuchs mit anschließendem Bruch. Zu Beginn zeigt sich eine leichte Deformation des Materials, welche sich im Lauf der Prüfung verdeutlicht. Es kommt zur Einschnürung zur Probenmitte hin, bis schließlich der Bruch erfolgt.



Abbildung 37: Sequenz des Bruchs von A während eines Zugversuchs.

Wie sich schon anhand der typischen Kurvenverläufe vermuten lässt, variiert der E-Modul von C zu A stark. Die Werte für C mit > 100 MPa liegen deutlich über denen von A (< 10 MPa). Sowohl bei C als auch bei A kommt es zu einer Abnahme des E-Moduls nach Vernetzung der Einzelschichten. Während diese bei C 25 % betrug, war die Abnahme, welche für A gemessen wurde, doppelt so hoch. Der E-Modul war hier nach RGX-Behandlung um die Hälfte reduziert. Durch eine zweite Kollagenschicht konnte für beide Kollagene im Vergleich zur RGX-behandelten Einzelschicht wieder ein höherer E-Modul gemessen werden. Für CC war der gemessene Wert um 17 % höher als der des unbehandelten Kollagens. AA überschritt den E-Modul der unbehandelten Proben nicht, dennoch lag er um 35 % über dem der behandelten RGX-Einzelschicht. Weder bei C noch bei A konnte eine weitere Steigerung des E-Moduls durch eine zusätzliche Schicht gemessen werden; bei beiden kam es zu einer Abnahme (Abbildung 38).

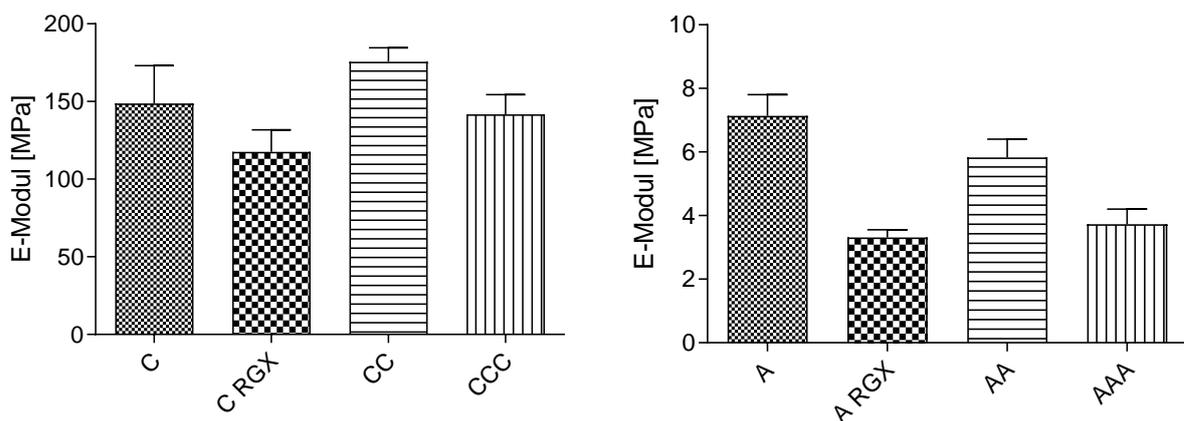


Abbildung 38: E-Modul kalkuliert aus Spannungs-Dehnungs-Diagrammen von unbehandelten und RGX behandelten Kollagenen sowie von verschiedenen Laminaten.

Wie oben erwähnt, konnte aufgrund der Limitation des Gerätes für C weder die max. ertragbare Spannung noch die Bruchdehnung bestimmt werden. Bei A kam es nach Quervernetzung genau wie bei den Werten der E-Module auch bei der maximal ertragbaren Spannung zu einer Abnahme. Diese Reduktion betrug 70 %. Über eine weitere Schicht konnte die maximal ertragbare Spannung um 142 % bezogen auf die RGX behandelte Einzelschicht erhöht werden. Das Dreierlaminat zeigte auch hier keine weitere Erhöhung des Wertes im Vergleich zu dem Bilayerlaminat. Im Gegenteil, durch die zusätzliche Schicht nahm die maximal ertragbare Spannung um 47 % ab.

Auch die Bruchdehnung von A nahm nach Quervernetzung um 32 % ab. Im Gegensatz zu den anderen Parametern nahm die Duktilität über das Schichten bis hin zu den 3er-Laminaten kontinuierlich zu und somit auch die Bruchdehnung. Für das 3er-Laminat konnte ein um 60 % höherer Wert verglichen mit unbehandeltem A gemessen werden. Somit hat das Schichten direkten Einfluss auf die Bruchdehnung.

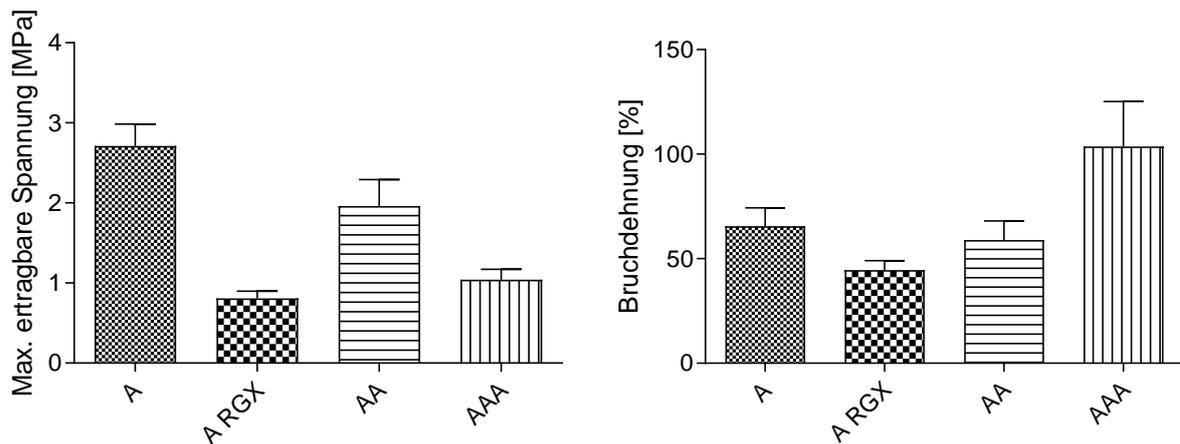


Abbildung 39: Maximal ertragbare Spannung und Bruchdehnung kalkuliert aus Spannungs-Dehnungs-Diagrammen von unbehandelten und RGX behandelten Kollagenen sowie von verschiedenen Laminaten.

4.4.3 Einfluss der Zellen auf die mechanische Stabilität

Um den Einfluss von Zellen auf die mechanische Stabilität der Kollagene und Laminata zu bestimmen, wurden Dickenmessungen durchgeführt. Eine Abnahme der Kollagendicken zwischen den beiden Messzeitpunkten (24 h und 72 h) wurde durch die Zellen verursachten Destabilisierung gleichgesetzt. In Tabelle 15 werden alle getesteten Proben aufgeführt. Aufgrund der Instabilität von ACA wurde dieses im weiteren Vorgehen ausgeschlossen.

Tabelle 15: Probenübersicht der bei den Dickenmessungen genutzten Kollagene bzw. Laminata

Monolayer	Bilayer	Multilayer
A (unbehandelt)	AA	AAA
A (RGX)	CC	CCC
C (unbehandelt)	AC	CAC
C (RGX)		ACA (instabil) keine Messung

Betrachtet man die Einzelschichten in unbehandeltem und quervernetztem Zustand, kann weder für C noch für A eine signifikante Abnahme der Dicke zwischen den beiden Zeitpunkten nach Zellkontakt detektiert werden (Abbildung 40).

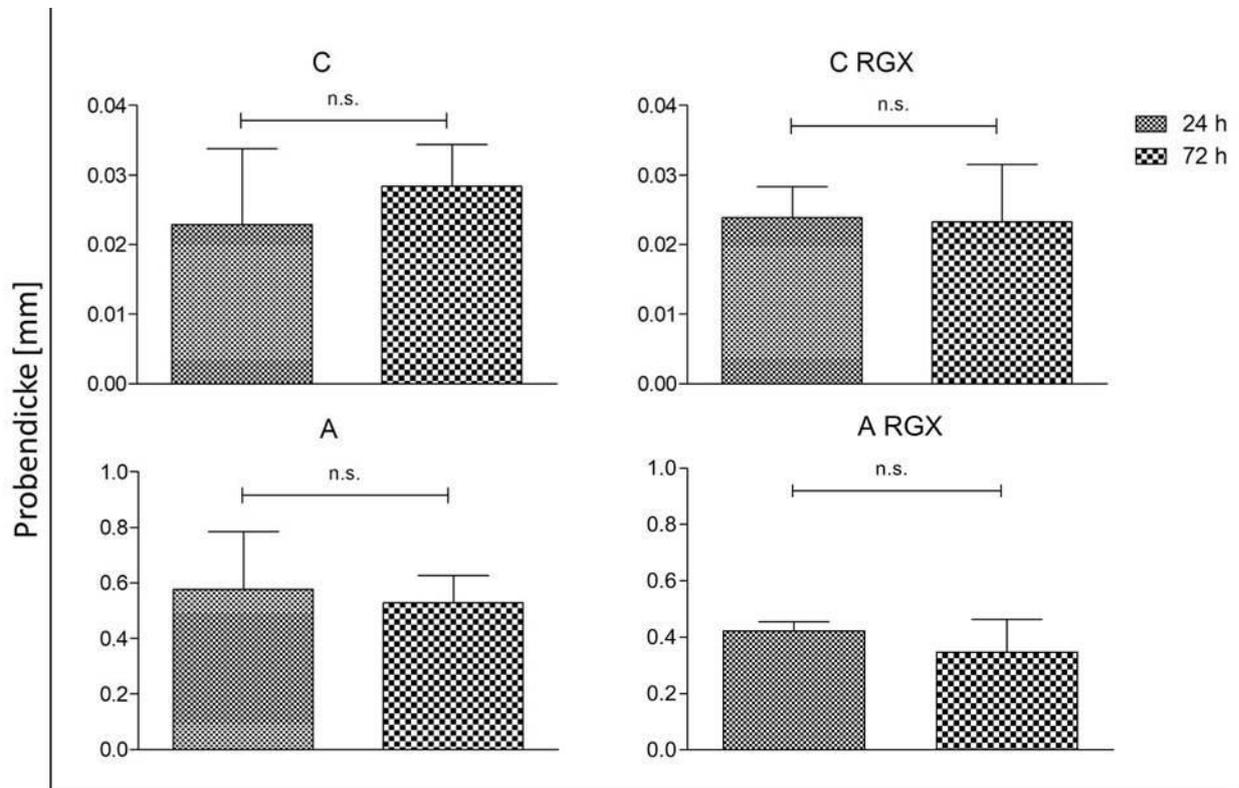


Abbildung 40: Probendicke verschiedener einzelschichtiger Kollagene nach Zellkontakt für 24 h bzw. 72 h (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$; n.s. nicht signifikant).**

Die homologen Zweierlaminare CC und AA zeigten keine Destabilisierung ihrer Struktur durch die Inkubation mit Zellen. Im Gegensatz dazu konnte eine 40-50 %ige Reduktion der Dicke im heterologen AC Laminat 72 h nach Inkubation mit den Zellen gemessen werden (Abbildung 41).

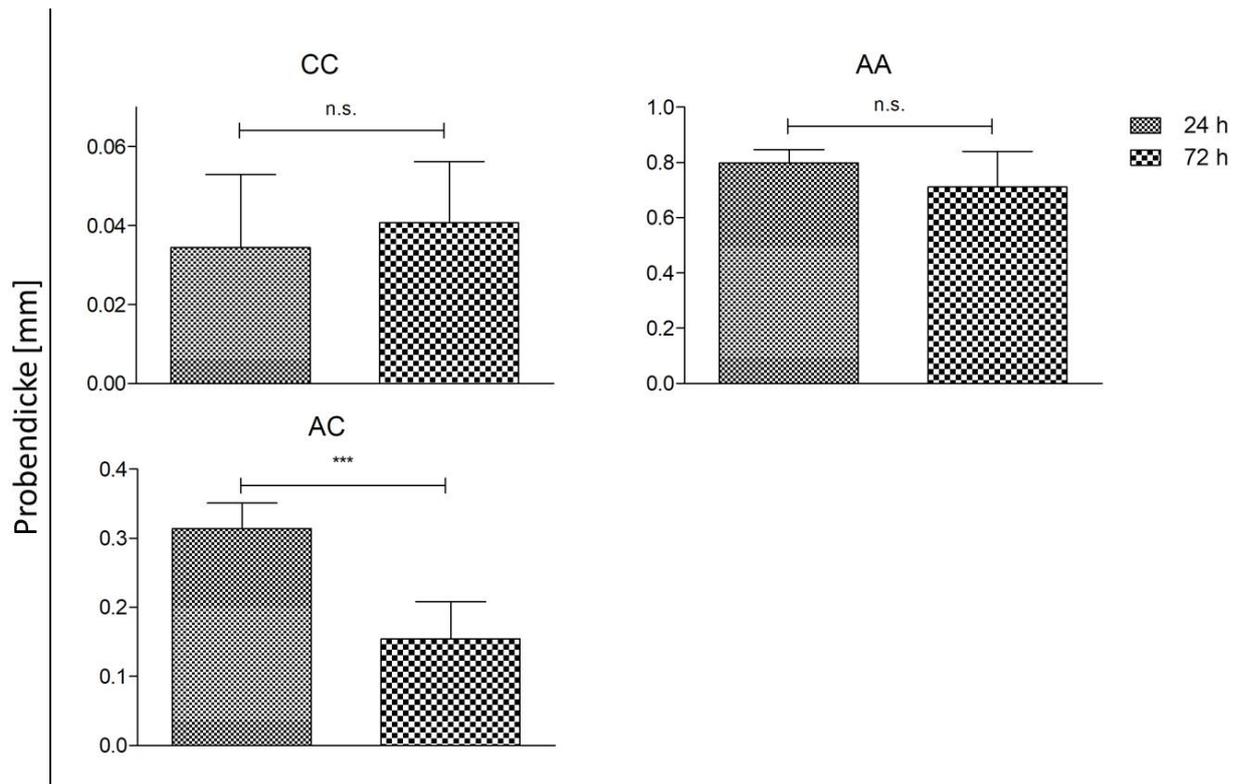


Abbildung 41: Probanddicke verschiedener zweier Kollagenlaminare nach Zellkontakt für 24 h bzw. 72 h (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$; n.s. nicht signifikant).**

Sowohl CCC als auch CAC zeigten eine signifikante Abnahme 72 h nach Zellkontakt und somit eine Destabilisierung ihrer Struktur. Dabei war die Abnahme bei CCC mehr als dreimal so hoch (30-40 %) als bei CAC. Hier wurde lediglich eine Abnahme im Bereich von max. 10 % bestimmt. AAA hingegen zeigte keine Veränderung in der Dicke nach Zellkontakt (Abbildung 42).

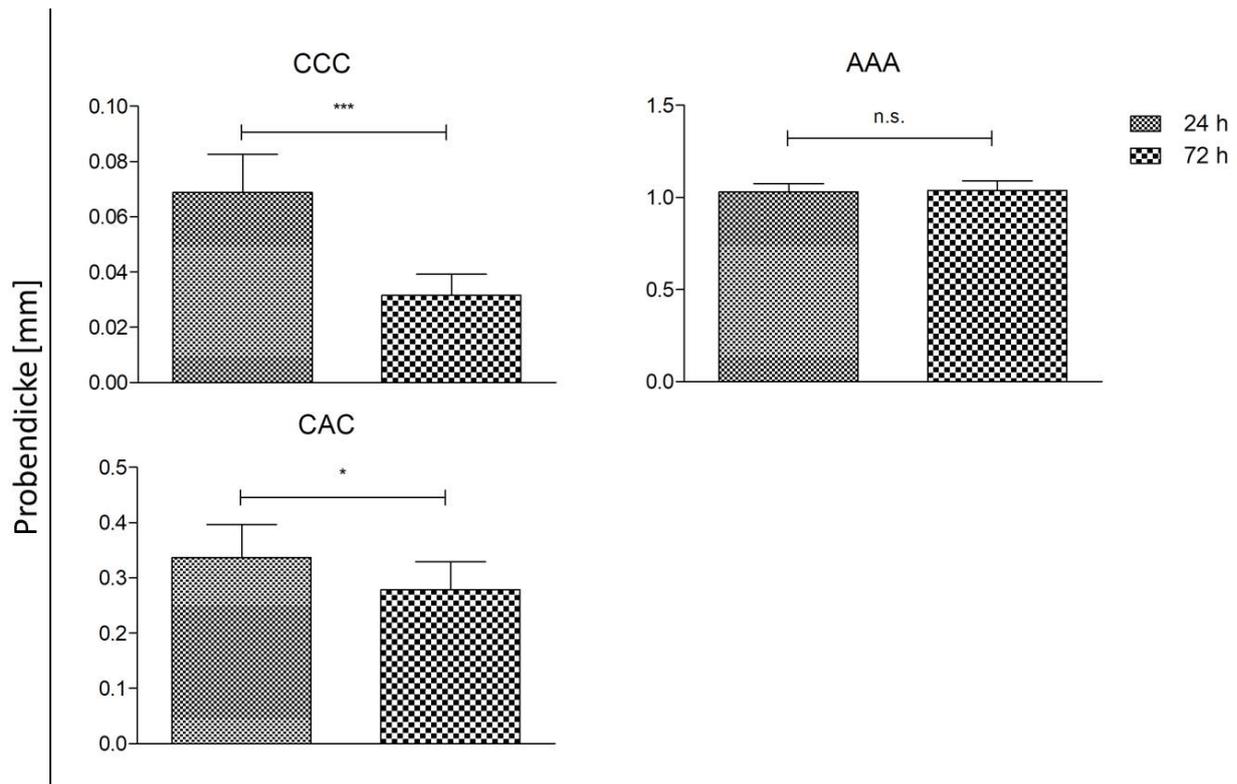


Abbildung 42: Probendicke verschiedener dreier Kollagenlamine nach Zellkontakt für 24 h bzw. 72 h (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$; n.s. nicht signifikant).**

4.4.3.1 Viabilität der Zellen auf den Laminaten

Um eventuelle Korrelationen zwischen der Zellviabilität und der Destabilisierung der Lamine festzustellen, wurde die Zellproliferation an zur Dickenmessung äquivalenten Zeitpunkten durchgeführt. Da für die spätere Anwendung vor allem mehrschichtige Lamine von Relevanz sind, wurden ausschließlich diese für die Untersuchungen berücksichtigt. Abbildung 43 zeigt die Ergebnisse prozentual bezogen auf die Kontrolle (Kulturplatte). Sowohl nach 24 h als auch nach 72 h waren signifikante Unterschiede in der Proliferation der NHDF zwischen allen Laminaten messbar. Die Unterschiede sind besonders deutlich bei direktem Vergleich der homologen Lamine. Während die Viabilität der Zellen auf CCC nach 24 h 87 % und nach 72 h 96 % betrug, fand auf AAA quasi keine Proliferation statt. Der Wert lag hier nach 24 h bei 7 % und nach 72 h bei 3 %. Die Proliferationsrate der NHDF auf CAC lag zwischen den homologen Laminaten. Dennoch fand auch hier eine sehr geringe Proliferation statt. Verglichen zu AAA gab es initial eine höhere Proliferation (23 % der Kontrolle), welche über den Zeitraum wie bei AAA abnahm. Somit ist CCC das einzige Laminat, auf dem die Viabilität der Zellen über den Zeitraum zunimmt und dessen Werte kaum von denen der Kontrolle abweichen.

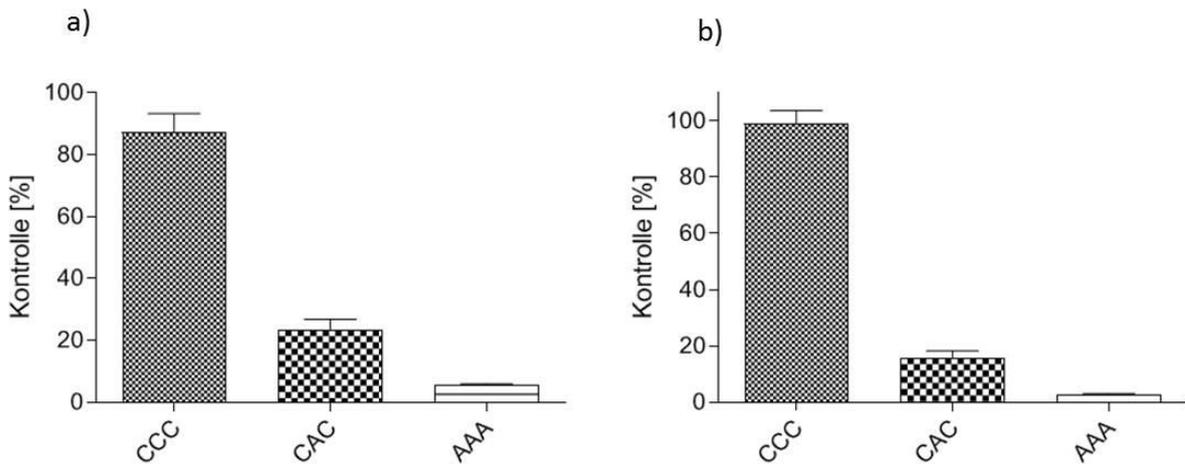


Abbildung 43: Viabilität von NHDF Zellen nach 24 h bzw. 72 h auf den verschiedenen Kollagenlaminaten. Da sich alle Werte höchst signifikant voneinander unterschieden ($*p < 0.001$) wurden diese aus Übersichtsgründen nicht in der Grafik aufgeführt. Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Kulturplatte) dargestellt.**

4.4.3.2 *In vitro*-Zytotoxizitätsuntersuchungen der Lamine

Um das Proliferationsverhalten der NHDFs besser zu verstehen, wurden die Lamine hinsichtlich ihrer zytotoxischen Eigenschaften untersucht. Hierfür wurden L929 Zellen genutzt, da diese laut DIN EN ISO 10993-5 zur Prüfung auf *in vitro*-Zytotoxizität von Medizinprodukten standardmäßig für solche Untersuchungen eingesetzt werden. Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Kulturplatte) dargestellt (Abbildung 44). Aufgrund der Höhe der Zellviabilität für CCC (100 %), bei welchen keine zytotoxischen Eigenschaften nachgewiesen werden konnten, wurden die Einzel- und Zweierschichten nicht weiter berücksichtigt. Betrachtet man die Werte bei A, AA und AAA wird deutlich, dass die Zytotoxizität des Mediums, welches mit den Kollagenen in Kontakt war mit der Anzahl der Schichten zunimmt. Während für das Medium welches mit A in Kontakt stand eine Zellviabilität von 85 % gemessen wurde, sank diese von 33 % auf 3 % über die zusätzlichen Schichten. Speziell der Wert für AAA impliziert eine hohe Zytotoxizität der Lamine auf die Zellen. Die DIN EN ISO 10993-5 definiert eine Reduktion um $> 30\%$ als zytotoxisch. Im Fall von AAA ist der Wert um 97 % reduziert. Für Medium, welches mit CCC und CAC in Kontakt war, konnte keine Zytotoxizität festgestellt werden. Die Werte auf CCC entsprechen denen der Kulturschale und bei CAC lag der Wert bei 88 %. In beiden Fällen war die Viabilität nicht um $> 30\%$ reduziert, auch wenn ein negativer Trend beobachtet wurde, sobald eine Schicht A im Laminat enthalten war.

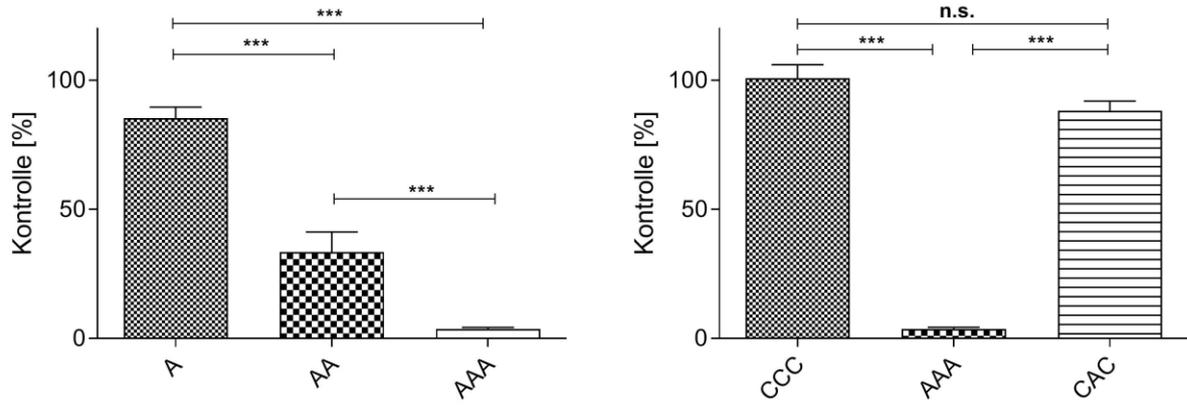


Abbildung 44: *In vitro*-Zytotoxizitäts-Assays der Laminare durchgeführt mit L929 Zellen (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n.s. nicht signifikant). Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Medium ohne Kollagenkontakt) dargestellt

5 Diskussion

Die Dissertation befasst sich mit der Entwicklung von Kollagenlaminaten zur beschleunigten Heilung von Knochenbrüchen kritischer Größe und der Verhinderung von Pseudoarthrosen. Dabei sollen die Freisetzung der inkorporierten Moleküle, welche zur verbesserten Knochenheilung beitragen, sowie die Stabilität des Laminates durch die Kollagen Zusammensetzung gesteuert werden. Die Arbeit basiert auf verschiedene interdisziplinären Methoden, welche zur Herstellung und Charakterisierung dieser Lamine dienen.

Da Infektionen bei einer gestörten Frakturheilung eine übergeordnete Rolle spielen, lag der erste Fokus der Arbeit zunächst auf der Evaluierung der Toxizität des Antibiotikums Vancomycin, mit welchem Infektionen vorgebeugt werden sollen. Hier wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen auf die Viabilität und Funktionalität an verschiedenen, am Regenerationsprozess beteiligten Zellen, bestimmt.

Die weitere Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und Charakterisierung der Lamine. Hierfür wurden der Einfluss der genutzten Kollagene und Lamine sowie deren Quervernetzungsparameter untersucht und im Folgenden ausdiskutiert. Außerdem soll die Aktivität der eingebrachten Moleküle nach Quervernetzung sowie die mechanische Charakterisierung abhängig von der Behandlung erörtert werden.

5.1 Toxizität von Vancomycin

Zur Prävention bakterieller Infektionen während des Heilungsprozesses soll in die Lamine Vancomycin inkorporiert werden. Damit durch eine zu hohe Konzentration kein negativer Effekt entsteht, wurde zunächst der Einfluss der verschiedenen Konzentration auf die Zellviabilität und deren Funktionalität bestimmt. Um möglichst aussagekräftige Ergebnisse in Bezug auf die Lamine und deren Anwendung zu erhalten, wurde hier eine Vielzahl von an der Knochenregeneration beteiligten Zellen einbezogen. Dazu zählen Fibroblasten, Endothelzellen, Muskelzellen und Osteoblasten. Weiter wurde ein langer Zeitraum (bis zu 10 Tage) und eine große Bandbreite an Konzentrationen (0,01 – 2 mg/mL) untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass jeder Zelltyp an mindestens einem Zeitpunkt über die Messdauer auf eine der Konzentrationen mit einer verminderten Viabilität reagiert. Generell fällt auf das die Sensitivität gegenüber Vancomycin von Tag 1 zu Tag 3 steigt und von Tag 7 zu Tag 10 abnimmt. Insbesondere die ersten Tage zeigen, dass es sich nicht nur um eine konzentrationsabhängige, sondern auch um eine zeitabhängige Reaktion handelt. Diese starke Zunahme der Sensitivitäten in

den ersten Tagen spricht bei Drug Delivery Systemen eher für einen „burst release“ (initial rasche Freisetzung) als für einen „steady state“ (anhaltende Freisetzung).

Des Weiteren verhalten sich alle Zellen unterschiedlich, sodass hier, wie zu erwarten war kein genereller Schluss gezogen werden kann. Primäre SkMc beispielsweise reagieren am sensibelsten mit einer signifikant verminderten Viabilität ab der kleinsten Konzentration an Tag 3. Lediglich HUVECs zeigen an diesem Tag keine signifikanten Unterschiede. Dieser Versuch wurde unabhängig voneinander dreimal durchgeführt. Hier haben die HUVECs stark unterschiedlich auf das Vancomycin reagiert, worauf die große Standardabweichung zurückzuführen ist. Da HUVECs sehr sensible primäre Zellen sind, ist die Interpretation dieser Ergebnisse schwer. Einen zeitabhängigen Effekt von Vancomycin auf HUVECs konnten Drouet *et al.* zeigen. Innerhalb der ersten 24 h kam es bei einer Konzentration von 5 mg/mL zu einer verminderten Viabilität [168]. Nach 72 h reagierten die Zellen nur noch sensitiv ab einer Konzentration von 2,5 mg/mL.

Weiter haben die Ergebnisse gezeigt, wie wichtig es ist, auch mit primären Zellen anstatt nur mit Zelllinien zu arbeiten. Während bei den primären Osteoblasten keine verminderte Viabilität an Tag 5 zur Kontrolle gemessen wurde, zeigte die osteoblasten-ähnliche Zelllinie SaOS-2 hier eine signifikante Verminderung ab der geringsten Konzentration.

Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurde zudem noch der Einfluss von Vancomycin auf das Differenzierungsverhalten von hOB, auf die Myotubenformation von SkMc und die Gefäßformation von HUVECs untersucht.

Dabei fällt auf, dass die hOB und die SkMc in den Funktionalitätstest deutlich sensitiver auf Vancomycin reagieren. Die SkMc zeigen eine verminderte Viabilität an Tag 5 ab einer Konzentration von 0,5 mg/mL. Die Messung zum Einfluss von Vancomycin auf die Myotubenformation fand analog zum Viabilitätsassay fünf Tage nach der Inkubation mit Vancomycin statt. Hier reagierten die Zellen bereits ab einer Konzentration von 0,1 mg/mL negativ auf das Vancomycin. Aufgrund des Versuchsaufbaus können bei den hOB nur die Werte von Tag 5 des Viabilitätsassays mit dem Funktionalitätstest an Tag 6 verglichen werden. Während sich für die hOB eine verminderte ALP Aktivität ab einer Konzentration von 1 mg/mL messen lies, konnte an Tag 5 kein negativer Einfluss von Vancomycin auf die Viabilität gemessen werden. Da die vorangegangenen Viabilitätstests zeigten, dass über die Dauer der Inkubation die Toxizität von Vancomycin abnimmt, kann auch bei den hOB in dem Funktionalitätstest obwohl Tag 5 mit Tag 6 verglichen wird, von einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin gesprochen werden

Im Gegensatz hierzu zeigen HUVECs in kleinen Konzentrationen (0,01-0,2 mg/mL) eine verbesserte Länge und Anzahl der junctions. Auf die totale Länge wurde kein Effekt gemessen. Generell lässt sich hier nicht erklären, warum das Vancomycin auf zwei der drei Parameter einen positiven Effekt hat.

Die Versuche konnten zeigen, dass selbst kleine Konzentration von 0,01 mg/mL einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität haben. In der Orthopädie werden oft Polymethylmethacrylate (PMMA)-Knochenzemente genutzt, die Antibiotika freisetzen. Diese Methode ermöglicht den Einsatz der benötigten Dosis am Ort des Geschehens ohne systemisch toxische Reaktion auszulösen. Dabei sind die dort genutzten Konzentrationen mit bis zu 3 g Antibiotikum pro Knochenzement extrem hoch oder bestehen aus Kombinationen verschiedener Präparate [169-171]. Die in der Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen allerdings, dass selbst kleinste Konzentration von 0.01 mg/mL toxisch auf die an der Knochenregeneration beteiligten Zellen wirken können. Es gibt jedoch auch Studien mit anderen Ergebnissen. So zeigt die Studie von Rathbone *et al.*, dass Vancomycin eines der am wenigsten toxisch wirkenden Antibiotika ist [172]. Hier wurde der Einfluss von 21 Antibiotika auf die Zellzahl und ALP Aktivität auf käuflich erworbene primäre Osteoblasten untersucht. Vancomycin vermindert dabei erst ab einer Konzentration von 5 mg/mL die Zellzahl (50-74 % zur Kontrolle) nach 10 bzw. 14 Tagen. Ab der gleichen Konzentration wird auch die ALP Aktivität beeinflusst, allerdings in einem geringeren Ausmaß (26-49 % zur Kontrolle). Die in dieser Dissertation durchgeführte Studie zeigt, dass der Einfluss von Vancomycin über den Zeitraum von 10 Tagen abnimmt. Da das Antibiotikum alle 4 Tage über einen Medienwechsel erneuert wird, spricht das eher für eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber dem Medikament als für eine Verstoffwechslung. Da auch hier ab Tag 10 keine verminderte Proliferation von Osteoblasten festgestellt wurde, stimmen die Ergebnisse teilweise überein. Dennoch zeigen selbst kleinere Konzentration von Vancomycin über einen kürzeren Zeitraum einen toxischen Effekt. Da bei Rathborn *et al.* nur nach 10 bzw. 14 Tage getestet wurde, kann die Aussage, dass Vancomycin das am wenigsten toxisch wirkende Antibiotikum darstellt, lediglich auf eine Therapiedauer von > 10 Tage bezogen werden.

Im Gegensatz dazu untersuchten Edin *et al.* die Viabilität von MG-63 Zellen unter Einfluss von Vancomycin nach einem kürzeren Zeitraum (24 h und 72 h)[173]. Dabei zeigte erst eine Konzentration von 10 mg/mL einen negativen Effekt auf die Zellen. Bis 1 mg/mL waren keine signifikanten Unterschiede messbar. Da hier mit osteoblasten-ähnlichen Zellen gearbeitet wurde, ist der Vergleich mit den hier dargelegten Ergebnissen nicht direkt möglich, da bekannt ist, dass sich Zelllinien und primäre Zellen oft im Verhalten unterscheiden [174].

Generell zeigen diese Ergebnisse wie wichtig es ist einzelne Antibiotika hinsichtlich ihres Einflusses auf verschiedenste Zellen und unterschiedlichen Expositionszeiten zu untersuchen. Die Studie zeigt auch, dass die im Knochenzement oft eingesetzten 3 mg Antibiotikum deutlich zu hoch sind und negativen Einfluss auf die Zellen nehmen können. Auch um die Ausbildung von Antibiotikaresistenzen zu verhindern, ist es wichtig optimal wirksame Dosen über einen relevanten Zeitraum freizusetzen. Da in den Laminaten Vancomycin über einen kurzen Zeitraum freigesetzt werden soll, ist es besonders wichtig mit geringen, aber wirksamen Konzentration zu arbeiten, sodass es direkt zur Bakterienabtötung kommt, bevor die wirksame Dosis unterschritten wird.

5.2 Einfluss der Kollagene sowie der Quervernetzungsparameter auf die Zellviabilität

Die Grundlage der Lamine stellt neben den Kollagenen selbst ihre Herstellung durch Quervernetzung dar. Zur optimalen Knochenregeneration sollen die Lamine biokompatibel sein und die Quervernetzung möglichst keinen bzw. im besten Fall einen positiven Einfluss auf die Zellviabilität haben. Deshalb wurden zunächst die Vernetzungsparameter optimiert sowie der Einfluss der Kollagene auf die Zellproliferation evaluiert.

5.2.1 Einfluss der Quervernetzungsparameter

Speziell in der Ophthalmologie, bei Verletzungen der Cornea, kommt oft photochemisches Quervernetzen mit Bengalrosa zum Einsatz. Hier werden meist Konzentration von 0,1 % RB genutzt [175-177]. Die Studie von Chan *et al.* konnte zeigen, dass neben der Menge der Laserenergie auch die Konzentration des Photosensibilisators Einfluss auf die Porengröße hat [178]. Da in der Augenheilkunde andere Zellen als bei der Knochenregeneration von Relevanz sind und verschiedene Zellpopulationen unterschiedliche Ansprüche an die Oberflächentopographie haben, sollten zunächst die Vernetzungsparameter optimiert werden [179-181]. Beispielsweise ist bekannt, dass raue Oberflächen die Adhäsion von Osteoblasten fördern, wohingegen Fibroblasten glatte Oberflächen bevorzugen [182]. Auch andere Zellen wie Makrophagen und Keratinozyten sind dafür bekannt, sensitiv auf die Oberflächentopographie zu reagieren [183] [184, 185].

Hierzu wurde anfangs der Einfluss der RB-Konzentration zur Quervernetzung auf die Zellviabilität von NHDFs und hOB untersucht. Da es lediglich um den Einfluss des RB ging, wurde C als Modellkollagen verwendet. Neben der in der Ophthalmologie üblichen 0,1 % RB-

Lösung wurde zusätzlich eine 0,01 % RB-Lösung genutzt. Chan *et al.* zeigten bereits, dass selbst sehr geringe RB-Konzentrationen von $< 0,00008$ % Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften von Kollagengelen haben können [141]. In Abhängigkeit von der RB-Konzentration zeigen NHDFs keinen signifikanten negativen Einfluss bezüglich ihrer Viabilität bezogen auf die Kontrolle (Kulturboden). Dennoch liegt ein negativer Trend vor, denn die Proliferation von hOB wird durch die höhere RB Konzentration signifikant negativ beeinflusst. Wie schon erwähnt, können Änderungen der mechanischen Eigenschaften durch Quervernetzung die Zellviabilität bzw. deren Proliferation beeinflussen.

Es ist bekannt, dass RB *in vitro* phototoxischer wirkt als *in vivo*, dafür wird u. a. der Unterschied in der Zellumgebung verantwortlich gemacht [186]. *In vivo* sind die Zellen von der dreidimensionalen extrazellulären Matrix umgeben mit deren Bestandteilen sie wechselwirken können. Diese Wechselwirkung kann beispielsweise Einfluss auf die Reaktion der Zelle auf externe Reize nehmen [187]. Betrachtet man dagegen die *in vitro*-Bedingungen wachsen die Zellen auf der Kulturplatte als Monolayer ohne die in der Matrix enthaltenen Strukturproteine und Proteoglycane.

Bei der photochemischen Gewebebindung stehen die Zellen unter direktem Einfluss der Bestrahlung und des RB. In diesem Versuchsaufbau hingegen wurden die Kollagene, bevor sie mit Zellen versetzt wurden, quervernetzt. In der direkten Herstellung der Lamine spielen die Zellen selbst keine Rolle. Daher ist der oben genannte Umgebungseffekt nicht von Relevanz und stellt keine Begründung für die verminderte Proliferation von hOB dar.

Da in der Ophthalmologie standardmäßig Konzentrationen von 0,1 % eingesetzt werden, wird nicht von einer direkten Toxizität von RB ausgegangen, sondern von geänderten mechanischen Eigenschaften sowie einer veränderten Oberflächenbeschaffenheit. Diese Veränderung konnte auch in nachfolgenden Versuchen bestätigt werden. Neben der RB-Konzentration wurde auch untersucht, ob die Dauer der Quervernetzung Einfluss auf die Zellviabilität hat. Auf allen getesteten Kollagenen konnte weder mit hOB noch mit SkMc ein Unterschied in der Proliferation bestimmt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Quervernetzung der Kollagene nach 10 min vollständig abgelaufen ist. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für das weitere Vorgehen (Testung der Aktivitäten der Biomoleküle sowie der Herstellung der Lamine) folgende Parameter gewählt:

10 min mit 0,01 % RB Lösung.

5.2.2 Biokompatibilität der verschiedenen Kollagene

Nach Optimierung der Vernetzungsparameter wurden die verschiedenen Kollagene hinsichtlich ihrer Biokompatibilität untersucht. Hierzu wurden neben den hOB auch SkMc Zellen mit einbezogen. Beide reagierten nahezu identisch auf die verschiedenen Kollagene. Die stärkste Proliferation fand auf C gefolgt von A und dann auf V statt. Die Viabilität der Zellen auf C zeigte dabei über die Tage eine kontinuierliche Zunahme. Von Tag 1 zu Tag 7 nahm die Viabilität der hOB auf A zunächst ab, in den folgenden Tagen blieben die Werte dann konstant. Bei den SkMc blieb die Zellviabilität von Tag 1 zu Tag 3 konstant und erhöhte sich anschließend leicht. Im Gegensatz zu A nahm die Viabilität der hOB auf V von Tag 7 zu Tag 10 auch weiterhin ab. Gründe für das unterschiedliche Verhalten können die Kollagenstrukturen selbst sein. C ist ein sehr dünner, flexibler Film. V hingegen ist ein sehr kompaktes, starres Kollagen, welches die Zellen bei der Migration hindern könnte. Die schwammartige Struktur von A könnte ebenfalls das Verhalten der Zellen erklären. Aufgrund der Dicke könnten die Zellen länger benötigen, um einen Zell-Zell-Kontakt herzustellen. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde der gleiche Versuch nochmals mit einer dreifach höheren Zellzahl durchgeführt. Dies führte allerdings zu den gleichen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt). Daher wird angenommen, dass dieses Verhalten auf die mechanischen Eigenschaften des Kollagens zurückzuführen ist.

Die im Vergleich zur Kontrolle geringe Viabilität der Zellen auf A und V stimmt mit der Studie von Rothamel *et al.* überein. Hier wurde die Zellzahl von SaOS-2 und humanen parodontalen Ligamentfibroblasten untersucht, nachdem diese für sieben Tage auf vier käuflich erwerbbar Kollagenen inkubiert wurden. Bei allen getesteten Kollagenen war die Zellzahl signifikant geringer als die der Kontrolle [188]. Im Gegensatz dazu nahm die Viabilität von hOB und SkMc auf C zu und erreichte nach Quervernetzung 100 % der Viabilität der Kontrolle. Ein direkter Studienvergleich fällt allerdings aufgrund der verschiedenen Bedingungen (Zellen, Kollagene, Kulturdauer) schwer.

Für das weitere Vorgehen wurde wegen der andauernd sehr schlechten Viabilität der Zellen auf V dieses für die weitere Laminatentwicklung nicht berücksichtigt. Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass verschiedene Zellen unterschiedlich auf den Kollagenen proliferieren. Somit kann über eine Kombination zwischen einem Kollagen, auf dem die Zellen gut proliferieren, und einem Kollagen, wo dies in geringem Ausmaß geschieht die Laminatdegradierung gesteuert werden.

5.2.2.1 Einfluss der Ausrichtung der Kollagene

Weiter zeigen die SkMc sowie die hOB stark unterschiedliche Viabilität auf C und A. Um daraus resultierende Einflüsse auf die weiteren Versuche auszuschließen, wurde untersucht, welchen Einfluss die Ausrichtung der Lamine in der Mikrotiterplatte auf die Zellviabilität von hOB nimmt. Während versuchsbedingt ein Kollagen am Boden der Kulturplatte haftet, wird das Zweite auf diesem platziert und darauf werden anschließend die Zellen ausgesät. Somit besteht zur unteren Schicht zunächst kein direkter Zellkontakt. Obwohl die Viabilität der Zellen auf den Einzelschichten stark variiert, zeigt sich im heterologen Laminat kein signifikanter Unterschied zwischen den Ausrichtungen. Verschiedene Studien mit biologischen Verbundwerkstoffen zeigen, dass solche Materialkombinationen Einfluss auf das Zellverhalten nehmen können [189, 190]. Eine solche Kombination könnte auch hier die Viabilität der hOB positiv beeinflussen. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Zellen aufgrund der Grenzflächen auch seitlich in das 2er-Laminat einwandern können. Somit haben die Zellen die Option, in Richtung einer biologisch kompatiblen Matrix zu migrieren.

Für das weitere Vorgehen wurde ein Einfluss der Ausrichtung der Lamine auf die Zellproliferation ausgeschlossen.

5.3 Einfluss der Quervernetzung auf die Wirkungsweise von Vancomycin, BMP-7 und SDF-1 α

Die Lamine sollen durch Freisetzung einer definierten Konzentration an Antibiotika bzw. Biomolekül zur Knochenregeneration beitragen. Dafür werden Vancomycin, BMP-7 und SDF-1 α in RB gelöst bzw. verdünnt und auf das Kollagen gegeben, bevor mit grünem Licht quervernetzt wird. Durch den zugrundeliegenden Herstellungsprozess stehen die Moleküle direkt unter Einfluss der Quervernetzung der Kollagene. Um den Einfluss dieses Prozesses auf die Molekül-Aktivität auszuschließen, wurden Aktivitätstest nach der RGX-Behandlung durchgeführt.

5.3.1 Antimikrobielle Aktivität von Vancomycin nach Quervernetzung

Zur Testung von Vancomycin wurden drei unterschiedliche Konzentrationen genutzt (10, 50 und 100 μg) und diese in PBS/RB gelöst bzw. RGX-behandelt. Da die Umgebung im Körper deutlich komplexer ist (Enzyme, Blutfluss etc.) als *in vitro*, wurde bewusst mit einer MHK-überschreitenden Konzentration gearbeitet. Die vorangegangene Toxizitätstestung von Vancomycin konnte außerdem zeigen, dass sehr kleine Konzentrationen am ersten Tag keine bis

sehr geringe Toxizität aufweisen. Da in diesem Versuchsaufbau zusätzlich die Diffusion aus den Kollagenen eine Rolle spielt, wurde die fünffache, die 25-fache sowie die 50-fache MHK-Konzentration gewählt.

Bei C entsteht in jeder genutzten Konzentration und behandlungsunabhängig (PBS- oder RB-gelöst bzw. RGX-behandelt) ein Hemmhof. Auch für A lässt sich die gleiche Beobachtung machen. Bei beiden Kollagenen unterscheidet sich die Größe der Hemmhöfe zwischen den Konzentrationen kaum. Vergleicht man C und A scheinen die Hemmhöfe von A visuell kleiner.

Da kein offensichtlicher Unterschied zwischen den Behandlungen (PBS, RB, RGX) lag, wurde ein Einfluss der RGX-Behandlung auf die Vancomycin-Aktivität ausgeschlossen und weitere Untersuchungen mit Vancomycin beschichteten Kollagenen angeschlossen.

Auch im weiterführenden Versuch zur Bestimmung des Einflusses auf die Vancomycin Freisetzung zeigten sich Unterschiede zwischen den beiden Kollagenen. Wurden 10 µg Vancomycin auf C aufgebracht und das damit in Kontakt stehende Medium mit *Staphylococcus aureus* infiziert, bildeten sich bei anschließendem Ausplattieren einer 1:10 Verdünnung deutliche KBE. Wurde der Versuch mit A durchgeführt, war dies nicht der Fall. Hier war die gesamte Agarplatte mit einem Bakterienrasen bedeckt.

Von Projektpartnern der Technischen Universität Darmstadt durchgeführte Freisetzungsversuche zeigen, dass sowohl bei C als auch bei A 80-90 % des inkorporierten Vancomycins innerhalb der ersten 24 h freigesetzt wird [163]. Somit würde in der kleinsten Menge immer noch 8–9 µg freigesetzt werden, was deutlich über dem MHK von 2 µg liegt. Weiter wurde gezeigt, dass kein Unterschied in der Freisetzung zwischen RGX-behandelten und unbehandelten Proben besteht. Somit nehmen bei der weiteren Laminatentwicklung lediglich die Schicht, in welcher das Vancomycin eingebracht ist, sowie das verwendete Kollagen Einfluss auf die Freisetzung. Der Prozess der Quervernetzung selbst kann ausgeschlossen werden. Eine mögliche Begründung für die höhere Bakterienbelastung bei A könnte der Unterschied im „burst release“ sein. Während bei C in den ersten 30 min 2/3 des Vancomycins freigesetzt wird, wird bei A nur die Hälfte freigesetzt. Die initiale Bakterienabtötung könnte somit ausschlaggebend für die hier zugrundeliegenden Unterschiede sein. In höheren Konzentrationen (50 µg) lassen sich keine Unterschiede mehr zwischen den Kollagenen feststellen. Somit sollte, wenn A die zum Knochen ausgerichtete Schicht darstellt, mit einer Mindestkonzentration von 50 µg Vancomycin beschichtet werden, wohingegen bei C 10 µg Vancomycin zur Abtötung des *Staphylococcus aureus* ausreichen. Generell ist für Anwendungen in der Klinik ein „burst release“ von Vorteil, da es hierbei zum akuten Abtöten der

pathogenen Keime kommt, bevor der MHK unterschritten wird [191]. Die RGX Behandlung nimmt weder Einfluss auf die Aktivität noch auf die Freisetzung von Vancomycin. Während bei der herkömmlichen systemischen Infektionsprophylaxe hohe Dose verabreicht werden, ermöglichen die Kollagenlamine kleine aber wirksame Konzentrationen.

5.3.2 Osteogene und angiogene Aktivität von BMP-7 und SDF-1 α nach Quervernetzung

Neben Vancomycin wurde die Aktivität des angiogenese-fördernden Faktors SDF-1 α , sowie die des osteogenese-fördernden Faktors BMP-7 unter Einfluss von RGX untersucht.

Sowohl bei C als auch bei A, ließ sich eine signifikant gesteigerte Zellproliferation der HUVECs messen, wenn die quervernetzten Kollagene SDF-1 α enthielten. Daraus lässt sich schließen, dass der Prozess des Quervernetzens keinen Einfluss auf die Aktivität von SDF 1- α nimmt und dieses ohne Probleme in das Laminat inkorporiert werden kann. Die Testung der Aktivität von BMP-7 auf die osteogene Differenzierung von Osteoblasten erfolgte mit zwei Konzentrationen (100 und 500 ng) und einem ALP Assay. Bei der Adsorption von BMP-7 in PBS auf den Kollagenen zeigte sich sowohl bei C als auch bei A eine erhöhte ALP-Aktivität. Diese Aktivitätssteigerung scheint unabhängig von den Konzentrationen zu sein, da zwischen den 100 ng und 500 ng BMP-7 kein signifikanter Unterschied gemessen werden kann. Es zeigen sich analoge Ergebnisse, wenn C mit BMP-7 quervernetzt wurde. Auch hier war eine erhöhte konzentrationsunabhängige ALP-Expression messbar. Verglichen mit dem unbehandelten BMP-7 ist diese zwar leicht reduziert, aber dennoch deutlich vorhanden.

Chan et al. konnten zeigen, dass die Vernetzung, abhängig von der RB Konzentration Einfluss auf die Freisetzung von BSA hat und diese dadurch retardiert werden kann [136]. Im Gegensatz zu C kann nach Quervernetzung bei A kein positiver Effekt des BMP-7 auf die hOB gemessen werden. Da die Aktivität von BMP-7 nach Adsorption auf A vorhanden bleibt, kann daraus gefolgert werden, dass die mechanischen und strukturellen Änderungen durch RGX Einfluss auf die biologische Wirkungsweise nehmen. Aufgrund der kompakten Struktur und der dichten Fasern von C wurde in vorangegangenen Untersuchungen davon ausgegangen, dass dieses schon in bestimmter Weise vorvernetzt ist [163]. Im Gegensatz dazu zeigt A eine Struktur mit offenen Poren, welche mehr Vernetzungsmöglichkeiten bieten. Somit könnte es durch die stärkere Vernetzung zu einem größeren Einfluss auf die Freisetzung von BMP-7 kommen.

Weiter könnte die Größe der Proteine eine Rolle spielen. BMP-7 ist mit einer molekularen Größe zwischen 25-35 kDa mehr als doppelt so groß wie das SDF-1 α . *Chan et al.* zeigten, dass die Porengrößenverteilung von RGX-behandelten, sowie GA quervernetzten Kollagengelen abnimmt.

Diese lag in den unbehandelten Kontrollen zwischen 200-400 μm . Nach Quervernetzung verringerte sie sich auf 1-2 μm [178]. Zwischen RGX und GA gab es keine signifikanten Unterschiede, Eine solch veränderte Porengrößenverteilung könnte Einfluss auf die Freisetzung von BMP-7 nehmen. Da SDF-1 α eine geringere molekulare Größe hat, wäre es möglich, dass die veränderte Porengröße keinen Effekt auf dessen Freisetzung hat.

Ähnliche Effekte wurden für mesoporöse Silizium-Nanopartikel (MS-MP) beschrieben. Pastor *et al.* zeigten in ihrer Studie, dass die Porengröße in solchen Nanopartikeln Einfluss auf die Freisetzung von BMP-7 nehmen kann [192]. Bei großen Poren (> 10 nm) konnte eine 100 %ige Freisetzung innerhalb von 24 h bis 48 h erreicht werden. Im Gegensatz dazu behielten MS-MP mit Poren < 7 nm auch nach 96 h den Großteil ihrer Molekülladung. So konnte in diese Partikeln eine bis zu 2 Wochen retardierte Freisetzung von BMP-7 erreicht werden.

Die Experimente zeigen deutlich, dass das Quervernetzen mit RGX eine vielversprechende Methode zur Herstellung der Lamine ist. Das direkte Lösen oder das Verdünnen in RB ermöglicht die Beladung der Kollagene mit definierten Konzentrationen an gewünschten Wirkstoffen oder Biomolekülen. Dadurch können beliebig viele Kollagenschichten mit unterschiedlichen Inhalten und anhaltenden Aktivitäten ineinander quervernetzt werden.

5.4 Mechanische Charakterisierung der Kollagene

Im Folgenden werden die einzelnen Ergebnisse der Versuche zur mechanischen Charakterisierung diskutiert. Abbildung 45 zeigt eine Übersicht der Zusammenhänge zwischen den mechanischen Eigenschaften, der Zellproliferation und der Kollagenlaminatzusammensetzung.

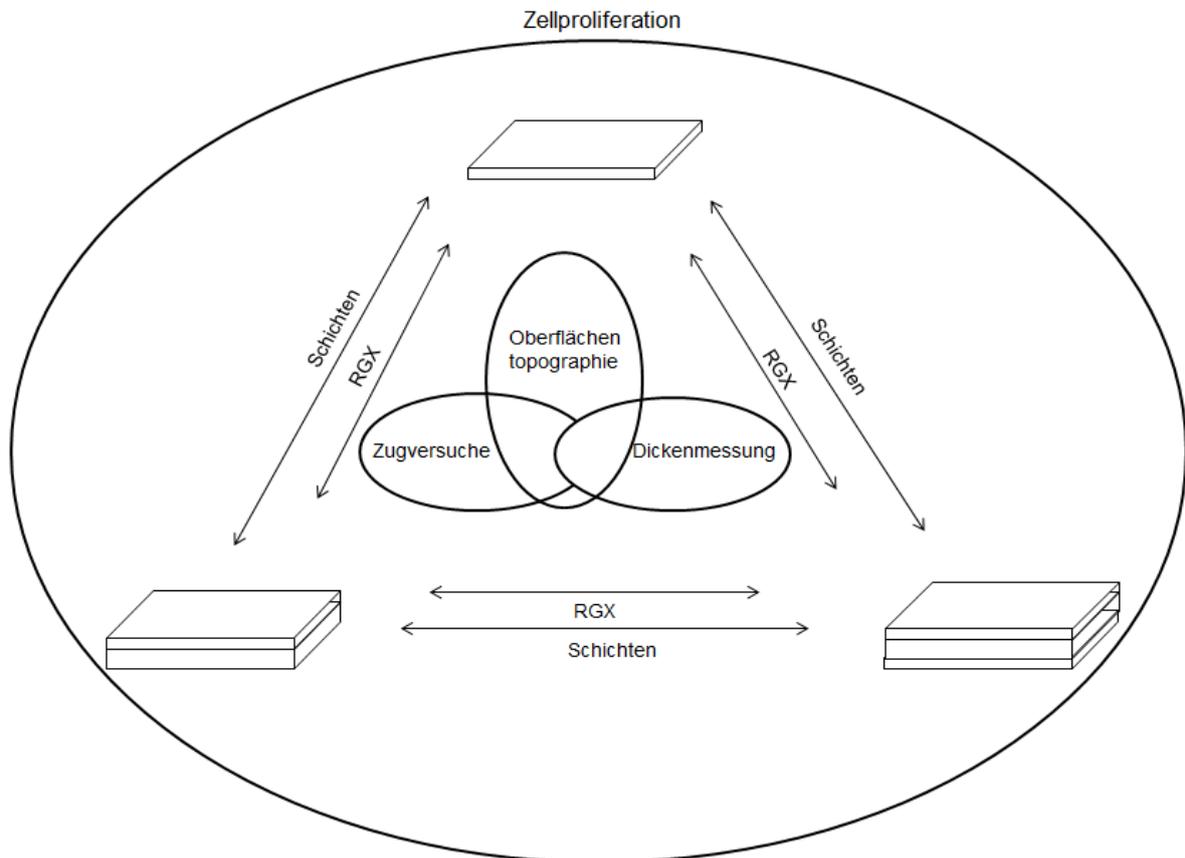


Abbildung 45: Zusammenhang zwischen den Kollagenschichten, der Zellproliferation und den mechanischen Eigenschaften.

5.4.1 Einfluss der Quervernetzung auf die Oberflächentopografie

Mithilfe der Konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie sollte der Einfluss der Quervernetzung auf die Oberflächentopografie untersucht werden. Dabei reflektieren die lichtmikroskopischen Aufnahmen die makroskopische Wahrnehmung. Die Prägungen auf C werden auch hier nochmals deutlich, genauso wie die schwammartige Struktur von A. Dabei zeigen sich zwischen den Kollagenen auch im Höhenprofil starke Unterschiede. Beim Vergleich zwischen unbehandelten und quervernetzten Kollagenen reduziert sich dieses Profil sowohl für A also auch für C. Die kompakte Struktur von C wird somit noch fester. Dies zeigt sich auch in Dickenmessungen. Die Dicke reduziert sich um 21 % wenn C quervernetzt wurde [163]. A hingegen zeigt einen völligen

Kollaps der Schwammstruktur. Dieser Zusammenfall ist allerdings flüssigkeitsabhängig und nicht behandlungsabhängig. Wie frühere Untersuchungen gezeigt haben führt auch Kontakt mit PBS zu einem solchen Strukturkollaps [163]. Auch wenn angenommen wird, dass der Verlust der Schwammstruktur zu einer Änderung der Porengröße und Verteilung führt, kann hierzu keine direkte Aussage getroffen werden.

5.4.2 Einfluss des Quervernetzens sowie des Schichtens der Kollagene auf das mechanische Verhalten

Um die Lamine mechanisch zu charakterisieren sowie den Einfluss der RGX Behandlung auf die Einzelschichten zu untersuchen, wurden Zugversuche mit einem Faserzugmodul durchgeführt. Um eine möglichst anwendungsnahe Umgebung zu schaffen fand zuvor ein 10-minütiges Quellen der Proben in PBS statt. Zur möglichst detailreichen Charakterisierung wurden folgende Werte bestimmt: der E-Modul, die Bruchdehnung sowie die max. ertragbare Spannung. Dabei ist der E-Modul ein Maß für die Steifigkeit des Materials. Mithilfe der Bruchdehnung kann eine Aussage bezüglich der Materialduktilität getroffen werden, d. h. je höher dieser Wert ist, desto mehr kann sich das Material plastisch verformen, bevor es zu einem Bruch kommt. Die max. ertragbare Spannung stellt genau das dar, was sie aussagt. Duktile Materialien brechen hier nicht sofort, sie schnüren ein und dehnen sich weiter (Abbildung 37).

Zur Bestimmung der E-Module wird eine hohe Auflösung mit geringer Kraft benötigt. Genau aus diesem Grund lässt sich für C keine Aussagen bezüglich der Bruchdehnung und der max. ertragbaren Spannung treffen. Die max. Zugkraft des Faserzugmoduls beträgt 1000 mN und ist damit zu gering für das kompakte C Kollagen. Wenn auch keine quantitative Aussage möglich ist, zeigt die Tatsache, dass die Bestimmung der Werte für A, nicht aber für C möglich ist, dass große Unterschiede in den mechanischen Eigenschaften bestehen.

Bei den Multilayerlaminaten wurde ACA ausgeschlossen, da dieses nicht stabil war. Es ließ sich weder für die Dickenmessungen aus den 48-Well-Platten entfernen noch für die Zugversuche in die richtige zuschneiden.

5.4.2.1 Einfluss auf die Bruchdehnung und die max. ertragbare Spannung

Die Bruchdehnung sowie die max. ertragbare Spannung von A nehmen nach Quervernetzung zunächst ab. Nach Vernetzung mit einer zweiten Kollagenschicht kommt es, wie zu erwarten, zu einer Zunahme beider mechanischer Kennwerte. Die Bruchdehnung kann über eine dritte Schicht nochmals erhöht werden, sodass sie über dem Wert des unbehandelten Kollagens liegt. Für die

Multilayerlaminare findet keine weitere Steigerung der max. ertragbaren Spannung statt, diese vermindert sich wieder.

Die Abnahme der Bruchdehnung nach Quervernetzung wurde bereits in der Literatur beschrieben. So zeigt Rattenschwanz-Kollagen Typ 1 nach RGX Behandlung eine Laserenergie abhängige Abnahme der Bruchdehnung verglichen mit der Kontrollgruppe [141]. Charulatha *et al.* konnten eine von der Art der Vernetzung abhängige Abnahme in der Bruchdehnung messen [139] und die Ergebnisse von Angele *et al.* zeigen eine Kollagen- und EDC/NHS-Konzentrations-abhängige Abnahme [193]. Hier zeigt sich, welche Bandbreite an Parametern bei der Entwicklung von mechanisch definierten Biomaterialien zu beachten ist.

Betrachtet man die in dieser Arbeit hergestellten Laminare, fällt auf, dass die Art der Vernetzung sowie die verwendeten Kollagene Konstanten sind. Durch die vorangegangenen Versuche konnten optimale Parameter festgelegt werden, um so eine einfache und normierte Herstellung zu gewährleisten. Dies ermöglicht die einfache Herstellung der Laminare, welche mittels der eingesetzten Kollagene sowie der Anzahl der Schichten modifiziert werden können.

Genau wie die Bruchdehnung nimmt die max. ertragbare Spannung nach RGX Behandlung ab. Verschiedene Studien zeigen allerdings eine Zunahme nach verschiedenen Quervernetzungsmethoden. Dazu zählen neben GA und EDC/NHS auch RGX [135, 139, 141, 193]. Aufgrund von Unterschieden im generellen Versuchsaufbau (Kollagen, Quervernetzung, Konzentrationen der eingesetzten Chemikalien) ist ein direkter Vergleich jedoch nicht möglich. Auch wenn es über eine dritte Kollagenschicht nicht zur weiteren Steigerung der max. ertragbaren Spannung kommt, zeigen die Ergebnisse eine deutlich höhere Bruchdehnung verglichen zu den Bilayerlaminaten. Auch dieses Ergebnis zeigt die Fähigkeit der Kollagene, die mechanischen Eigenschaften über verschiedene Schichten einzustellen auf.

5.4.2.2 Einfluss auf den E-Modul

Auch die quantifizierbaren Werte für den E-Modul zeigen deutlich die Unterschiede in den mechanischen Eigenschaften der Kollagene auf. Die Werte für C sind mit > 100 MPa über zehnmal höher als die für A (< 10 MPa). Diese Unterschiede waren aufgrund der makroskopischen Strukturen zu erwarten. Es ist anzunehmen, dass C aufgrund seiner kompakten, festen Struktur deutlich steifer ist und somit mehr Widerstand gegen Verformung aufbringt als A. Dieser Unterschied könnte auch Einfluss auf die Zellviabilität haben. Die Versuche zur Biokompatibilität der Kollagene zeigen sowohl für SkMc als auch für hOB eine deutlich stärkere Proliferation auf C

als auf A. Da die Einzelschicht von A keine signifikant zytotoxischen Eigenschaften aufweist, wird dies als Ursache für das unterschiedliche Zellverhalten ausgeschlossen.

Die Charakterisierung von Park *et al.* eines Verbundwerkstoffes aus Zellulose-Nanofasern, zeigt eine E-Modul-abhängige Zellproliferation und Ausdifferenzierung von Osteoblasten. Die höchste Viabilität sowie die stärkste ALP Aktivität wurden dabei auf dem Scaffold mit dem höchsten E-Modul von 42,5 MPa gemessen [194]. Da der E-Modul von C wie schon erwähnt deutlich über A liegt, könnte auch das eine mögliche Erklärung für die bessere Zellproliferation der hOB auf C sein.

Sowohl bei A also auch bei C kommt es zur Abnahme des E-Moduls, wenn die Einzelschichten quervernetzt werden. Über eine zweite Schicht kann er wieder erhöht werden, wobei der E-Modul für CC den Wert des unbehandelten C überschreitet. Wie bei der max. ertragbaren Spannung kommt es zu keiner weiteren Zunahme über eine dritte Schicht, sondern zu einer Abnahme.

Speziell für C werden anisotrope Eigenschaften angenommen. Betrachtet man die vier Messungen von C in Abbildung 36, zeigt sich, dass diese sich in zwei Ausrichtungen teilen lassen. Dies könnte sich auf die Ausrichtung der Prägungen während des Zugversuchs zurückzuführen lassen. Somit hätte es Einfluss, ob die Prägung waagrecht oder senkrecht zur Zugrichtung steht (Abbildung 46). Es wurde angenommen, dass sich die wahren mechanischen Eigenschaften dazwischen befinden, weshalb die Messungen gemittelt wurden.

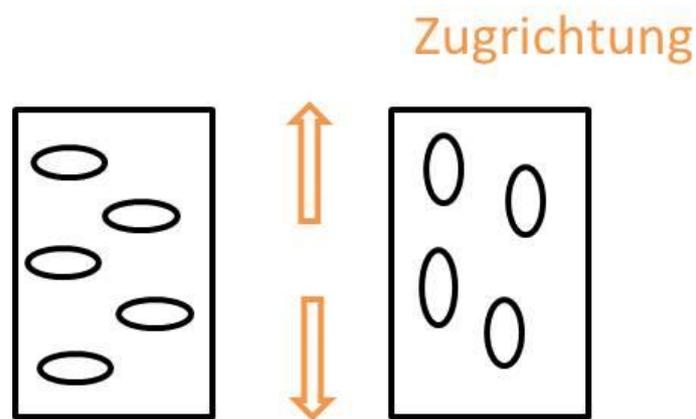


Abbildung 46: Beispiel für die Ausrichtung der Prägungen von C im Faserzugmodul.

In der Literatur wird oft von einer Zunahme des E-Moduls nach Quervernetzung gesprochen. So konnten Wertheim *et al.* einen höheren E-Modul der Kornea von Hasen nach *ex vivo* Behandlung mit RGX messen [195]. Auch mit EDC/NHS quervernetztes mikrofibrilläres Kollagen konnte diese Beobachtung gemacht werden [150]. Allerdings ist bekannt, dass Unterschiede in den Ergebnissen durch unterschiedliche Zusammensetzung der Aminosäuren sowie durch Kollagene verschiedener Spezies begründet werden können [193]. Auch spielt der Versuchsaufbau eine Rolle. So zeigt beispielsweise die Studie von Singh *et al.* ein konträres Ergebnis zu Wertheim *et al.* Hier konnte keine signifikante Verbesserung des E-Moduls der Kornea von Hasen gemessen werden, wenn diese mit RGX behandelt wurden [196]. Die Aufnahmen der Konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie konnten ein verändertes Höhenprofil nach Quervernetzung sowohl für C als auch für A zeigen. Außerdem ist eine Hypothese für das nicht mehr aktive BMP-7 eine Änderung in der Porenstruktur von A durch Quervernetzung. Diese konnte auch schon mehrfach in der Literatur beschrieben werden [178, 197, 198]. Eine Veränderung der Strukturen könnte zu anderen Rissstellen während des Zugversuchs führen und so den E-Modul und die max. ertragbare Spannung beeinflussen.

Die Zugversuche zeigen deutlich, dass es durch das Schichten der Kollagene möglich ist, Kollagenlamine mit maßgeschneiderten und individuellen mechanischen Eigenschaften herzustellen. Durch die großen Unterschiede der gemessenen Parameter von C und A lässt sich eine große Eigenschaftsbreite mit geringem Aufwand fertigen. Dabei lassen sich die mechanischen Eigenschaften nicht nur anhand der verwendeten Kollagene steuern, sondern auch über die Anzahl der verwendeten Schichten.

5.4.3 Zellinduzierte Destabilisierung der Lamine – Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften

Mithilfe von Dickenmessungen wurde die Stabilität der Kollagene und der Lamine (vor und nach RGX-Behandlung) nach Zellkontakt mit NHDFs untersucht. Dabei wurde eine Abnahme in der Dicke zwischen 24 und 72 h mit einer zellbedingten Destabilisierung gleichgesetzt. Durch genaue Charakterisierung dieses Prozesses kann die Freisetzung der in den Laminen inkorporierten Moleküle gesteuert werden. Da eine Fixierung mit PFA in allen Proben stattfand, wird eine potenziell darauf basierende Stabilisierung vernachlässigt.

Unabhängig von der Behandlung konnte in den Einzelschichten keine Abnahme der Dicke zwischen den Tagen gemessen werden. Auch die homologen Bilayerlamine zeigen keine Destabilisierung. Im Gegensatz dazu konnte bei dem heterologen Bilayerlaminat eine signifikante

Abnahme gemessen werden. Bei den Multilayerlaminaten zeigte lediglich AAA keine Abnahme der Dicke. Sowohl CCC als auch CAC zeigen eine signifikante Destabilisierung. Aufgrund der Strukturen wurde anfangs damit gerechnet, dass eher bei A als C eine Destabilisierung stattfindet. Basierend auf seiner offenporigen Struktur bietet A mehr Angriffsfläche als das starre C. Während C und CC keine Abnahmen in den Dicken zeigen, ist dies bei CCC der Fall. Vor Versuchsbeginn wurde angenommen wurde, dass jede weitere C-Schicht das Laminat stabilisiert. Dies scheint genau wie beim E-Modul, nicht der Fall zu sein.

Unterschiede im Proliferationsverhalten der Zellen wurden dabei ausgeschlossen, da NHDFs sowohl auf der Einzelschicht als auch beim Multilayerlaminat eine nahezu identische Viabilität zeigen.

Vor allem für die Destabilisierung durch die Zellen könnte der Herstellungsprozess eine Rolle spielen. C zeigt zwar eine kompakte Struktur, ist aber dennoch sehr dünn. So kann es beim Platzieren der Schichten trotz RB-Flüssigkeitsschicht dazu kommen, dass die Schichten nicht ganz plan aufeinander aufliegen. Vor allem bei CCC entsteht damit eine große Anzahl an Grenzflächen, in die die Zellen migrieren und proliferieren können. Somit wird das Kollagen nicht nur von „oben“ und „unten“ degradiert, sondern auch von „innen“ heraus.

Daraus resultiert, dass neben der Laminatkomposition auch die Anzahl der Grenzflächen eine tragende Rolle in der Entwicklung spielen. Somit lassen sich durch die Anzahl der Schichten nicht nur die mechanischen Parameter einstellen, sondern auch die Freisetzung durch Grenzflächen beeinflussen. Obwohl A eine weiche Struktur zeigt, konnte weder für A noch für AA oder AAA eine mechanische Destabilisierung gemessen werden.

5.4.3.1 Zellviabilität auf den Laminaten und deren zytotoxische Wirkung

Bei Betrachtung der Viabilität auf den Laminaten ist die im vorhergehenden Abschnitt erläuterte Beobachtung der nicht vorhandenen Destabilisierung der A-Lamine nicht verwunderlich. Genau wie die SkMc und die hOB zeigen NHDF auf A nahezu keine Proliferation. Auf Grund der geringen Viabilität und zur weiteren Erklärungsfindung wurde ein *in vitro*-Zytotoxizitätstest durchgeführt. Dieser konnte zeigen, dass mit Anzahl der A-Schichten die Zytotoxizität zunimmt. Zunächst wurde angenommen, dass diese Zunahme mit der Steigerung des RB Volumens einhergehen könnte. Während zur Quervernetzung von A 57,1 µL RB-Lösung genutzt wurden, benötigte das AAA Laminat 211,3 µL. Dieser Einfluss konnte allerdings ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Für die Testung der Zytotoxizität wurde dem Medium das entsprechende

RB-Volumen, welches zuvor unter Einfluss von grünem Licht stand, zugesetzt und der Einfluss auf die Viabilität der L929 getestet.

Der zytotoxischen Wirkung von A als Laminat wird hier nicht weiter nachgegangen, da auf Grundlage der vorhergegangenen Proliferationsversuche ausgeschlossen wurde, ein homologes Laminat aus A herzustellen. Zusätzlich findet eine Behandlung mit RGX vielseitigen Einsatz in der Medizin [176, 199-201], weshalb angenommen wird, dass die Toxizität speziell von diesem Kollagen selbst ausgeht. Die Proliferationsversuche mit CAC zeigen, dass, wenn auch geringer als auf CCC, eine Proliferation der Zellen stattfindet. Außerdem wurde keine zytotoxische Wirkung festgestellt. Somit bleibt die Möglichkeit eines „Sandwichaufbaus“ mit A als Mittelschicht bestehen.

Im Gegensatz zu den homologen Bilayerlaminaten zeigt das heterologe Laminat (AC) eine Abnahme in der Höhe und somit eine Destabilisierung der Struktur. Dies ist auf die unterschiedlichen Materialeigenschaften und deren Kombination zurückzuführen. C zeigt eine sehr stabile und feste Struktur, auf der die Zellen gut proliferieren, wohingegen A sehr weich ist und darauf nur eine geringe Viabilität der Zellen messbar war. Wie anfangs erwähnt, wurde davon ausgegangen, dass eine Destabilisierung eher bei A als bei C stattfinden wird. Die durch C bedingte höhere Zellzahl ermöglicht die Destabilisierung von A wodurch es zu einer insgesamt reduzierten Probendicke kommt.

Auch bei dem Multilayerlaminat CAC kann eine Abnahme in der Probenhöhe nach Zellkontakt gemessen werden. Obwohl durch den Einfluss von A eine stärkere Destabilisierung als bei CCC erwartet wurde, zeigte sich dies im Versuch nicht. Anhand der Viabilität der Zellen auf den Laminaten lässt sich dieses nicht vorhersehbare Ergebnis erklären. Die NHDF proliferieren auf CCC mehr als doppelt so stark wie auf CAC. Dies zeigt, dass der Abbau der Kollagene nicht nur durch das mechanische Verhalten dominiert wird, sondern auch von der Eigenschaft der Lamine, die Zellproliferation zu fördern. Speziell für CCC und CAC lässt sich schließen, dass es zu einer beschleunigten Freisetzung kommt, wenn die Moleküle in das erstgenannte Laminat eingebracht werden. Dabei wird nur der Freisetzungsprozess durch Degradierung, nicht aber der durch Diffusion einbezogen.

Die Degradierung der Kollagen-Scaffolds und der damit einhergehenden Matrixdestabilisierung erfolgt durch die Metalloproteinase-1 (MMP-1). Diese von Fibroblasten produzierten Endopeptidasen sind im Körper für den Kollagenverdau zuständig [202, 203]. Für die Unterschiede im Abbau, welche MMP-1-getrieben sind, gibt es zwei Erklärungen. Zum einen

zeigen die Zellen stark unterschiedliches Proliferationsverhalten auf den Kollagenen. Je mehr viable Zellen vorhanden sind, desto mehr MMP-1 wird sezerniert, weshalb es folglich zu einer stärkeren Destabilisierung kommt. Zum anderen kann die erhöhte MMP-1-Expression auf die Eigenschaften der Kollagene und die veränderten mechanischen Eigenschaften als Laminat zurückgeführt werden.

So ist bekannt, dass verschiedene Parameter wie die Oberflächentopografie, die Porengröße, sowie mechanische Eigenschaften Einfluss auf die Zellproliferation oder die Expression von intrinsischen Faktoren nehmen können [204-211]. Die Studie von Xie *et al.* untersuchte den Einfluss des E-Moduls von Polymethylsiloxanen auf die Genexpression und die Proteinaktivität von MMP-2. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese sowohl bei Herzmuskelzellen als auch bei kardialen Fibroblasten mit steigender Substratsteifheit zunahm [211].

Eine von der Mikrotopografie der Implantatoberfläche abhängige ALP Aktivität konnte von Masaki *et al.* gezeigt werden [210]. Auch diese Ergebnisse zeigen die komplexe Zell-Material-Wechselwirkung. Durch den Aufbau der Lamine werden nicht nur die mechanischen Eigenschaften selbst beeinflusst, sondern auch zusätzlich Grenzflächen geschaffen. Die Zellen können aus diversen Seiten in das Material migrieren und so mit verschiedensten Materialeigenschaften wechselwirken. Generell lässt sich schwer vorhersagen, ob die Zellantwort durch die Material-Zell-Wechselwirkung oder die makroskopischen Materialeigenschaften selbst dominiert wird [212, 213].

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass bei AC, CCC und CAC in unterschiedlichem Ausmaß eine Destabilisierung durch Zellkontakt auftritt. Wie gewünscht lässt sich so die Freisetzung inkorporierter Biomoleküle für medizinische Anwendungen steuern. Durch gezieltes Einbringen dieser Wirkstoffe in das Laminat kann die Freisetzung beeinflusst werden. Beispielsweise besteht die Möglichkeit, durch das Aufbringen einer zusätzlichen Schicht die Freisetzung zu retardieren, da diese zunächst abgebaut werden muss. Außerdem könnte eine Außenschicht aus A die Freisetzung verlangsamen, da hier eine deutlich geringere Proliferation stattfindet. Der große Unterschied im mechanischen Verhalten zwischen A und C erlaubt eine große Bandbreite an Anwendungsgebieten.

6 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Kollagenlamine entwickelt, die zur beschleunigten Frakturheilung beitragen sollen. Dies geschieht zum einen über das Einbringen des Antibiotikums Vancomycin zur Prävention von Infektionen. Zum anderen soll die Regeneration selbst über den osteogen wirkenden Faktor BMP-7 und den angiogen wirkenden Faktor SDF-1 α beschleunigt werden.

Die Herstellung über RGX hat sich dabei als vielversprechender Ansatz herausgestellt. Sie ermöglicht die Anfertigung der Lamine sowie deren Beladung mit der gewünschten Wirkstoffkonzentration. Auch wenn bereits Studien zur Freisetzung von Vancomycin aus den Laminen durchgeführt wurden, müssen diese um die Freisetzung von BMP-7 und SDF-1 α erweitert werden, um so die optimal wirksame Dosis einsetzen zu können.

Die Stabilität sowie die mechanischen Eigenschaften können über die Laminatkomposition gesteuert werden. Betrachtet man die große Anzahl verschiedener Kollagenmembranen, bestehen durch den Ansatz der Kollagenlamine nahezu unbegrenzte Möglichkeiten, mithilfe einer einfachen Methode Scaffolds mit maßgeschneiderten mechanischen Eigenschaften für jegliche klinische Anwendung herzustellen. Durch die verschiedenen Schichten der dadurch bedingten Laminatdegradierung sowie die Ausrichtung an der Verletzungsstelle kann zusätzlich die Freisetzung gezielt kontrolliert werden.

Dennoch besteht Bedarf an einer Vielzahl weiterer Untersuchungen wie beispielsweise einer Co-Kultur aus *Staphylococcus aureus*, HUVECs und hOB. So können zunächst die Wirksamkeit des Endproduktes *in vitro* weiter charakterisiert und nachgewiesen werden. Außerdem könnten potenziell positive synergistische Effekte so detektiert werden.

Für die Zulassung eines solchen Medizinproduktes muss dessen Wirksamkeit zunächst *in vivo* nachgewiesen werden. Dabei stellen die weiterführenden Charakterisierungen eine maßgebliche Basis zur Genehmigung eines Tierversuchs dar. Hierzu gehört auch ein verbessertes und standardisiertes Sterilisationsverfahren, welches fortführend getestet und etabliert werden muss.

Generell zeigen die in der Arbeit aufgeführten Ergebnisse einen vielversprechenden und sehr einfachen Ansatz zur Herstellung von Kollagenlaminen mit definierten mechanischen Eigenschaften. Durch die zusätzliche Möglichkeit der Inkorporierung verschiedenster Biomoleküle und Medikamente besteht auf lange Sicht die Chance, diese Lamine flexibel im klinischen Alltag einzusetzen.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mögliche Gründe für eine gestörte Frakturheilung (Die Grafik wurde mit Biorender.com erstellt).	3
Abbildung 2: Diamond concept nach Giannoudis <i>et al.</i> zur Knochenregeneration.	5
Abbildung 3: Übersicht über die Vorteile von Drug Delivery Systemen.	7
Abbildung 4: Überblick über den Herstellungsprozess und die Wirkungsweise der Lamine. Über die Beladungsvolumina lassen sich definierte Konzentrationen an Biomolekülen (gelöst in RB) auf die Kollagene aufbringen, bevor diese anschließend zusammen quervernetzt werden. Die Lamine sollen mithilfe von Vancomycin Infektionen vorbeugen. Mithilfe von SDF-1 α soll die Angiogenese und mit BMP-7 die Osteogenese verbessert werden (Die Grafik wurde mithilfe von Biorender.com erstellt).	15
Abbildung 5: Überblick über die Untersuchungen, welche zur Bestimmung der Toxizität von Vancomycin durchgeführt wurden.	16
Abbildung 6: Überblick über die einzelnen Arbeitspakete und Entwicklungsschritte der Kollagenlamine.	17
Abbildung 7: Übersicht zur Vorbereitung und Herstellung von einzelschichtigen Kollagenen sowie von Kollagenlaminen für die Zellkultur.	32
Abbildung 8: Schematischer Versuchsaufbau zur Untersuchung der Laminaausrichtung auf die Zellproliferation	34
Abbildung 9: Schematischer Versuchsaufbau zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung von Vancomycin nach RGX-Behandlung (Die Grafik wurde mit Biorender.com erstellt).	35
Abbildung 10: Apparatur für die Zugversuche während der Justierung mit den Endmaßen (a) sowie die Einspannung der C Probe mithilfe von Sandpapier (b).	37
Abbildung 11: Versuch einer Messung des heterologen AC Laminats.	38
Abbildung 12: Versuchsaufbau der Dickenmessungen der Kollagene mit einem Digmar CX1 Höhenmessgerät.	39
Abbildung 13: Proliferation humaner SkMc unter Einfluss von Vancomycin mit einem Wechsel des Antibiotikums alle 4 Tage (* p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001 zur Kontrolle). Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Medium ohne Vancomycin) dargestellt.	42
Abbildung 14: Proliferation humaner hOB unter Einfluss von Vancomycin mit einem Wechsel des Antibiotikums alle 4 Tage (* p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001 zur Kontrolle). Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Medium ohne Vancomycin) dargestellt.	43
Abbildung 15: Proliferation von SaOS-2 unter Einfluss von Vancomycin mit einem Wechsel des Antibiotikums alle 4 Tage (* p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001 zur Kontrolle). Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Medium ohne Vancomycin) dargestellt.	44
Abbildung 16: Proliferation von HUVECs unter Einfluss von Vancomycin mit einem Wechsel des Antibiotikums alle 4 Tage (* p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001 zur Kontrolle). Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Medium ohne Vancomycin) dargestellt.	45
Abbildung 17: Proliferation von NHDF unter Einfluss von Vancomycin mit einem Wechsel des Antibiotikums alle 4 Tage (* p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001 zur Kontrolle). Die Ergebnisse sind dargestellt als % bezogen auf die Kontrolle ohne Vancomycin (100 %).	46
Abbildung 18: Beispiel eines Angiogenese-Assays mit HUVECS nach Inkubation mit 0.1 mg/mL Vancomycin. Mikroskopische Aufnahme der Gefäßbildung in Matrigel a) und deren Auswertung mithilfe des Angiogenese Analyser b) in ImageJ von Gilles Carpentier. Dabei repräsentieren verschiedene Farben unterschiedliche Parameter.	47
Abbildung 19: Angiogenese-Assay von HUVECS nach Inkubation mit Vancomycin. Parameter zur Quantifizierung der Ergebnisse sind die Anzahl der junctions, die totale Segmentlänge und die totale Länge (* p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001 zur Kontrolle). Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Medium ohne Vancomycin) dargestellt.	48

Abbildung 20: Beispiel für die Auswertung der Immunofluoreszenz humaner Myoblasten nach fünftägiger Differenzierung a) Überlagerungsbilder, b) Myosin Färbung, c) Zellkernfärbung und d) Binärbild zur Quantifizierung des Einflusses von Vancomycin auf die Myotubenbildung	49
Abbildung 21: Auswertung der Immunfluoreszenz zur Myotubenformation humaner Myoblasten unter Einfluss verschiedener Vancomycin-Konzentrationen (* p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001 zur Kontrolle). Die folgenden Ergebnisse werden prozentualbezogen auf die Kontrolle (Medium ohne Vancomycin) dargestellt.	50
Abbildung 22: ALP Aktivität humaner Osteoblasten, nachdem diese unter Einfluss von Vancomycin für fünf Tage ausdifferenziert wurden (* p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001 zur Kontrolle). Die Ergebnisse werden prozentualbezogen auf die Kontrolle (Medium ohne Vancomycin) dargestellt.	51
Abbildung 23: Makroskopische Aufnahmen der verwendeten Kollagene: Collagen Solutions (C), Atelocollagen (A) und Viscofan (V).	52
Abbildung 24: Einfluss der Bengalrosakonzentration auf die Zellproliferation von NHDF (a) und hOB (b) auf C (* p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001). Die Ergebnisse werden prozentualbezogen auf die Kontrolle (Kulturplatte) dargestellt.	53
Abbildung 25: Einfluss der Belichtungsdauer der RGX Behandlung auf hOb und SkMc. Die Ergebnisse werden prozentualbezogen auf die Kontrolle (Kulturplatte) dargestellt.	54
Abbildung 26: Einfluss der RGX-Behandlung auf das Proliferationsverhalten von hOB und SkMc. Die Ergebnisse sind dargestellt als % bezogen auf die Kontrolle (Kulturplatte 100 %).	56
Abbildung 27: Einfluss der Ausrichtung der Lamine in der Mikrotiterplatte auf hOB (* p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001; n.s. nicht signifikant). Aufgrund der hohen Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten wurden die Ergebnisse nicht gepoolt.	57
Abbildung 28: Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Vancomycin auf <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538 P und ATCC 29213).	59
Abbildung 29: Assay zur Bestimmung des Hemmhofes von <i>Staphylococcus aureus</i> , wenn die Kollagene mit verschiedenen Konzentrationen an Vancomycin beschichtet und RGX behandelt wurden. Als Kontrolle dient Vancomycin, welches in PBS bzw. in RB ohne Bestrahlung gelöst wurde.	60
Abbildung 30: Test zur Bestimmung des Einflusses der Kollagene auf die Freisetzung von Vancomycin. Dafür wurden die Kollagene mit 10 µg Vancomycin beschichtet und RGX behandelt. Anschließend wurde Medium mit <i>Staphylococcus aureus</i> beimpft und nach 24 h ausplattiert. Während sich bei einer 1:10 Verdünnung von C (a) KBE bilden ist dies für A (b) nicht der Fall.	61
Abbildung 31: Assay zur Aktivität von SDF-1α nach RGX Behandlung. Hierfür wurde nach drei Tagen ein alamarBlue™ Assay mit HUVECs durchgeführt (* p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001; n.s. nicht signifikant). Die Ergebnisse werden prozentualbezogen auf die Kontrolle (Kulturplatte) dargestellt.	62
Abbildung 32: Osteogene Aktivität von BMP-7 nach Adsorption auf C in PBS und RB (mit anschließender Quervernetzung mit grünem Licht) (* p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001; n.s. nicht signifikant). Die Ergebnisse werden prozentualbezogen auf die Kontrolle (Kulturplatte) dargestellt.	64
Abbildung 33: Osteogene Aktivität von BMP-7 nach Adsorption auf A in PBS und RB (mit anschließender Quervernetzung mit grünem Licht) (* p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001; n.s. nicht signifikant). Aufgrund der großen Unterschiede in der ALP Aktivität wurden die Ergebnisse nicht gepoolt sondern einzeln dargestellt.	65
Abbildung 34: Konfokale Lasermikroskopie-Aufnahmen von C (a), (b) und A (c), (d) bevor (a), (c) und nachdem (b), (d) diese quervernetzt wurden (Vergrößerung 50x, die Maßstabsbalken betragen 100 nm).	66
Abbildung 35: Beispiel einer Spannungs-Dehnungskurve und der daraus ermittelten mechanischen Parameter (max. ertragbare Spannung, Bruchdehnung und E-Modul) zur Charakterisierung der Lamine.	68
Abbildung 36: a) und b) zeigen typische Spannungs-Dehnungs Diagramme von C und A am Beispiel von RGX-behandelten Proben. c) zeigt die für C unterschiedlichen Kurvenverläufe verschiedener Messungen. Aus diesen wurden die mechanischen Kennwerte gemittelt.	69
Abbildung 37: Sequenz des Bruchs von A während eines Zugversuchs.	69
Abbildung 38: E-Modul kalkuliert aus Spannungs-Dehnungs-Diagrammen von unbehandelten und RGX behandelten Kollagenen sowie von verschiedenen Laminen.	70

Abbildung 39: Maximalertragbare Spannung und Bruchdehnung kalkuliert aus Spannungs-Dehnungs-Diagrammen von unbehandelten und RGX behandelten Kollagenen sowie von verschiedenen Laminaten.....	71
Abbildung 40: Probendicke verschiedener einzelschichtiger Kollagene nach Zellkontakt für 24 h bzw. 72 h (* p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001; n.s. nicht signifikant).	72
Abbildung 41: Probendicke verschiedener zweier Kollagenlamine nach Zellkontakt für 24 h bzw. 72 h (* p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001; n.s. nicht signifikant).	73
Abbildung 42: Probendicke verschiedener dreier Kollagenlamine nach Zellkontakt für 24 h bzw. 72 h (* p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001; n.s. nicht signifikant).	74
Abbildung 43: Viabilität von NHDF Zellen nach 24 h bzw. 72 h auf den verschiedenen Kollagenlaminaten. Da sich alle Werte höchst signifikant voneinander unterschieden (***p < 0.001) wurden diese aus Übersichtsgründen nicht in der Grafik aufgeführt. Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Kulturplatte) dargestellt.	75
Abbildung 44: <i>In vitro</i> -Zytotoxizitäts-Assays der Lamine durchgeführt mit L929 Zellen (* p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001; n.s. nicht signifikant). Die Ergebnisse werden prozentual bezogen auf die Kontrolle (Medium ohne Kollagen Kontakt) dargestellt	76
Abbildung 45: Zusammenhang zwischen den Kollagenschichten, der Zellproliferation und den mechanischen Eigenschaften.	87
Abbildung 46: Beispiel für die Ausrichtung der Prägnungen von C im Faserzugmodul.	90

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele für synthetische Biomaterialien im klinischen Alltag und deren Anwendungsgebiete.	11
Tabelle 2: Liste der verwendeten Kollagene	18
Tabelle 3: Liste der verwendeten Zelllinien	18
Tabelle 4: Liste der verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze.....	19
Tabelle 5: Liste der verwendeten Materialien für die Mikrobiologie	20
Tabelle 6: Liste der verwendeten Chemikalien.....	20
Tabelle 7: Liste der verwendeten Antikörper.....	22
Tabelle 8: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.	23
Tabelle 9: Liste der verwendeten Geräte.....	24
Tabelle 10: Liste der verwendeten Software	25
Tabelle 11: Liste der für die verschiedenen Zellen genutzten Medien	27
Tabelle 12: Übersicht über die Untersuchungen, welche bezüglich der Biokompatibilität der Kollagene durchgeführt wurden	33
Tabelle 13: Bezeichnung der Zweierlamine und deren Ausrichtung in der Kulturplatte.....	56
Tabelle 14: Probenübersicht der bei den Zugversuchen genutzten Kollagene bzw. Lamine	67
Tabelle 15: Probenübersicht der bei den Dickenmessungen genutzten Kollagene bzw. Lamine	71

9 Literaturverzeichnis

- [1] J.R. Porter, T.T. Ruckh, K.C. Popat, Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies, *Biotechnology progress* 25(6) (2009) 1539-60.
- [2] R. Marsell, T.A. Einhorn, The biology of fracture healing, *Injury* 42(6) (2011) 551-5.
- [3] A. Schindeler, M.M. McDonald, P. Bokko, D.G. Little, Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture, *Seminars in cell & developmental biology* 19(5) (2008) 459-66.
- [4] K.M. Davis, K.S. Griffin, T.G. Chu, J.C. Wenke, B.T. Corona, T.O. McKinley, M.A. Kacena, Muscle-bone interactions during fracture healing, *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 15(1) (2015) 1-9.
- [5] L. Claes, S. Recknagel, A. Ignatius, Fracture healing under healthy and inflammatory conditions, *Nature Reviews Rheumatology* 8(3) (2012) 133-143.
- [6] T.A. Einhorn, R.J. Majeska, E.B. Rush, P.M. Levine, M.C. Horowitz, The expression of cytokine activity by fracture callus, *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 10(8) (1995) 1272-81.
- [7] T. Kon, T.J. Cho, T. Aizawa, M. Yamazaki, N. Nooh, D. Graves, L.C. Gerstenfeld, T.A. Einhorn, Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing, *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 16(6) (2001) 1004-14.
- [8] R. Dimitriou, E. Tsiridis, P.V. Giannoudis, Current concepts of molecular aspects of bone healing, *Injury* 36(12) (2005) 1392-404.
- [9] L.C. Gerstenfeld, D.M. Cullinane, G.L. Barnes, D.T. Graves, T.A. Einhorn, Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation, *Journal of cellular biochemistry* 88(5) (2003) 873-84.
- [10] T.J. Cho, L.C. Gerstenfeld, T.A. Einhorn, Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing, *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17(3) (2002) 513-20.
- [11] S.M. Perren, Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology, *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 84(8) (2002) 1093-110.
- [12] K.D. Hankenson, K. Gagne, M. Shaughnessy, Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration, *Advanced drug delivery reviews* 94 (2015) 3-12.
- [13] R.A. Hayda, C.T. Brighton, J.L. Esterhai, Jr., Pathophysiology of Delayed Healing, *Clinical Orthopaedics and Related Research*® 355 (1998).
- [14] G.M. Calori, W. Albisetti, A. Agus, S. Iori, L. Tagliabue, Risk factors contributing to fracture non-unions, *Injury* 38 (2007) S11-S18.
- [15] L. Claes, P. Augat, G. Suger, H.J. Wilke, Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing, *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 15(4) (1997) 577-84.

- [16] C.L. Ekegren, E.R. Edwards, R. de Steiger, B.J. Gabbe, Incidence, Costs and Predictors of Non-Union, Delayed Union and Mal-Union Following Long Bone Fracture, *International journal of environmental research and public health* 15(12) (2018).
- [17] J.F. Keating, P.I. O'Brien, P.A. Blachut, R.N. Meek, H.M. Broekhuysse, Reamed interlocking intramedullary nailing of open fractures of the tibia, *Clinical orthopaedics and related research* (338) (1997) 182-91.
- [18] K. O'Halloran, M. Coale, T. Costales, T. Zerhusen, Jr., R.C. Castillo, J.W. Nascone, R.V. O'Toole, Will My Tibial Fracture Heal? Predicting Nonunion at the Time of Definitive Fixation Based on Commonly Available Variables, *Clinical orthopaedics and related research* 474(6) (2016) 1385-95.
- [19] K.A. Ross, K. O'Halloran, R.C. Castillo, M. Coale, J. Fowler, J.W. Nascone, M.F. Sciadini, C.T. LeBrun, T.T. Manson, A.R. Carlini, J.E. Jolissaint, R.V. O'Toole, Prediction of tibial nonunion at the 6-week time point, *Injury* 49(11) (2018) 2075-2082.
- [20] T.C.O.T. Society, Nonunion Following Intramedullary Nailing of the Femur with and without Reaming: Results of a Multicenter Randomized Clinical Trial, *JBJS* 85(11) (2003) 2093-2096.
- [21] W.J. Metsemakers, N. Roels, A. Belmans, P. Reynders, S. Nijs, Risk factors for nonunion after intramedullary nailing of femoral shaft fractures: Remaining controversies, *Injury* 46(8) (2015) 1601-7.
- [22] P.M. Rommens, J. Blum, M. Runkel, Retrograde nailing of humeral shaft fractures, *Clinical orthopaedics and related research* (350) (1998) 26-39.
- [23] A. Sarmiento, J.B. Zagorski, G.A. Zych, L.L. Latta, C.A. Capps, Functional bracing for the treatment of fractures of the humeral diaphysis, *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 82(4) (2000) 478-86.
- [24] L. Audigé, D. Griffin, M. Bhandari, J. Kellam, T.P. Rüedi, Path Analysis of Factors for Delayed Healing and Nonunion in 416 Operatively Treated Tibial Shaft Fractures, 438 (2005) 221-232.
- [25] D.K. Wukich, A.J. Kline, The management of ankle fractures in patients with diabetes, *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 90(7) (2008) 1570-8.
- [26] J.R. Lynch, L.A. Taitzman, D.P. Barei, S.E. Nork, Femoral nonunion: risk factors and treatment options, *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 16(2) (2008) 88-97.
- [27] M. Farokhi, F. Mottaghitalab, M.A. Shokrgozar, K.L. Ou, C. Mao, H. Hosseinkhani, Importance of dual delivery systems for bone tissue engineering, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 225 (2016) 152-69.
- [28] P.V. Giannoudis, T.A. Einhorn, D. Marsh, Fracture healing: the diamond concept, *Injury* 38 Suppl 4 (2007) S3-6.
- [29] M.J. Patzakis, C.G. Zalavras, Chronic posttraumatic osteomyelitis and infected nonunion of the tibia: current management concepts, *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 13(6) (2005) 417-27.
- [30] S.G. Madanagopal, D. Seligson, C.S. Roberts, The antibiotic cement nail for infection after tibial nailing, *Orthopedics* 27(7) (2004) 709-12.
- [31] M. Mifsud, M. McNally, Local delivery of antimicrobials in the treatment of bone infections, *Orthopaedics and Trauma* 33(3) (2019) 160-165.

- [32] U. Saran, S. Gemini Piperni, S. Chatterjee, Role of angiogenesis in bone repair, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 561 (2014) 109-117.
- [33] A. Horner, N.J. Bishop, S. Bord, C. Beeton, A.W. Kelsall, N. Coleman, J.E. Compston, Immunolocalisation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human neonatal growth plate cartilage, *J Anat* 194 (Pt 4)(Pt 4) (1999) 519-524.
- [34] E.J. Mackie, Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture, *The international journal of biochemistry & cell biology* 35(9) (2003) 1301-5.
- [35] K.F. Dickson, S. Katzman, G. Paiement, The importance of the blood supply in the healing of tibial fractures, *Contemporary orthopaedics* 30(6) (1995) 489-93.
- [36] K.D. Hankenson, M. Dishowitz, C. Gray, M. Schenker, Angiogenesis in bone regeneration, *Injury* 42(6) (2011) 556-61.
- [37] M.R. Hausman, M.B. Schaffler, R.J. Majeska, Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis, *Bone* 29(6) (2001) 560-564.
- [38] J.H. Holstein, M. Klein, P. Garcia, T. Histing, U. Culemann, A. Pizanis, M.W. Laschke, C. Scheuer, C. Meier, H. Schorr, T. Pohlemann, M.D. Menger, Rapamycin affects early fracture healing in mice, *British journal of pharmacology* 154(5) (2008) 1055-62.
- [39] P.V. Giannoudis, T.A. Einhorn, G. Schmidmaier, D. Marsh, The diamond concept – open questions, *Injury* 39 (2008) S5-S8.
- [40] J.S. Carson, M.P. Bostrom, Synthetic bone scaffolds and fracture repair, *Injury* 38 Suppl 1 (2007) S33-7.
- [41] J.C. Banwart, M.A. Asher, R.S. Hassanein, Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation, *Spine* 20(9) (1995) 1055-60.
- [42] J.S. Silber, D.G. Anderson, S.D. Daffner, B.T. Brislin, J.M. Leland, A.S. Hilibrand, A.R. Vaccaro, T.J. Albert, Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion, *Spine* 28(2) (2003) 134-9.
- [43] R.F. Heary, R.P. Schlenk, T.A. Sacchieri, D. Barone, C. Brotea, Persistent iliac crest donor site pain: independent outcome assessment, *Neurosurgery* 50(3) (2002) 510-6; discussion 516-7.
- [44] E.D. Arrington, W.J. Smith, H.G. Chambers, A.L. Bucknell, N.A. Davino, Complications of iliac crest bone graft harvesting, *Clinical orthopaedics and related research* (329) (1996) 300-9.
- [45] G. Hannink, J.J. Arts, Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration?, *Injury* 42 Suppl 2 (2011) S22-5.
- [46] K.U. Lewandrowski, V. Rebmann, M. Pässler, G. Schollmeier, A. Ekkernkamp, H. Grosse-Wilde, W.W. Tomford, Immune response to perforated and partially demineralized bone allografts, *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association* 6(6) (2001) 545-55.
- [47] B.E. Buck, T.I. Malinin, M.D. Brown, Bone transplantation and human immunodeficiency virus. An estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), *Clinical orthopaedics and related research* (240) (1989) 129-36.
- [48] H.J. Mankin, F.J. Hornicek, K.A. Raskin, Infection in massive bone allografts, *Clinical orthopaedics and related research* (432) (2005) 210-6.

- [49] M. Kaur, K. Singh, Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications, *Materials Science and Engineering: C* 102 (2019) 844-862.
- [50] A. Bekmurzayeva, W.J. Duncanson, H.S. Azevedo, D. Kanayeva, Surface modification of stainless steel for biomedical applications: Revisiting a century-old material, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 93 (2018) 1073-1089.
- [51] R.Q. Frazer, R.T. Byron, P.B. Osborne, K.P. West, PMMA: an essential material in medicine and dentistry, *Journal of long-term effects of medical implants* 15(6) (2005) 629-39.
- [52] C. Piconi, G. Maccauro, Zirconia as a ceramic biomaterial, *Biomaterials* 20(1) (1999) 1-25.
- [53] X. Yu, X. Tang, S.V. Gohil, C.T. Laurencin, *Biomaterials for Bone Regenerative Engineering*, 4(9) (2015) 1268-1285.
- [54] L.C. Chow, Next generation calcium phosphate-based biomaterials, *Dental materials journal* 28(1) (2009) 1-10.
- [55] I.D. Xynos, M.V. Hukkanen, J.J. Batten, L.D. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak, Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation In vitro: implications and applications for bone tissue engineering, *Calcified tissue international* 67(4) (2000) 321-9.
- [56] Y. Li, Y. Liu, R. Li, H. Bai, Z. Zhu, L. Zhu, C. Zhu, Z. Che, H. Liu, J. Wang, L. Huang, Collagen-based biomaterials for bone tissue engineering, *Materials & Design* 210 (2021) 110049.
- [57] A.C. Anselmo, S. Mitragotri, An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 190 (2014) 15-28.
- [58] H. Zhong, G. Chan, Y. Hu, H. Hu, D. Ouyang, A Comprehensive Map of FDA-Approved Pharmaceutical Products, *Pharmaceutics* 10(4) (2018) 263.
- [59] Y. Barenholz, Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 160(2) (2012) 117-34.
- [60] P. Wu, D.W. Grainger, Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis, *Biomaterials* 27(11) (2006) 2450-67.
- [61] H. Lu, Y. Liu, J. Guo, H. Wu, J. Wang, G. Wu, Biomaterials with Antibacterial and Osteoinductive Properties to Repair Infected Bone Defects, *Int J Mol Sci* 17(3) (2016) 334.
- [62] P. van de Wetering, A.T. Metters, R.G. Schoenmakers, J.A. Hubbell, Poly(ethylene glycol) hydrogels formed by conjugate addition with controllable swelling, degradation, and release of pharmaceutically active proteins, *Journal of Controlled Release* 102(3) (2005) 619-627.
- [63] D. Fan, E. De Rosa, M.B. Murphy, Y. Peng, C.A. Smid, C. Chiappini, X. Liu, P. Simmons, B.K. Weiner, M. Ferrari, E. Tasciotti, Mesoporous Silicon-PLGA Composite Microspheres for the Double Controlled Release of Biomolecules for Orthopedic Tissue Engineering, 22(2) (2012) 282-293.

- [64] B. Rutledge, D. Huyette, D. Day, J. Anglen, Treatment of osteomyelitis with local antibiotics delivered via bioabsorbable polymer, *Clinical orthopaedics and related research* (411) (2003) 280-7.
- [65] D. Campoccia, L. Montanaro, P. Speziale, C.R. Arciola, Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use, *Biomaterials* 31(25) (2010) 6363-77.
- [66] C. Nica, Z. Lin, A. Sculean, M.B. Asparuhova, Adsorption and Release of Growth Factors from Four Different Porcine-Derived Collagen Matrices, *Materials (Basel, Switzerland)* 13(11) (2020).
- [67] W.-H. Lee, C.-Y. Loo, A.V. Zavgorodniy, M. Ghadiri, R. Rohanizadeh, A novel approach to enhance protein adsorption and cell proliferation on hydroxyapatite: citric acid treatment, *RSC Advances* 3(12) (2013) 4040-4051.
- [68] C. Strobel, N. Bormann, A. Kadow-Romacker, G. Schmidmaier, B. Wildemann, Sequential release kinetics of two (gentamicin and BMP-2) or three (gentamicin, IGF-I and BMP-2) substances from a one-component polymeric coating on implants, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 156(1) (2011) 37-45.
- [69] Y. Cho, J. Hong, Sustained release of therapeutic proteins from multilayers adsorbed on the sidewalls of porous membranes, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 562 (2019) 296-303.
- [70] N.J. Shah, M.L. Macdonald, Y.M. Beben, R.F. Padera, R.E. Samuel, P.T. Hammond, Tunable dual growth factor delivery from polyelectrolyte multilayer films, *Biomaterials* 32(26) (2011) 6183-6193.
- [71] B. Spellberg, B.A. Lipsky, Systemic Antibiotic Therapy for Chronic Osteomyelitis in Adults, *Clinical Infectious Diseases* 54(3) (2011) 393-407.
- [72] H.S. Fraimow, Systemic antimicrobial therapy in osteomyelitis, *Seminars in plastic surgery* 23(2) (2009) 90-99.
- [73] C.S. Lewis, P.R. Supronowicz, R.M. Zhukauskas, E. Gill, R.R. Cobb, Local antibiotic delivery with demineralized bone matrix, *Cell and tissue banking* 13(1) (2012) 119-27.
- [74] A.D. Hanssen, Local antibiotic delivery vehicles in the treatment of musculoskeletal infection, *Clinical orthopaedics and related research* (437) (2005) 91-6.
- [75] H.W. Buchholz, H. Engelbrecht, [Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins], *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 41(11) (1970) 511-5.
- [76] J.M. Curtis, V. Sternhagen, D. Batts, Acute renal failure after placement of tobramycin-impregnated bone cement in an infected total knee arthroplasty, *Pharmacotherapy* 25(6) (2005) 876-80.
- [77] T.M. van Raaij, L.E. Visser, A.G. Vulto, J.A. Verhaar, Acute renal failure after local gentamicin treatment in an infected total knee arthroplasty, *The Journal of arthroplasty* 17(7) (2002) 948-50.
- [78] A.J. Ambard, L. Mueninghoff, Calcium phosphate cement: review of mechanical and biological properties, *Journal of prosthodontics : official journal of the American College of Prosthodontists* 15(5) (2006) 321-8.

- [79] N. Aldahak, D. Dupre, M. Ragaee, S. Froelich, J. Wilberger, K.M. Aziz, Hydroxyapatite bone cement application for the reconstruction of retrosigmoid craniectomy in the treatment of cranial nerves disorders, *Surg Neurol Int* 8 (2017) 115-115.
- [80] J.K. Ellington, M. Harris, L. Webb, B. Smith, T. Smith, K. Tan, M. Hudson, Intracellular *Staphylococcus aureus*. A mechanism for the indolence of osteomyelitis, *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 85(6) (2003) 918-21.
- [81] A. Bistolfi, G. Massazza, E. Verne, A. Masse, D. Deledda, S. Ferraris, M. Miola, F. Galetto, M. Crova, Antibiotic-loaded cement in orthopedic surgery: a review, *ISRN orthopedics* 2011 (2011) 290851.
- [82] V. Alt, J. Franke, R. Schnettler, Local Delivery of Antibiotics in the Surgical Treatment of Bone Infections, *Techniques in Orthopaedics* 30 (2015) 230-235.
- [83] N. Kakudo, K. Kusumoto, Y.B. Wang, Y. Iguchi, Y. Ogawa, Immunolocalization of vascular endothelial growth factor on intramuscular ectopic osteoinduction by bone morphogenetic protein-2, *Life sciences* 79(19) (2006) 1847-55.
- [84] H. Peng, V. Wright, A. Usas, B. Gearhart, H.C. Shen, J. Cummins, J. Huard, Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4, *The Journal of clinical investigation* 110(6) (2002) 751-9.
- [85] M.M. Deckers, R.L. van Bezooijen, G. van der Horst, J. Hoogendam, C. van Der Bent, S.E. Papapoulos, C.W. Löwik, Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A, *Endocrinology* 143(4) (2002) 1545-53.
- [86] R.A. Perez, S.-J. Seo, J.-E. Won, E.-J. Lee, J.-H. Jang, J.C. Knowles, H.-W. Kim, Therapeutically relevant aspects in bone repair and regeneration, *Materials Today* 18(10) (2015) 573-589.
- [87] D.H.R. Kempen, L. Lu, A. Heijink, T.E. Hefferan, L.B. Creemers, A. Maran, M.J. Yaszemski, W.J.A. Dhert, Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration, *Biomaterials* 30(14) (2009) 2816-2825.
- [88] J. Deshane, S. Chen, S. Caballero, A. Grochot-Przeczek, H. Was, S. Li Calzi, R. Lach, T.D. Hock, B. Chen, N. Hill-Kapturczak, G.P. Siegal, J. Dulak, A. Jozkowicz, M.B. Grant, A. Agarwal, Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism, *The Journal of experimental medicine* 204(3) (2007) 605-18.
- [89] Y. Cun, B. Diao, Z. Zhang, G. Wang, J. Yu, L. Ma, Z. Rao, Role of the stromal cell derived factor-1 in the biological functions of endothelial progenitor cells and its underlying mechanisms, *Exp Ther Med* 21(1) (2021) 39.
- [90] F. Yang, F. Xue, J. Guan, Z. Zhang, J. Yin, Q. Kang, Stromal-Cell-Derived Factor (SDF) 1-Alpha Overexpression Promotes Bone Regeneration by Osteogenesis and Angiogenesis in Osteonecrosis of the Femoral Head, *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 46(6) (2018) 2561-2575.
- [91] I. Petit, D. Jin, S. Raffii, The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis, *Trends Immunol* 28(7) (2007) 299-307.

- [92] M.M. Martino, P.S. Briquez, K. Maruyama, J.A. Hubbell, Extracellular matrix-inspired growth factor delivery systems for bone regeneration, *Advanced drug delivery reviews* 94 (2015) 41-52.
- [93] C.-Y. Ho, A. Sanghani, J. Hua, M. Coathup, P. Kalia, G. Blunn, Mesenchymal stem cells with increased stromal cell-derived factor 1 expression enhanced fracture healing, *Tissue Eng Part A* 21(3-4) (2015) 594-602.
- [94] M.R. Urist, Bone: formation by autoinduction, *Science* 150(3698) (1965) 893-9.
- [95] S. Cecchi, S.J. Bennet, M. Arora, Bone morphogenetic protein-7: Review of signalling and efficacy in fracture healing, *J Orthop Translat* 4 (2015) 28-34.
- [96] G.B. Bishop, T.A. Einhorn, Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery, *International orthopaedics* 31(6) (2007) 721-7.
- [97] Z. Dahabreh, G.M. Calori, N.K. Kanakaris, V.S. Nikolaou, P.V. Giannoudis, A cost analysis of treatment of tibial fracture nonunion by bone grafting or bone morphogenetic protein-7, *International orthopaedics* 33(5) (2008) 1407.
- [98] J.G. Devine, J.R. Dettori, J.C. France, E. Brodt, R.A. McGuire, The use of rhBMP in spine surgery: is there a cancer risk?, *Evid Based Spine Care J* 3(2) (2012) 35-41.
- [99] J. Chrastil, J.B. Low, P.G. Whang, A.A. Patel, Complications associated with the use of the recombinant human bone morphogenetic proteins for posterior interbody fusions of the lumbar spine, *Spine* 38(16) (2013) E1020-7.
- [100] N. Mathavan, D.B. Raina, M. Tägil, H. Isaksson, Longitudinal in vivo monitoring of callus remodeling in BMP-7- and Zoledronate-treated fractures, *Spine* 38(9) (2020) 1905-1913.
- [101] C. Schlickewei, T.O. Klatter, Y. Wildermuth, G. Laaff, J.M. Rueger, J. Ruesing, S. Chernousova, W. Lehmann, M. Epple, A bioactive nano-calcium phosphate paste for in-situ transfection of BMP-7 and VEGF-A in a rabbit critical-size bone defect: results of an in vivo study, *Journal of materials science. Materials in medicine* 30(2) (2019) 15.
- [102] M.F. Maitz, Applications of synthetic polymers in clinical medicine, *Biosurface and Biotribology* 1(3) (2015) 161-176.
- [103] A.E. Steiert, M. Boyce, H. Sorg, Capsular contracture by silicone breast implants: possible causes, biocompatibility, and prophylactic strategies, *Medical devices (Auckland, N.Z.)* 6 (2013) 211-8.
- [104] C.H. Wong, M. Samuel, B.K. Tan, C. Song, Capsular contracture in subglandular breast augmentation with textured versus smooth breast implants: a systematic review, *Plastic and reconstructive surgery* 118(5) (2006) 1224-1236.
- [105] T.J. Newland, M.L. McDermott, D. Elliott, L.D. Hazlett, D.J. Apple, R.J. Lambert, R.P. Barrett, Experimental neodymium:YAG laser damage to acrylic, poly(methyl methacrylate), and silicone intraocular lens materials, *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 25(1) (1999) 72-76.
- [106] T. Oshika, T. Nagata, Y. Ishii, Adhesion of lens capsule to intraocular lenses of polymethylmethacrylate, silicone, and acrylic foldable materials: an experimental study, *The British journal of ophthalmology* 82(5) (1998) 549-53.
- [107] T. Gajewski, K. Szajek, H. Stępak, T. Łodygowski, G. Oszkinis, The influence of the nylon balloon stiffness on the efficiency of the intra-aortic balloon occlusion,

International journal for numerical methods in biomedical engineering 35(4) (2019) e3173.

[108] M.A. Geith, J.D. Eckmann, D.C. Haspinger, E. Agrafiotis, D. Maier, P. Szabo, G. Sommer, T.G. Schratzenstaller, G.A. Holzapfel, Experimental and mathematical characterization of coronary polyamide-12 balloon catheter membranes, *PloS one* 15(6) (2020) e0234340.

[109] M. Shakiba, E. Rezvani Ghomi, F. Khosravi, S. Jouybar, A. Bigham, M. Zare, M. Abdouss, R. Moaref, S. Ramakrishna, Nylon—A material introduction and overview for biomedical applications, 32(9) (2021) 3368-3383.

[110] A. Shani, V. Poliansky, H. Mulla, N. Rahamimov, Nylon Skin Sutures Carry a Lower Risk of Post-Operative Infection than Metal Staples in Open Posterior Spine Surgery: A Retrospective Case-Control Study of 270 Patients, *Surgical infections* 21(5) (2020) 440-444.

[111] A. Boger, M. Bohner, P. Heini, S. Verrier, E. Schneider, Properties of an injectable low modulus PMMA bone cement for osteoporotic bone, *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 86(2) (2008) 474-82.

[112] M.S. Zafar, Prosthodontic Applications of Polymethyl Methacrylate (PMMA): An Update, *Polymers* 12(10) (2020).

[113] Y. Ucar, T. Akova, I. Aysan, Mechanical Properties of Polyamide Versus Different PMMA Denture Base Materials, *Journal of Prosthodontics* 21(3) (2012) 173-176.

[114] A.D. Metcalfe, M.W. Ferguson, Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration, *Journal of the Royal Society, Interface* 4(14) (2007) 413-37.

[115] R. Mihai, I.P. Florescu, V. Coroiu, A. Oancea, M. Lungu, In vitro biocompatibility testing of some synthetic polymers used for the achievement of nervous conduits, *J Med Life* 4(3) (2011) 250-255.

[116] D. Jain, D. Bar-Shalom, Alginate drug delivery systems: application in context of pharmaceutical and biomedical research, *Drug Development and Industrial Pharmacy* 40(12) (2014) 1576-1584.

[117] H.H. Tønnesen, J. Karlsen, Alginate in Drug Delivery Systems, *Drug Development and Industrial Pharmacy* 28(6) (2002) 621-630.

[118] S. Cohen, E. Lobel, A. Trevigoda, Y. Peled, A novel in situ-forming ophthalmic drug delivery system from alginates undergoing gelation in the eye, *Journal of Controlled Release* 44(2) (1997) 201-208.

[119] B.A. Aderibigbe, B. Buyana, Alginate in Wound Dressings, *Pharmaceutics* 10(2) (2018) 42.

[120] W. Friess, Collagen--biomaterial for drug delivery, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 45(2) (1998) 113-36.

[121] M. Xeroudaki, M. Thangavelu, A. Lennikov, A. Ratnayake, J. Bisevac, G. Petrovski, P. Fagerholm, M. Rafat, N. Lagali, A porous collagen-based hydrogel and implantation method for corneal stromal regeneration and sustained local drug delivery, *Scientific reports* 10(1) (2020) 16936.

- [122] M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini, Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Progress in Polymer Science* 36(8) (2011) 981-1014.
- [123] A. Anitha, S. Sowmya, P.T.S. Kumar, S. Deepthi, K.P. Chennazhi, H. Ehrlich, M. Tsurkan, R. Jayakumar, Chitin and chitosan in selected biomedical applications, *Progress in Polymer Science* 39(9) (2014) 1644-1667.
- [124] A.B. Lansdown, M.J. Payne, An evaluation of the local reaction and biodegradation of calcium sodium alginate (Kaltostat) following subcutaneous implantation in the rat, *J R Coll Surg Edinb* 39(5) (1994) 284-288.
- [125] M. Dalheim, J. Vanacker, M.A. Najmi, F.L. Aachmann, B.L. Strand, B.E. Christensen, Efficient functionalization of alginate biomaterials, *Biomaterials* 80 (2016) 146-156.
- [126] T.I. Shaheen, A.S. Montaser, S. Li, Effect of cellulose nanocrystals on scaffolds comprising chitosan, alginate and hydroxyapatite for bone tissue engineering, *Int J Biol Macromol* 121 (2019) 814-821.
- [127] H.V. Almeida, B.N. Sathy, I. Dudurych, C.T. Buckley, F.J. O'Brien, D.J. Kelly, Anisotropic Shape-Memory Alginate Scaffolds Functionalized with Either Type I or Type II Collagen for Cartilage Tissue Engineering, *Tissue Eng Part A* 23(1-2) (2017) 55-68.
- [128] P. Prang, R. Müller, A. Eljaouhari, K. Heckmann, W. Kunz, T. Weber, C. Faber, M. Vroemen, U. Bogdahn, N. Weidner, The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels, *Biomaterials* 27(19) (2006) 3560-9.
- [129] L.M. Delgado, Y. Bayon, A. Pandit, D.I. Zeugolis, To cross-link or not to cross-link? Cross-linking associated foreign body response of collagen-based devices, *Tissue engineering. Part B, Reviews* 21(3) (2015) 298-313.
- [130] C. Meena, S.A. Mengi, S.G. Deshpande, Biomedical and industrial applications of collagen, *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Chemical Sciences* 111(2) (1999) 319-329.
- [131] T. Miyata, T. Taira, Y. Noishiki, Collagen engineering for biomaterial use, *Clinical materials* 9(3-4) (1992) 139-48.
- [132] A.M. Ferreira, P. Gentile, V. Chiono, G. Ciardelli, Collagen for bone tissue regeneration, *Acta biomaterialia* 8(9) (2012) 3191-3200.
- [133] C.V.M. Rodrigues, P. Serricella, A.B.R. Linhares, R.M. Guerdes, R. Borojevic, M.A. Rossi, M.E.L. Duarte, M. Farina, Characterization of a bovine collagen–hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering, *Biomaterials* 24(27) (2003) 4987-4997.
- [134] M. Koide, K. Osaki, J. Konishi, K. Oyamada, T. Katakura, A. Takahashi, K. Yoshizato, A new type of biomaterial for artificial skin: dehydrothermally cross-linked composites of fibrillar and denatured collagens, *Journal of biomedical materials research* 27(1) (1993) 79-87.
- [135] B.P. Chan, K.F. So, Photochemical crosslinking improves the physicochemical properties of collagen scaffolds, *Journal of biomedical materials research. Part A* 75(3) (2005) 689-701.

- [136] O.C. Chan, K.F. So, B.P. Chan, Fabrication of nano-fibrous collagen microspheres for protein delivery and effects of photochemical crosslinking on release kinetics, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 129(2) (2008) 135-43.
- [137] V.R. Sinha, A. Trehan, Biodegradable microspheres for protein delivery, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 90(3) (2003) 261-80.
- [138] C.H. Lee, A. Singla, Y. Lee, Biomedical applications of collagen, *International journal of pharmaceutics* 221(1-2) (2001) 1-22.
- [139] V. Charulatha, A. Rajaram, Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes, *Biomaterials* 24(5) (2003) 759-67.
- [140] B.A. Harley, J.H. Leung, E.C. Silva, L.J. Gibson, Mechanical characterization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds, *Acta biomaterialia* 3(4) (2007) 463-74.
- [141] B.P. Chan, T.Y. Hui, O.C. Chan, K.F. So, W. Lu, K.M. Cheung, E. Salomatina, A. Yaroslavsky, Photochemical cross-linking for collagen-based scaffolds: a study on optical properties, mechanical properties, stability, and hematocompatibility, *Tissue engineering* 13(1) (2007) 73-85.
- [142] T. Pan, W. Song, X. Cao, Y. Wang, 3D Bioplotting of Gelatin/Alginate Scaffolds for Tissue Engineering: Influence of Crosslinking Degree and Pore Architecture on Physicochemical Properties, *Journal of Materials Science & Technology* 32(9) (2016) 889-900.
- [143] A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, D.E. Discher, Matrix elasticity directs stem cell lineage specification, *Cell* 126(4) (2006) 677-89.
- [144] W. Zhao, X. Li, X. Liu, N. Zhang, X. Wen, Effects of substrate stiffness on adipogenic and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 40 (2014) 316-23.
- [145] L.H.H. Olde Damink, P.J. Dijkstra, M.J.A. Van Luyn, P.B. Van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 6(8) (1995) 460-472.
- [146] X. Wu, L. Black, G. Santacana-Laffitte, C.W. Patrick, Jr., Preparation and assessment of glutaraldehyde-crosslinked collagen-chitosan hydrogels for adipose tissue engineering, *Journal of biomedical materials research. Part A* 81(1) (2007) 59-65.
- [147] M.D. Harriger, A.P. Supp, G.D. Warden, S.T. Boyce, Glutaraldehyde crosslinking of collagen substrates inhibits degradation in skin substitutes grafted to athymic mice, *Journal of biomedical materials research* 35(2) (1997) 137-45.
- [148] L.H. Olde Damink, P.J. Dijkstra, M.J. van Luyn, P.B. van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide, *Biomaterials* 17(8) (1996) 765-73.
- [149] M.J. van Luyn, P.B. van Wachem, L.H. Olde Damink, P.J. Dijkstra, J. Feijen, P. Nieuwenhuis, Secondary cytotoxicity of cross-linked dermal sheep collagens during repeated exposure to human fibroblasts, *Biomaterials* 13(14) (1992) 1017-24.
- [150] N. Davidenko, C.F. Schuster, D.V. Bax, N. Raynal, R.W. Farndale, S.M. Best, R.E. Cameron, Control of crosslinking for tailoring collagen-based scaffolds stability and mechanics, *Acta biomaterialia* 25 (2015) 131-42.

- [151] M. Rafat, F. Li, P. Fagerholm, N.S. Lagali, M.A. Watsky, R. Munger, T. Matsuura, M. Griffith, PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen-chitosan hydrogels for corneal tissue engineering, *Biomaterials* 29(29) (2008) 3960-3972.
- [152] J.S. Pieper, T. Hafmans, J.H. Veerkamp, T.H. van Kuppevelt, Development of tailor-made collagen-glycosaminoglycan matrices: EDC/NHS crosslinking, and ultrastructural aspects, *Biomaterials* 21(6) (2000) 581-93.
- [153] D.M. Simmons, J.N. Kearney, Evaluation of collagen cross-linking techniques for the stabilization of tissue matrices, *Biotechnology and applied biochemistry* 17(1) (1993) 23-9.
- [154] K. Billiar, J. Murray, D. Laude, G. Abraham, N. Bachrach, Effects of carbodiimide crosslinking conditions on the physical properties of laminated intestinal submucosa, *Journal of biomedical materials research* 56(1) (2001) 101-8.
- [155] J.S. Pieper, A. Oosterhof, P.J. Dijkstra, J.H. Veerkamp, T.H. van Kuppevelt, Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate, *Biomaterials* 20(9) (1999) 847-58.
- [156] M. Haugh, M. Jaasma, F. O'Brien, The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen-GAG scaffolds, *Journal of biomedical materials research. Part A* 89 (2009) 363-9.
- [157] D. Balasubramanian, X. Du, J.S. Zigler Jr., THE REACTION OF SINGLET OXYGEN WITH PROTEINS, WITH SPECIAL REFERENCE TO CRYSTALLINS, 52(4) (1990) 761-768.
- [158] J.L. Hott, R.F. Borkman, ANALYSIS OF PHOTO-OXIDIZED AMINO ACIDS IN TRYPTIC PEPTIDES OF CALF LENS γ -II CRYSTALLIN, 56(2) (1992) 257-262.
- [159] J.A. Ramshaw, L.J. Stephens, P.A. Tulloch, Methylene blue sensitized photo-oxidation of collagen fibrils, *Biochim Biophys Acta* 1206(2) (1994) 225-30.
- [160] A.K. Adams, E.A. Talman, L. Campbell, B.K. McIlroy, M.A. Moore, Crosslink formation in porcine valves stabilized by dye-mediated photooxidation, *Journal of biomedical materials research* 57(4) (2001) 582-7.
- [161] E.I. Alarcon, H. Poblete, H. Roh, J.-F. Couture, J. Comer, I.E. Kochevar, Rose Bengal Binding to Collagen and Tissue Photobonding, *ACS Omega* 2(10) (2017) 6646-6657.
- [162] E.E. Verter, T.E. Gisel, P. Yang, A.J. Johnson, R.W. Redmond, I.E. Kochevar, Light-Initiated Bonding of Amniotic Membrane to Cornea, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52(13) (2011) 9470-9477.
- [163] S. Eckes, J. Braun, J.S. Wack, U. Ritz, D. Nickel, K. Schmitz, Rose Bengal Crosslinking to Stabilize Collagen Sheets and Generate Modulated Collagen Laminates, *Int J Mol Sci* 21(19) (2020) 7408.
- [164] A. Hofmann, U. Ritz, S. Verrier, D. Eglin, M. Alini, S. Fuchs, C.J. Kirkpatrick, P.M. Rommens, The effect of human osteoblasts on proliferation and neo-vessel formation of human umbilical vein endothelial cells in a long-term 3D co-culture on polyurethane scaffolds, *Biomaterials* 29(31) (2008) 4217-4226.
- [165] A. Hofmann, U. Ritz, M.H. Hessmann, C. Schmid, A. Tresch, J.D. Rompe, A. Meurer, P.M. Rommens, Cell viability, osteoblast differentiation, and gene expression are altered in human osteoblasts from hypertrophic fracture non-unions, *Bone* 42(5) (2008) 894-906.

- [166] G. Carpentier, S. Berndt, S. Ferratge, W. Rasband, M. Cuendet, G. Uzan, P. Albanese, Angiogenesis Analyzer for ImageJ — A comparative morphometric analysis of “Endothelial Tube Formation Assay” and “Fibrin Bead Assay”, *Scientific reports* 10(1) (2020) 11568.
- [167] Farley, J.E. Wergedal, D.J. Baylink, Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity of bone-forming cells, *Science* 222(4621) (1983) 330.
- [168] M. Drouet, F. Chai, C. Barthelemy, G. Lebuffe, B. Debaene, B. Decaudin, P. Odou, Influence of vancomycin infusion methods on endothelial cell toxicity, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59(2) (2015) 930-4.
- [169] P.H. Hsieh, Y.H. Chang, S.H. Chen, S.W. Ueng, C.H. Shih, High concentration and bioactivity of vancomycin and aztreonam eluted from Simplex cement spacers in two-stage revision of infected hip implants: a study of 46 patients at an average follow-up of 107 days, *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 24(8) (2006) 1615-21.
- [170] B.A. Masri, C.P. Duncan, C.P. Beauchamp, Long-term elution of antibiotics from bone-cement: an in vivo study using the prosthesis of antibiotic-loaded acrylic cement (PROSTALAC) system, *The Journal of arthroplasty* 13(3) (1998) 331-8.
- [171] M.J. Penner, C.P. Duncan, B.A. Masri, The in vitro elution characteristics of antibiotic-loaded CMW and Palacos-R bone cements, *The Journal of arthroplasty* 14(2) (1999) 209-14.
- [172] C.R. Rathbone, J.D. Cross, K.V. Brown, C.K. Murray, J.C. Wenke, Effect of various concentrations of antibiotics on osteogenic cell viability and activity, *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 29(7) (2011) 1070-4.
- [173] M.L. Edin, T. Miclau, G.E. Lester, R.W. Lindsey, L.E. Dahners, Effect of cefazolin and vancomycin on osteoblasts in vitro, *Clinical orthopaedics and related research* (333) (1996) 245-51.
- [174] E.A. Lidington, D.L. Moyes, A.M. McCormack, M.L. Rose, A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions, *Transplant immunology* 7(4) (1999) 239-46.
- [175] D. Cherfan, E.E. Verter, S. Melki, T.E. Gisel, F.J. Doyle, Jr., G. Scarcelli, S.H. Yun, R.W. Redmond, I.E. Kochevar, Collagen cross-linking using rose bengal and green light to increase corneal stiffness, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54(5) (2013) 3426-33.
- [176] P. Gallego-Muñoz, L. Ibares-Frías, E. Lorenzo, S. Marcos, P. Pérez-Merino, N. Bekesi, I.E. Kochevar, M.C. Martínez-García, Corneal Wound Repair After Rose Bengal and Green Light Crosslinking: Clinical and Histologic Study, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58(9) (2017) 3471-3480.
- [177] N. Bekesi, I.E. Kochevar, S. Marcos, Corneal Biomechanical Response Following Collagen Cross-Linking With Rose Bengal-Green Light and Riboflavin-UVA, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57(3) (2016) 992-1001.
- [178] B.P. Chan, O.C. Chan, K.F. So, Effects of photochemical crosslinking on the microstructure of collagen and a feasibility study on controlled protein release, *Acta biomaterialia* 4(6) (2008) 1627-36.

- [179] K.T. Bowers, J.C. Keller, B.A. Randolph, D.G. Wick, C.M. Michaels, Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro, *The International journal of oral & maxillofacial implants* 7(3) (1992) 302-10.
- [180] M. Könönen, M. Hormia, J. Kivilahti, J. Hautaniemi, I. Thesleff, Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium, *Journal of biomedical materials research* 26(10) (1992) 1325-1341.
- [181] C.M. Murphy, F.J. O'Brien, Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds, *Cell Adh Migr* 4(3) (2010) 377-381.
- [182] T.P. Kunzler, T. Drobek, M. Schuler, N.D. Spencer, Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients, *Biomaterials* 28(13) (2007) 2175-82.
- [183] B. Wójciak-Stothard, Z. Madeja, W. Korohoda, A. Curtis, C. Wilkinson, Activation of macrophage-like cells by multiple grooved substrata. Topographical control of cell behaviour, *Cell Biol Int* 19(6) (1995) 485-90.
- [184] J. Meyle, K. Gültig, W. Nisch, Variation in contact guidance by human cells on a microstructured surface, *Journal of biomedical materials research* 29(1) (1995) 81-8.
- [185] A.I. Teixeira, P.F. Nealey, C.J. Murphy, Responses of human keratocytes to micro- and nanostructured substrates, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 71A(3) (2004) 369-376.
- [186] M. Yao, C. Gu, F.J. Doyle, Jr., H. Zhu, R.W. Redmond, I.E. Kochevar, Why is rose bengal more phototoxic to fibroblasts in vitro than in vivo?, *Photochemistry and photobiology* 90(2) (2014) 297-305.
- [187] J.A. Pedersen, M.A. Swartz, Mechanobiology in the third dimension, *Ann Biomed Eng* 33(11) (2005) 1469-90.
- [188] D. Rothamel, F. Schwarz, A. Sculean, M. Herten, W. Scherbaum, J. Becker, Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells, *Clinical oral implants research* 15(4) (2004) 443-9.
- [189] L. Pomeranic, D. Benayahu, Mesenchymal Cell Growth and Differentiation on a New Biocomposite Material: A Promising Model for Regeneration Therapy, 10(3) (2020) 458.
- [190] D.V. Bax, H.E. Smalley, R.W. Farndale, S.M. Best, R.E. Cameron, Cellular response to collagen-elastic composite materials, *Acta biomaterialia* 86 (2019) 158-170.
- [191] X. Zhang, U.P. Wyss, D. Pichora, M.F. Goosen, Biodegradable controlled antibiotic release devices for osteomyelitis: optimization of release properties, *The Journal of pharmacy and pharmacology* 46(9) (1994) 718-24.
- [192] E.L. Pastor, E. Reguera-Nuñez, E. Matveeva, M. Garcia-Fuentes, Pore size is a critical parameter for obtaining sustained protein release from electrochemically synthesized mesoporous silicon microparticles, *PeerJ* 3 (2015) e1277.
- [193] P. Angele, J. Abke, R. Kujat, H. Faltermeier, D. Schumann, M. Nerlich, B. Kinner, C. Englert, Z. Ruszczak, R. Mehrl, R. Mueller, Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices, *Biomaterials* 25(14) (2004) 2831-2841.

- [194] M. Park, D. Lee, S. Shin, J. Hyun, Effect of negatively charged cellulose nanofibers on the dispersion of hydroxyapatite nanoparticles for scaffolds in bone tissue engineering, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 130 (2015) 222-228.
- [195] C.M. Wertheimer, C. Elhardt, S.M. Kaminsky, L. Pham, Q. Pei, B. Mendes, S. Afshar, I.E. Kochevar, Enhancing Rose Bengal-Photosensitized Protein Crosslinking in the Cornea, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 60(6) (2019) 1845-1852.
- [196] M. Singh, J. Li, Z. Han, S. Vantipalli, C.H. Liu, C. Wu, R. Raghunathan, S.R. Aglyamov, M.D. Twa, K.V. Larin, Evaluating the Effects of Riboflavin/UV-A and Rose-Bengal/Green Light Cross-Linking of the Rabbit Cornea by Noncontact Optical Coherence Elastography, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57(9) (2016) Oct112-20.
- [197] M. McKegney, I. Taggart, M.H. Grant, The influence of crosslinking agents and diamines on the pore size, morphology and the biological stability of collagen sponges and their effect on cell penetration through the sponge matrix, *Journal of materials science. Materials in medicine* 12(9) (2001) 833-44.
- [198] S. Tasker, J.P.S. Badyal, Influence of Crosslinking upon the Macroscopic Pore Structure of Cellulose, *The Journal of Physical Chemistry* 98(31) (1994) 7599-7601.
- [199] D. Cherfan, E.E. Verter, S. Melki, T.E. Gisel, F.J. Doyle, Jr, G. Scarcelli, S.H. Yun, R.W. Redmond, I.E. Kochevar, Collagen Cross-Linking Using Rose Bengal and Green Light to Increase Corneal Stiffness, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54(5) (2013) 3426-3433.
- [200] G. Davies, The Rose Bengal test, *The Veterinary record* 88(17) (1971) 447-9.
- [201] N. Vanerio, M. Stijnen, B. de Mol, L.M. Kock, Biomedical Applications of Photo- and Sono-Activated Rose Bengal: A Review, *Photobiomodul Photomed Laser Surg* 37(7) (2019) 383-394.
- [202] A. Pardo, M. Selman, MMP-1: the elder of the family, *The international journal of biochemistry & cell biology* 37(2) (2005) 283-8.
- [203] M. Meyer, Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties, *BioMedical Engineering OnLine* 18(1) (2019) 24.
- [204] J. Zeltinger, J.K. Sherwood, D.A. Graham, R. Müller, L.G. Griffith, Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition, *Tissue engineering* 7(5) (2001) 557-72.
- [205] F.J. O'Brien, B.A. Harley, I.V. Yannas, L.J. Gibson, The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds, *Biomaterials* 26(4) (2005) 433-41.
- [206] E. Biazar, M. Heidari, A. Asefnejad, N. Montazeri, The relationship between cellular adhesion and surface roughness in polystyrene modified by microwave plasma radiation, *International journal of nanomedicine* 6 (2011) 631-9.
- [207] N. Vanerio, M. Stijnen, B.A.J.M. de Mol, L.M. Kock, Biomedical Applications of Photo- and Sono-Activated Rose Bengal: A Review, *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery* 37(7) (2019) 383-394.
- [208] T. Yeung, P.C. Georges, L.A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver, P.A. Janmey, Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion, *Cell motility and the cytoskeleton* 60(1) (2005) 24-34.

- [209] T. Arahira, M. Todo, Effects of Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Compressive Mechanical Behavior of Collagen/ β -TCP Composite Scaffold, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 39 (2014) 218-230.
- [210] C. Masaki, G.B. Schneider, R. Zaharias, D. Seabold, C. Stanford, Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression, *Clinical oral implants research* 16(6) (2005) 650-6.
- [211] J. Xie, Q. Zhang, T. Zhu, Y. Zhang, B. Liu, J. Xu, H. Zhao, Substrate stiffness-regulated matrix metalloproteinase output in myocardial cells and cardiac fibroblasts: implications for myocardial fibrosis, *Acta biomaterialia* 10(6) (2014) 2463-72.
- [212] M.J. Dalby, N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, M.O. Riehle, P. Herzyk, C.D. Wilkinson, R.O. Oreffo, The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder, *Nature materials* 6(12) (2007) 997-1003.
- [213] A.A. Zadpoor, Bone tissue regeneration: the role of scaffold geometry, *Biomaterials science* 3(2) (2015) 231-45.