

Aus dem Institut für Pathologie  
der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Evaluation des Wachstums und der Genexpression von Endothelzellen Fibroblasten  
und Keratinozyten auf oberflächenmodifizierten kollagenbasierten für Wundheilung  
und Hautregeneration konstruierten Biomaterialien

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Ahmad Al Diri  
aus Daraa

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 12. Juli 2022

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	5
Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis .....	7
1. Einleitung.....	8
1.1 Tissue Engineering.....	8
1.2 Tissue Engineering und Wundheilung.....	10
1.3 NPWT .....	10
1.4 Angiogenese.....	11
1.5 Proanthocyanidine und die Angiogenese .....	12
1.6 Cocultures .....	14
2. Ziel der Arbeit .....	14
3. Materialien.....	17
3.1 Zelllinien .....	17
3.1.1 L929 .....	17
3.1.2 MRC-5.....	18
3.1.3 HaCaT.....	18
3.1.4 HFF .....	18
3.1.5 HUVEC .....	19
3.1.6 ISO-HAS-1 .....	19
3.2 Zellkultur Nährmedien .....	20
3.2.1 Inhaltstoffe.....	20
3.2.2 Zellkulturmedium.....	20
3.3 Biomaterialien.....	21
3.4 Primers .....	22
3.5 Kits .....	23
3.6 Chemikalien und Antikörper .....	23
3.7 Zellkulturmaterialien .....	24
3.8 Geräte .....	25
4. Methoden .....	26
4.1 Zellkultivierung .....	26
4.2 Sterilitätstest der Prototyp-Biomaterialien.....	27
4.3 Zelladhäsion an den Prototyp-Biomaterialien .....	27
4.4 Zellviabilitätstest mithilfe von alamarBlue .....	28

4.5 Endotoxintest durch Anfärbung von E-Selectin .....	29
4.6 Wachstum der Zellen auf den Prototyp-Biomaterialien .....	30
4.7 Entwicklung eines 3-D Multizell-Sphäroidsystems zur Evaluierung der Migration und Invasion von Hautzellen in 3D-Kollagen-Scaffolds.....	31
4.8 RT-PCR .....	32
4.8.1 RNA - Isolation .....	32
4.8.2 Reverse Transkription .....	33
4.8.3. PCR.....	33
4.8.4. Gelelektrophorese .....	34
4.9 Evaluierung des Angiogenese-stimulierenden Potentials der Prototyp-Biomaterialien .....	35
5. Ergebnisse .....	35
5.1 Sterilitätstest der Prototyp-Biomaterialien.....	35
5.2 Zelladhäsion an den Prototyp-Biomaterialien .....	36
5.3 Effekt der Extrakte von den Prototyp-Biomaterialien auf die metabolische Aktivität der Zellen.....	37
5.4 Endotoxintest durch Anfärbung von E-Selectin .....	40
5.5 Wachstum der Zellen auf den Prototyp-Biomaterialien .....	42
5.5.1 Wachstum der Multizell-Sphäroide auf den Prototyp-Biomaterialien .....	50
5.7 PCR.....	51
5.7.1 Phänotypische Genexpression von HUVEC .....	51
5.7.2 Phänotypische Genexpression von HaCaT.....	53
5.7.3 Phänotypische Genexpression von HFF .....	54
5.7.4 Phänotypische Genexpression von MRC-5.....	54
5.8 Das Angiogenese-stimulierende Potential.....	55
6. Diskussion.....	56
6.1 Einfluss der GAGs .....	57
6.2 Einfluss der Proanthocyanidine .....	61
6.3 Die Genexpression .....	63
6.4 Angiogenese.....	65
7. Zusammenfassung .....	66
Literaturverzeichnis.....	68
Danksagung.....	77

## Abkürzungsverzeichnis

3-D	Dreidimensional
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Arbeitspaket
BM	Biomaterial
BSA	Bovine serum albumine
CK	Cytokeratin
CS	Chondroitinsulfat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EC	Endothelzellen
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
ECM	Extrazelluläre Matrix
ETO	Ethylenoxid
FCS	Fetal calf serum
GAG	Glykosaminoglykan
GFP	Green fluorescent protein
HA	Hyaluronsäure
HaCaT	Cultured Human Keratinocyte
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyloxy)ethansulfonsäure
HFF	Human foreskin fibroblasts
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IF	Immunfluoreszenz
LPS	Lipopolysaccharid
MRC-5	Medical Research Council cell strain 5
NPWT	Negative pressure wound therapy
o/n	Overnight
PAC	Proanthocyanidin
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion

pD	Porcine Dermis
PDGF	Platelet derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
pP	Porcines Perikard
RNA	Ribonucleic acid
RT	Reverse Transkriptase
Tab	Tabelle
TE	Tissue engineering
TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial cell growth factor
vWF	von Willebrand Faktor

## Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Herstellung der Sphäroide

**Abbildung 2:** HFF auf Biomaterialien für 24 h gefärbt mit Calcein-AM

**Abbildung 3:** Metabolische Aktivität der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten

**Abbildung 4:** Der Effekt der steigenden Konzentration von PAC auf die Lebensfähigkeit der Zellen nach 24 h

**Abbildung 5:** E-Selektin Färbung von Endothelzellen (HUVEC) auf den Prototyp-Biomaterialien

**Abbildung 6:** Darstellung des Zelladhäsionsmoleküls E-Selectin

**Abbildung 7:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HUVEC Zellen auf den Biomaterialien in Wells 5 Tage nach Zugabe der Zellen

**Abbildung 8:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HFF Zellen auf den Biomaterialien in Wells 5 Tage nach Zugabe der Zellen

**Abbildung 9:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MRC-5 Zellen auf den Biomaterialien in Wells 5 Tage nach Zugabe der Zellen

**Abbildung 10:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HaCaT Zellen auf den Biomaterialien in Wells 5 Tage nach Zugabe der Zellen

**Abbildung 11:** Fluoreszenz- und Phasenkontrast-Aufnahmen von aus HFF bestehenden Sphäroiden mit den Biomaterialien nach 6 h und 72 h

**Abbildung 12:** PCR Ergebnisse für die Genexpression von auf Biomaterialien wachsenden HUVEC

**Abbildung 13:** PCR Ergebnisse für die Genexpression von auf Biomaterialien wachsenden HaCaT

**Abbildung 14:** PCR Ergebnisse für die Genexpression von auf Biomaterialien wachsenden HFF

**Abbildung 15:** PCR Ergebnisse für die Genexpression von auf Biomaterialien wachsenden MRC-5

**Abbildung 16:** Aufnahmen einer Kokultur von HFF und HUVEC auf Zellkulturplastik und Prototyp-Biomaterial 2a zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe von Angiogenese induzierenden Substanzen

## Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** Die Zusammensetzung verschiedener Nährmedien

**Tabelle 2:** Die Prototyp-Biomaterialien

**Tabelle 3:** Liste der kommerziell erhältlichen und in den Untersuchungen verwendeten Kollagene

**Tabelle 4:** Die im Rahmen der Genexpressionsuntersuchung utilisierten Primers

**Tabelle 5:** Ergebnisse des Sterilitätstests

# 1. Einleitung

## 1.1 Tissue Engineering

Der Verlust von Gewebe oder ganzen Organen aufgrund von Trauma, Tumoren, Infektions- oder Erbkrankheiten ist eine der größten Herausforderungen für das medizinische Gesundheitssystem (Langer und Vacanti 1993). Wenn dieser Gewebsverlust zu groß ist, ist eine chirurgische Behandlung erforderlich. Diese beinhaltet Gewebstransplantation, von einem Individuum zu einem anderen (allogenes Transplantat), die Gewebeentnahme an einer gesunden Stelle des betroffenen Individuums (autologes Transplantat), oder künstlichen Ersatz wie Herzklappen oder synthetische Gefäßtransplantate. Diese Strategien wurden zwar in letzter Zeit drastisch entwickelt, sind aber mit Nachteilen verkoppelt wie Spendermangel, hohen Kosten und den Nebenwirkungen von Immunsuppression, welche bei Organtransplantation von Bedeutung ist, um eine Abstoßung des Gewebes zu verhindern (Ikada 2006; Lalan et al. 2001). Die Morbidität der Donorstelle verursacht durch die Gewebeentnahme und die Verfügbarkeit der Gewebe limitieren die autologe Transplantation. Die künstlichen Ersatzstoffe sind mit einer eingeschränkten Biokompatibilität verbunden, die zu Entzündungen an der Implantationsstelle, und einer begrenzten Kompensation der verlorenen Gewebefunktion führen kann (Lalan et al. 2001).

Um all diese Nachteile zu überwinden, wurde in den letzten Jahrzehnten ein neuer Ansatz zur Kompensation von verlorenem oder beschädigtem Gewebe entwickelt, der als „Tissue Engineering“ bezeichnet wurde. Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Feld, das die Prinzipien des Ingenieurwesens und der Biowissenschaften auf die Entwicklung biologischer Ersatzstoffe anwendet, die die Gewebefunktion oder ein ganzes Organ wiederherstellen, erhalten oder verbessern (Langer und Vacanti 1993). Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Strategien zur Wiederherstellung der Gewebefunktionen entwickelt, die kürzlich unter dem breiteren Feld der regenerativen Medizin zusammengefasst wurden (Hutmacher et al. 2007). Der zellbasierte Ansatz beruht auf der Anwendung von Zellen allein, die injiziert oder als Zellblätter angewendet werden können. Beispiele dafür sind Knochenmarkstransplantation und Stammzellinjektion. Der matrixbasierte Ansatz oder die geführte Geweberegeneration basiert auf Wachstumsfaktor freisetzenden



Matrizen, die implantiert werden, um die Regeneration des geschädigten oder gestörten Gewebes zu potenzieren und zu steuern. Eine Kombination von diesen Ansätzen um Gewebeverbindungen zu erzeugen, die dem ursprünglichen Gewebe ähnlich sind, repräsentiert allerdings die derzeit beliebteste Strategie (Vacanti und Langer 1999). Das ultimative Ziel dieser Tissue Engineering-Strategie ist es, unabhängig von Organ- oder Gewebeentnahme und der Verwendung künstlicher Geräte zu werden, indem Gewebe entworfen und konstruiert werden, die den spezifischen Anforderungen und Bedürfnissen jedes einzelnen Patienten entsprechen (Vacanti und Langer 1999). Um dieses Ziel zu erreichen, werden Zellen, die spezifisch für das zu restaurierende Gewebe sind, oder geeignete Vorläuferzellen, die das Potenzial haben, sich von diesem Zelltyp zu unterscheiden, mit minimalem Trauma (z. B. aus Blutproben oder Knochenmarkaspiration) aus dem Patienten isoliert und *ex-vivo* durch Zellkulturtechniken expandiert und auf konstruierten Gerüsten (Scaffolds) ausgesät, die der extrazellulären Matrix des Zielgewebes ähneln (Hutmacher et al. 2007). Das Gerüst besteht typischerweise aus Komponenten mit ähnlichen Eigenschaften wie die gewebespezifische extrazelluläre Matrix, ermöglicht eine strukturelle Unterstützung, wodurch eine vorübergehende dreidimensionale Migration und Differenzierung der Zellen ermöglicht wird - und wird idealerweise mit der gleichen Geschwindigkeit abgebaut, mit der die migrierten Zellen erzeugt werden (Chan und Leong 2008). Wachstumsfaktoren sind ebenfalls in Tissue Engineering immer essenzieller geworden. Wachstumsfaktoren sind Proteine oder Polypeptide, die von Zellen sekretiert werden und an extrazelluläre oder intrazelluläre Rezeptoren binden, um die Proliferation, Migration und Differenzierung der sekretierenden Zellen (autokrin) oder benachbarter Zellen (parakrin) zu regulieren (Heinrich et al. 2014). Es wurden mehrere Wachstumsfaktoren identifiziert, die für die Entwicklung spezifischer Gewebe wichtig sind. Die Einbeziehung dieser Wachstumsfaktoren in die Gerüstmatrix zur kontrollierten Freisetzung ist ein vielversprechender Ansatz zur weiteren Verbesserung des Tissue Engineering-Prozesses. Ebenso wichtig ist die Funktionalisierung der Gerüste mit im menschlichen Körper und/oder natürlich vorkommenden Verbindungen, was im Folgenden dargestellt wird. Daher stellen Gerüste, Zellen und Wachstumsfaktoren bis heute die drei Grundkomponenten der meisten Tissue Engineering-Ansätze dar (Ikada 2006).

## 1.2 Tissue Engineering und Wundheilung

Die Haut ist das größte Organ des Körpers und hat eine Reihe von Funktionen; Schutz vor äußeren Einflüssen, Regulierung des Wärmehaushalts, Speichern von Wasser, Fett und Salzen, Beteiligung an der körpereigenen Vitamin-D-Synthese und Auscheidorgan. Hautkompartimente, Epidermis und Haarfollikel beherbergen Stammzellen, die für die Homöostase und Regeneration der Haut unverzichtbar sind. Diese Stammzellen tragen auch zur Wundheilung bei, die eine hoch organisierte und koordinierte Reihe von Prozessen ist, die zur Wiederherstellung der Gewebeintegrität und der Funktion von geschädigtem Gewebe führen. Das Ineinandergreifen von Entzündung, Regeneration und Reparatur wird durch die Wundheilung an der Haut veranschaulicht. Die exsudative Phase zeichnet sich durch die akute fibrinöse Entzündungsreaktion aus, die resorptive und reparative Phase ähneln der chronisch-granulierenden Entzündung. Allerdings wird klinisch bei normaler Wundheilung nicht von einer Entzündung gesprochen. Grundsätzlich wird zwischen der Wundheilung per primam intentionem (PP-Heilung) und der Heilung per secundam intentionem (PS-Heilung) unterschieden. Bei PP-Heilung handelt es sich um eine unkomplizierte Wundheilung, wobei die Wundränder gut aneinander liegen, suffizient durchblutet sind und keimarme Wundverhältnisse vorhanden sind. Während die PS-Heilung bei größeren Gewebsdefekten, Nekrosen und /oder Wundinfektion in Gang gesetzt wird.

Erfolgreiche Wundheilungsprozesse führen häufig zu nicht heilenden Wunden. Chronische Wunden werden durch die Erschöpfung von Stammzellen und eine Vielzahl anderer zellulärer und molekularer Mechanismen verursacht, z.B. venöse oder arterielle Insuffizienz, Diabetes, Nierenerkrankung, Trauma, fortgeschrittenes Alter, Fremdkörper, Störung der Regulation des Entzündungsprozesses und /oder beeinträchtigter Ernährungs- oder Immunstatus (Ojeh et al. 2015).

## 1.3 NPWT

Eine verzögerte Wundheilung insbesondere bei schwierigen Wunden und bei älteren Menschen mit Begleiterkrankungen ist ein großes Problem. Es führt zu Schmerzen, Morbidität, verlängerter Behandlung und erfordert große rekonstruktive Operationen, die eine enorme soziale und finanzielle Belastung darstellen. Die negative pressure

wound therapy (NPWT) ist eine Alternative der Wundversorgung, die den Unterdruck nutzt, um die Wunde für die Spontanheilung oder durch weniger rekonstruktive Optionen vorzubereiten. Die Methode der NPWT-Anwendung umfasst ein gründliches Debridement, eine ausreichende Blutstillung und das Anlegen eines sterilen Schaumverbands. Ein gefensterter Schlauch wird in den Schaumstoff eingebettet und die Wunde mit Klebeband luftdicht verschlossen. Der Fensterschlauch ist an eine Vakuumpumpe mit Flüssigkeitssammelbehälter angeschlossen. Die Maschine liefert kontinuierliche oder intermittierende Absaugung im Bereich von 50 bis 125 mmHg. Die NPWT-Verbände werden am 3. Tag gewechselt. Die Unterdrucktherapie stabilisiert das Wundmilieu, reduziert die Wundödeme somit die bakterielle Belastung, verbessert die Gewebedurchblutung und stimuliert Granulationsgewebe und Angiogenese. All dies verbessert die Möglichkeit des primären Wundverschlusses und reduziert den Bedarf an plastischen Eingriffen. Die NPWT-Therapie scheint im Hinblick auf die Verringerung des Wundvolumens, der Wundtiefe, der Behandlungsdauer und der Kosten einfacher und effektiver als herkömmliche Wundauflagen für die Behandlung schwieriger Wunden zu sein (Agarwal et al. 2019).

Ein Funktionstest wurde durch das Projektpartner durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die in dieser Arbeit untersuchten Prototyp- Biomaterialien: die Kollagenvliese und Deckmembrane NPWT-geeignet sind. Essenzielle Eigenschaften dabei waren die Porosität, Zugfestigkeit und Beständigkeit der Prototypen.

Im Rahmen der NPWT ist die Porosität dieser Prototyp-Biomaterialien unabdingbar, da das Abtransport von Wundsekret dabei sehr entscheidend ist. Außerdem sollten sie so biodegradierbar sein, dass der Verbandswechsel nicht zwingend notwendig ist und somit die Zerstörung der neu gebildeten Gewebe verhindert ist. In dieser Hinsicht sollten die Kollagenvliese ebenfalls die Zellmigration und die Vaskularisierung durch die offenporige Struktur ermöglichen.

## 1.4 Angiogenese

Die Induktion von De-novo-Blutgefäßen ist entscheidend, um eine erfolgreiche Zellmigration und Proliferation auf den verschiedenen Biomaterial-Gerüsten zu erzielen. Angiogenese wird als grundlegendes Verfahren bei der Regeneration und Wiederherstellung verschiedener Gewebe angepriesen. Während der Wundheilung dringen angiogene Kapillarsprossen in das Fibrin/Fibronektin-reiche Wundgerinnsel

ein und organisieren sich innerhalb weniger Tage zu einem mikrovaskulären Netzwerk im gesamten Granulationsgewebe. Zwischen Endothelzellen, angiogenetischen Zytokinen, wie FGF, VEGF, TGF-beta, Angiopoietin und Mastzelltryptase, und der Umgebung der extrazellulären Matrix (ECM) tritt eine dynamische Interaktion auf.

Spezifische Endothelzellen-ECM-Rezeptoren sind entscheidend für diese morphogenetischen Veränderungen in Blutgefäßen während der Wundheilung. Einige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Wund-ECM die Angiogenese teilweise durch Modulation der Integrin-Rezeptor-Expression regulieren kann (Tonnesen et al. 2000; Koivisto et al. 2014). Die Wundangiogenese scheint auch durch die Interaktion von Endothelzellen mit der spezifischen dreidimensionalen ECM-Umgebung im Wundraum reguliert zu werden. Das Verständnis der molekularen Mechanismen, die die Wundangiogenese regulieren, insbesondere wie ECM den Bedarf an ECM-Rezeptoren und angiogenetischen Faktoren moduliert, könnte neue Ansätze für die Behandlung chronischer Wunden bieten (Tonnesen et al. 2000).

Ein äußerst potenter pro-angiogener Faktor ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), der eine mitogene und anti-apoptotische Wirkung auf Endothelzellen hat, die vaskuläre Permeabilität erhöht und die Zellmigration fördert (Melincovici et al. 2018). Aufgrund dieser Wirkungen trägt es aktiv zur Regulierung der normalen und pathologischen angiogenetischen Prozesse bei. Beim Menschen besteht die VEGF-Familie aus mehreren Mitgliedern, wie z.B. VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, die an Tyrosinkinase-Zellrezeptoren (VEGFRs) binden: VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3. Sowohl VEGF als auch VEGFRs werden nicht nur auf Endothelzellen, sondern auch auf Nicht-Endothelzellen exprimiert. Während VEGFR-1 und VEGFR-2 überwiegend auf vaskulären Endothelzellen exprimiert werden, wird VEGFR-3 insbesondere auf lymphatischen Endothelzellen exprimiert. VEGFR-2 hat die stärkste pro-angiogenetische Aktivität und eine höhere Tyrosinkinase-Aktivität als VEGFR-1 (Melincovici et al. 2018).

## 1.5 Proanthocyanidine und die Angiogenese

Proanthocyanidine sind natürlich vorkommende polyphenolische Verbindungen, die sich in der chemischen Struktur, pharmakologischen Wirkung und Eigenschaften unterscheiden und in Früchten, Gemüse, Nüssen u.v.a. weit verbreitet sind. PACs

gehören zu einer größeren Klasse von reichlich vorhandenen, pflanzlichen Verbindungen, Flavonoiden, die vor allem aufgrund ihrer signifikanten antioxidativen Aktivität und Fängerkapazitäten für freie Radikale zahlreiche wertvolle gesundheitliche Wirkungen haben. Traubenkerne sind eine reichliche Quelle für Proanthocyanidin (PACs) (Shejawal et al. 2020). Beeren sind reich an Proanthocyanidin, Flavonoidglykosiden, die für die rote, violette und blaue Farbe der Früchte verantwortlich sind. Es hat sich gezeigt, dass die Aufnahme von PAC über die Nahrung den allgemeinen antioxidativen Abwehrstatus verbessert (Shejawal et al. 2020). Zudem wurden die die vaskuläre endotheliale Funktion modulierenden Eigenschaften von Proanthocyanidin-reiche-Nahrung untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass PAC morphologische Veränderungen in Endothelzellen mit Reorganisation des Aktinzytoskeletts sowie Veränderung der Tyrosinkinase-Signalisierung auslöste. Dies war eine wichtige Beobachtung, da laminare Strömung eine wichtige schützende Rolle im Gefäßsystem spielt, indem sie einen gesunden endothelialen Phänotyp induziert, der durch Resistenz gegen Atherombildung gekennzeichnet ist, die Vasodilatation fördert und einen antithrombotischen Zustand verleiht (Caton et al. 2010).

Die Inkorporation von PAC in den untersuchten Prototyp-Biomaterialien sollte zu den genannten Vorteilen einen positiven Einfluss auf den essenziellen Faktor, die Angiogenese, haben. Esposito et al. (2019) zeigte, dass PAC die Produktion von VEGF erhöhte, der die frühe Angiogenese bei der Einleitung der Wundheilung stimuliert.

Die Angiogenese könnte auch pathologisch sein, wie bei der Tumorgenese der Fall ist. Bewundernswert sind die starken chemopräventiven Eigenschaften von GSPE (grape seed proanthocyanidin extract), was durch die anti-angiogenetische Eigenschaft erzielt wurde.

Roy et al. (2002) zeigte, dass GSPE die  $H_2O_2$  sowie  $TNF\alpha$  induzierte VEGF-Expression durch die humanen Keratinozyten inhibiert. Huang et al. (2012) stellte die Hypothese auf, dass GSPEs mehrere Signalwege modulieren, um anti-angiogenetische Wirkungen zu zeigen, unter anderem die Herunterregulierung sowohl des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors als auch des Angiopoietin-Signalwegs.

## 1.6 Cocultures

Bildung und Erhaltung der reifen Epidermis, die aus basalen, stacheligen, granulären und verhornten Schichten besteht, beruhen auf einem kontinuierlichen Prozess der Zellproliferation und der terminalen Differenzierung. Ein genaues Verständnis dieser komplexen Konstruktion mit stark vaskularisiertem dynamischem System des Hautgewebes bzw. der komplexen Abhängigkeiten zwischen verschiedenen Zellen und Zelltypen würde weitere Einblicke in die stark regulierten Prozesse während der Wundheilung, nämlich die Angiogenese, ermöglichen, um ein Konstrukt für Implantatzwecke im Skin Tissue Engineering zu entwickeln. Aus diesem Hintergrund sind in dieser Studie Co-Kulturen bestehend aus primären Fibroblasten und Endothelzellen zum Einsatz gekommen, um die in-vivo-Situation nachzuahmen, und die Rolle bestimmter Wachstumsfaktoren, besonders VEGF, während der Angiogenese zu untersuchen, ihre Expression in dieser Co-Kulturen zu beobachten und nach bestimmter Zeit Kultivierung zu vergleichen.

Battiston et al. (2014) zeigte, dass die Co-Kultur Systemen zur Stimulierung einer gewünschten biologischen Reaktion, basierend auf das Cross-Talk zwischen den unterschiedlichen Zelltypen, utlisiert werden. Solche Reaktionen sind beispielsweise die Angiogenese, die Regeneration von verschiedenen Geweben wie die Haut, Muskeln, Knochen, Knorpel. Dementsprechend wurden verschiedene Co-Kulturen angewendet, um diese biologischen Reaktionen zu untersuchen. Daher ist es wichtig, dass Biomaterialien als ein integrales Element bei der experimentellen Gestaltung von Co-Kultur Systemen betrachtet werden, anstatt sich ausschließlich auf die biochemischen Reaktionen der Zellkomponenten zu konzentrieren. Vor diesem Hintergrund sind die Studien, die Co-Kulturen utlisieren, hilfreich, um die Biokompatibilität und Verwendung eines bestimmten Biomaterials für ein bestimmtes Zielorgan zu untersuchen.

## 2. Ziel der Arbeit

Gesamtziel des Projektes war die Entwicklung eines neuartigen Wundheilungssystems auf Kollagenbasis, welches zur Kombination mit der Unterdruck-Wundtherapie (negative pressure wound therapy, NPWT) geeignet ist und erstmalig eine Versorgung chronischer Wunden ohne zusätzliches inflammatorisches Potenzial ermöglicht. Dabei sollte das Kollagen-Scaffold die

Zellmigration und die Angiogenese durch eine offenporige Struktur unterstützen und den Wundheilungsprozess einleiten.

Die Behandlung schwer heilbarer Wunden ist eine Herausforderung für Chirurgen, und das anschließende medizinische Management kann anspruchsvoll sein. Der Mangel an einer geeigneten Menge an intakter Haut oder Hautzellen ist ein Hauptproblem für solche Patienten. Selbst wenn autologe Hautzellen verfügbar sind, gibt es Schwierigkeiten, die Zellen als kontinuierliche Schicht herzustellen, die direkt auf die Wunde aufgebracht werden könnte (Lesiak et al. 2019). Vor diesem Hintergrund war das Bestreben, Ansätze zu entwickeln, die Heilung chronischer Wunden unterstützen, immens. Unser Projektpartner hatte zu diesem Zweck Kollagenvliese und transparente Deckmembrane entwickelt, die gleichzeitig ausreichende Standzeit und gute Biokompatibilität zeigen sollten, sowie in Kombination mit der Unterdruck-Wundtherapie ohne zusätzliches inflammatorisches Potenzial einsetzbar sind. Da diese Biomaterialien kollagenbasiert sind, sollte die Fremdkörperreaktion reduziert sein. Neben Kollagen enthalten diese Biomaterialien Glykosaminoglykane (GAGs) und Quervernetzer. GAGs sind hochmolekulare Polysaccharide, die entweder kovalent an Proteine gebunden vorkommen und Proteoglykane bilden, oder frei in der extrazellulären Matrix (ECM) vorkommen. Die Gruppe der GAGs besteht aus 6 Mitgliedern, nämlich Heparin, Heparansulfat, Keratansulfat, Dermatansulfat, Chondroitinsulfat und dem einzigen unsulfatierten GAG, Hyaluronsäure. Diese unterscheiden sich in der chemischen Zusammensetzung, Struktur und Funktion (Chakrabarti und Park 1980; Shejawal et al. 2020). Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat stellen in Bezug auf die Masse den größten Anteil der im menschlichen Körper vorkommenden GAGs dar (Schuurmans et al. 2021). Alle GAGs, außer Hyaluronsäure, sind kovalent an Proteine in sogenannten Proteoglykanen gebunden. Diese Proteoglykane werden in fast allen Zellen produziert und in der ECM sezerniert oder in Plasmamembranen eingebaut. Proteoglykane interagieren mit anderen ECM-Komponenten, um hydratisierte gelartige Strukturen zu bilden, die es dem Gewebe ermöglichen, Druckkräften zu widerstehen. Eine gut untersuchte Proteoglykanfamilie sind die Aggrecan-ähnlichen Proteoglykane, die die Hauptquellen für Chondroitinsulfat im Körper sind (Schuurmans et al. 2021).

Hyaluronsäure liegt als lösliches Polymer in der ECM vor, mit den höchsten Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit und im Glaskörper des Auges. Sie spielt



eine wichtige Rolle in allen Phasen der Wundheilung und besitzt die Fähigkeit große Volumen an Flüssigkeit zu binden (Litwiniuk et al. 2016). Deshalb hat sie im Körper oft hydrierende, schmierende und füllende Funktionen (Schuurmans et al. 2021; Gupta et al. 2019; Laurent et al. 1996; Chakrabarti und Park 1980). Es wurde berichtet, dass es Molekulargewichte von Millionen Dalton erreicht, was sich in den physikalisch-chemischen Eigenschaften von HA-Lösungen wie hoher Viskosität und Viskoelastizität widerspiegelt (Schuurmans et al. 2021). Diese Eigenschaften sind wiederum wichtig, um die Lasten bei Gelenkbewegungen zu verteilen und den Knorpel zu schützen. Diese Eigenschaften machen HA zu einer vielversprechenden Funktionalisierung im Rahmen der NPWT. HA könnte nicht nur die Wundheilung anregen, sondern auch für die verbesserte Absorption von Wundexsudat und die Hydrierung des Wundbettes sorgen.

CS besitzt neben den strukturellen Aufgaben als Teil der ECM auch regulierende und antiinflammatorische Wirkungen (Iovu et al. 2008). Aufgrund der ubiquitären Natur von Chondroitinsulfat und Hyaluronsäure im menschlichen Körper und ihrer weit verbreiteten klinischen Verwendung haben Derivate dieser Polysaccharide, die Hydrogele bilden können, ein hohes Potenzial zur Verwendung als Gerüste im Tissue Engineering. Dementsprechend eröffnet die Inkorporation von GAGs in den Biomaterialien neue Wege bezüglich der Biokompatibilität und der Verbesserung der Zell-adhäsion und -migration (Freundenberg et al. 2016; Schuurmans et al. 2021). Von den GAGs wurden die Hyaluronsäure (HA) und das Chondroitinsulfat (CS) zur Funktionalisierung der in dieser Arbeit untersuchten Biomaterialien erprobt. Durch die Quervernetzungstechnologie sollten einerseits die GAGs in den Prototyp-Biomaterialien verankert werden, andererseits wird die Beständigkeit und somit der Standzeit der Kollagenvliese verbessert. Als Quervernetzer ist das Proanthocyanidine (PAC) zum Einsatz gekommen.

Diese Arbeit sollte durch die Anwendung von Proliferations- und toxikologischen Assays sowie Migrations-/Invasionsassays mit gesunden humanen Zellen der drei Zelltypen der menschlichen Haut (aus dieser isoliert) - Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen - der Evaluierung und Identifizierung von den Prototyp-Biomaterialien für die optimale Regeneration hautähnlicher Gewebe dienen. Die Kriterien für einen optimalen Prototyp für Hautregeneration sind die Entstehung einer



räumlichen Zellverteilung und die Demonstration normaler Zell-Phänotypen wie in gesundem Gewebe.

Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Toxizität, Zellkompatibilität, Adhäsion, Proliferation, Lebensdauer der Zellen, Migration und Invasion von Kollagen-Biomaterialien, die vom Projektpartner hergestellt wurden, in der Interaktion mit Zellen der menschlichen Haut, d.h. humanen Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Hierfür wurden Zelllinien sowohl als primäre Zellen verschiedenen Ursprungsgewebes in Zellkultur herangezogen und anschließend auf den Biomaterialien ausgesät, um unter den gleichen Bedingungen wie zuvor in der Zellkultur *in vitro* wachsen zu können. Darüber hinaus wurden die Herausbildung und Penetration von mikropillar-ähnlichen Strukturen durch Endothelzellen in 3D-Kollagen-Biomaterialien unter Angiogenese-stimulierenden Bedingungen sowie die Genregulation und die Differenzierung von Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen auf den entsprechenden Materialien untersucht und evaluiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten wertvolle Aufschlüsse über die Eignung der getesteten kollagenbasierten Biomaterialien für die Anwendung bei chronischen Wunden und für eine rasche Haut-Geweberegeneration liefern.

## 3. Materialien

### 3.1 Zelllinien

#### 3.1.1 L929

Die L929 Fibroblasten-Zelllinie wurde aus areolarem Bindegewebe und Fettgewebe der 100 Tage alten männlichen Hausmäuse isoliert, und kann bei den Toxizitätstests, als Zielstruktur bei TNF Erkennungstest und in der Entwicklung der neuen Tumor Therapien verwendet werden. (Sawai 2016; German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details 2020). Diese Zelllinie wurde von ATCC CCL-1 LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland, bereitgestellt (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details 2020). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen T25 unter Verwendung des in 3.2 unten gezeigten Mediums: DMEM + 10 % FCS + 1 % (100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) + 1 % Glutamax I, kultiviert.

### 3.1.2 MRC-5

MRC-5 ist eine Zelllinie, die aus dem Lungengewebe 14 Wochen alt kaukasischer Föten stammen. (Coriell Institute 2020), können ebenfalls bei den Toxizitätstests angewendet, gegenwärtig finden sie in Impfstoffentwicklung einschließlich gegen HAV, VZV und Poliovirus auch einen Gebrauch (Jacobs 1976; Jacobs et al. 1970). Ebenso wurden diese Zellen in Zellkulturflaschen T25 unter Verwendung des in 3.2 unten gezeigten Mediums: DMEM + 10 % FCS + 1 % (100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) + 1 % Glutamax I, kultiviert.

### 3.1.3 HaCaT

HaCaT sind eine spontan transformierte unsterbliche Keratinozyten-Zelllinie aus adulter menschlicher Haut (Boukamp et al. 1988). Sie werden aufgrund ihrer hohen Kapazität zur Differenzierung und Proliferation in vitro verwendet um das Wachstum und die Differenzierung der Keratinozyten zu untersuchen, im pharmakotoxikologischen Bereich finden sie auch Gebrauch (Schürer et al. 1993; Schoop et al. 1999). Auch diese Zellen wurden in Zellkulturflaschen T25 unter Verwendung des in 3.2 unten gezeigten Mediums: DMEM + 10 % FCS + 1 % (100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) + 1 % Glutamax I, kultiviert.

### 3.1.4 HFF

HFF sind Primärzellen und repräsentieren Fibroblasten, die aus gesunder juveniler Vorhaut isoliert wurden. Die HFF-Zellen wurden enzymatisch mit den HDMEC-Zellen gewonnen. Diese Mischkultur, die sowohl HDMEC als auch HFF enthielt, wurde mit magnetisch markierten Antikörpern, die nur HDMECs binden, bis zur Konfluenz inkubiert. Durch eine sogenannte biomagnetische Trennung wurden die HFF- von HDMEC-Zellen getrennt. Die HFF wurden als negative Fraktion erhalten. Die gesamte Zellsuspension wurde in eine Röhre gegeben und ein Magnet wurde an der Seite der Röhre angebracht. Zellen, an die der Antikörper gebunden ist, d.h. die HDMECs wurden dann an die Glaswand gebunden und das Medium konnte entfernt werden. Dieses Medium enthielt die HFF, da der Antikörper nicht an sie gebunden hat, und wurde dann in eine Zellkulturflasche T25 mit dem DMEM Medium + 10 % FCS + 1% (100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) +1 % Glutamax I gegeben. Sollten einige HDMECs vorhanden sein, sterben sie bald ab, da ihnen bestimmte

Nährstoffe und Kofaktoren fehlen, die nicht im HFF-Medium enthalten sind (Grützner et al. 2015).

### 3.1.5 HUVEC

HUVEC sind Primärzellen, die aus der Nabelschnur gewonnen werden. HUVEC sind die meistbenutzten Endothelzellen für in vitro Versuche und werden vor allem als Modell-System zur Überprüfung der Angiogenese genutzt. HUVEC wurden von frisch resezierten humanen Nabelschnuren isoliert, gemäß einer gut etablierten Methode (Jaffe et al. 1973).

In einem mit Puffer gefülltes Gefäß, bestehend aus 900 ml destilliertem Wasser, 100 ml 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) (10 X), 1 % Pen/Strep, 1 % Ciprofloxacin und 1 % Amphotericin B wurden die Nabelschnüren nach der Entnahme bei 4 °C gelagert. Ein Drainageröhrchen in beide Enden der Vena umbilicalis, um sie mit dem HEPES Puffer spülen zu können, wurden geführt, nachdem die Druckstellen der Klammer mit Skalpell reseziert wurden. Während ein Drainageröhrchen an einem Ende verschlossen war, wurden 10 ml 0,2 % Kollagenase, verdünnt mit dem HEPES Puffer, in die Vene injiziert. Die Nabelschnüren wurden für 15-20 Min bei 37 °C inkubiert, dann massiert. Die Endothelzellen enthaltende Kollagenaselösung wird mittels Puffer herausgewaschen. In ein Zentrifugenröhrchen wurde diese Zellsuspension mit 10 ml M 199 und 20 % FCS übertragen. Es wurde dann für fünf Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überschusses konnten die verbliebenen Zellen mit 5 ml M 199 inklusive 20 % FCS, 1 % Glutamax, 1% (100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) und 10 µl/ml ECGS/Na-Heparin resuspendiert und in ein gelatinebedecktes Zellkulturflasche der Größe 25 cm<sup>2</sup> ausgesät werden. Die Zellen wurden dann bei 37 °C und einem Luftgasgemisch von 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % O<sub>2</sub> inkubiert. Die Subkultivierung erfolgte immer nach mikroskopischer Untersuchung (siehe 4.1). Die HUVEC Zellen wurden nur bis zur Passage 4 genutzt.

### 3.1.6 ISO-HAS-1

ISO-HAS-1 repräsentieren eine humane aus Hämangiosarkomgewebe eines 84-jährigen japanischen Mannes stammende Endothelzelllinie (Masuzawa et al. 1999). Verglichen mit den primären Endothelzellen exprimiert diese Zelllinie die zellulären Adhäsionsmoleküle ähnlich wie die primären mit dem Unterschied, dass die

Expression der Zytokine konstitutiv stattfindet mit Ausnahme von IL-8 und nicht durch LPS reguliert wird. Die CD31, eine Thrombozyten-Endothelzellen Adhäsionsmolekül, wird von ISO-HAS heterogen exprimiert. Die Klonierung von den CD31 exprimierenden ISO-HAS Zellen führte zur Gewinnung der ISO-HAS-1 Zelllinie Aufgrund der reproduzierbaren, gleichmäßigen Anfärbbarkeit von vWF wurde die Zelllinie ISO-HAS-1 verwendet (Unger et al. 2002). Diese Zellen wurden in Zellkulturflaschen T25 unter Verwendung des in 3.2 unten gezeigten Mediums: RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % (100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) + 1 % Glutamax I. kultiviert.

## 3.2 Zellkultur Nährmedien

### 3.2.1 Inhaltstoffe

DMEM Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, D5671
ECGS	Becton-Dickinson
FCS	Sigma-Aldrich, St. Louis
GlutaMax™-1 (100X)	Gibco, Carlsbad
M199 Medium, HEPES Modifikation	Sigma-Aldrich, St. Louis, M7528
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Carlsbad, 15140122
RPMI 1640	Gibco, Carlsbad

### 3.2.2 Zellkulturmedium

Tabelle 1: Die Zusammensetzung der für die verschiedenen Zelltypen eingesetzten Mediums

Zellen	Zusammensetzung des Mediums
<b>HUVEC</b>	M199 + 20 % FCS + 1 % (100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) + 1 % Glutamax I + 10 µl/ml ECGS/Na-Heparin (1:1000)
<b>ISO-HAS-1</b>	RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % (100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) + 1 % Glutamax I

<b>MRC-5, L929, HaCaT und HFF</b>	DMEM + 10 % FCS + 1 % (100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) + 1 % Glutamax I
-----------------------------------	---

### 3.3 Biomaterialien

Die untersuchten Prototyp-Biomaterialien: poröse Kollagenvliese und transparente Deckmembranen haben wir steril verpackt vom Projektpartner erhalten. Die Kollagenvliese haben als Ursprungsgewebe porcine Dermis und unterscheiden sich grundsätzlich durch die Zusatzstoffe und dessen Verhältnis zum Basismaterial Kollagen. Diese Zusatzstoffe sind Glykosaminoglykane (GAGs): Hyaluronsäure (HA) und Chondroitinsulfat (CS), und als Quervernetzer Proanthocyanidine (PAC). Die Tabelle 2 zeigt die untersuchten Kollagenvliese:

Tabelle 2: Die untersuchten Prototyp-Biomaterialien mit Information über die verwendeten GAGs, Quervernetzer und das Sterilisationsverfahren

Vliesvariante	GAG	Vernetzung	Massenverhältnis	Anzahl verschickt
<b>1</b>	-	-	-	2
<b>2a</b>	HA	-	KOL:HA = 4:1	2
<b>2b</b>	CS	-	KOL:CS = 4:1	2
<b>3a.1</b>	-	PAC	KOL:PAC = 1:1	2
<b>3a.2</b>	-	PAC	KOL:PAC = 2:1	2

Materialien
<b>5 cm x 5 cm x 1 cm Kollagenvliese mit GAGs oder Vernetzung</b>
<b>ETO-sterilisiert</b>
<b>Steril verpackt</b>

Die transparenten Deckmembranen haben als Ursprungsgewebe porcine Dermis und porcines Perikard. Tabelle 3 zeigt die zusätzlich als Vergleich untersuchten Biomaterialien: ein kommerziell erhältliches Kollagenvlies von Rogg und die beiden vom Projektpartner entwickelten Prototypen für die transparente Deckmembran.

Tabelle 3: Liste der kommerziell erhältlichen und in den Untersuchungen verwendeten Kollagene

Probe	Art	Beschreibung	Größe	Menge	Steril
<b>pP</b>	Transparente Deckmembran	Porcines Perikard	80 x 100 mm <sup>2</sup>	1	ja
<b>pD</b>	Transparente Deckmembran	Porcine Dermis	20 x 30 mm <sup>2</sup>	4	ja
<b>Rogg</b>	Kollagenvlies	Rogg BioKollagen Wundauflage	45 x 110 mm <sup>2</sup>	4	ja

### 3.4 Primers

Tabelle 4: Die im Rahmen der Genexpressionsuntersuchung utilisierten Primers

Gene	Größe (bp)	Annealing- Temperatur (°C)	Sequenz
<b>Aktin</b>	574	63	5'- GACCTGACTGACTACCTCATGA -3' 5'- AGCATTTGCGGTGGACGATGGAG - 3'
<b>Kollagen Typ I</b>	121	60	5' - ATGAGAGCCCTCACACTCCTC - 3' 5' - CTAGACCGGGCCGTAGAAGCG - 3'
<b>CK10</b>	221	60	5' - GGTGGGAGTTATGGAGGCAG - 3' 5' - TCCAGAGCCCGAACTTTGTC - 3'
<b>CK14</b>	116	60	5' - TCATGGATGTGCACGATGGC - 3' 5' - GATCTGTGTCCACACGGGG - 3'
<b>E-Selectin</b>	258	62	5' - TACACTTGCAAGTGTGACCC - 3' 5' - TGTCACAGCATCACACTCAACC - 3'
<b>Filaggrin</b>	243	60	5' - TGAGGGCACTGAAAGGCAAA - 3' 5' - TGGCCACATAAACCTGGGTC - 3'
<b>Involucrin</b>	248	60	5' - AACCCCAATGACCCCAATCC - 3' 5' - CCTCCTTTGAGAATGGGCCG - 3'
<b>Loricrin</b>	248	60	5' - GCCGTCCAAATAGATCCCCC - 3' 5' - GCAAACCTCGGGTAGCATCA - 3'

<b>PECAM</b>	240	58	5' - CAACAGACATGGCAACAAGG - 3' 5' - TTCTGGATGGTGAAGTTGGC - 3'
<b>VEGF</b>	123	57	5' - CTTGCCTTGCTGCTCTACCT - 3' 5' - GCAGTAGCTGCGCTGATAGA - 3'
<b>vWF</b>	308	57	5' - GATCCTAGTGGGGAATAAGG - 3' 5' - TGGTGAGGTCATTGTTCTGG - 3'

### 3.5 Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Appliedbiosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, 4368813
RedTaq, ReadyMix, PCR-Reaktionsmischung	Sigma-Aldrich, St. Louis R2648-20RXN

### 3.6 Chemikalien und Antikörper

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
1 kb DNA ladder	New England BioLabs, Frankfurt/Main, N3232L
100 bp DNA Ladder	New England BioLabs
Alexa Fluor, goat anti mouse IgG 488	Invitrogen, Molecular Probes, A11008
BSA (Bovine serum albumine)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Calcein AM 1 mg/ml	Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad
Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis, C2432
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Ethanol absolute	Honeywell, Charlotte 32205
Fibronectin 1 µg/ml	Roche, Carlsbad, 11051407001
Gelatin	Sigma-Aldrich
HBSS (Hanks balanced salt solution)	Gibco, life technologies, Carlsbad 14060-040

Isopropanol ≥ 99 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, I9516
LPS	Sigma and Lonza (E. coli O111:B4,L2630)
Mouse anti E-Selectin CD62-E	Monosan, Uden, 6010
Paraffin	
PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)	Sigma-Aldrich, St. Louis D8537
PECAM (CD31) Monoclonal Mouse Anti Human IgG	Agilent DAKO, Santa Clara, M0823
peqGREEN 20000 X DNA/RNA Dye	vwr, Darmstadt 37-5010
PFA 3,7 % (Paraformaldehyd)	Merck, Darmstadt
Prolong Gold	ThermoFischer, DE
Resazurin Sodium Salt	Sigma-Aldrich, St. Louis, R7017-1G
	Thermo scientific, Thermo
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/μl)	Fisher Scientific, Waltham, EO0382
TBE buffer (Tris-Borat-EDTA)	Gibco, Carlsbad
TRI Reagent Solution, RNA Isolation Reagent	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham AM9738
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, T8787
Trypan Blue Solution 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, T8154
Trypsin-EDTA 1x	Gibco Thermo Fisher Scientific, Waltham
UltraPure Agarose	Invitrogen, life technologies, Carlsbad, 16500-500

### 3.7 Zellkulturmaterialien

#### Material

EasyLoad (Pipettenspitzensatz)  
Falcon Zentrifugenröhrchen, 15 ml, 50 ml  
Kammerobjektträger-System mit 8 Kammern,  
Lab-Tek II

#### Hersteller

Greiner bio-one, Solingen  
Sigma-Aldrich  
Sigma-Aldrich, St. Louis,  
120125LE1207



Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
MultiFit Guard 3 Filter Tips	Sorensen, 17370
Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Solingen
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Greiner bio-one, Solingen
Stripette, Pipettensatz	Costar
Zellkulturplatte mit 96 Kammern, CellStar	Greiner bio-one, Solingen 655180, 655101
Zellkulturplatte mit 48 Kammern, CellStar	Greiner bio-one, Solingen 677180
Zellkulturflaschen T25: 25 cm <sup>2</sup> , T75: 75 cm <sup>2</sup>	TPP, Trasadingen

### 3.8 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose Gel Electrophoresis Systems "Sub-Cell GT"	Bio Rad, München
Brutschrank, CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus Instruments, Hanau
Electrophoresis power supply "PHERO- stab. 500"	Biotec Fischer
Fluoreszenz-Mikroskop HS, Biorevo, HS9000E	KEYENCE, Neu-Isenburg
Inkubator "CO <sub>2</sub> -Auto Zero"	Heraeus Instruments
Inverses Mikroskop	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
Konfokalmikroskop, DM RE	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
Kühlschrank 4 °C	Bosch, München
Laptop	Asus
Mikrowellen	Bosch
Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Pipetman	Gilson
Plattenreader, Spark 10M	Tecan
Sicherheitswerkbank "Heraeus safe"	Heraeus Instruments, Hanau
Spectrophotometer "Nanodrop 2000"	Thermo Scientific, Wilmington
Thermocycler "Gene Amp PCR System 9700"	Applied Biosystems, Foster
Vortexer	Fisherlabs

Waage LC42  
Zentrifuge 5427R

Sartorius, Göttingen  
Eppendorf AG, Hamburg

## 4. Methoden

### 4.1 Zellkultivierung

Zellkulturarbeiten wurden immer steril im Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in adhärenenten Zellkulturflaschen der Größe 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup> mit dem entsprechenden Medium kultiviert, und regelmäßig nach mikroskopischer Kontrolle, wobei die Konfluenz der Substratoberfläche bis zu 80-90 % evaluiert wurde, subkultiviert (Freshney 2016; McAteer und Douglas 1979).

Das alte Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS sorgfältig gewaschen. Danach wurde 1 ml bei 25 cm<sup>2</sup> und 1,5 ml bei 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen von 0,25 % Trypsin/EDTA zu den Zellen pipettiert. Die Inkubationszeit hat sich nach Zellart variiert. Während die HUVEC sehr empfindlich sind, wobei die Trypsin/EDTA Lösung bereits nach ca. 10 s abgesaugt wurde, haben die HaCaT mehr Zeit (ca. 3 Minuten oder länger) gebraucht. Sanftes Klopfen auf die Zellkulturflaschen hilft beim Ablösen der Zellen. Nach mikroskopischer Inspektion wurde frisches adäquates Medium zugegeben. Um alle von der Substratfläche abgelösten Zellen in einer Suspension zu sammeln, wurde schnell resuspendiert.

Die dadurch entstehende Zellsuspension kann dann für Subkultivierung oder Zählung verwendet werden. Die Subkultivierung von HUVEC Zellen wurde im Verhältnis 1:3, von anderen Zellarten 1:5 durchgeführt. Bei der Subkultivierung von HUVEC Zellen wurden die Zellkulturflaschen eine Stunde vorab mit 0,2 % Gelatinelösung in PBS, oder mit Fibronectin (100 µg/ml) 1:200 in PBS benetzt. Auf diese Beschichtung wurde bei der Subkultivierung von anderen Zellarten verzichtet. Die neu subkultivierten Zellkulturflaschen wurden bis zur nächsten Subkultivierung bzw. Mediumwechsel bei 35-37 °C inkubiert, wobei der Mediumwechsel alle 2-3 Tage durchgeführt wurde.

Für die Errechnung der Anzahl der Zellen pro ml wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet, in die 20 µl der mit Trypan blue (0,04 %) gefärbten Zellen pipettiert wurden. Die Zählkammer enthält 4 Quadrate der Größe 0,25 \* 0,25 mm, in denen

die Zellen mithilfe des Lichtmikroskops ausgezählt wurden. Dieser Wert wurde durch 2 geteilt und mit  $10^4$  multipliziert (Qiagen 2020).

Anhand dieser ermittelten Zellkonzentration und der erwünschten für jedes Experiment speziellen Zellzahl kann die benötigte Menge von der Zellsuspension errechnet werden.

## 4.2 Sterilitätstest der Prototyp-Biomaterialien

Die Materialien wurden vom Hersteller in sterilen Verpackungen erhalten, nachdem sie durch ETO behandelt worden waren. Die Materialien hatten eine Größe von ungefähr  $5\text{ cm} \times 5\text{ cm} \times 0,2\text{ cm}$ . Diese wurden unter sterilen Bedingungen entfernt und die Materialien wurden mit einem Skalpell oder einer Schere in kleine gleiche Stücke geschnitten, ungefähr  $0,5 \times 0,5\text{ cm}$ . Geschnittene Stücke wurden in einer sterilen Petrischale aufbewahrt. Um sicherzustellen, dass die Stücke nach dem Schneiden steril waren, wurde ein Sterilitätstest durchgeführt. Zum Testen der Sterilität wurden drei Stücke jedes Materials nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und in 5 ml DMEM-Medium ohne Zusatzstoffe in ein 15 ml Röhrchen gegeben und das Röhrchen mit dem Material bei  $37\text{ °C}$  in einem Bakterieninkubator 96 Stunden lang inkubiert und anschließend auf Trübung untersucht. Eine Sterilitätskontrolle wurde nur mit Medium durchgeführt. Eine Kontrolle zum Nachweis, dass Bakterien im Medium wachsen könnten, wurde durchgeführt, indem E. coli in das Medium inokuliert wurde. Das Röhrchen wurde neben den anderen Röhrchen inkubiert, welche jeden Tag auf Trübung untersucht wurden.

## 4.3 Zelladhäsion an den Prototyp-Biomaterialien

Im Anschluss sollte die Fähigkeit der verschiedenen Zelltypen zur Adhäsion an den einzelnen Biomaterialien bestimmt werden. Dieser Vorgang erforderte die Zugabe von  $200\text{ }\mu\text{l}$  Medium mit Zellen ( $100\text{ Zellen}/\mu\text{l}$ ) auf das Material in einem Wellplatte über zwei Stunden, gefolgt von der Zugabe von weiterem Medium nach diesem Zeitraum. Die Zellen wurden mittels Trypsin im Zellkulturfläschchen gelöst, und auf  $20000$  Zellen pro well in einer 96-well Platte ausgesät. Anschließend konnten die Zellen für  $24\text{ h}$  bei  $37\text{ °C}$ ,  $5\text{ \% CO}_2$  und  $95\text{ \%}$  Luftfeuchtigkeit anwachsen. Nach  $24$  Stunden wurden die Zellen mit Calcein-AM (fluoreszierendes Vitalfärbemittel) gefärbt, mikroskopisch evaluiert und mit Zellen auf Zellkulturplastik verglichen (siehe

Abb. 2 ). Sämtliche Zellen wurden jeweils auf mehreren Proben der Materialien auf verschiedene Variablen wie Anzahl der Zellen, Volumen der hinzugegebenen Zellen und Inkubationszeit untersucht.

#### 4.4 Zellviabilitätstest mithilfe von alamarBlue

Dieser Test wurde mit den Fibroblasten-Zelllinie L929, MRC-5, Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und primären Endothelzellen HUVEC gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Zum Zwecke dieses Tests wurde Resazurin (auch bekannt als alamarBlue) vorbereitet (Ivanov et al. 2017). 12 mg Resazurinsalz wurden in 100 ml HBSS mit Kalzium und Magnesium aufgelöst und dann durch 0,22 µm Filter gefiltert, aliquotiert und bis zu einem Jahr lichtgeschützt bei -20 °C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurde Resazurin aufgetaut. Die übrig gebliebene Stammlösung wurde nicht länger als 2 Wochen bei 2–8 °C gelagert.

Biomaterialienextrakte wurden hierfür ebenfalls vorbereitet. Ein 0,5 x 0,5 x 0,2 cm Stück Biomaterial wurde in 1,5 ml Medium (dasselbe Medium, in dem die Zellen kultiviert wurden) in ein steriles 2 ml Eppendorf-Röhrchen gegeben und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert, um eine Biomaterial-Extraktlösung herzustellen. Am folgenden Tag wurde das Medium mit dem Biomaterial zentrifugiert, um das Biomaterial zu entfernen, und das Extrakt wurde in ein steriles Röhrchen umgefüllt. Enthält ein Biomaterial toxische Substanzen oder Endotoxin, findet sich dieses im Extrakt. Die Extrakte wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

96 - Well Platten von den jeweiligen Zellen wurden mit 20000 Zellen/Well vorbereitet. Um das Wachstum und den Metabolismus der Zellen beurteilen zu können, wurde 30 µl Resazurin zu den Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation zugegeben. Jeweils erfolgte eine Inkubation von drei Stunden nach Zugabe des Resazurin. Die Zellen wurden dann mithilfe des Spektralphotometers bei einer Exzitation von 530 bis 560 nm und einer Emission von 580 bis 600 nm auf derselben Platte ausgewertet wurden. Die fluoreszenten und damit stoffwechselaktiven Zellen wurden erfasst und als Summe repräsentiert. Als Kontrolle diente das Medium, das ausschließlich mit Resazurin versetzt wurde.

Ebenfalls dienten die mit Triton X-100 behandelten und damit nicht mehr proliferierenden Zellen als Kontrolle. Um das Wachstum der Zellen nach 24 h, 48 h, 72 h vergleichen zu können, erfolgte nach der Auswertung eine graphische

Darstellung. Sämtliche Experimente wurden mit mindestens 3 Stücken/Proben der Biomaterialien durchgeführt.

Wir erhielten eine Probe des in der Synthese der Materialien verwendeten PAC vom Projektpartner. Das PAC wurde in Zellkulturmedium in Lösung gebracht und eine Verdünnungsreihe wurde hergestellt. Die verdünnten Lösungen wurden wie im oben beschriebenen Extrahierungsassay den Zellen hinzugegeben. Anschließend wurde die metabolische Aktivität der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in Abb. 4 gezeigt.

#### 4.5 Endotoxintest durch Anfärbung von E-Selectin

In diesem Assay wird die E-Selectin - Expression bei HUVEC Zellen mittels Immunfluoreszenz evaluiert. Dieser Versuch startete mit der Beschichtung des Kammerobjektträgers mit 0,2 % Gelatinelösung in PBS, oder mit Fibronectin 1:200 in PBS für eine Stunde lang bei 37 °C. Danach wurden die Zellen im adäquaten Medium im Kammerobjektträger kultiviert und für 24 h inkubiert. Dabei wurden pro Kammer 15000 Zellen in 250 µl Medium inklusive Growth Factor 10 µl/ml ECGS/Na-Heparin (1:1000) dazu gegeben. Biomaterialien-Extrakte wurden wie oben beschrieben (siehe 4.4) vorbereitet.

Nach mikroskopischer Kontrolle bzgl. der Konfluenz der Zellen wurde das Medium aus den Kammern entsorgt und dann folgte die Zugabe von frischem Medium, LPS und den Extrakten der Prototyp-Biomaterialien folgendermaßen: Kammer 1: Kontrollmedium, nur Medium; Kammer 2: Positivkontrolle: Medium, 1 µl/ml LPS; Kammer 3-7: jeweils 20 µl Extrakt der Prototyp-Biomaterialien; Kammer 8: Negativkontrolle: nur Medium.

Anschließend wurde der Kammerobjektträger für 4 h inkubiert. Danach wurde das Medium aus allen Kammern entsorgt und mit PBS zweimal gewaschen. Die Fixation der Zellen auf dem Objektträger erfolgte durch die Zugabe von 3,7 % Paraformaldehyd (PFA). Das PFA wurde nach 15 Min. lang Inkubation entsorgt und mit PBS viermal gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte durch die Zugabe von 250 µl (0,2 %) Triton X-100 pro Kammer und für 10 Min. Inkubation, damit der Antikörper und DAPI die Zellmembran durchdringen können. Danach wurde Triton entsorgt und mit PBS dreimal gewaschen. Anschließend wurde der 1:100 in 1 % BSA/PBS (BSA blockiert die unspezifische Bindung von IgG) verdünnter Primärantikörper (E-Selectin Antikörper, Monosan CD62E Monosan 6010) zu den

Zellen gegeben und dann wurde für eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschvorgang (viermal) mit PBS wurde der 1:1000 in 1 % BSA/PBS verdünnte sekundäre Antikörper, Alexa 488 anti-mouse IgG, zugegeben, und dann für eine Stunde lang unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Nach doppeltem Waschvorgang mit PBS wurde 1:10000 in destilliertem Wasser verdünntes DAPI, ein zur Markierung von DNA (Zellkern) eingesetzter Fluoreszenzfarbstoff, zugegeben und für Fünf Min. lang inkubiert, und dann erneut mit PBS zweimal gespült. Nach Entsorgung des PBS wurde das Deckglas mithilfe von Prolong Eindeckmittel fixiert und o/n bei 4 °C inkubiert, um zu verhärten. Der Objektträger wurde dann am nächsten Tag mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

#### 4.6 Wachstum der Zellen auf den Prototyp-Biomaterialien

Hier wurde das Wachstumsverhalten der Zellen in Präsenz der Biomaterialien untersucht, dafür wurde ein Stück Biomaterial (ca. 0,5 mm<sup>2</sup>) in einem Well einer 48-Well-Platte mit den Zellen in einer Konzentration von 50000 Zellen pro Well in 500 µl vom adäquaten Medium 4 bis 5 Tage inkubiert. Zur Vitalfärbung der Zellen auf dem dreidimensionalen Gerüst eignet sich der fluoreszierende intrazelluläre Ionenindikator Calcein-acetoxymethyl (Calcein-AM) Ester. Nach Zugabe des Indikators zum Nährmedium durchdringt er die Zellmembran und beginnt nach Einwirkung einer intrazellulären Esterase und im Kontakt mit Calciumionen zu fluoreszieren. Es wurden 10 µl pro Well gegeben und 10 bis 20 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops, dabei wurden auch Bilder aufgenommen. Die Biomaterialien wurden unter Verwendung einer Pinzette invertiert, um das Wachstumsverhalten der Zellen möglichst ganzheitlich evaluieren zu können. Die zu untersuchenden Zellen waren primäre Endothelzellen (HUVEC), primäre Fibroblasten (HFF) Fibroblasten-Zelllinie (MRC-5) und Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT).

## 4.7 Entwicklung eines 3-D Multizell-Sphäroidsystems zur Evaluierung der Migration und Invasion von Hautzellen in 3D-Kollagen-Scaffolds

Die Herstellung der Sphäroide unter Verwendung des in Abb. 1 gezeigten Systems erwies sich als optimale Methode. Ein Agarosegel wurde in eine Form gegossen, aus der nach Erhärtung und Entfernung ein Well mit 81 individuellen Mikrowells entstand. Nach Zugabe einer Zellsuspension in die Mikrowells verteilten sich die Zellen gleichmäßig auf die 81 Wells und bildeten Sphäroide. Diese waren stabil genug, um entfernt, auf ein kleines Volumen konzentriert und direkt auf ein Prototyp-Biomaterial platziert werden zu können. HFF und HUVEC wurden ausgewählt, da sie anfänglich die wichtigsten Zellen im Wundheilungsprozess sind und da gezeigt wurde, dass HUVEC in Kokultur mit HFF mit der Zeit kapillarähnliche Strukturen bildet (Herzog et al. 2014; Rouwkema et al. 2006).

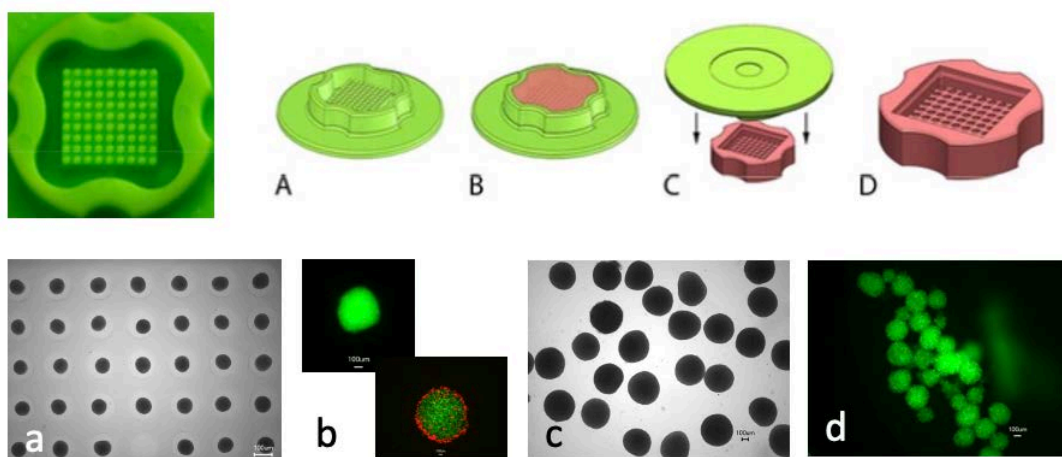


Abb. 1: Herstellung der Sphäroide. Die obere Reihe zeigt das Gelformsystem zur Herstellung der Mikrowells; die untere Reihe zeigt die Entstehung der 81 Sphäroide. Obere Reihe: Agarosegel wird in die Form gegossen (B), erstarren lassen und dann aus der Form entfernt (C). Eine Zellsuspension wird dem in der Form entstandenen Well zugegeben (D), und die Zellen verteilen sich gleichmäßig in die 81 Mikrowells. Untere Reihe: a) Aufnahme von D mit Sphäroiden bestehend aus 1000 Zellen pro Mikrowell, b) Sphäroide eines Zelltyps oben, aus zwei Zelltypen unten (rot und grün markierte Zellen), entstanden durch Zugabe des zweiten Zelltyps nach 24 h., c) aus der Form entnommene Sphäroide und d) konzentrierte, fluoreszent markierte Sphäroide.

Aus HFF, HUVEC oder einer Mischung von beiden Zelltypen hergestellte Sphäroide wurden den Biomaterialien 1 und 2a.1 zugegeben, da diese Materialien sowie bei porciner Dermis die höchste Zelladhäsion gezeigt hatten (siehe 5.2 und 5.5). Die Sphäroide wurden aus den oben beschriebenen Mikrowells entfernt, in einem kleinen Volumen von Medium konzentriert und direkt auf ein unten in einer



Wellplatte befindliches Prototyp-Biomaterial platziert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Lebendzell- Färbemittel (Calcein-AM) gefärbt, um die Sphäroide und die Zellen innerhalb der Sphäroide im Verlauf verfolgen zu können. Mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurden Aufnahmen von den Zellsphäroiden und den Prototyp - Biomaterialien nach 6 h, 24 h und 72 h gesammelt und evaluiert.

## 4.8 RT-PCR

Dies erfolgt durch mehrere Schritten: zuerst wird die RNA isoliert, von der eine cDNA (complementary DNA) durch reverse Transkription vorbereitet wird, dann wird mithilfe von Gen-spezifischer Primer in Polymerase Kettenreaktion die Ziel-cDNA vermehrt, um genug DNA-Mengen zu erhalten und in Agarosegelelektrophorese nachzuweisen. Bei der Agarosegelelektrophorese wird die DNA zunächst über ein elektrisches Feld nach Größe getrennt und dann durch Anfärben mit peqGREEN, das mit der DNA interkaliert, als Banden sichtbar gemacht und fluoresziert unter UV-Licht.

### 4.8.1 RNA - Isolation

Nachdem die auf und neben dem Biomaterial wachsenden Zellen abgelöst wurden, was nach 1, 2 und 3-wöchiger Inkubation mit regelmäßigem Mediumwechsel mithilfe von 1 ml Trizol erfolgte. Diese Zellsuspension wurde dann in ein Eppendorfröhrchen übertragen und mit 200 µl Chloroform, welches bei der Phasentrennung wichtig ist, gevortext und dann auf Eis für 5 Min gelagert. Eine Zentrifugation für 15 Min bei 4 °C und 11200 rpm erfolgte anschließend. Die wässrige Phase, die die RNA enthält, wurde in ein neues Eppendorfröhrchen übertragen und die gleiche Menge Isopropanol wurde hinzu gegeben (das Isopropanol hilft bei der Ausfällung der RNA). Das Röhrchen wurde dann mehrmals invertiert und auf Eis für 10 Min gelagert. Nach einer erneuten Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C und 11200 rpm wurde das erkennbare RNA-Pellet vom Röhrchen mit 500 µl 80% Ethanol gewaschen. Die entstandene Suspension wurde anschließend für 5 Min bei 4 °C und 8200 rpm zentrifugiert. Die letzten zwei Schritte wurden wiederholt, um das Ethanol anschließend zu entsorgen und das Pellet trocknen zu lassen. Dann wurde das Pellet in 20 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und die RNA-Konzentration in Spectrophotometer gemessen.



#### 4.8.2 Reverse Transkription

Mithilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits wurde nach Herstellervorgaben im Real Time PCR Cyclor transkribiert.

Um cDNA aus der isolierten RNA zu erhalten, benötigten wir ein Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$ , von denen 10  $\mu\text{l}$  die Master-Mix enthält:

<b>Komponente</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
10 x RT buffer	2
25 x dNTP Mix (100 mM)	0,8
10 x RT Random Primers	2
Multiscribe Reverse Transkriptase	1
RNase Inhibitor	1
Nuclease freies Wasser	3,2
<b>Total Per Reaktion</b>	<b>10</b>

Innerhalb der 20- $\mu\text{l}$ -Reaktion sollten insgesamt 50 ng/ $\mu\text{l}$  (oder insgesamt 1000 ng = 1  $\mu\text{g}$ ) der isolierten RNA vorhanden sein, welche zu einem Gesamtgemisch 10  $\mu\text{l}$  verdünnt werden. In einem kleinen PCR-Röhrchen wurden die 10  $\mu\text{l}$  Master-Mix und die 10  $\mu\text{l}$  RNA/Wasser-Mix gemischt. Die cDNA-Synthese wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

<b>Einstellung</b>	<b>Schritt 1</b>	<b>Schritt 2</b>	<b>Schritt 3</b>	<b>Schritt 4</b>
Temp.	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zeit	10 Min	120 Min	5 Min	$\infty$

Die entstandene cDNA wurde auf 1:10 verdünnt und bei 4 °C gelagert und für die weiteren PCRs verwendet.

#### 4.8.3. PCR

Die cDNA wurde vorsichtig auf Eis aufgetaut und dann sofort verwendet. Es wurde für diese Arbeit den RedTaq Readymix PCR Reaction Mix nach Herstellerangaben verwendet. Um festzustellen, ob die interessierende DNA vorhanden ist, wurde ein 25  $\mu\text{l}$  Reaktionsröhrchen vorbereitet, das Folgendes enthält:

<b>Konzentration</b>	<b>Volumen pro Röhrchen/Reagent</b>
1 X	12,5 $\mu$ L RedTaq Ready Mix
0,2 $\mu$ M	0,5 $\mu$ L Fwd Primer (10 $\mu$ M)
0,2 $\mu$ M	0,5 $\mu$ L Rev Primer (10 $\mu$ M)
	2 $\mu$ L cDNA sample
	9,5 $\mu$ L RNase freies Wasser
Total Volumen	25 $\mu$ L

Danach wurden die Reaktionsröhrchen in den Thermocycler überführt und der PCR-Prozess wurde mit diesen Standardbedingungen durchgeführt:

- 94  $^{\circ}$ C, 2 min. (DNA-Denaturierung)
- 35 Zyklen:
  - 94  $^{\circ}$ C, 30 s; (DNA-Denaturierung)
  - Annealingtemperatur (je nach PCR-Produkt unterschiedlich, siehe 3.4), 30 s  
(Annealing von Primern an Ziel-DNA)
  - 72  $^{\circ}$ C, 30 s (DNA-Synthese)
- 72  $^{\circ}$ C, 10 min. (letzter DNA-Verlängerungsschritt)

Anschließend wurde die amplifizierte cDNA dann auf Eis gelagert, bis eine Gelelektrophorese durchgeführt wurde.

#### 4.8.4. Gelelektrophorese

Für die Untersuchung der DNA-Sequenzen in dieser Arbeit wurde Agarosegelkonzentration von 0,8 % verwendet. Das Agarosegel wurde mit 0,5 TBE-Puffer hergestellt und mithilfe des Mikrowellenofens aufgekocht. Nach Zugabe von 2  $\mu$ l peqGREEN 20000X wurde die flüssige Agarose in eine gerahmte Schale gegossen. Ein 10-Zinken-Kamm wurde in die Agarose eingeführt, um nach dem Erstarren Taschen zu erzeugen. Die Schale mit der erstarrten Agarose wurde dann in die Elektrophoresekammer überführt, die Schale wurde entfernt und TBE-Puffer hinzugefügt, so dass das Gel vollständig eingetaucht war. Zu jeder cDNA wurde blau gefärbter Ladepuffer gegeben (25  $\mu$ l cDNA + 5  $\mu$ l Ladepuffer) und 10  $\mu$ l dieser Mischung wurden in jede Tasche pipettiert. Zusätzlich wurde eine Tasche mit der

Negativkontrolle beladen (reines Wasser mit Ladepuffer), eine mit der Positivkontrolle (DNA von den Zellen) und eine mit der DNA-Leiter. Eine Spannung von 100 V wurde für 30-40 Minuten lang an die Kammer angelegt. Danach wurde die Schale mit dem Gel aus der Kammer entfernt und das Gel gelöst und auf einen UV-Tisch gelegt. Unter UV-Licht wurden die DNA-Banden fluoreszierend visualisiert. Mithilfe einer montierten Digitalkamera wurden Bilder aufgenommen.

#### 4.9 Evaluierung des Angiogenese-stimulierenden Potentials der Prototyp-Biomaterialien

Um zu erkennen, ob die Prototyp-Biomaterialien die Ausbildung von mikrokapillarähnlichen Strukturen unterstützen, wurde das *in vitro* 3-D Kokulturmodell (mit Fibroblasten/Endothelzellen-Kokulturen) bei Prototyp-Biomaterialien 1 und 2a, den meistversprechenden der in den vorherigen Untersuchungen identifizierten Materialien, angewendet. Hierfür wurden die Zellen dem Material zugegeben, und nach 24 h wurde VEGF (Angiogenese induzierenden Substanz) zu dem Kulturmedium hinzugefügt (Tag 0). Die Färbung zur Identifizierung der Endothelzellen wurde an Tag 5 und Tag 10 durchgeführt. Zu diesen Zeitpunkten wurden Aufnahmen mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops gesammelt und evaluiert.

### 5. Ergebnisse

#### 5.1 Sterilitätstest der Prototyp-Biomaterialien

Um sicherzustellen, dass die Biomaterialien nach dem Entfernen aus der Verpackung und nach dem Schneiden in kleine Stücke steril waren, wurden geschnittene Materialstücke in ein Medium gegeben, das das Wachstum von Mikroorganismen unterstützte.

Tabelle 5 : Ergebnisse des Sterilitätstests von den Prototyp-Biomaterialien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe der Materialien zu den Röhren.

Material	24 h	48 h	72 h	96 h
<b>1</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>2a</b>	- - -	- - -	- - -	- - -

<b>2b</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>3a.1</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>3a.2</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>Rogg</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>pD</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>pP</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>Sterile control</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>E. coli</b>	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +

- keine Trübung + Trübung. Die gezeigten Ergebnisse sind für 3 Röhrchen, jeweils 3 einzelne Materialstücke.

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, waren die vom Projektpartner erhaltenen Materialien steril und die Proben waren nach dem Schneiden in kleine Stücke steril. Das Kontrollröhrchen zeigt, dass bakterielle Verunreinigungen im Medium wachsen konnten.

## 5.2 Zelladhäsion an den Prototyp-Biomaterialien

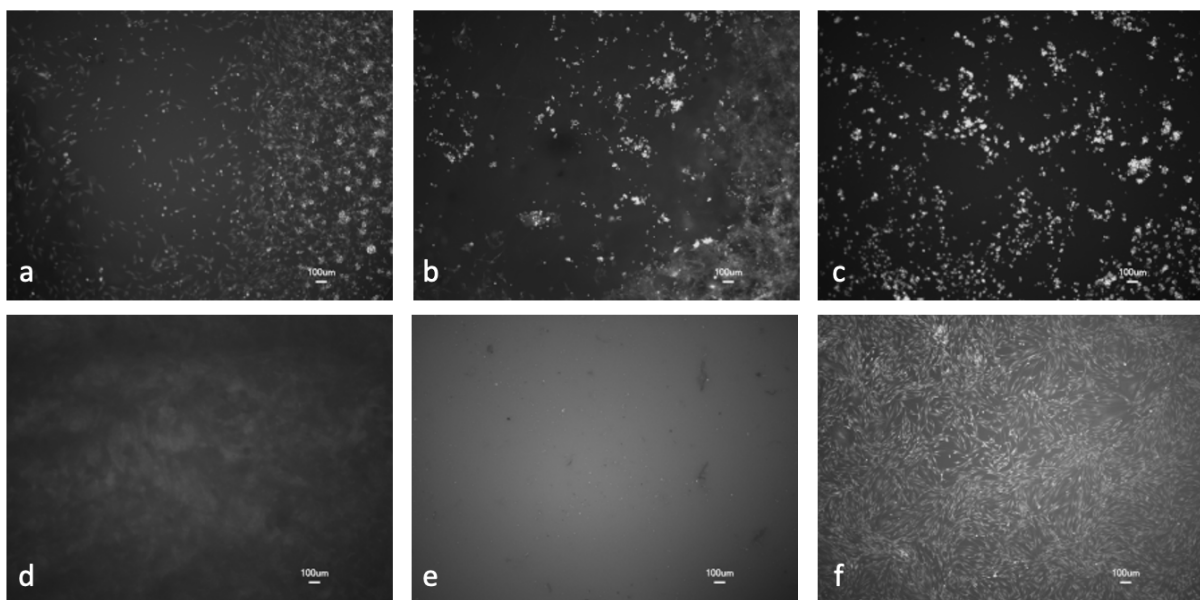


Abb. 2: HFF auf Biomaterialien für 24 h gefärbt mit Calcein-AM. a) 1, b) 2a, c) 2b, d) 3a.1, e) 3a.2, f) Kontrolle, Plastik.

Wie in Abb. 2 zu sehen haben sich HFF Zellen an 1, 2a und 2b angelagert jedoch in geringerer Anzahl als die Kontrollzellen (f) und in zahlreichen Fällen mit einer

gerundeten Morphologie. Ein gerundetes Erscheinungsbild signalisiert Ablösung und Absterben der Zellen. Eine geringe Anzahl von Zellen wurde auf 3a.1 beobachtet, eine höhere auf 3a.2, jedoch insgesamt nur wenige lebende Zellen. Fast alle Zellen auf diesen beiden Materialien zeigten eine gerundete Form. Ähnliche Resultate wurden bei den drei anderen Zelltypen beobachtet.

### 5.3 Effekt der Extrakte von den Prototyp-Biomaterialien auf die metabolische Aktivität der Zellen

Wie in 4.3 erklärt wurde, wurden die 96 - Well Platten mithilfe des Spektralphotometers ausgelesen, und die Ergebnisse sind tabellenartig in Excel-Datei erzeugt worden, dann wurden mittels der Mittelwerte- und Standardabweichung-Formeln Diagramme erzeugt. Die Ergebnisse repräsentieren hier einen der dreimal durchgeführten Versuch für jede Zellart.

In den folgenden Diagrammen sind zwei Kontrollgruppen zu beobachten, die Zellen im Medium ohne Prototyp-Biomaterialienextrakte und die Zellen, die Triton X-100 ausgesetzt wurden. Die Messbalken mit der Beschriftung „Medium“ bei 24 h Messung geben die Zellpopulation auf Zellkulturplastik als Kontrolle an, und sie repräsentieren zu jedem Messzeitpunkt 100 %, zu denen die anderen Messbalken die Relation zeigen.

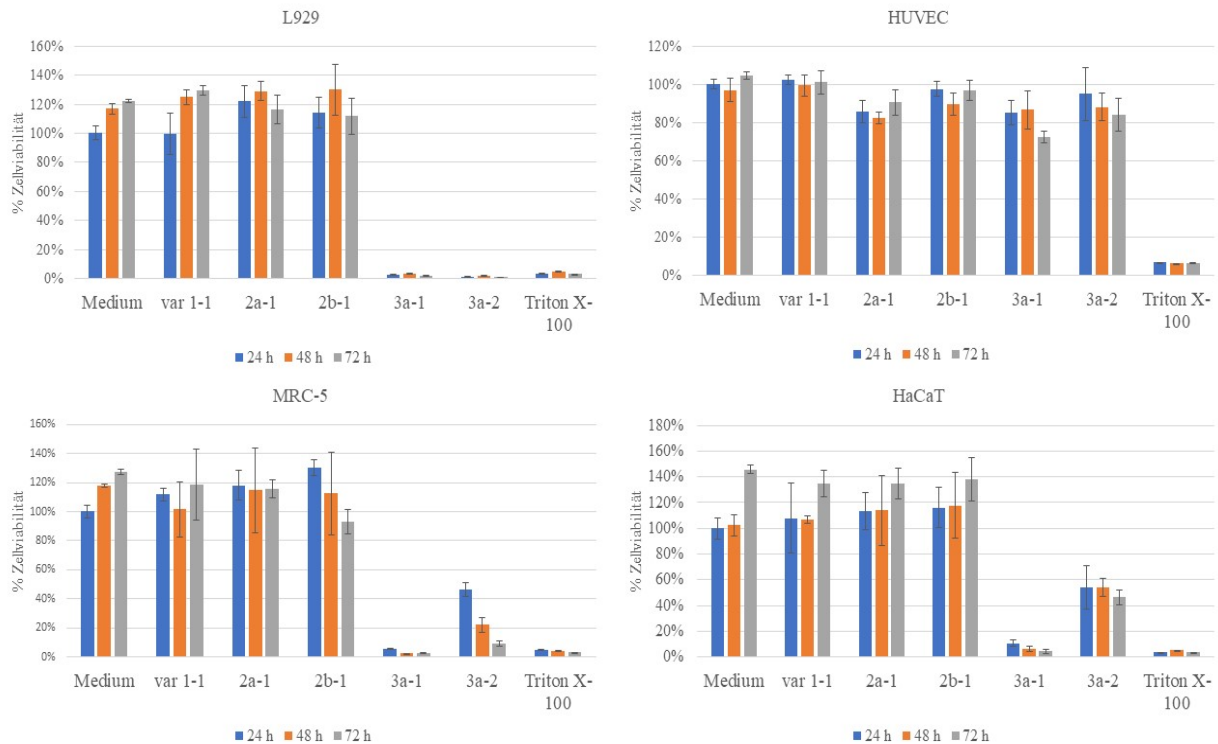


Abb. 3: Metabolische Aktivität der Zellen nach Einwirkung von aus Materialien hergestellten Extrakten zu verschiedenen Zeitpunkten im Vergleich mit Kontrollzellen. Y-Axis zeigt die Zellpopulation, X-Axis zeigt den Zeitverlauf, weiße Strecken: Standardabweichung,  $p < 0,05$ ,  $n = 3$ . Medium = Zellkulturmedium auf Zellkulturplastik als Kontrolle, var 1-1 = Biomaterial 1, 2a-1 = Biomaterial 2a, 2b-1 = Biomaterialien 2b, 3a.1 und 3a.2 wie oben beschrieben. Triton X-100: Zellen unter Einwirkung von Triton, das zur Zerstörung aller Zellmembranen führt und zum Ausbleiben der Resazurin Konversion.

Wie in Abb. 3 zu sehen steigerte sich mit der Zeit die metabolische Aktivität bei allen Zelltypen in der reines Medium-Kontrolle. Ähnliche Ergebnisse gab es für die Materialien 1 (Var 1.1), 2a.1 und 2b.1 bei allen vier Zelltypen. Dies bedeutet, dass keine toxischen Substanzen in den Materialien vorhanden waren. Bei 3a.1 und 3a.2 erwiesen sich die den Zellen zugegebenen Extrakte als hoch toxisch für L929, MRC-5 und HaCaT Zellen bei 3a.1 und etwas weniger toxisch bei 3a.2 für MRC-5 und HaCaT. Die Toxizität nahm mit der Einwirkungszeit des Extrakts zu.

Zu bemerken ist, der Effekt der Extrakte der Biomaterialien 3a.1 und 3a.2 auf die Zellproliferation, wobei der Effekt der 3a.1 vermutlich aufgrund des hohen PAC-Anteils immenser ist: Kol : PAC = 1:1. Dies führte uns zum weiteren Test wie in 4.4 erklärt, dabei wurde der Effekt der PAC-Konzentration auf die Zellproliferationsrate untersucht. Die nächsten Diagramme zeigen die Ergebnisse dieses Tests.

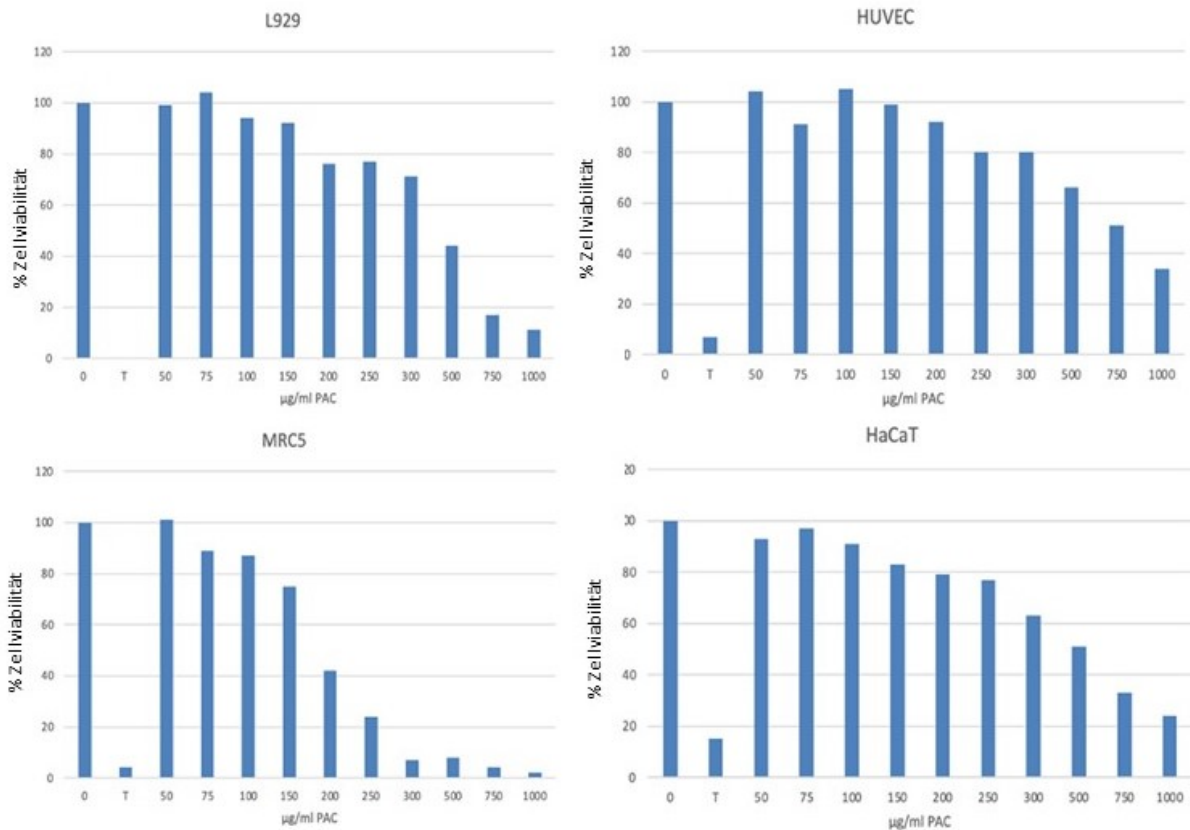


Abb. 4: Der Effekt der steigenden Konzentration von PAC auf die Lebensfähigkeit der Zellen nach 24 h. PAC wurde in den angezeigten Konzentrationen zu den Zellen in Wells hinzugegeben und 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Lebensfähigkeit der Zellen mithilfe des oben beschriebenen Resazurin Assays bestimmt. 0 steht für ohne Zugabe von PAC und T ist die Aktivität nach 30 Min mit Triton X-100 vor der Zugabe von Resazurin.

Wie aus Abb. 4 ersichtlich wurde bei PAC Konzentrationen über 100 µg/ml eine im Vergleich zur Kontrolllösung verringerte Lebensfähigkeit der Zellen beobachtet und bei höheren Konzentrationen eine größere Toxizität. L929 und MRC-5 scheinen bei PAC allein am empfindlichsten zu sein, was sich mit den Beobachtungen bei den Toxizitätstests mit 3a.1 und 3a.2 in Abb. 3 überschneidet. HUVEC und HaCaT scheinen eine höhere Resistenz gegenüber PAC zu haben, was ebenfalls mit den Ergebnissen in Abb. 3 übereinstimmt. Insgesamt zeigen die Resultate, dass PAC bei bestimmten Konzentrationen einen signifikanten toxischen Effekt auf Zellen in Kultur hat. Es war jedoch aufgrund von Interferenzen mit den Substanzen des Mediums und mit dem Serum nicht möglich, die Konzentrationen von PAC zu bestimmen, die von den Materialien in das Zellkulturmedium freigesetzt wurden.

## 5.4 Endotoxintest durch Anfärbung von E-Selectin

Anhand des Fluoreszenz-Mikroskops BIOREVO - KEYENCE wurde die immuncytochemische E-Selektin Markierung der Zellen nach Inkubation mit Extrakten und mit LPS dargestellt (siehe 4.5). Dies wurde unter Anwendung des Fluoreszenzfilters des Färbungsmittel Alexa 488 (Grün) und des Zellkerns (DAPI, Blau) erzielt.



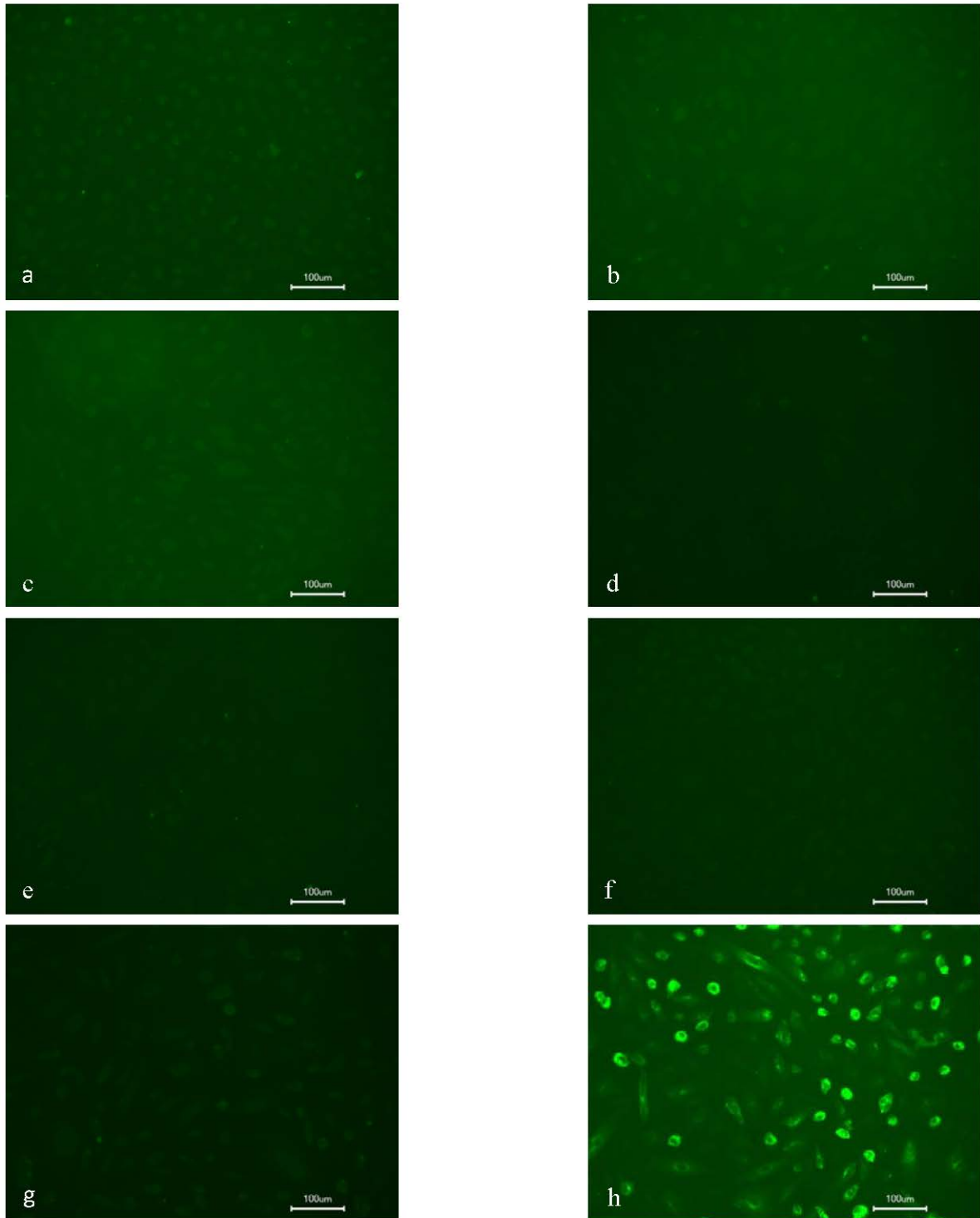


Abb. 5: E-Selektin Färbung von Endothelzellen (HUVEC) auf den Prototyp-Biomaterialien nach einer 4- stündigen Inkubationszeit mit Extrakten. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, fixiert und mit einem Antikörper gegen E-Selektin inkubiert. a) 1, b) 2a, c) 2b, d) 3a.1, e) 3a.2, f) Zellen im Zellkulturmedium ohne Zugabe von Extrakten oder von LPS zeigten keine Färbung, g) Zellen ohne Zugabe von primärem Antikörper, h) Kontrolle: Zellen die mit 1 µg/ml LPS (Endotoxin) inkubiert wurden.

Wie in Abb. 5 zu sehen zeigten mit LPS inkubierte Zellen eine starke Induktion von E-Selektin (grüne Färbung um den Zellkern). Keines der aus den Biomaterialien

gewonnenen Extrakte resultierte in der Induktion von E-Selektin auf Endothelzellen. Die Ergebnisse belegen, dass die Materialien kein Endotoxin enthielten.

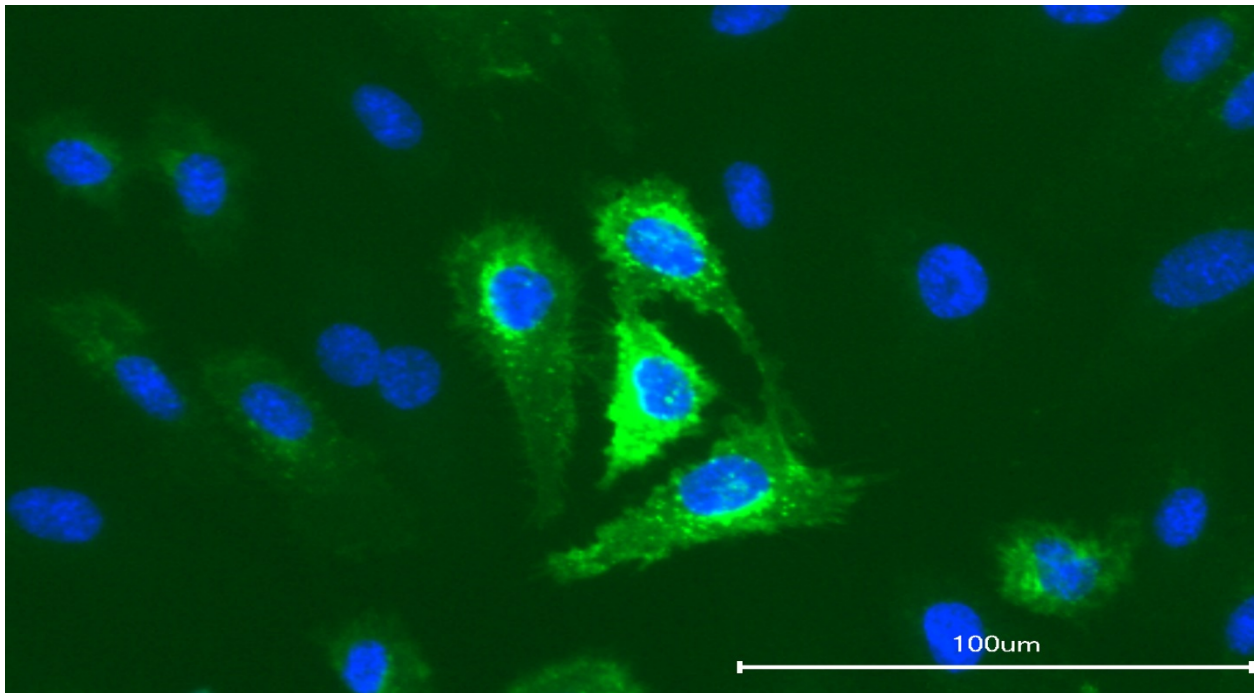


Abb. 6: Darstellung des Zelladhäsionsmoleküls E-Selectin (Grün) in der Kontrolle am Rand des Zellkerns (Blau).

## 5.5 Wachstum der Zellen auf den Prototyp-Biomaterialien

Die Biomaterialien wurden mit verschiedenen Zellsuspensionen (siehe. 4.3 und 4.6) kultiviert, wobei die Zellen nach 4 bis 5 Tagen Inkubation mit Calcein-AM gefärbt wurden, und dann wurden die folgenden Bilder mithilfe des Fluoreszenzmikroskops aufgenommen.

Die folgenden Bilder stellen das Wachstums- bzw. Proliferationsverhalten der verschiedenen Zelllinien bzw. primären Zellen auf die Biomaterialien dar.

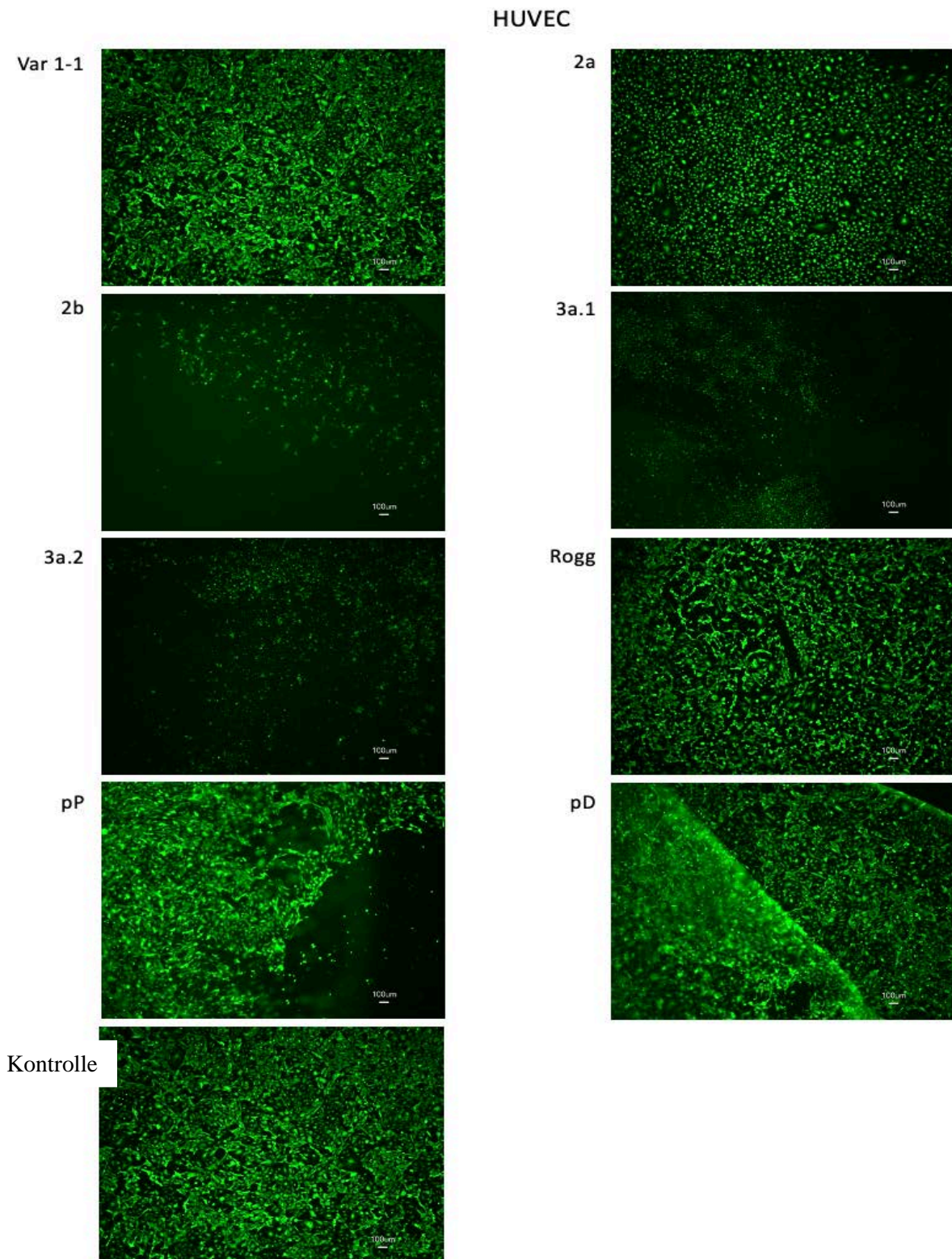


Abb. 7: Aufnahmen von HUVEC Zellen auf den Biomaterialien in Wells 5 Tage nach Zugabe der Zellen. Jedes Bild steht stellvertretend für mindestens 8 Aufnahmen pro Well und für Zellen auf mindestens 3 verschiedenen Stücken des Materials.

Wie aus Abb. 7 ersichtlich zeigten die HUVEC-Zellen Adhäsion an und Wachstum auf Material 1 (Var1-1), wobei die Zellen eine auf Zellkulturplastik wachsenden Zellen ähnliche Morphologie zeigten. Eine ähnliche Anzahl von Zellen scheint an 2a

angelagert, diese Zellen haben jedoch eine mehr abgerundete Gestalt (abgelöste Zellen). Auf 2b können Zellen auf dem Material gesehen werden, allerdings in wesentlich geringerer Anzahl als auf 2a. Auf 3a.1 wurden weniger Zellen beobachtet als auf 3a.2; auf beiden Materialien adhärirten nur sehr wenige Zellen bei meist abgerundeter Morphologie. Längere Inkubationszeiten führten nicht zu einer erhöhten Zahl von adhären Zellen. Generell verringerte sich die Anzahl von HUVEC Zellen auf den Materialien im Verlauf, am schnellsten auf 3a.1 und 3a.2, gefolgt von 2a und 2b und schließlich 1. Jedoch wuchsen bei 1, 2a und 2b in Wells Zellen, die sich von den Materialien ablösten, normal auf dem Zellkulturplastik; bei 3a.1 und 3a.2 waren die Ergebnisse für abgelöste Zellen unterschiedlich. Dies mag teilweise auf die Menge von PAC zurückzuführen sein, die mit der Zeit aus dem Material freigesetzt wurde. Die Zellen zeigten eine sehr gute Adhäsion an die Kontrollmaterialien, Rogg, porcines Perikard und porcine Dermis, und Anzahl und Morphologie der Zellen ähnelten denen der Zellkulturplastik-Kontrolle. Die Anzahl der Zellen stieg im Verlauf der Zeit weiter. Insgesamt lagerten sich die Zellen anfänglich in unterschiedlichen Mengen an das jeweilige Prototyp-Biomaterial an, die Anzahl der angelagerten Zellen nahm jedoch im Lauf der Zeit wieder ab.



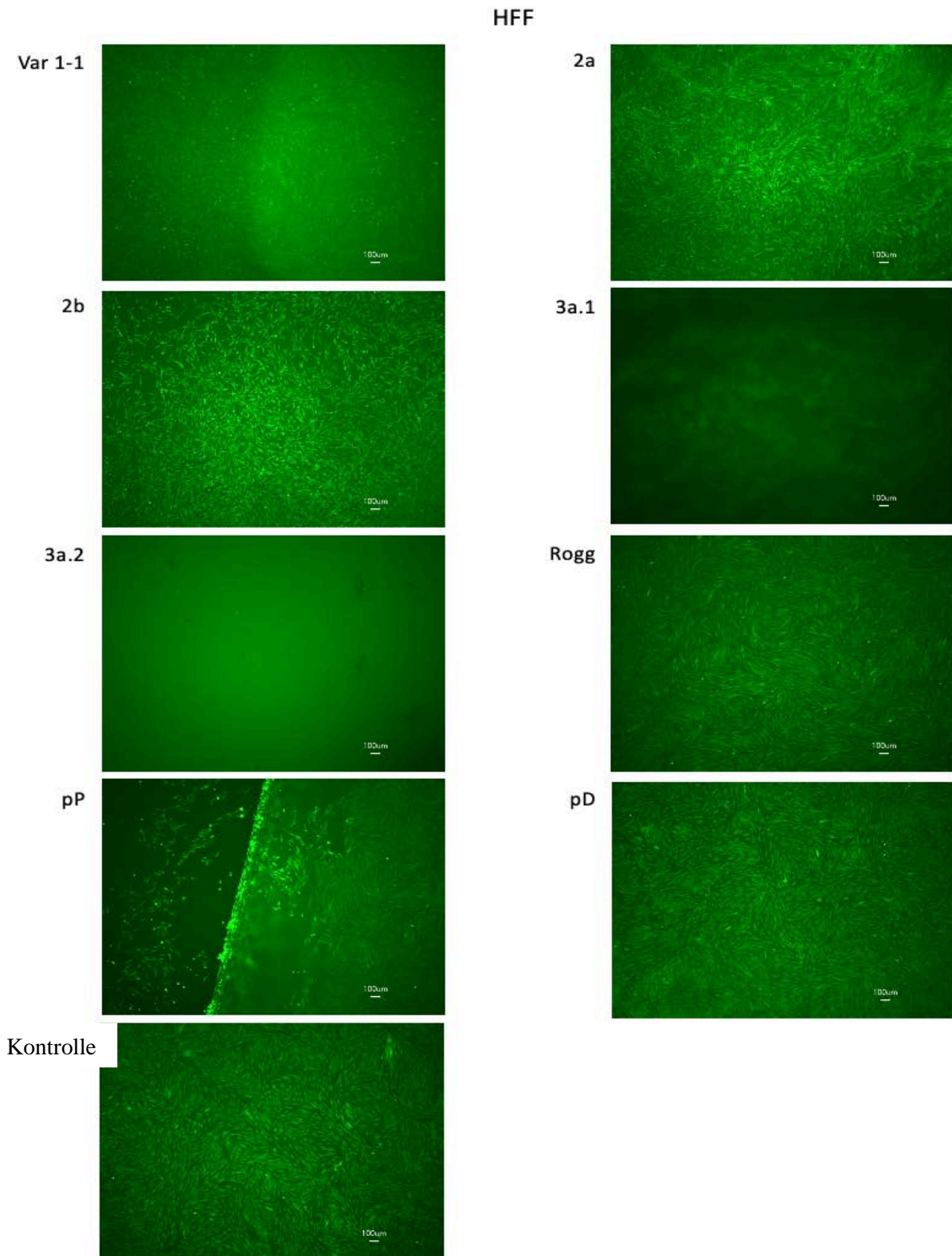


Abb. 8: Aufnahmen von HFF Zellen auf den Biomaterialien in Wells 5 Tage nach Zugabe der Zellen. Jedes Bild steht stellvertretend für mindesten 8 Aufnahmen pro Well und für Zellen auf mindestens 3 unterschiedlichen Stücken des Materials.

Abb. 8 zeigt die Ergebnisse der HFF-Zellen auf den verschiedenen Prototyp-Biomaterialien. Die Zellen haben sich an 1 (Var1-1), 2a und 2b angelagert, zeigten

jedoch eine gegenüber den Kontrollzellen etwas mehr abgerundete Morphologie. Im Verlauf (eine Woche zusätzliche Inkubationszeit) lösten sich die Zellen von diesen drei Materialien ab. Die Zellen auf dem Zellkulturplastik wuchsen weiter. Auf 3a.1 und 3a.2 waren fast keine lebensfähige Zellen zu sehen. Einige Zellen wurden auf dem Zellkulturplastik beobachtet, jedoch nur ein kleiner Bruchteil der ursprünglich zugegebenen Menge. Ein nahezu flächendeckendes Wachstum zeigte sich auf den drei kommerziellen Materialien, Rogg, porcines Perikard und porcine Dermis, und kam dem der Kontrollzellen gleich.

## MRC-5

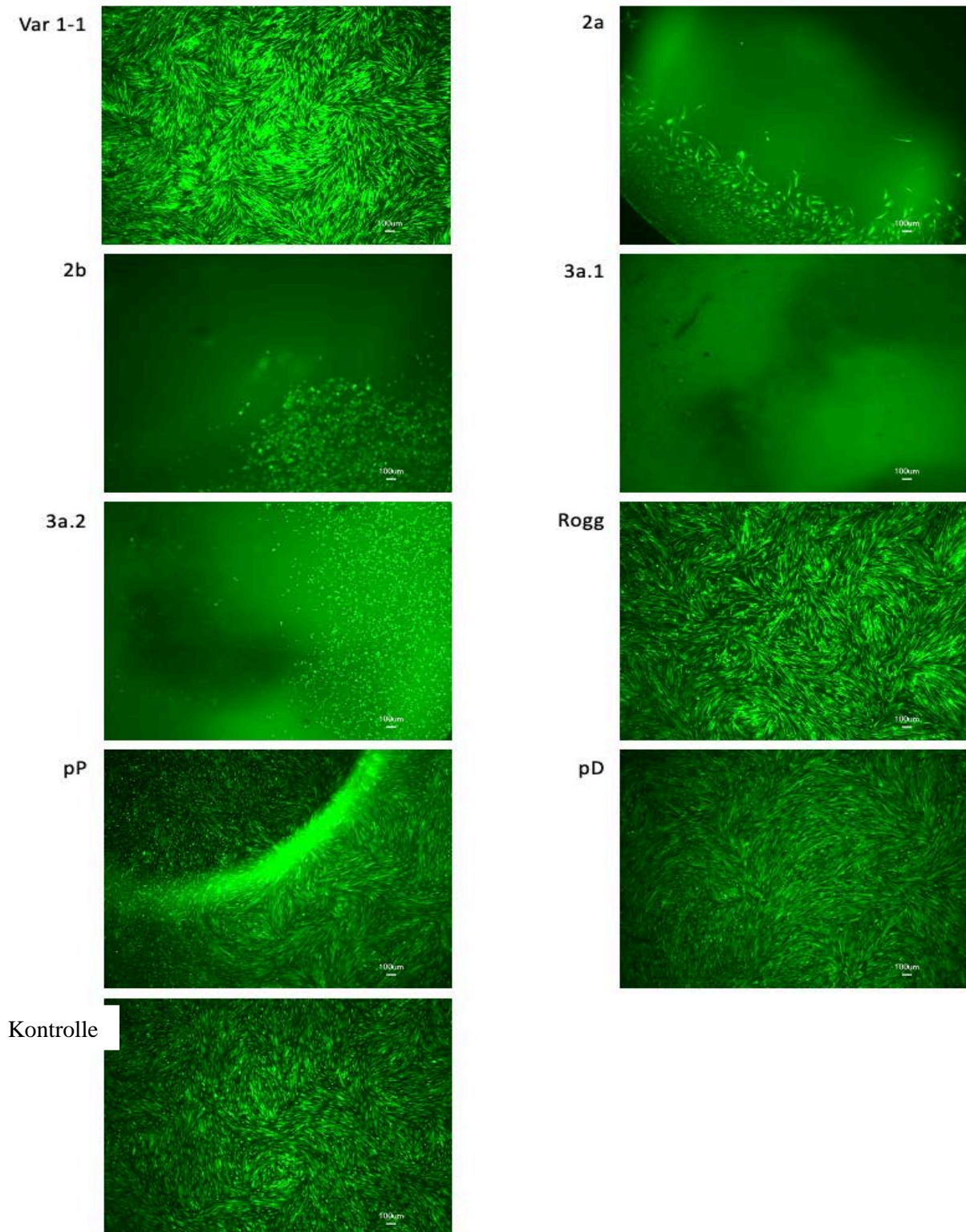


Abb. 9: Aufnahmen von MRC-5 Zellen auf verschiedenen Materialien in Wells 5 Tage nach Zugabe der Zellen. Jedes Bild steht stellvertretend für mindesten 8 Aufnahmen pro Well und für Zellen auf mindestens 3 unterschiedlichen Stücken des Materials.

Abb. 9 zeigt das Wachstum von MRC-5, einer Fibroblasten-Zelllinie.

Interessanterweise waren die Ergebnisse anders als bei den HFF Zellen. Die

Zellmorphologie und Zellanlagerung an Prototyp-Biomaterial 1 war sehr gut, ähnelte denen der kommerziell erhältlichen Kollagenmembranen und der Kontrollzellen. Die Zellen waren länglich mit der typischen gestreckten Zellmorphologie und fast flächendeckend ausgebreitet; abgerundete Zellen waren nur vereinzelt zu sehen. Bei 2a, 2b und 3a.2 gab es wesentlich weniger angelagerte Zellen auf dem Material. In allen drei Fällen waren die Zellen weniger langgestreckt als die MRC-5 auf Zellkulturplastik; einige waren abgerundet. Bei diesen drei Materialien wurde auch Zellwachstum in den Wells beobachtet. Diese Zellen wuchsen bei fortgesetzter Inkubationszeit weiter, wohingegen sich die Zellen auf den Materialien während der zusätzlichen Inkubationsperiode allmählich ablösten (nach ca. 10 Tagen, Ergebnisse nicht gezeigt). Auf dem 3a.1 Material wurden keine Zellen beobachtet und auch im Well konnten nur wenige angelagerte Zellen entdeckt werden.



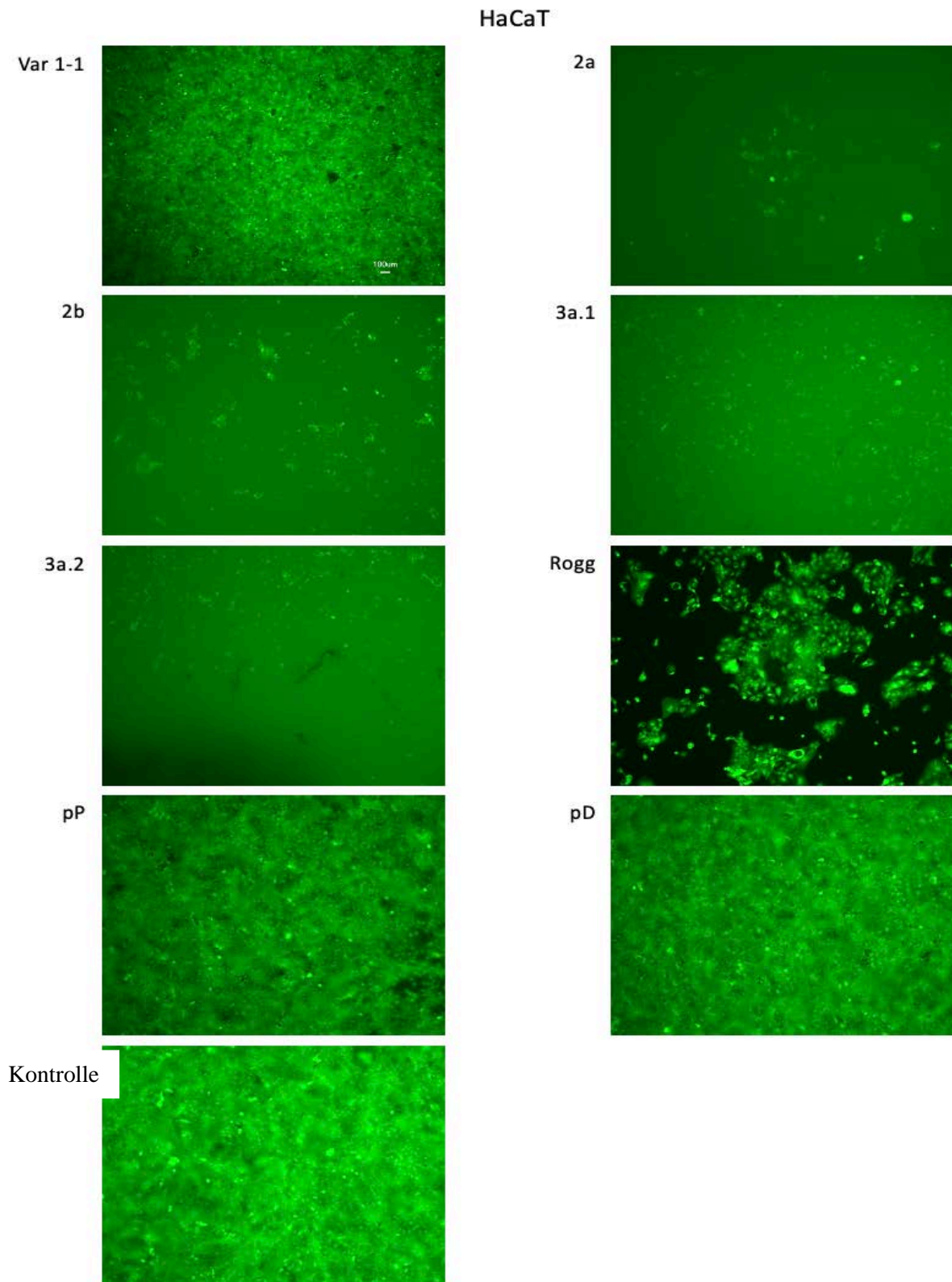


Abb. 10. Aufnahmen von HaCaT Zellen auf verschiedenen Materialien in Wells 5 Tage nach Zugabe der Zellen. Jedes Bild steht stellvertretend für mindesten 8 Aufnahmen pro Well und für Zellen auf mindestens 3 unterschiedlichen Stücken des Materials.

Anlagerung und Wachstum von Keratinozyten auf den Biomaterialien wurden mithilfe der HaCaT Zelllinie untersucht; die Ergebnisse werden in Abb. 10 gezeigt. Das

Wachstum von HaCaT-Zellen auf dem Prototyp-Biomaterial 1 ähnelte dem bei Kontrollzellen oder den kommerziell erhältlichen Materialien porcines Perikard und porcine Dermis. Überraschenderweise war das Wachstum von HaCaT auf Rogg nicht gut; es bildeten sich Zellklumpen sowie eine große Anzahl abgerundeter Zellen, was auf Zellablösung schließen lässt. Von den zu den Prototyp-Biomaterialien 2a, 2b, 3a.1 und 3a.2 zugegebenen Zellen lagerten sich nur sehr wenige an die Materialien an oder blieben nach 5 Tagen angelagert. Einige adhärente und proliferierende Zellen wurden in den Wells in Nachbarschaft zu den Prototyp-Biomaterialien beobachtet, jedoch deutlich weniger als bei Kontrollzellen zur selben Zeit.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei allen Prototyp-Biomaterialien nach der Zugabe von Zellen eine anfängliche Anlagerung an das Material beobachtet wurde, jedoch in viel geringerem Umfang als bei den transparenten Kollagenmembranen. Darüber hinaus kam es im Verlauf zu einer Ablösung der Zellen von den Prototyp-Biomaterialien, wohingegen in den Wells eine dauerhafte Anlagerung und beginnende Proliferation zu beobachten waren.

#### 5.5.1 Wachstum der Multizell-Sphäroide auf den Prototyp-Biomaterialien

Abb. 11 zeigt Sphäroide auf einem Prototyp-Biomaterial nach 6 h (Abb. 11: a und b). Trotz unterschiedlicher Parameter wie Konzentration der Sphäroide, Anzahl von Zellen im Sphäroid, Inkubationszeit, Vorbehandlung der Materialien gelang es nicht, die Zellen zur Anlagerung an die Prototyp-Biomaterialien zu bringen. Generell wurde innerhalb von 24 h eine Positionierung der Zellen neben und nicht länger auf den Materialien beobachtet (Abb. 11: c und d, Ansammlung der Sphäroide im Bereich über dem Biomaterial, das sich unterhalb der eingezeichneten Linien befindet). Diese Resultate ähnelten denen, die bei Zugabe individueller Zellsuspensionen zu den Prototyp-Biomaterialien beobachtet worden sind. Auffallend war, dass die gleichen Sphäroide bei porciner Dermis noch nach 72 h und längeren Zeiträumen auf dem Biomaterial angelagert blieben (Abb. 11: e und f). Ähnliche Resultate wurden bei Sphäroiden aus HUVEC und einer Mischung aus HFF und HUVEC beobachtet (Ergebnisse sind nicht gezeigt). Insgesamt konnten aus verschiedenen Zellen sowie aus gemischten Zelltypen hergestellte Sphäroide direkt auf den Prototyp-Biomaterialien platziert werden und lagerten sich anfänglich an diese an,

wurden jedoch nach 24 h nicht mehr auf den Materialien, sondern daneben  
vorgefunden.

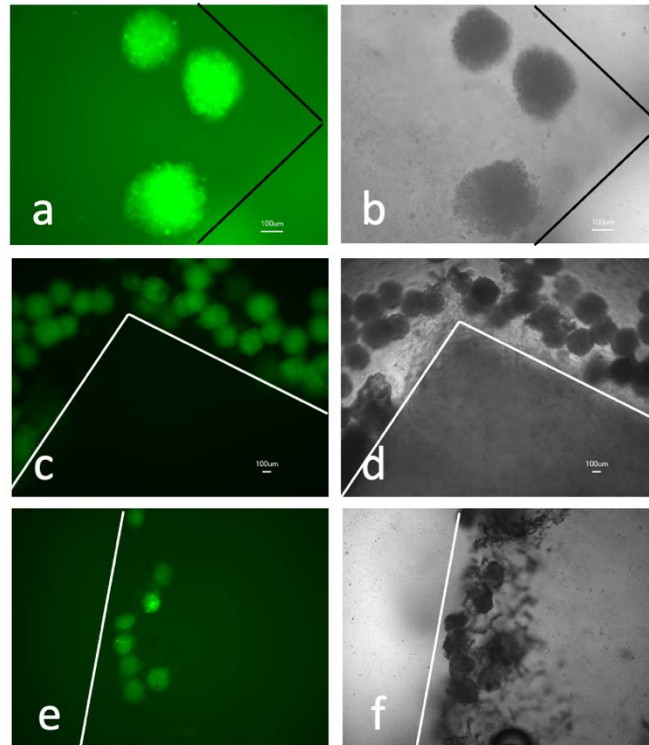


Abb. 11: Fluoreszenz- und Phasenkontrast-Aufnahmen von aus HFF bestehenden Sphäroiden mit den Biomaterialien nach 6 h und 72 h. Sphäroide mit 1000 Zellen/Sphäroid wurden mithilfe von HFF (mit Lebendzell-Färbemittel gefärbt) wie oben beschrieben hergestellt (siehe 4.7) und auf das Prototyp-Biomaterial 2a.1 platziert. Bild a) und b) sind Fluoreszenz- und Phasenkontrast-Aufnahmen von Sphäroiden auf 2a nach 6 h mit augenscheinlich an das Biomaterial (von den schwarzen Linien umgrenzt und auf der linken Seite) angelagerten Sphäroiden. Bild c) und d) zeigen dasselbe Material nach 24 h. Sphäroide finden sich im Well, jedoch nicht mehr auf dem Material. Der Umriss des Materials wird von den weißen Linien markiert, das Material befindet sich im unteren Bildbereich. Bild e) und f) sind repräsentative Aufnahmen von Sphäroiden auf porciner Dermis (pD) nach 72 h. Das Material befindet sich rechts von der weißen Linie.

## 5.7 PCR

### 5.7.1 Phänotypische Genexpression von HUVEC

Für Endothelzellen waren die wichtigen Marker die Expression von vWF, PECAM und die Induktion von E-Selektin. Abb. 11 zeigt die PCR Ergebnisse.

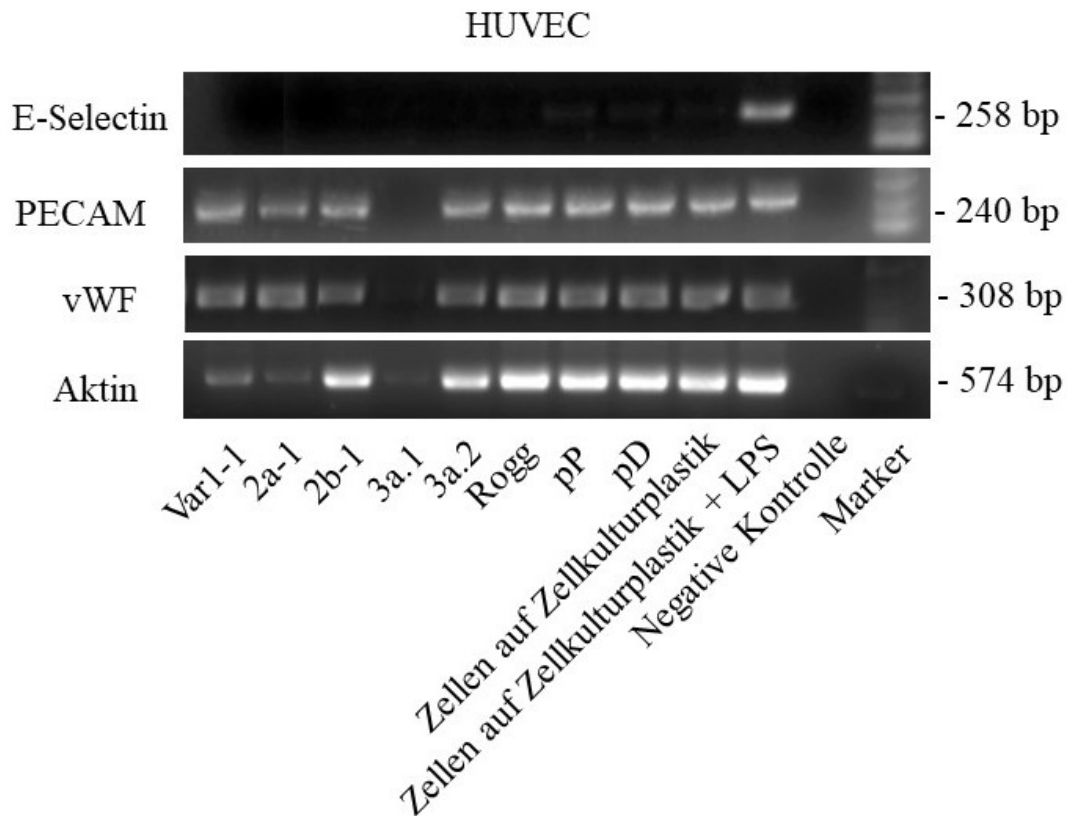


Abb. 12: PCR Ergebnisse für die Genexpression von auf Biomaterialien wachsenden HUVEC (Endothelzellen).

Abb. 12 zeigt die Ergebnisse für die HUVEC Genexpression auf den verschiedenen Materialien. Für das Housekeeping Gen Aktin wurden unterschiedliche Resultate beobachtet.

Ein niedrigeres Niveau der Genexpression für Aktin bei 1 (Var1-1), 2a (2a-1) und 3a.1 hat sich gezeigt. Für die RNA-Isolation und die cDNA-Synthese von den auf 3a.1 wachsenden Zellen wurde kein Aktin-Band beobachtet. Dieses Problem trat interessanterweise bei aus den kommerziell erhältlichen Materialien isolierter RNA/cDNA nicht auf. Die PCR-Ergebnisse zeigen, dass die Expression von vWF und PECAM bei allen Materialien ähnlich war und dass es bei keinem der Materialien zur Expression von E-Selektin durch die Zellen kam. Diese Beobachtungen belegen, dass die Endothelzellen auf den verschiedenen Materialien eine normale Genexpression zeigten, und bestätigen die IF Ergebnisse, dass die Materialien keine Endotoxine enthalten. Die Zellen zeigten eine normale Genexpression auf den Materialien und induzierten E-Selektin, wenn Endotoxin (LPS) dem Medium hinzugegeben wurde.

## 5.7.2 Phänotypische Genexpression von HaCaT

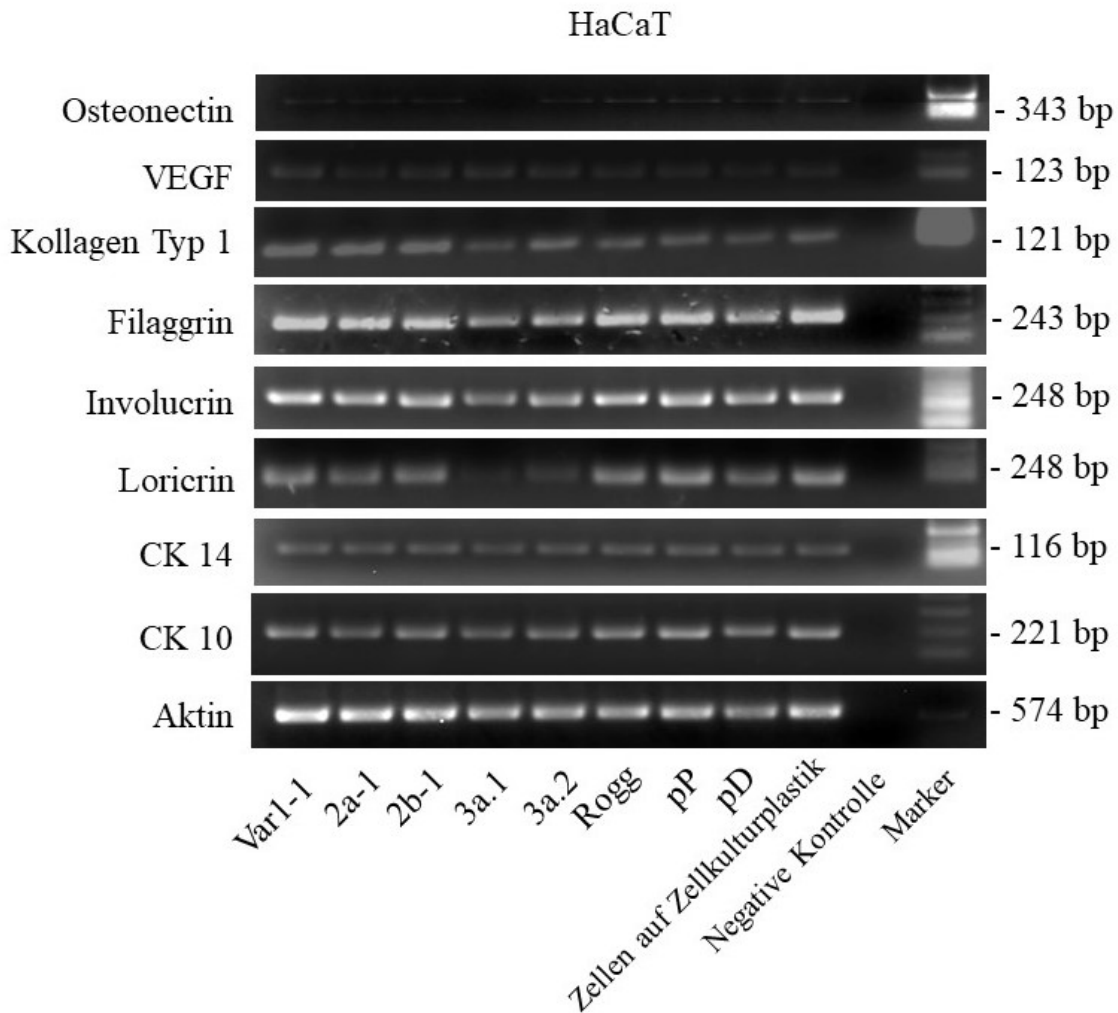


Abb. 13: PCR Ergebnisse für die Genexpression von auf Biomaterialien wachsenden HaCaT (Keratinocyten).

Abb. 13 zeigt die Ergebnisse für Keratinocyten repräsentiert durch die humane HaCaT-Zelllinie. Die Isolation von RNA und die Synthese von cDNA wurde durch das bei allen Proben beobachtete Aktin-Band bestätigt. Im Allgemeinen exprimieren sie wenig VEGF und kein Osteonectin (wird von Fibroblasten während der Wundheilung in der Haut produziert). Die Ergebnisse der PCR zeigen, dass HaCaT-Zellen auf allen untersuchten Materialien ein ähnliches Genexpressionsmuster zeigen wie Zellen auf Plastik. Insgesamt wurde kein wesentlicher Unterschied zwischen der Genexpression von auf den Materialien wachsenden Keratinocyten und der von auf Plastik wachsenden Kontrollzellen festgestellt.

### 5.7.3 Phänotypische Genexpression von HFF

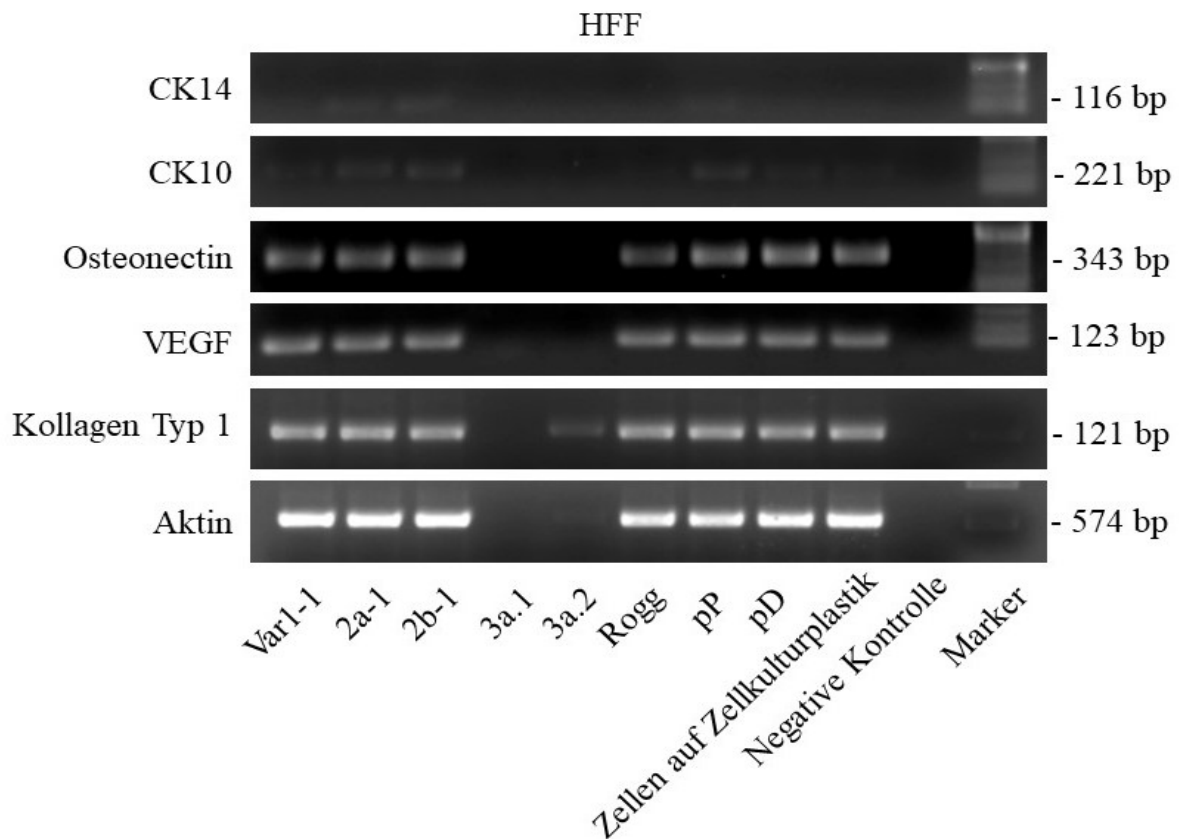


Abb. 14: PCR Ergebnisse für die Genexpression von auf Biomaterialien wachsenden HFF (Fibroblasten).

Wie in Abb. 14 bei HFF (primäre humane Fibroblasten) ersichtlich, wurde die Expression von Aktin auf allen Materialien außer 3a.1 und 3a.2 beobachtet. Bei den übrigen Materialien zeigt sich bei den HFF eine typische Fibroblasten-Genexpression für Kollagen, VEGF und Osteonectin. Es wurde keine Expression von Zytokeratin-Genen beobachtet. Die HFF-Zellen zeigen also eine normale phänotypische Expression auf den Prototyp-Biomaterialien.

### 5.7.4 Phänotypische Genexpression von MRC-5



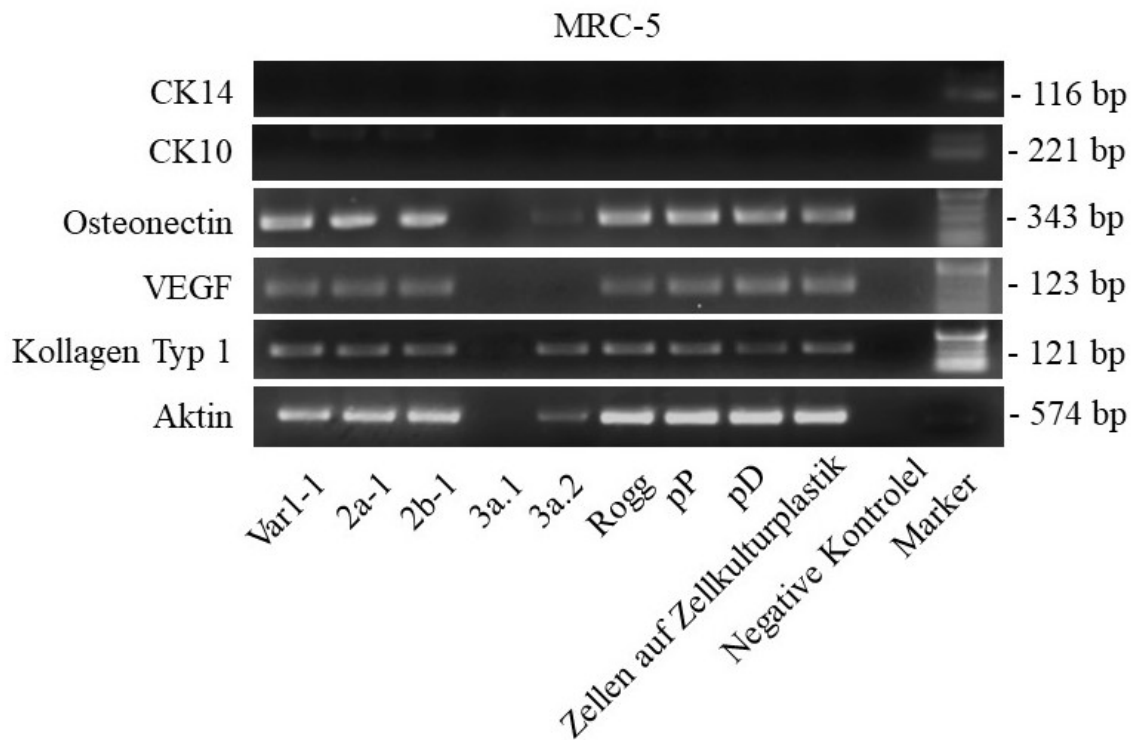


Abb. 15: PCR Ergebnisse für die Genexpression von auf Biomaterialien wachsenden MRC-5 (Fibroblasten).

Wie bei der Fibroblasten-Zelllinie MRC-5 in Abb. 15 gezeigt ist, wurde auf allen Materialien Aktin-Expression beobachtet außer auf (3a.1) und in geringerem Maß auf (3a.2). Die MRC-5-Zellen zeigen eine typische Fibroblasten-Genexpression für Kollagen, VEGF und Osteonectin auf den verschiedenen Materialien. Die Expression von Zytokeratin-Genen CK10 und CK14 wurde nicht beobachtet. Die MRC-5-Zellen gleichen somit den primären HFF-Zellen und zeigen eine normale phänotypische Expression von Fibroblasten Zellen auf den Prototyp-Biomaterialien.

## 5.8 Das Angiogenese-stimulierende Potential

Das Material 2a (2a.1) wurde für die Kokultur ausgewählt, da es das beste Wachstum für HFF und HUVEC zeigte und die Zellen am längsten an diesem Material angelagert blieben. Wie in Abb. 16 zu sehen zeigten HUVEC in Kokultur mit HFF auf Zellkulturplastik am Tag 5 kapillarähnliche Strukturen, die sich am Tag 10 vermehrt hatten. Am Tag 5 waren keine kapillarähnlichen Strukturen auf dem Material 2a.1 zu beobachten. Das Material begann, sich aufzulösen, jedoch waren noch Zellen zu erkennen. Auch am Tag 10 waren keine kapillarähnlichen Strukturen

zu sehen. Unter den gleichen Bedingungen konnten hingegen kapillarähnliche Strukturen auf porciner Dermis beobachtet werden.

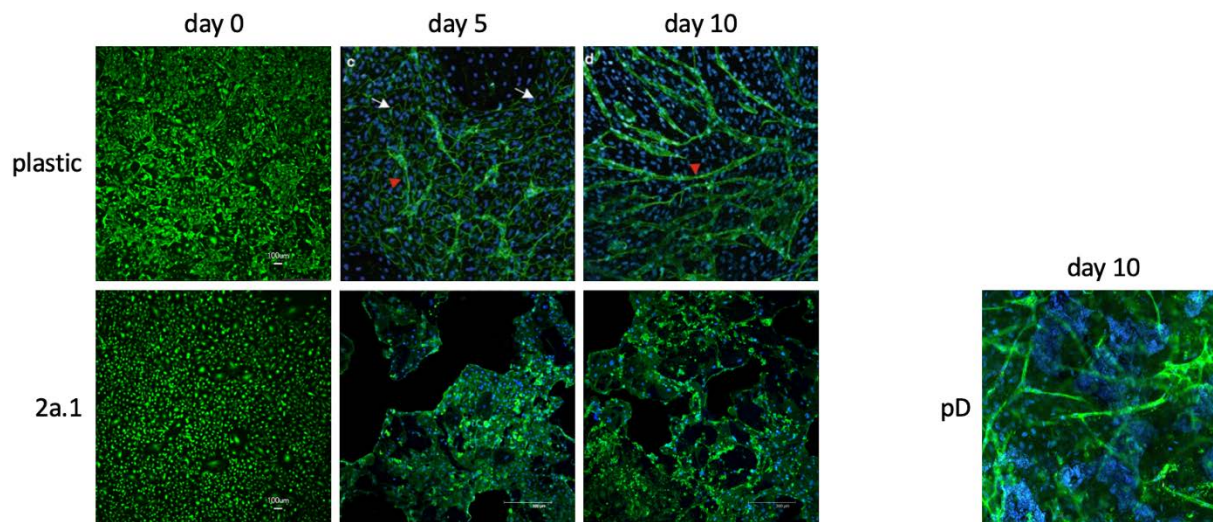


Abb. 16: Aufnahmen einer Kokultur von HFF und HUVEC auf Zellkulturplastik und Prototyp-Biomaterial 2a (2a.1) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe von Angiogenese induzierenden Substanzen. Rote Pfeile markieren von HUVEC ausgebildete kapillarähnliche Strukturen, weiße Pfeile zeigen Anhäufungen von HFF mit blau gefärbten Nuklei. Die Aufnahmen sind repräsentativ für die von drei unterschiedlichen Stücken vom Biomaterial 2a (2a.1) angefertigten. Das rechte Bild zeigt die Kapillarbildung in einer Kokultur auf porciner Dermis (pD) an Tag 10.

## 6. Diskussion

Dieses Projekt war darauf ausgerichtet, festzustellen, ob die Biomaterialien den Standards entsprechen und Ergebnisse zeigen, die ihre weitere Verwendung in in-vivo-Studien unterstützen oder nicht, und demzufolge, ob sie bei der Wundheilung effizient sind. Die Sterilität von Biomaterialien ist für die Studien mit Zellen essenziell. Die Biomaterialien wurden aus biologischen Proben hergestellt, die große Mengen an Mikroorganismen enthalten. Zudem kann die Handhabung zu Kontamination führen. Um sicherzustellen, dass die vom Projektpartner erhaltenen neu synthetisierten Prototyp-Biomaterialien steril waren, und durch Schneiden der Materialien keine Kontamination verursacht wurde, wurde ein Sterilitätstest durchgeführt. Eine längere Inkubationszeit bis 96 Stunden wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass selbst eine sehr kleine Menge an Mikroorganismen nachweisbar war. Drei Stücke wurden zufällig ausgewählt. Die Ergebnisse des Sterilitätstests zeigten, dass die Biomaterialien steril waren, durch die Aufteilung in kleinere Stücke nicht kontaminiert wurden und für weitere Studien mit Zellen verwendet werden konnten. In unserer Studie hatten wir Biomaterialien, die für die



Wundheilung entwickelt wurden. Zur Optimierung dieses Zwecks wurden einige Materialien: GAGs und PAC, dem Kollagen zugesetzt.

## 6.1 Einfluss der GAGs

Die Effizienz der Zugabe von GAGs, als wichtige Komponenten der extrazellulären Matrix, zu den neuartigen Biomaterialien wurde wohl in zahlreichen Studien untersucht. In einer Studie (Schuurmans et al. 2021) wurden die Hydrogelgerüste auf Basis von Hyaluronsäure-Methacrylat (HAMA) und Chondroitinsulfat-Methacrylat (CSMA) für Tissue-Engineering-Anwendungen untersucht, und haben sich als geeignete und vielseitige Biomaterialien für biomimetische Hydrogelgerüste erwiesen. Ihre Anwendung ist, obwohl nicht darauf beschränkt, stark auf Knorpel-, Knochen- und kardiale Tissue-Engineering-Anwendungen ausgerichtet.

Die einzigartige Fähigkeit von sulfatierten GAGs, Komplexe mit Proteinen zu bilden, legt nahe, dass Matrices mit einem hohen Gehalt an sulfatierten GAGs ein wirksames Mittel zum lokalisierten Abfangen von Zytokinen in-vivo darstellen können. Diese Möglichkeit bietet vielversprechende neue Biomaterialeigenschaften, z. B. das Einfangen und die effektive Entfernung von proinflammatorischen Zytokinen bei der biomaterialgestützten Wundheilung, und die Umleitung der Wachstumsfaktorgradienten, die die Gewebeformung und -regeneration in-vivo steuern (Freudenberg et al. 2016).

Mathews et al. (2014) entwickelte neuartige biomimetische Tripolymergerüste unter Verwendung eines ECM-Proteins, Kollagen Typ 1, ein ECM-Glykosaminoglykan, Hyaluronsäure, und ein natürliches osteokonduktives Polymer, Chitosan. Unter Verwendung humaner aus Knochenmark gewonnener mesenchymaler Stammzellen unterstützten die Gerüste die Zelladhäsion, verbesserten die Zellproliferation, förderten die Zellmigration, zeigten eine gute Zellebensfähigkeit und ein osteogenes Potenzial (Mathews et al. 2014).

Förster et al. (2012) zeigte die verbesserte Adhäsion, Proliferation und die Ausbreitung der Osteoblasten, Osteoklasten und ihre Vorläuferzellen auf mit Kollagen I, HA und CS beschichteten orthopädischen Implantaten aus Titan oder Hydroxylapatit in Tiermodellen, welches die periimplantäre Knochenbildung fördert.

Vandrovcová et al. (2011) zeigte, dass Collagen I/CS-Beschichtungen die MG 63-Zellproliferation fördern, die Zelladhäsion verbessern und die osteogene Zelldifferenzierung verstärken. In anderer Studie (Manfrini et al. 2015) wurde ein aus

HA/Kollagen/Chondroitin-Sulfat zusammengesetztes Biomaterial unter Verwendung einer gentechnisch veränderten humanen Zelllinie Saos-eGFP untersucht.

Fluoreszenzdaten zeigten, dass das analysierte Gerüst in der Lage war, die Zelladhäsion und Proliferation in ähnlicher Weise zu begünstigen, wie es in der Kontrolle, Zellkulturplastik, gezeigt wurde.

Die Prototyp-Biomaterialien wurden in unserem Projekt geprüft, ob sie zytokompatibel sind, und um eine mögliche Freisetzung toxischer Verbindungen auszuschließen, wurde ein auf ISO10993-5 basierender Toxizitätsassay zur Messung der metabolischen Aktivität der Zellen (ein Indikator für lebensfähige Zellen) durchgeführt. Zusätzlich wurde die L929 Zelllinie verwendet, da diese oft die einzige in Toxizitätsstudien für Biomaterialien genutzte Zelllinie ist und von ISO10993 empfohlen wird. Bei diesem Assay wurde die Toxizität der Biomaterialien mithilfe von Resazurin untersucht. Resazurin wird auch AlamarBlue genannt, ist ein ungiftiger, wasserlöslicher blauer Farbstoff, welcher als pH-Indikator und Redoxindikator fungiert, der bei Reduktion irreversibel zum rosafarbenen, fluoreszierenden Resorufin umgesetzt wird (Twigg 1945) und zur Messung der Zellviabilität und der Zytotoxizität von Stoffen eingesetzt wird.

Unsere Ergebnisse bzgl. der Materialien 1 (Kollagen-Gerüst), 2a (Kollagen-Gerüst mit HA) und 2b (Kollagen-Gerüst mit CS) zeigten, dass die Proliferation und die metabolische Aktivität der Zellen MRC-5 (humane Fibroblasten-Zelllinie), HFF (primäre humane Vorhaut-Fibroblasten), HaCaT (humane Keratinozyten-Zelllinie) und HUVEC (primäre humane Nabelschnur-Endothelzellen) ähnlich waren, wie in der Kontrolle gezeigt wurde. Das war nicht der Fall bei der Zelladhäsion auf den Biomaterialien. Die HFF adhärten auf den Biomaterialien 1, 2a, und 2b, allerdings in geringerer Anzahl als in der Kontrolle, und meistens in gerundeter Form, welche die Ablösung und Absterben der Zellen signalisiert. Ob die geringe anfängliche Anlagerung der Zellen auf den Prototyp-Biomaterialien auf eine mögliche Freisetzung toxischer Substanzen zurückzuführen ist, sei anhand der Ergebnisse des Toxizitätsassays ausgeschlossen. Ebenfalls haben anscheinend die Oberflächenbeschaffenheit und die Porosität der Prototyp-Biomaterialien keinen großen Beitrag zu der Zelladhäsion geleistet.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die Prototyp-Biomaterialien Endotoxin beinhalten, haben wir das Endotoxinassay durchgeführt. Endotoxine oder die

sogenannten Lipopolysaccharide (LPS) sind Stoffe, die die Bakterien herstellen, und bei den Säugetieren Fieber, Entzündung, Zell- u. Gewebeschäden bis hin zum septischen Schock hervorrufen können (Saluk-Juszczak und Wachowicz 2005). Die LPS selbst in sehr geringen Mengen können in vitro durch vermehrte Expression von E-Selectin; ein Zelladhäsionsmolekül; bei Endothelzellen nachgewiesen werden (Unger et al. 2014). In diesem Assay wurde die Expression von E-Selectin bei HUVEC induziert und mittels immunfluoreszenter Färbung evaluiert. E-Selektin wird auf Endothelzellen in vitro in maximal 4 h exprimiert, und es sind nur Femtogramm von Endotoxin nötig, um eine durch Immunfluoreszenzfärbung sichtbare Induktion zu verursachen.

Die Endothelzellen HUVEC wiesen die Expression des spezifischen Moleküls E-Selectin nach der Induktion durch LPS auf (siehe 5.4). Dies weist einerseits die erhaltene Syntheseleistung dieser Zellen nach, andererseits ist es essenziell festzustellen, ob die Prototyp-Biomaterialien Endotoxine enthalten. Die Resultate in diesem Assay zeigten, dass alle Materialien frei von Endotoxin waren.

Andere Methoden zum Endotoxin-Nachweis in anderen Studien variierten sich von biologischen Detektionstechniken wie RPT (Rabbit pyrogen test) und LAL (Limulus amoebocyte lysate assay); welche als Goldstandard gelten, bis hin zu elektronischen Biosensoren und fluoreszenzbasierte Techniken (Schneier et al. 2020). Es wird ständig versucht, LAL als Goldstandard zu behalten, welches auf Extrakte von Pfeilschwanzkrebse basiert. Diese werden gefangen, und fast ausgeblutet, und dann wieder overboard geworfen. Mit der Verbesserung der Technologie wurden alternative Techniken entwickelt, um den Druck auf die Pfeilschwanzkrebs zu verringern. Wir haben mit unserer Methodik nachgewiesen, dass die Detektion von Endotoxin einerseits effektiv und kostengünstig sein kann, andererseits ohne Tierleiden erfolgen kann.

Zu beachten ist die Tatsache, dass drei verschiedene, kommerziell erhältliche Kollagenmembranen: pP, pD und Rogg als Kollagenvlies hinzugefügt und in allen weiteren Untersuchungen verwendet wurden. Zellen wuchsen und vermehrten sich auf allen diesen Materialien.

Um zu beobachten, wie sich die Zellen auf den Prototyp-Biomaterialien über einen längeren Zeitraum (72 h) verhalten, ob sie wachsen und proliferieren, haben wir das Lebendzell-Färbemittel Calcein-AM verwendet, um die vitalen Zellen zu markieren und die durch Fluoreszenzmikroskopie zu evaluieren. Voraussetzung zur

Fluoreszenz ist die Enzymaktivität der zellständigen Esterase und somit die Viabilität der Zelle. Auch die Integrität der Zellmembran als weiteres Zeichen der Viabilität ist nötig, da sonst das gebildete fluoreszierende Produkt nicht in der Zelle verbleiben und in die Umgebung austreten würde (Neri et al. 2001). Selbst sehr wenige, lebende Zellen lassen sich dadurch sehr gut auf der Matrix erkennen. Der toxische Effekt des Calcein-AM tritt darüber hinaus erst mehrere Stunden nach Zugabe zu den Zellen auf, wodurch ein genügend großes Zeitfenster zur Auswertung und Untersuchung der jeweiligen Probe unter dem Fluoreszenzmikroskop verbleiben. Die beste Zelladhäsion und Proliferation wurde auf den Prototyp-Biomaterialien 1 und 2a gezeigt, und war die der Kontrolle annähernd, welches mit den oben genannten Studien korreliert.

Wir haben verschiedene Methoden zur Erhöhung der Anzahl an die Materialien adhärenter Zellen untersucht. Diese reichten von der direkten Zugabe von Zellen in verschiedenen Konzentrationen und Volumen auf die Oberfläche des Materials über die separate Zugabe von Zellen und Materialien in Wells zur Beschichtung von Materialien mit Adhärenzfaktoren wie Gelatine oder Fibronectin vor der Zugabe von Zellen sowie der direkten Zugabe von Zellsphäroiden aus Einzelzelltypen oder multiplen Zelltypen zu den Biomaterialien.

Es wurde gezeigt, dass 3-D Zellsphäroide, besonders in vitro generierte Multizell-Sphäroide, Geweben sowohl bezüglich der Zellstrukturen als auch -funktionen sehr ähnlich sind.

Ganesan et al. (2017) entwickelte modifizierte dreidimensionale Sandwich-Kokultur, um das Crosstalk zwischen primären Endothelzellen und glatten Muskelzellen zu analysieren. Dabei wurde festgestellt, dass mehrere wichtige Aspekte eines in-vivo-Blutgefäßes nachahmt werden können. Schoop et al. (1999) untersuchte HaCaT-Zellen in organotypischen Kokulturen auf Kollagengelen mit humanen dermalen Fibroblasten, und stellte fest, dass die HaCaT Zellen in so einer 3D-Kokultur in Koordination mit den Fibroblasten und abhängig von dieser (Parakrin) in der Lage waren, ein bemerkenswert gut strukturiertes und differenziertes Plattenepithel bei weiterer Kulturzeit von bis zu 3 Wochen zu entwickeln.

Bei unseren Untersuchungen haben wir die HFF und HUVEC genutzt, da diese Zellen für die frühen Stadien der Wundheilung sowie für die Bildung kapillarähnlicher Strukturen von essenzieller Bedeutung sind (Heller et al. 2020; Alekseeva et al.

2014). Wir haben Sphäroide bestehend aus einem Zelltyp oder Multizell-Typen (primäre Fibroblasten HFF und Endothelzellen HUVEC) wurden auf ein Prototyp-Biomaterial aufgebracht, und die Migration und Invasion der Zellen im Material wurde mittels fluoreszentem 3-D Live-Cell Imaging oder Konfokalmikroskopie verfolgt. Der Vorteil der Sphäroide liegt in der Möglichkeit der direkten Platzierung von Zellen an spezifischen Stellen auf der Membran sowie in der Möglichkeit der direkten Interaktion individueller Zelltypen mit anderen Zelltypen (interzelluläre Kommunikation), wie es auch bei der Migration in-vivo geschieht (Herzog et al. 2014; Ganesan et al. 2017). Dieses System stellt eine signifikante Annäherung an die in-vivo Situation und Bedingungen dar und kann so der Identifikation des optimalen Materials für die Migration der Zellen vom Gewebe auf das Material in einer Wundsituation dienen (Lesiak et al. 2019). Die Inkubationszeit lag zwischen einem Tag und vier Wochen. Obwohl es oft zu einer Adhäsion kam, wurde in den meisten Fällen bei allen Zelltypen keine Proliferation und allmähliche Ausbreitung auf das Material beobachtet.

Die Beschichtung der Prototyp-Biomaterialien mit Adhärenzfaktoren verstärkte die anfängliche Anlagerung, jedoch verringerte sich die Anzahl der Zellen auf den Materialien im Lauf der Zeit. In den meisten Fällen waren die abgelösten Zellen nicht abgestorben, sondern hatten sich an das um die Biomaterialien herum befindliche Zellkulturplastik angelagert und normal vermehrt.

## 6.2 Einfluss der Proanthocyanidine

Proanthocyanidine, wie in 1.5 beschrieben, sind Substanzen mit vielversprechenden gesundheitlichen Eigenschaften wie z.B die antiinflammatorische, antioxidative Aktivität und die Fängerkapazität für freie Radikale und Verbesserung der endothelialen Funktion (Shejawal et al. 2020; Esposito et al. 2019; Caton et al. 2010). Ebenfalls ist die Inkorporation von PAC in den Biomaterialien ist vielversprechend. Huang et al. (2020) zeigte in einer Studie die Fähigkeit von PAC, die Funktion der menschlichen Parodontal Ligament-Fibroblasten zu modulieren, und zur Knochenbildung in einem entzündlichen Milieu beizutragen, indem es die Hemmung der Osteogenese-bezogenen Gen- und Proteinexpression, der alkalische Phosphatase-Aktivität umkehrt und den NF- $\kappa$ B-Signalweg unterdrückt. Somit kann PA ein potenzielles Behandlungsmittel für die parodontale Knochenregeneration

sein. In einer Studie wurde gezeigt, wie das PAC die Migration von den menschlichen dermalen Fibroblasten in den frühen Stadien der Wundheilung fördert, die mitochondriale Bioenergetik (Atmungskette und ATP-Produktion) und die Expression wichtiger Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) (Integrin-  $\beta_1$  und Kollagen Typ I  $\alpha_2$ -Kette) stimuliert (Esposito et al. 2019).

Laut der Angaben des Projektpartner wurde PAC als wasserlöslicher Quervernetzer verwendet, um die Beständigkeit und die Biokompatibilität der untersuchten Kollagenvliese zu verbessern. Die Vernetzungsreaktion beruht auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den phenolischen Hydroxylgruppen des PACs und der amidischen Carbonylgruppen des Kollagens. Deshalb sollte kein toxisches Nebenprodukt während der Vernetzung entstehen. Allerdings haben wir beim Toxizitätsassay festgestellt, dass die metabolische Aktivität und die Zellproliferation der Zellen (L929, HaCaT und MRC-5) bei den mit PAC funktionalisierten Prototyp-Biomaterialien 3a.1 und 3a.2: sehr limitiert war, wobei dies beim 3a.1 immenser war, und die Endothelzellen HUVEC weniger beeinflusst erschienen. Die höhere Konzentration von PAC im 3a.1 mag eine Erklärung dafür sein, im Vergleich zum 3a.2. Ebenfalls waren die Zelladhäsion und Wachstum auf den Prototyp-Biomaterialien sehr eingeschränkt. Ob diese Ergebnisse auf unsterile Biomaterialien oder einen Inhalt vom Endotoxin ist durch unsere Sterilitätstest und Endotoxinassay ausgeschlossen.

Wie in 4.4 erklärt wurde, wurde der Effekt von reinem PAC auf die Lebensfähigkeit der verschiedenen Zelltypen untersucht, um die unerklärlichen Resultate des Zellviabilitätstests bei den Materialien 3a.1 und 3a.2 zu bestätigen. Es wurde tatsächlich festgestellt, dass die Endothelzellen HUVEC und die Keratinozyten HaCaT resistenter gegenüber PAC erschienen, wohingegen die Fibroblasten L929 und MRC-5 am empfindlichsten zu sein schienen. Es wurde in Studien nachgewiesen, dass PAC die Angiogenese über die Herunterregulierung sowohl der VEGF-Produktion als auch der Angiopoietin-Signalübertragung hemmt und die Apoptose induziert und somit eine antitumorigene Wirkung besitzt (Huang et al. 2012; Katiyar und Athar 2013; Wu et al. 2020). Darauf könnte die hohe Empfindlichkeit der Tumorzelllinien (L929 und MRC-5) gegenüber PAC beruhen. Es könnte auch sein, dass die Gewebszellen nicht ausreichend ausgestattet sind, wie die Endothelzellen, um mit solchen Stoffen wie PAC direkt umzugehen. Während in

anderen tierbasierten Studien untersucht wurde, wie PAC durch seinen antioxidativen und Radikalfängeraktivitäten und die Hemmung der Proteinkinase C und Nekrosefaktor- $\kappa$ B die endotheliale Dysfunktion in hyperglykämischer Situation verhindert (Jiang et al. 2015; Pinna et al. 2017). Dies könnte uns einen Hinweis geben, dass die Funktion von Endothelzellen (HUVEC) durch PAC nicht eingeschränkt wird, vielmehr in Hinsicht auf die Barriere-Funktion zwischen Blut und Gewebe und die Regulation des Blutdruckes aufrechterhalten werden könnte.

### 6.3 Die Genexpression

Ein essenzieller Teil unserer Arbeit beschäftigte sich mit der Evaluierung der phänotypischen Genexpression bestimmter Marker von den verschiedenen auf den Materialien wachsenden Zellen, wobei der Grad der Expression ein Indikator der Biokompatibilität und ein Maß für die Stimulation und Unterstützung der phänotypischen Differenzierung und Funktionalität der Zellen ist. Die Schwierigkeit, genügend Zellen auf den Prototyp-Biomaterialien zum Wachsen zu bringen, machte Untersuchungen mit Immunassays unmöglich, jedoch war die geringere Anzahl von Zellen ausreichend für die Analyse der Genexpression mittels RT-PCR.

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion ist eine in der Molekularbiologie benutzte aus zwei Methoden bestehende Kombination, und zwar aus der Nutzung der Reversen Transkriptase (RT) und der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). RT-PCR wird genutzt, um RNA nachzuweisen, wie z. B. die Genexpression von spezifischen Genen in Zellen, Geweben und Blutserum oder das Genom von RNA-Viren (Scagnolari et al. 2017; Devlin 2011).

Wir sind davon ausgegangen, dass Substanzen in den Prototyp-Biomaterialien wie Kollagen und Proanthocyanidine die Reaktionen für RNA Isolation, cDNA Synthese und PCR Reaktionen inhibierten. Kim et al. (2000) beschrieb die Hemmung der PCR durch Kollagen. Diese Hemmung war nicht bei einem bestimmten Primersatz festzustellen und konnte teilweise durch Anpassung der Konzentration von Magnesiumionen in der Reaktionsmischung umgekehrt werden. Die RNA-Extraktion aus Hautgewebe ist eine Herausforderung, da die Hyaluronsäure-Kollagen-Matrix extrem schwer zu homogenisieren ist (Reimann et al. 2019). In dieser Studie wurden verschiedene Methoden der RNA-Extraktion untersucht. Die optimale Strategie bestand darin, die Probe in RLT-Lysepuffer aus dem RNeasy Fibrous Tissue Kit



kombiniert mit Beta-Mercaptoethanol zu sammeln, zu lagern und zu homogenisieren. Wang und Stegemann (2010) zeigte in Bezug auf die RNA-Extraktion, dass die RNA-Quantität, -Qualität und -Reinheit bei Kollagenbiomaterialien mit Anwendung Cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB)-Methode vergleichbar oder besser war als auf Guanidiniumthiocyanat basierende Methoden (TRIzol und Qiagen). In einer Studie wurde die Fähigkeit der Flavonoide, sich an RNA zu binden, bestätigt (Nafisi et al. 2009). Wir gehen davon aus, dass PAC und Kollagen in den Prototyp-Biomaterialien mögliche Ursache für die unerklärlichen und kontroversen Ergebnissen bei RNA-Isolierung; die Quantität und Reinheit der isolierten RNA waren sehr unterschiedlich. Wir konnten durch Erhöhung der Konzentration von Beta-Mercaptoethanol, welches ein stark reduzierendes Reagens ist, das RNase irreversibel denaturiert, ein reproduzierbares PCR Ergebnis erreichen.

Im Rahmen der Untersuchung der Genexpression ist die Agarose-Gelelektrophorese zum Einsatz gekommen. Bei der wird ein Agarosegel in einen Ionenpuffer gegeben und ein elektrischer Strom angelegt. Dieser erzeugt ein elektrisches Feld, das die negativ geladene DNA durch die Gelmatrix in Richtung der positiven Elektrode bewegt. Dies trennt die DNA - Fragmente entsprechend ihrer Größe, da sich kleinere Fragmente schneller durch das Gel bewegen. Dies führt zu Banden von DNA-Fragmenten mit einer bestimmten Basenlänge, die durch Verwendung einer standardisierten DNA-Leiter identifiziert werden können, die DNA-Fragmente bekannter Größen enthält. Das peqGREEN, das dem Elektrophoresepuffer zugesetzt wird, interkaliert mit der DNA und fluoresziert, wenn es UV-Licht ausgesetzt wird. Die Fluoreszenz von peqGREEN verstärkt sich nach Interkalation mit der DNA um mehrere Faktoren, so dass die DNA-Banden im Gel sichtbar gemacht werden können. Die HUVEC zeigten eine normale Genexpression (vWF und PECAM), allerdings war die Expression vom Housekeeping Gen Aktin unterschiedlich und niedriger als die der kommerziell erhältlichen Biomaterialien. Es ist bekannt, dass die Keratinozyten unterschiedliche Level von Zytokeratinen sowie verschiedene Differenzierungsmarker wie Lorikrin, Involukrin, Filaggrin und Kollagene exprimieren (Sanz-Gómez et al. 2020). Dies entspricht unserer Ergebnisse bei der Genexpression der HaCaT. Nur sehr geringe Menge an VEGF wurde exprimiert, und keine Osteonektin-Expression konnte festgestellt werden.



Fibroblasten produzieren Kollagen, VEGF und Osteonektin während der Wundheilung und sollten keine Zytokeratine exprimieren (Ueno et al. 2015; Ito et al. 2007; Wasi et al. 1984). Die HFF zeigten eine typische Fibroblasten-Genexpression bis auf die Expression von Aktin bei den Prototyp-Biomaterialien, die PAC enthielten. Da die RNA Isolation und cDNA Synthese aus den Zellen auf diesen Materialien mehrfach versucht und es hat nicht funktioniert. Ebenfalls wie die primären HFF zeigte die Fibroblasten-Zelllinie MRC-5 eine normale phänotypische Genexpression, keine Aktin-Genexpression bei dem Prototyp-Biomaterial 3a.1 und eine verringerte bei 3a.2.

Aktine sind ein wesentlicher Bestandteil des Zytoskeletts und spielen eine entscheidende Rolle in einer Vielzahl von zellulären Prozessen, einschließlich Zellmigration, Zellteilung und der Regulation der Genexpression. Diese Funktionen werden der Fähigkeit von Aktin zugeschrieben, Filamente zu bilden, die sich je nach den Bedürfnissen der Zelle schnell an- und abbauen können (Bunnell et al. 2011). Die fehlende Aktin-Expression, die Problematik mit der RNA-Isolation, cDNA Synthese und PCR Reaktionen könnten wahrscheinlich, wie bei den oben genannten Studien, auf PAC-Freisetzung aus den Prototyp-Biomaterialien, den enthaltenen Kollagenen oder unbekanntem Stoffen in den Prototyp-Biomaterialien beruhen.

## 6.4 Angiogenese

Die Ausbildung eines schnell wachsenden, strukturierten und funktionellen Gefäßsystems im Biomaterial nach der Implantation ist essenziell für das Wachstum und Überleben der anderen in das Biomaterial migrierenden Zelltypen sowie für die Geweberegeneration in-vivo (Saberianpour et al. 2018). Essenziell ist dabei die Expression von VEGF (Vascular endothelial growth factor), welcher einen Wachstumsfaktor mit wichtiger proangiogener Aktivität darstellt, der eine mitogene und antiapoptotische Wirkung auf Endothelzellen hat, die Gefäßpermeabilität erhöht, die Zellmigration fördert u.v.m. (Melincovici et al. 2018).

Bei unseren Untersuchungen haben wir den VEGF zu dem Kulturmedium hinzugefügt, um die in-vivo Situation zu simulieren. Kokulturen von HFF und HUVEC auf dem meistversprechenden Material 2a wurden zu diesem Zweck verwendet. Wir konnten keine Bildung kapillarähnlichen Strukturen feststellen. Es wurde

nachgewiesen, dass sich Mikrokapillare *in vitro* in 3-D Fibroin Biomaterialien mit Kokulturen von Osteoblasten und Endothelzellen entwickeln (Unger et al. 2010; Unger et al. 2009). Weinandy et al. (2014) zeigte, dass die Co-Kultivierung von HFFs die HUVECs ausreichend bei der Bildung von kapillarähnlichen Strukturen unterstützte. Mikrokapillare bilden sich ebenfalls in 2-D in Anwesenheit von Endothelzellen in Kokultur mit Fibroblasten in einem gewebeähnlichen Kollagenkonstrukt (Heller et al. 2020; Alekseeva et al. 2014). Ebenfalls essenziell ist das Biomaterial selbst, ob es die Angiogenese fördert. Dies kann besonders durch die Zusammensetzung und der Oberflächenbeschaffenheit v.a. die poröse Struktur beeinflusst wurden. Bobbert und Zadpoor (2017) untersuchten die Auswirkungen der porösen Biomaterialarchitektur einschließlich Porengröße, Porenform und die Faserorientierung u.a. auf die Effizienz der Angiogenese, und stellten fest, dass Poröse Biomaterialien mit einer Porengröße von mehr als 400 µm scheinen für die Angiogenese von Vorteil zu sein. Blutgefäße liefern die Zellen und Nährstoffe, die für den Knochenaufbau benötigt werden. Die Porengröße unserer Prototyp-Biomaterialien ist nicht angegeben. Interessanterweise hatte ein erhöhter PAC-Anteil gemäß des Sachberichts vom Projektpartner kleinere Porengröße zum Ergebnis. Dies bedeutet, dass PAC nicht nur bioaktiv ist, sondern morphologische Effekte auf die Biomaterialien hat.

Park et al. (2012) zeigte, dass Hyaluronsäure, welche im Prototyp-Biomaterial 2a inkorporiert ist, die Angiogenese stimuliert. Andere Studien deuteten auf eine starke und spezifische synergistische Wechselwirkung zwischen HA und VEGF bei der Stimulierung der in-vivo-Angiogenese hin (Lu et al. 2019). Diese Stimulierung war größer bei den HA-Hydrogelen mit VEGF Freisetzung im Vergleich zu den Situationen, wo HA-Hydrogel oder wässriges VEGF allein utilized wurde (Pardue et al. 2008).

## 7. Zusammenfassung

Die für die Heilung chronischer Wunden entwickelten Prototyp-Biomaterialien wurden mithilfe humaner Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen evaluiert, um ihre Biokompatibilität und Eignung für die Wundheilung zu prüfen. Die Materialien wurden als sterile Einzelmembranen geliefert, die nach Erhalt in kleine Abschnitte von 0,5 cm x 0,5 cm aufgeteilt wurde. Diese kleinen Abschnitte wurden

für alle weiteren Untersuchungen benutzt. 3 beliebige Abschnitte pro Material wurden ausgewählt und auf Sterilität sowie die Anwesenheit von Endotoxin geprüft, und 3 Abschnitte wurden auf die Adhäsion der für diese Studie ausgewählten 4 Zelltypen untersucht: MRC-5 (humane Fibroblasten-Zelllinie), HFF (primäre humane Vorhaut-Fibroblasten), HaCaT (humane Keratinozyten-Zelllinie) und HUVEC (primäre humane Nabelschnur-Endothelzellen). Die Materialien waren steril, endotoxinfrei und die Zellen adhärten, jedoch in viel geringerer Anzahl als am Zellkultur-Kontrollplastik.

Toxizitätstests der Materialien wurden nach der ISO10995 Methodik und mit den empfohlenen Zelllinien sowie den oben genannten Zelllinien durchgeführt. Nur die PAC-haltigen Materialien zeigten Toxizität. PAC wurde bereitgestellt, und Verdünnungsreihen wurden mit jeder Zellsorte auf Toxizität getestet. Obwohl eine gewisse Toxizität oberhalb bestimmter Konzentrationen festgestellt wurde, konnten diese Untersuchungen nicht erklären, warum die Zellen nicht auf den Materialien wuchsen. Schließlich konnten Bedingungen für ausreichendes Wachstum hergestellt und als Grundlage für die geplanten Zell-Genregulations- und Angiogenese Studien genutzt werden. Mithilfe von PCR wurde die Genexpression von Zellen auf Materialien mit der von Zellen auf Plastik verglichen, und ähnliche und zellspezifische Genexpression wurde bei allen Materialien beobachtet. In einem Kokultursystem von HFF und HUVEC, einem wohletablierten System zum Nachweis der Angiogenese und Kapillarbildung durch HUVEC in 2- und 3-D, bildeten sich Kapillare nur auf Plastik und auf der als Kontrolle ausgewählten porcinen Dermis. Auf Material 1 und 2a, den beiden am meisten zellkompatiblen der 5 erhaltenen Prototyp-Biomaterialien, wurde keine Kapillarbildung beobachtet.

Es wurde gezeigt, dass Sphäroide, insbesondere Multizell-Sphäroide, den Bedingungen von Zellen in-vivo sehr nahe kommen. Die Untersuchungen mit Einzel- und Multizell-Sphäroiden (HFF, HUVEC oder HFF und HUVEC) brachten nicht die erwarteten Resultate. Sphäroide wurden aus unterschiedlichen Mengen von Zellen gebildet und an verschiedenen Tagen nach der Formation gesammelt und direkt auf die Materialien aufgebracht. Es war erwartet worden, dass die große Ansammlung von Einzelzelltypen (HFF oder HUVEC) oder Multizelltypen (HFF mit HUVEC) in einem Sphäroid sich bei Aufbringung auf das Prototyp-Biomaterial 2a mehr wie ein organartiges Gewebe verhalten würde. Dies war nicht der Fall. Obwohl bis zum

Zeitpunkt von 6 h eine anfängliche Adhäsion beobachtet werden konnte, befanden sich die Sphäroide innerhalb von 24 h, analog zu den Einzelzell-Studien, fast alle seitlich von, nicht auf, den Materialien. Im Gegensatz dazu blieben die Sphäroide an dem als Kontrolle verwendeten porcine Dermis adhärent.

Die für diese Untersuchungen erhaltenen Prototyp-Biomaterialien warfen unerwartete Probleme auf und lieferten durchgehend unerwartete und unerklärliche Resultate, die die Anwendung etablierter Methoden und die Ableitung von Schlussfolgerungen erschwerten. Die Materialien waren steril, enthielten kein Endotoxin, und Toxizität der Materialextrakte wurde nicht beobachtet. Es wurden in Biomaterialstudien an Haut und Primärzellen erprobte Zellen verwendet und etablierte Methoden eingesetzt, und die Zellen verhielten sich auf Plastik und Kontroll-Kollagenmaterialien wie erwartet (Genregulation, Sphäroid-Anlagerung, Angiogenese). Das größte Problem stellte die zeitabhängige Ablösung der Zellen von den Prototyp-Biomaterialien dar. Leider gelang es nicht, herauszufinden, warum die Zellen nicht an den Biomaterialien adhärent blieben und sich nicht flächendeckend auf diesen vermehrten.

## Literaturverzeichnis

- Agarwal, Pawan; Kukrele, Rajeev; Sharma, Dhananjaya (2019): Vacuum assisted closure (VAC)/negative pressure wound therapy (NPWT) for difficult wounds: A review. In: *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma* 10 (5), S. 845–848. DOI: 10.1016/j.jcot.2019.06.015.
- Alekseeva, Tijna; Unger, Ronald E.; Brochhausen, Christoph; Brown, Robert A.; Kirkpatrick, James C. (2014): Engineering a microvascular capillary bed in a tissue-like collagen construct. In: *Tissue Engineering. Part A* 20 (19-20), S. 2656–2665. DOI: 10.1089/ten.tea.2013.0570.
- Battiston, Kyle G.; Cheung, Jane W. C.; Jain, Devika; Santerre, J. Paul (2014): Biomaterials in co-culture systems: towards optimizing tissue integration and cell signaling within scaffolds. In: *Biomaterials* 35 (15), S. 4465–4476. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.02.023.
- Bobbert, F. S. L.; Zadpoor, A. A. (2017): Effects of bone substitute architecture and surface properties on cell response, angiogenesis, and structure of new bone.

- In: *Journal of materials chemistry. B* 5 (31), S. 6175–6192. DOI: 10.1039/c7tb00741h.
- Boukamp, P.; Petrussevska, R. T.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fusenig, N. E. (1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. In: *The Journal of Cell Biology* 106 (3), S. 761–771. DOI: 10.1083/jcb.106.3.761.
- Bunnell, Tina M.; Burbach, Brandon J.; Shimizu, Yoji; Ervasti, James M. (2011):  $\beta$ -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. In: *Molecular biology of the cell* 22 (21), S. 4047–4058. DOI: 10.1091/mbc.E11-06-0582.
- Caton, Paul W.; Potheary, Mark R.; Lees, Delphine M.; Khan, Noorafza Q.; Wood, Elizabeth G.; Shoji, Toshihiko et al. (2010): Regulation of vascular endothelial function by procyanidin-rich foods and beverages. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 58 (7), S. 4008–4013. DOI: 10.1021/jf9031876.
- Chakrabarti, B.; Park, J. W. (1980): Glycosaminoglycans: structure and interaction. In: *CRC critical reviews in biochemistry* 8 (3), S. 225–313. DOI: 10.3109/10409238009102572.
- Chan, B. P.; Leong, K. W. (2008): Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. In: *European Spine Journal* 17 Suppl 4 (Suppl 4), S. 467–479. DOI: 10.1007/s00586-008-0745-3.
- Coriell Institute (2020): MRC-5 - NORMAL HUMAN FETAL LUNG FIBROBLAST. Online verfügbar unter [https://catalog.coriell.org/0/Sections/Search/Sample\\_Detail.aspx?Ref=AG05965-D](https://catalog.coriell.org/0/Sections/Search/Sample_Detail.aspx?Ref=AG05965-D), zuletzt aktualisiert am 01.12.2020, zuletzt geprüft am 01.12.2020.
- Devlin, Thomas M. (2011): Textbook of biochemistry with clinical correlations. 7th ed. Hoboken, N.J.: Wiley; Chichester : John Wiley [distributor].
- Esposito, Debora; Overall, John; Grace, Mary H.; Komarnytsky, Slavko; Lila, Mary Ann (2019): Alaskan Berry Extracts Promote Dermal Wound Repair Through Modulation of Bioenergetics and Integrin Signaling. In: *Front. Pharmacol.* 10, S. 1058. DOI: 10.3389/fphar.2019.01058.
- Förster, Yvonne; Rentsch, Claudia; Schneiders, Wolfgang; Bernhardt, Ricardo; Simon, Jan C.; Worch, Hartmut; Rammelt, Stefan (2012): Surface modification of implants in long bone. In: *Biomatter* 2 (3), S. 149–157. DOI: 10.4161/biom.21563.
- Freshney, R. Ian (2016): Culture of animal cells. A manual of basic technique and specialized applications. Seventh edition. Hg. v. Amanda Capes-Davis, Carl Gregory und Stefan Przyborski. Hoboken New Jersey: Wiley Blackwell.
- Freudenberg, Uwe; Liang, Yingkai; Kiick, Kristi L.; Werner, Carsten (2016): Glycosaminoglycan-Based Biohybrid Hydrogels: A Sweet and Smart Choice for Multifunctional Biomaterials. In: *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* 28 (40), S. 8861–8891. DOI: 10.1002/adma.201601908.

- Ganesan, Minu Karthika; Finsterwalder, Richard; Leb, Heide; Resch, Ulrike; Neumüller, Karin; Martin, Rainer de; Petzelbauer, Peter (2017): Three-Dimensional Coculture Model to Analyze the Cross Talk Between Endothelial and Smooth Muscle Cells. In: *Tissue Engineering. Part C, Methods* 23 (1), S. 38–49. DOI: 10.1089/ten.TEC.2016.0299.
- German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details (2020). Online verfügbar unter <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-2>, zuletzt aktualisiert am 01.12.2020, zuletzt geprüft am 01.12.2020.
- Grützner, Verena; Unger, Ronald E.; Baier, Grit; Choritz, Lars; Freese, Christian; Böse, Thomas et al. (2015): Enzyme-responsive nanocomposites for wound infection prophylaxis in burn management: in vitro evaluation of their compatibility with healing processes. In: *International journal of nanomedicine*, S. 4111–4124. DOI: 10.2147/IJN.S81263.
- Gupta, Ramesh C.; Lall, Rajiv; Srivastava, Ajay; Sinha, Anita (2019): Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. In: *Frontiers in Veterinary Science* 6, S. 192. DOI: 10.3389/fvets.2019.00192.
- Heinrich, Peter C.; Müller, Matthias; Graeve, Lutz; Löffler, Georg (2014): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9., vollständig überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Imprint; Springer (Springer-Lehrbuch).
- Heller, Martin; Bauer, Heide-Katharina; Schwab, Roxana; Blatt, Sebastian; Peters, Katharina; Nezi-Cahn, Sandra et al. (2020): The impact of intercellular communication for the generation of complex multicellular prevascularized tissue equivalents. In: *Journal of biomedical materials research. Part A* 108 (3), S. 734–748. DOI: 10.1002/jbm.a.36853.
- Herzog, David Paul Eric; Dohle, Eva; Bischoff, Iris; Kirkpatrick, Charles James (2014): Cell communication in a coculture system consisting of outgrowth endothelial cells and primary osteoblasts. In: *BioMed Research International* 2014, S. 320123. DOI: 10.1155/2014/320123.
- Huang, Jiahui; Liu, Lianlian; Jin, Shanshan; Zhang, Yu; Zhang, Liguang; Li, Shutong et al. (2020): Proanthocyanidins Promote Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Fibroblasts in Inflammatory Environment Via Suppressing NF-κB Signal Pathway. In: *Inflammation* 43 (3), S. 892–902. DOI: 10.1007/s10753-019-01175-y.
- Huang, Shuangsheng; Yang, Ninggang; Liu, Yuanyuan; Hu, Lamei; Zhao, Jin; Gao, Jing et al. (2012): Grape seed proanthocyanidins inhibit angiogenesis via the downregulation of both vascular endothelial growth factor and angiopoietin signaling. In: *Nutrition research (New York, N.Y.)* 32 (7), S. 530–536. DOI: 10.1016/j.nutres.2012.05.012.
- Hutmacher, Dietmar Werner; Schantz, Jan Thorsten; Lam, Christopher Xu Fu; Tan, Kim Cheng; Lim, Thiam Chye (2007): State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. In: *Journal of*



- tissue engineering and regenerative medicine* 1 (4), S. 245–260. DOI: 10.1002/term.24.
- Ikada, Yoshito (2006): Challenges in tissue engineering. In: *Journal of the Royal Society, Interface* 3 (10), S. 589–601. DOI: 10.1098/rsif.2006.0124.
- Iovu, M.; Dumais, G.; Du Souich, P. (2008): Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. In: *Osteoarthritis and cartilage* 16 Suppl 3, S14-8. DOI: 10.1016/j.joca.2008.06.008.
- Ito, T-K; Ishii, G.; Chiba, H.; Ochiai, A. (2007): The VEGF angiogenic switch of fibroblasts is regulated by MMP-7 from cancer cells. In: *Oncogene* 26 (51), S. 7194–7203. DOI: 10.1038/sj.onc.1210535.
- Ivanov, Delyan P.; Grabowska, Anna M.; Garnett, Martin C. (2017): High-Throughput Spheroid Screens Using Volume, Resazurin Reduction, and Acid Phosphatase Activity. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1601, S. 43–59. DOI: 10.1007/978-1-4939-6960-9\_4.
- Jacobs, J. P. (1976): The status of human diploid cell strain MRC-5 as an approved substrate for the production of viral vaccines. In: *Journal of biological standardization* 4 (2), S. 97–99. DOI: 10.1016/0092-1157(76)90018-4.
- Jacobs, J. P.; Jones, C. M.; Baille, J. P. (1970): Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. In: *Nature* 227 (5254), S. 168–170. DOI: 10.1038/227168a0.
- Jaffe, E. A.; Nachman, R. L.; Becker, C. G.; Minick, C. R. (1973): Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. In: *The Journal of clinical investigation* 52 (11), S. 2745–2756. DOI: 10.1172/JCI107470.
- Jiang, Yanfei; Li, Yujie; Ding, Ye; Dai, Xiaoqian; Ma, Xiaotao; Bao, Lei et al. (2015): Grape seed proanthocyanidin extracts prevent high glucose-induced endothelial dysfunction via PKC and NF-κB inhibition. In: *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 79 (9), S. 1493–1503. DOI: 10.1080/09168451.2014.991679.
- Katiyar, Santosh K.; Athar, Mohammad (2013): Grape seeds: ripe for cancer chemoprevention. In: *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 6 (7), S. 617–621. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-13-0193.
- Kim, S.; Labbe, R. G.; Ryu, S. (2000): Inhibitory effects of collagen on the PCR for detection of *Clostridium perfringens*. In: *Applied and environmental microbiology* 66 (3), S. 1213–1215. DOI: 10.1128/AEM.66.3.1213-1215.2000.
- Koivisto, Leeni; Heino, Jyrki; Häkkinen, Lari; Larjava, Hannu (2014): Integrins in Wound Healing. In: *Advances in Wound Care* 3 (12), S. 762–783. DOI: 10.1089/wound.2013.0436.
- Lalan, S.; Pomerantseva, I.; Vacanti, J. P. (2001): Tissue engineering and its potential impact on surgery. In: *World journal of surgery* 25 (11), S. 1458–1466. DOI: 10.1007/s00268-001-0131-3.

- Langer, R.; Vacanti, J. P. (1993): Tissue engineering. In: *Science (New York, N.Y.)* 260 (5110), S. 920–926. DOI: 10.1126/science.8493529.
- Laurent, T. C.; Laurent, U. B.; Fraser, J. R. (1996): The structure and function of hyaluronan: An overview. In: *Immunology and cell biology* 74 (2), A1-7. DOI: 10.1038/icb.1996.32.
- Lesiak, Marta; Sieroń, Łukasz; Gutmajster, Ewa; Kowalczyk, Agnieszka; Bochenek, Marcelina; Utrata-Wesołek, Alicja et al. (2019): Fibroblast and keratinocyte crosstalk: the effect of a poly(triethylene glycol ethyl ether methacrylate) thermoresponsive surface on short-term co-culture. In: *European journal of dermatology : EJD* 29 (2), S. 126–140. DOI: 10.1684/ejd.2019.3561.
- Litwiniuk, Malgorzata; Krejner, Alicja; Speyrer, Marcus S.; Gauto, Anibal R.; Grzela, Tomasz (2016): Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. In: *Wounds : a compendium of clinical research and practice* 28 (3), S. 78–88.
- Lu, Jiaju; Guan, Fengyi; Cui, Fuzhai; Sun, Xiaodan; Zhao, Lingyun; Wang, Ying; Wang, Xiumei (2019): Enhanced angiogenesis by the hyaluronic acid hydrogels immobilized with a VEGF mimetic peptide in a traumatic brain injury model in rats. In: *Regenerative biomaterials* 6 (6), S. 325–334. DOI: 10.1093/rb/rbz027.
- Manfrini, Marco; Mazzoni, Elisa; Barbanti-Brodano, Giovanni; Nocini, Pierfrancesco; D'agostino, Antonio; Trombelli, Leonardo; Tognon, Mauro (2015): Osteoconductivity of Complex Biomaterials Assayed by Fluorescent-Engineered Osteoblast-like Cells. In: *Cell Biochem Biophys* 71 (3), S. 1509–1515. DOI: 10.1007/s12013-014-0374-x.
- Masuzawa, Mikio; Fujimura, Takao; Hamada, Yuhko; Fujita, Yuhsuke; Hara, Hisamichi; Nishiyama, Shigeo et al. (1999): Establishment of a human hemangiosarcoma cell line (ISO-HAS). In: *International journal of cancer* 81 (2), S. 305–308. DOI: 10.1002/(sici)1097-0215(19990412)81:2<305::aid-ijc22>3.0.co;2-z.
- Mathews, Smitha; Bhonde, Ramesh; Gupta, Pawan Kumar; Totey, Satish (2014): Novel biomimetic tripolymer scaffolds consisting of chitosan, collagen type 1, and hyaluronic acid for bone marrow-derived human mesenchymal stem cells-based bone tissue engineering. In: *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 102 (8), S. 1825–1834. DOI: 10.1002/jbm.b.33152.
- McAteer, James A.; Douglas, William H.J. (1979): [10] Monolayer culture techniques: Elsevier (Cell Culture, 58), S. 132–140.
- Melincovici, Carmen Stanca; Boşca, Adina Bianca; Şuşman, Sergiu; Mărginean, Mariana; Mişu, Carina; Istrate, Mihnea et al. (2018): Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. In: *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* 59 (2), S. 455–467.
- Nafisi, Sh; Shadaloi, A.; Feizbakhsh, A.; Tajmir-Riahi, H. A. (2009): RNA binding to antioxidant flavonoids. In: *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 94 (1), S. 1–7. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2008.08.001.



- Neri, S.; Mariani, E.; Meneghetti, A.; Cattini, L.; Facchini, A. (2001): Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. In: *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 8 (6), S. 1131–1135. DOI: 10.1128/CDLI.8.6.1131-1135.2001.
- Ojeh, Nkemcho; Pastar, Irena; Tomic-Canic, Marjana; Stojadinovic, Olivera (2015): Stem Cells in Skin Regeneration, Wound Healing, and Their Clinical Applications. In: *International journal of molecular sciences* 16 (10), S. 25476–25501. DOI: 10.3390/ijms161025476.
- Pardue, Erin L.; Ibrahim, Samir; Ramamurthi, Anand (2008): Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering. In: *Organogenesis* 4 (4), S. 203–214. DOI: 10.4161/org.4.4.6926.
- Park, Deokbum; Kim, Youngmi; Kim, Hyunah; Kim, kyungjong; Lee, Yun-Sil; Choe, Jongseon et al. (2012): Hyaluronic acid promotes angiogenesis by inducing RHAMM-TGF $\beta$  receptor interaction via CD44-PKC $\delta$ . In: *Molecules and Cells* 33 (6), S. 563–574. DOI: 10.1007/s10059-012-2294-1.
- Pinna, Christian; Morazzoni, Paolo; Sala, Angelo (2017): Proanthocyanidins from *Vitis vinifera* inhibit oxidative stress-induced vascular impairment in pulmonary arteries from diabetic rats. In: *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 25, S. 39–44. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.12.015.
- Qiagen (2020): Animal Cell Culture - QIAGEN. Online verfügbar unter <https://www.qiagen.com/us/service-and-support/learning-hub/molecular-biology-methods/animal-cell-culture/?Print=1>, zuletzt aktualisiert am 17.12.2020, zuletzt geprüft am 17.12.2020.
- Reimann, Ene; Abram, Kristi; Köks, Sulev; Kingo, Külli; Fazeli, Alireza (2019): Identification of an optimal method for extracting RNA from human skin biopsy, using domestic pig as a model system. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 20111. DOI: 10.1038/s41598-019-56579-5.
- Rouwkema, Jeroen; Boer, Jan de; van Blitterswijk, Clemens A. (2006): Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. In: *Tissue engineering* 12 (9), S. 2685–2693. DOI: 10.1089/ten.2006.12.2685.
- Roy, Sashwati; Khanna, Savita; Alessio, Helaine M.; Vider, Jelena; Bagchi, Debasis; Bagchi, Manashi; Sen, Chandan K. (2002): Anti-angiogenic property of edible berries. In: *Free radical research* 36 (9), S. 1023–1031. DOI: 10.1080/1071576021000006662.
- Saberianpour, Shirin; Heidarzadeh, Morteza; Geranmayeh, Mohammad Hossein; Hosseinkhani, Hossein; Rahbarghazi, Reza; Nouri, Mohammad (2018): Tissue engineering strategies for the induction of angiogenesis using biomaterials. In: *J Biol Eng* 12 (1), S. 36. DOI: 10.1186/s13036-018-0133-4.

- Saluk-Juszczak, Joanna; Wachowicz, Barbara (2005): Aktywność prozapalna lipopolisacharydu [The proinflammatory activity of lipopolysaccharide]. In: *Postepy biochemii* 51 (3), S. 280–287.
- Sanz-Gómez, Natalia; Freije, Ana; Gandarillas, Alberto (2020): Keratinocyte Differentiation by Flow Cytometry. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2109, S. 83–92. DOI: 10.1007/7651\_2019\_237.
- Sawai, Hirofumi (2016): Induction of Apoptosis in TNF-Treated L929 Cells in the Presence of Necrostatin-1. In: *International journal of molecular sciences* 17 (10). DOI: 10.3390/ijms17101678.
- Scagnolari, Carolina; Turriziani, Ombretta; Monteleone, Katia; Pierangeli, Alessandra; Antonelli, Guido (2017): Consolidation of molecular testing in clinical virology. In: *Expert review of anti-infective therapy* 15 (4), S. 387–400. DOI: 10.1080/14787210.2017.1271711.
- Schneier, Mason; Razdan, Sidharth; Miller, Allison M.; Briceno, Maria E.; Barua, Sutapa (2020): Current technologies to endotoxin detection and removal for biopharmaceutical purification. In: *Biotechnology and bioengineering* 117 (8), S. 2588–2609. DOI: 10.1002/bit.27362.
- Schoop, V. M.; Mirancea, N.; Fusenig, N. E. (1999): Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. In: *The Journal of investigative dermatology* 112 (3), S. 343–353. DOI: 10.1046/j.1523-1747.1999.00524.x.
- Schürer, N.; Köhne, A.; Schliep, V.; Barlag, K.; Goerz, G. (1993): Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. In: *Experimental dermatology* 2 (4), S. 179–185. DOI: 10.1111/j.1600-0625.1993.tb00030.x.
- Schuurmans, Carl C. L.; Mihajlovic, Marko; Hiemstra, Christine; Ito, Keita; Hennink, Wim E.; Vermonden, Tina (2021): Hyaluronic acid and chondroitin sulfate (meth)acrylate-based hydrogels for tissue engineering: Synthesis, characteristics and pre-clinical evaluation. In: *Biomaterials* 268, S. 120602. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120602.
- Shejawal, Kiran P.; Randive, Dheeraj S.; Bhinge, Somnath D.; Bhutkar, Mangesh A.; Wadkar, Ganesh H.; Jadhav, Namdeo R. (2020): Green synthesis of silver and iron nanoparticles of isolated proanthocyanidin: its characterization, antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activities against COLO320DM and HT29. In: *Journal, genetic engineering & biotechnology* 18 (1), S. 43. DOI: 10.1186/s43141-020-00058-2.
- Tonnesen, M. G.; Feng, X.; Clark, R. A. (2000): Angiogenesis in wound healing. In: *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 5 (1), S. 40–46. DOI: 10.1046/j.1087-0024.2000.00014.x.
- Twigg, R. S. (1945): Oxidation-Reduction Aspects of Resazurin. In: *Nature* 155 (3935), S. 401–402. DOI: 10.1038/155401a0.

- Ueno, Takayuki; Utsumi, Jun; Toi, Masakazu; Shimizu, Kazuharu (2015): Characteristic Gene Expression Profiles of Human Fibroblasts and Breast Cancer Cells in a Newly Developed Bilateral Coculture System. In: *BioMed Research International* 2015, S. 960840. DOI: 10.1155/2015/960840.
- Unger, R. E.; Halstenberg, S.; Günther, H.; Sartoris, A.; Brochhausen, C.; Kirkpatrick, C. J. (2009): Bewertung von neuartigen Biomaterialien zum Zweck der Knochenrekonstruktion und -regeneration : In-vitro-Versuche mit Mono- und Kokulturen von Osteoblasten und Endothelzellen. In: *Der Orthopade* 38 (11), S. 1020–1028. DOI: 10.1007/s00132-009-1491-x.
- Unger, Ronald E.; Ghanaati, Shahram; Orth, Carina; Sartoris, Anne; Barbeck, Mike; Halstenberg, Sven et al. (2010): The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature. In: *Biomaterials* 31 (27), S. 6959–6967. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.057.
- Unger, Ronald E.; Krump-Konvalinkova, Vera; Peters, Kirsten; Kirkpatrick, C. James (2002): In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. In: *Microvascular research* 64 (3), S. 384–397. DOI: 10.1006/mvre.2002.2434.
- Unger, Ronald E.; Peters, Kirsten; Sartoris, Anne; Freese, Christian; Kirkpatrick, C. James (2014): Human endothelial cell-based assay for endotoxin as sensitive as the conventional Limulus Amebocyte Lysate assay. In: *Biomaterials* 35 (10), S. 3180–3187. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.059.
- Vacanti, Joseph P.; Langer, Robert (1999): Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. In: *Lancet (London, England)* 354, S32-S34. DOI: 10.1016/s0140-6736(99)90247-7.
- Vandrovcová, M.; Douglas, T.; Hauk, D.; Grössner-Schreiber, B.; Wiltfang, J.; Bačáková, L.; Warnke, P. H. (2011): Influence of collagen and chondroitin sulfate (CS) coatings on poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) on MG 63 osteoblast-like cells. In: *Physiol Res* 60 (5), S. 797–813. DOI: 10.33549/physiolres.931994.
- Wang, Limin; Stegemann, Jan P. (2010): Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetyltrimethylammonium bromide. In: *Biomaterials* 31 (7), S. 1612–1618. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.024.
- Wasi, S.; Otsuka, K.; Yao, K. L.; Tung, P. S.; Aubin, J. E.; Sodek, J.; Termine, J. D. (1984): An osteonectinlike protein in porcine periodontal ligament and its synthesis by periodontal ligament fibroblasts. In: *Canadian journal of biochemistry and cell biology = Revue canadienne de biochimie et biologie cellulaire* 62 (6), S. 470–478. DOI: 10.1139/o84-064.
- Weinandy, Stefan; Laffar, Simone; Unger, Ronald E.; Flanagan, Thomas C.; Loesel, Robert; Kirkpatrick, C. James et al. (2014): Biofunctionalized microfiber-

assisted formation of intrinsic three-dimensional capillary-like structures. In: *Tissue Engineering. Part A* 20 (13-14), S. 1858–1869. DOI: 10.1089/ten.tea.2013.0330.

Wu, Xinbo; Yu, Haiyang; Zhou, Haichao; Li, Zihua; Huang, Hui; Xiao, Fajiao et al. (2020): Proanthocyanidin B2 inhibits proliferation and induces apoptosis of osteosarcoma cells by suppressing the PI3K/AKT pathway. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 24 (20), S. 11960–11971. DOI: 10.1111/jcmm.15818.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich: