

Monolithische Polymere als Trägermaterial für Zellkultivierung, Zelldifferenzierung und Tissue-Engineering**

Andrea Löber, Andreas Verch, Bettina Schlemmer, Sandra Höfer, Bernhard Frerich* und Michael R. Buchmeiser*

Das Tissue-Engineering (TE),^[1–6] d.h. die Besiedlung von Gerüstmaterialien mit lebenden Zellen in vitro, die dann in einen Defektbereich implantiert werden, ist inzwischen für die Rehabilitation einer Vielzahl von Gewebedefekten vorgeschlagen worden. Vielfältige Strategien wurden für die Regeneration von Knochen und anderen Geweben entwickelt, die Techniken und Entwicklungen auf molekularer und zellulärer Ebene sowie auf Materialebene umfassen. Auf zellulärer Ebene haben sich mesenchymale Stammzellen (MSC) unterschiedlichen Ursprungs als Zellquelle durchgesetzt.^[7–9] Verfeinerte Bioreaktoren werden verwendet, um Besiedlungsprozesse zu unterstützen. Einen entscheidenden Punkt aber stellt die Verfügbarkeit geeigneter Gerüstmaterialien mit ausreichender Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und mechanischer Festigkeit dar, die darüber hinaus die Gewebeatmung und eine Vaskularisierung im Sinne der Einsprossung von Gefäßen erlauben. Mangelnde Erfolge bei bisherigen klinischen Anwendungen können ihre Ursache auch in den Unzulänglichkeiten gegenwärtig verfügbarer Gerüstmaterialien haben.^[8,10]

Gerüstmaterialien für das TE haben in erster Linie als Träger für die Transplantation der Zellen in den Defektbereich zu fungieren. Offene, großporige Strukturen sind erwünscht, um die Integration des künstlichen Gewebes in der Empfängerregion zu ermöglichen.^[7] Die Morphologie des Gerüstmaterials soll dazu beitragen, den Aufbau und die Struktur des neuen Gewebes^[11] hinsichtlich Größe, Form und Vaskularisierung zu steuern.^[12] Dabei haben bioabbaubare Polymere für das TE einige grundsätzliche Vorteile.^[13] Im

Vergleich zu biologischen Materialien bedeutet die Verwendung von Polymeren ein geringeres Risiko für Immunreaktionen, und nach vollständiger Resorption verbleibt im Idealfall das neu gebildete Gewebe. Das Design und die maßgeschneiderte Synthese von bioabbaubaren Polymeren mit geeigneten mechanischen Eigenschaften ist daher eine der besonderen Herausforderungen beim TE. Unser Ziel war es, in einem interdisziplinären Ansatz Materialien für das TE von Knochen und Weichgeweben für plastisch-rekonstruktive Problemstellungen zu entwickeln.

Auf der Suche nach geeigneten Gerüsten für das TE konzentrierten wir uns auf monolithische Trägermaterialien. Monolithische Materialien sind einheitlich strukturierte Matrices mit großen, untereinander verbundenen Poren, deren Durchmesser üblicherweise im unteren Mikrometerbereich liegt. In den letzten 15 Jahren wurden monolithische Trägermaterialien auf Polymerbasis für Trenntechniken sowie für die Organo- und Biokatalyse entwickelt. Signifikante Beiträge kamen dabei von Fréchet und Švec et al., die monolithische Medien für diese Zwecke durch radikalische Polymerisation herstellten.^[14] Wir trugen zu diesem Forschungsgebiet bei, indem wir einen Syntheseansatz auf der Basis der ringöffnenden Metathesepolymerisation (ROMP) entwickelten, der in einer Stufe zu funktionalisierten monolithischen Polymeren führt. Mithilfe dieses Syntheseansatzes konnten bereits zahlreiche monolithische Systeme realisiert werden.^[15–18] Kürzlich erweiterten wir unser Verfahren um die Elektronenstrahl(ES)-basierte Synthese hoch poröser monolithischer Materialien.^[19]

Über die Verwendung monolithischer Materialien für das TE wurde noch nicht berichtet. Bisherige Trägermaterialien umfassten beispielsweise Gläser oder Keramiken auf Basis der Sol-Gel-Chemie und geschäumte oder durch Elektrospinnen hergestellte Polymere; auch Template, strukturierte Polymere und Drucktechniken wurden eingesetzt.^[20–23] Ein wesentlicher Vorteil monolithischer Materialien ist dabei, dass sie im Zuge eines Abformprozesses in jegliche geometrische Form gebracht und dadurch ganze Körperteile nachgebildet werden können.

Für Anwendungen beim TE muss ein Gerüstmaterial bestimmte Kriterien erfüllen. Erforderlich ist eine hoch poröse Struktur, wobei die Porendurchmesser mindestens 150 µm betragen sollten. Nur bei ausreichenden Porendurchmessern wird ein substanzielles Einwachsen von Zellen und die Vaskularisierung ermöglicht. Eine weitere Forderung ist die Biokompatibilität, und hierzu gehört, dass Zellwachstum und Zelldifferenzierung durch das Material nicht beeinträchtigt werden, sei es durch zelltoxische Substanzen im Material selbst oder durch im Zuge des Abbauprozesses

[*] Prof. Dr. Dr. B. Frerich

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universität Leipzig, und NovaTissue GmbH, Leipzig (Deutschland)
E-Mail: bernhard.frerich@medizin.uni-leipzig.de
Homepage: <http://www.uni-leipzig.de/~mkg/>

A. Löber, A. Verch, B. Schlemmer, Prof. Dr. M. R. Buchmeiser
Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung e.V. (IOM)
Permoserstraße 15, 04318 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 341-235-2584
E-Mail: michael.buchmeiser@iom-leipzig.de
Homepage: <http://www.iom-leipzig.de>

Prof. Dr. M. R. Buchmeiser
Institut für Technische Chemie, Universität Leipzig
Linnéstraße 3, 04103 Leipzig (Deutschland)

S. Höfer
NovaTissue GmbH, Leipzig (Deutschland)

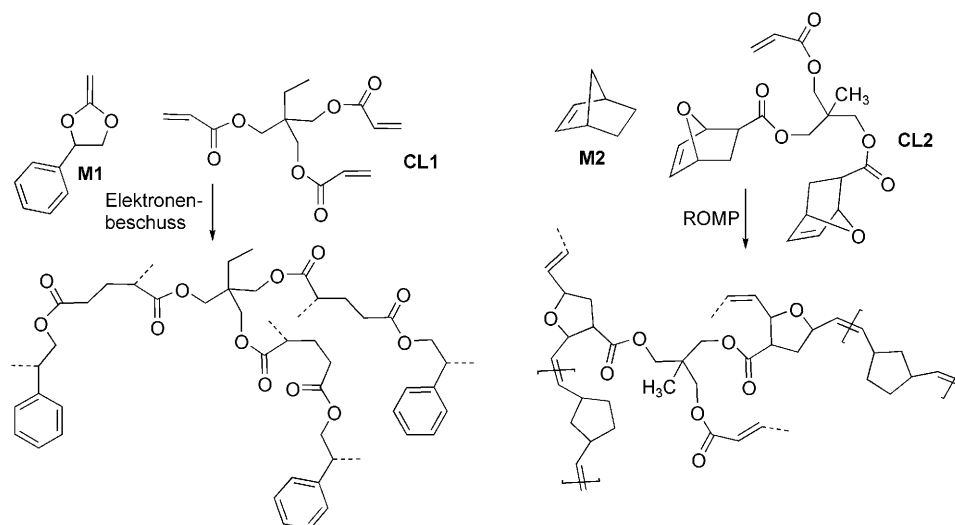
[**] Diese Arbeit wurde von der Bundesrepublik Deutschland und dem Freistaat Sachsen unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200801872> zu finden.

entstehende Substanzen. Eine weitere Voraussetzung für ungestörte Proliferation und Differenzierung bildet eine Oberfläche, die Zellkontakt und Adhäsion begünstigt. Angepasste mechanische Belastbarkeit und Bioabbaubarkeit sind essenziell. Die beim Abbauprozess entstehenden Polymerfragmente sollten vorzugsweise mittlere Molmassen unter $40\,000\text{ g mol}^{-1}$ aufweisen, um renal ausgeschieden werden zu können.

Unter Berücksichtigung dieser Anforderungen synthetisierten wir monolithische Trägermaterialien durch Elektronenstrahl(ES)-initiierte radikalische Polymerisation. 2-Methyliden-4-phenyl-1,3-dioxolan (**M1**) wurde als Monomer, Trimethylolpropantriacrylat (**CL1**) als Vernetzer verwendet. Als Lösungsmittel diente eine Mischung aus Toluol (Mikroporogen), 2-Propanol und Dodecan-1-ol (Makroporogene). Die optimale Mischung ist in Tabelle S1, Nr. 11 beschrieben (siehe die Hintergrundinformationen).^[19,24] Das resultierende vernetzte monolithische Copolymer hatte Poren mit einem Durchmesser $\leq 50\text{ }\mu\text{m}$. Seine Synthese und chemische Struktur sind in Schema 1 (links) zusammengefasst. Da **CL1** ein Triester ist und das Dioxolanderivat **M1** im Zuge der radikalischen Polymerisation ebenfalls in einen Ester umgewandelt wird,^[25] handelt es sich bei dem Copolymer um einen reinen Polyester, der als bioabbaubar angesehen werden kann. Eine elektronenmikroskopische Aufnahme ist in Abbildung 1 (oben) dargestellt.

Die spezifische Oberfläche des monolithischen Materials wurde mit N_2 -Adsorption bestimmt und betrug $12\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$, was



Schema 1. Durch ES-initiierte radikalische Polymerisation hergestellte monolithische Polyestermatrix (links); durch ROMP hergestellte monolithische Matrix (rechts).

eine makroporöse Struktur nahelegt. Die Lagerung des Materials in einem Phosphatpuffer (pH 7.2, 200 ppm NaN_3) bei 37°C resultierte nach einem Monat in einer Volumenzunahme durch Quellen (+5%) und in einem Massenverlust (−5%). Diese beiden Befunde sind kennzeichnend für einen langsamen Abbau des Materials. Hervorgehoben werden sollte auch, dass die ES-basierte Polymerisation direkt sterile Matrices liefert.

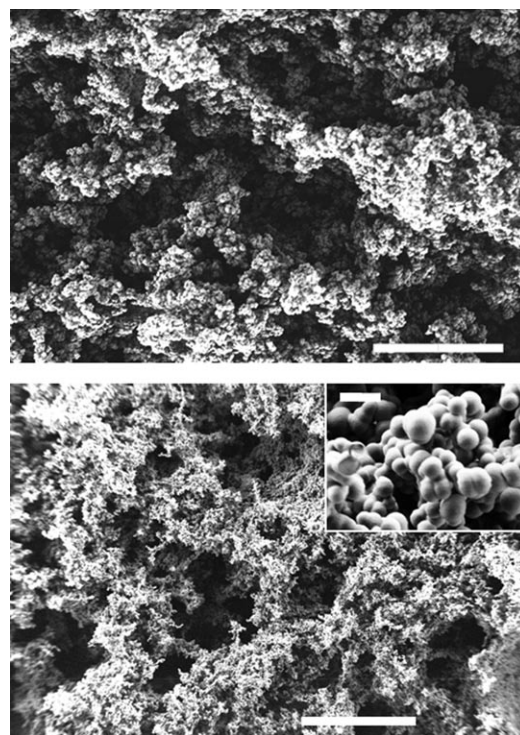


Abbildung 1. Durch ES-initiierte radikalische Polymerisation erhaltene (oben) und durch ROMP erhaltene (unten) monolithische poröse Gerüstmaterialien. Maßstäbe: $100\text{ }\mu\text{m}$ (oben), $400\text{ }\mu\text{m}$ (unten) und $4\text{ }\mu\text{m}$ (Einschub im unteren Bild).

Für Biokompatibilitätsstudien, In vitro-Wachstums- und Differenzierungstests mit dem Trägermaterial wurden Stammzellen aus humanem Fettgewebe (adipose tissue derived stem cells, ATSC) verwendet. Aus klinischer Sicht haben diese Zellen im Vergleich zu den aus Knochenmark gewonnenen MSC den Vorteil, dass sie leichter in großer Menge durch minimal invasive Entnahme zugänglich sind, sich aber gleichermaßen für das TE von Knochen und Weichgewebe (Fettgewebe) eignen. Beide Gewebe haben große Bedeutung für die Rekonstruktion kraniofazialer Defekte und ihre Regeneration

damit hohe klinische Relevanz. Die Kultivierung von ATSC auf den sterilisierten monolithischen Polyesterträgern ergab eine rasche Zellproliferation auf der Materialoberfläche. Allerdings konnte ein Einwachsen der Zellen in die monolithische Struktur innerhalb von 20 Tagen nicht beobachtet werden, hingegen löste sich der Zellverband von der Unterlage. Diese Befunde wurden auf den hydrophoben Charakter und die Struktur der Oberflächen zurückgeführt. Entspre-

chend wurde für diese Materialien ein vergleichsweise hoher Wasserrandwinkel von 142° gemessen.

Um die Zelladhäsion und damit das Einwachsen der Zellen zu verbessern, wandten wir uns polaren Monomeren und einem ROMP-Syntheseprotokoll zu. Unter Verwendung einer Mischung aus Norborn-2-en (**M2**) und Pentaglycerol-bis(7-oxanorborn-5-en-2-ylcarboxylat)monoacrylat (**CL2**) in unterschiedlichen Mengen eines Mikroporogens (Toluol) und eines Makroporogens (2-Propanol) in Gegenwart von $[\text{RuCl}_2(\text{Py})_2(\text{IMesH}_2)(\text{CHPh})]$ (**1**, Py = Pyridin, $\text{IMesH}_2 = 1,3\text{-Dimesitylimidazolin-2-yliden}$) als Initiator und unterschiedlichen Mengen an Pyridin als Regulator (Tabelle S2 in den Hintergrundinformationen) konnten verschiedene monolithische Strukturen realisiert werden. Wie bereits bei ähnlichen Systemen gezeigt wurde,^[26] gelingt in Gegenwart von sehr geringen Mengen Pyridin (70 ppm) ein Durchstimmen der monolithischen Struktur. Es muss erwähnt werden, dass die Acrylatgruppe in **CL2** als Kettenübertragungsreagens fungiert und somit die durchschnittliche Kettenlänge der von Norborn-2-en abgeleiteten Polymerblöcke reduziert.

Schema 1 (rechts) illustriert die Synthese; eine typische monolithische Struktur mit Poren von 200 μm Durchmesser ist in Abbildung 1 (rechts) gezeigt. Wie durch inverse Größenaus-schlusschromatographie bestimmt,^[27] resultieren diese großen Poren in einer Interpartikelporosität von 77%. Die Zusammensetzung der letztlich verwendeten Polymerisationsmischung, die Monolithe mit den größten Porendurchmessern ergab, wurde aus 13 verschiedenen Kompositionen ermittelt (Tabelle S2 in den Hintergrundinformationen). Um etwaige toxische Wirkungen von Katalysatorresten zu vermeiden, wurde die monolithische Struktur sorgfältig mit einer Mischung aus Dimethylsulfoxid, Ethylvinylether und THF gewaschen, was de facto zu einer quantitativen Entfernung des Übergangsmetallinitiators und zu Ru-Konzentrationen im Monolithen unter 0.1 ppm führte (die Messwerte lagen unterhalb der Nachweisgrenze der induktiv gekoppelten Plasmaemissionsspektroskopie, ICP-OES).

N_2 -Adsorptionsmessungen ergaben eine spezifische Oberfläche von $4\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$ und bestätigten somit die hoch poröse

Struktur des Monolithen. Die Lagerung des Materials in einem Phosphatpuffer über 13 Wochen führte zu einer starken Verkleinerung des Wasserrandwinkels (ursprünglich 142°). Tatsächlich konnten keine verlässlichen Werte mehr ermittelt werden, da der Wassertropfen rasch durch das Material aufgesogen wurde. Dieses Verhalten wird sowohl auf den stark hydrophilen Charakter von **CL2** als auch auf die hohe Oxidationstendenz der Poly(norborn-2-en)-Blöcke zurückgeführt (Oxidation in allylischer Position). Durchschnittlich (für $n = 4$), betrug der Young-Elastizitätsmodul dieser Materialien 1 MPa, die Druckfestigkeit betrug 7.4 MPa und die Martens-Härte betrug 0.3 Nmm^{-2} . Diese Werte waren hinreichend für Anwendungen beim TE von Fettgewebe. Der Polymerabbau wurde über 240 Tage beobachtet. Die Monolithe wurden dabei zunehmend krümelig, und Polymerfragmente mit mittleren Molmassen von $3000\text{--}28000\text{ g mol}^{-1}$ wurden beobachtet. Es ist auch wichtig festzuhalten, dass keine freie Acrylsäure nachgewiesen wurde.

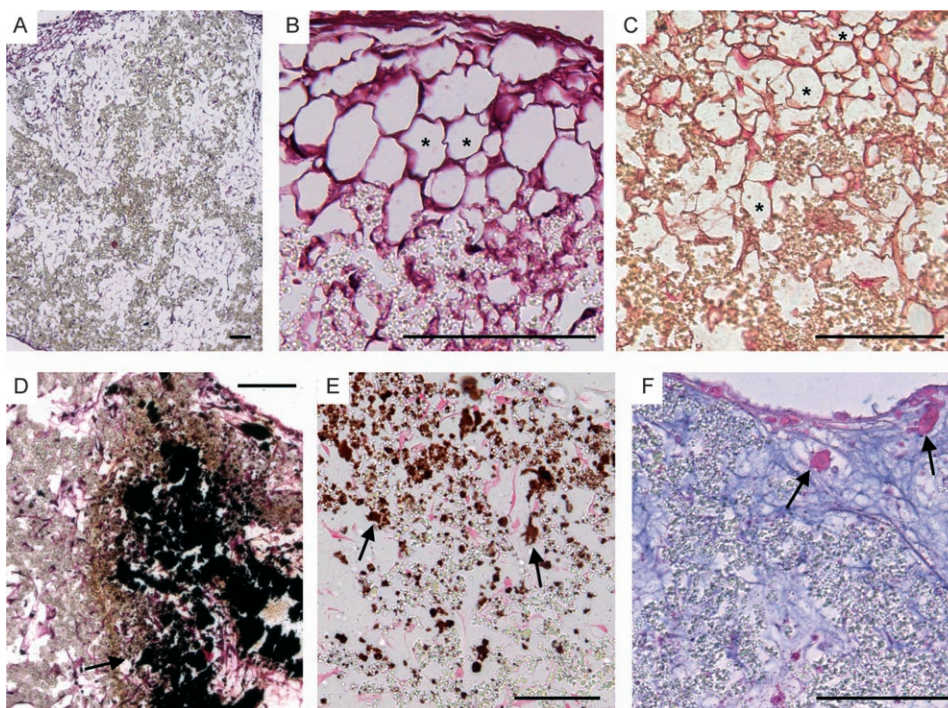


Abbildung 2. Lichtmikroskopische Abbildungen histologischer Schnitte von Monolithen, die mit Fettgewebstammzellen besiedelt und dann einer adipogenen (obere Reihe) oder osteogenen Differenzierung (untere Reihe) unterworfen wurden. Es handelt sich immer um senkrechte Querschnitte, sodass die Durchwachsung der Gerüste in zentrale Bereiche beurteilt werden kann. A) Der histologische Querschnitt in geringer Vergrößerung zeigt die Durchwachsung des Gerüstmaterials (graue Granula) nach adipogener Differenzierung. Kernhaltige Zellen (Zellkerne violett) sind bis in den zentralen Bereich des Gerüsts an diesem Querschnitt erkennbar (HE-Färbung). B) Region mit differenzierten, reifen, univakuolären Adipozyten aus einem Präparat der adipogenen Differenzierungsgruppe bei stärkerer Vergrößerung (HE-Färbung) und C) eine ähnliche Region nach S-100-Markierung (DAB, braun, zum Teil sichtbar als Braunfärbung im Zytoplasmaum der vakuolierten Adipozyten). Sterne in B) und C) markieren einzelne reife univakuoläre Adipozyten. D) Von-Kossa-Färbung zeigt massive Mineralisationen (braunschwarz, siehe Pfeile) nach osteogener Differenzierung innerhalb des monolithischen Gerüsts (Gegenfärbung der Kerne und Zellen mit HE). Das Gerüstmaterial (hellgraue Granula) ist sichtbar mit Zellen durchwachsen (linker Bildteil). E) Region mit geringerer Zelldichte und lockerer Mineralisation (Kerngegenfärbung mit Kernechtrot). Mineralisationen sind als braune Körner erkennbar (Pfeile), wenige rotgefärbte Kerne, das Gerüstmaterial als hellgraue, doppelbrechende Granula. F) Markierung mit Osteocalcin-Antikörper (Visualisierung mit BCIP/NBT, blau, Gegenfärbung mit Kernechtrot); Pfeile zeigen Mineralisationskerne. Alle Maßstäbe entsprechen 100 μm .

Im nächsten Schritt wurden die durch ROMP erzeugten Gerüstmaterialien mit ATSC besiedelt. Innerhalb von 12 Tagen vervierfachte sich die Zahl der Zellen auf der Oberfläche. Adhäsionsfaktoren wie Fibronektin, RGD-Peptid oder andere wurden nicht verwendet (abgesehen von Differenzierungsfaktoren und üblichen Mediumsupplementen). Um das Einwachsen und die Differenzierung in einem dreidimensionalen Kontext im Sinne von „Gewebeäquivalenten“ zu überprüfen, wurde die Kultivierung in rotierenden Kulturgefäßen durchgeführt. Mediumwechsel erfolgten wöchentlich. Unter diesen Bedingungen konnte ein Einwachsen der Zellen in die Poren des Materials beobachtet werden, zum Teil auch eine vollständige Durchwachsung und Durchdringung bis in die zentralen Bereiche des Gerüsts (Abbildung 2A). Nach der Proliferationsphase konnten die erfolgreiche osteogene und adipogene Differenzierung nachgewiesen werden (Abbildung 2). Die Differenzierung der ATSC in Adipozyten oder Osteoblasten wurde durch Supplementierung des Kulturmediums mit Isobutylmethylxanthin bzw. durch Zusatz von β -Glycerolphosphat und Dexamethason ausgelöst. Abbildung 2B zeigt typische reife, univakuoläre Adipozyten nach adipogener Differenzierung in einem solchen dreidimensionalen „Fettgewebsäquivalent“. In Abbildung 2D und E sind Mineralisationen 6 Wochen nach Beginn der osteogenen Differenzierung zu erkennen. Diese geht von Zellen aus, die in das poröse Gerüst eingewandert sind. Somit kann gezeigt werden, dass eine Biomineralisation erfolgreich auf und in diesen Materialien durchgeführt werden kann und unter Umständen durch die im Zuge des Hydrolyseprozesses gebildeten freien Carboxylatgruppen unterstützt wird. Der Nachweis der linienspezifischen Induktion und Differenzierung der ATSC auf den Monolithen wurde zusätzlich zu den histomorphologischen Darstellungen durch immunhistochemischen Nachweis der Osteocalcin-Expression nach osteogener Differenzierung (Abbildung 2F) und den Nachweis der S100-Positivität nach adipogener Differenzierung (Abbildung 2C) geführt. S100-Positivität im Zytoplasma ist typisch für Adipozyten und liefert einen Nachweis neben der univakuolären Morphologie.

Zusammenfassend haben wir neue polymere monolithische Gerüstmaterialien für den Einsatz in der Zellkultur und beim Tissue-Engineering entwickelt. Unsere gegenwärtigen Arbeiten konzentrieren sich auf die Verbesserung der mechanischen Stabilität der Gerüste, auf Langzeituntersuchungen zur Bioabbaubarkeit sowie auf die Biokompatibilität in vitro und in vivo.

Eingegangen am 22. April 2008,
veränderte Fassung am 26. Juli 2008
Online veröffentlicht am 16. Oktober 2008

Stichwörter: Biokompatible Polymere · Polymerisationen · Ringöffnungspolymerisationen · Tissue-Engineering · Zellwachstum

- [1] N. A. Peppas, R. Langer, *Science* **1994**, 263, 1715–1720.
- [2] E. Wintermantel, S.-W. Ha, *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*, 3. Aufl., Springer, Berlin, **2002**.
- [3] S. Levenberg, R. Langer, *Curr. Top. Dev. Biol.* **2004**, 61, 113–134.
- [4] R. Langer, L. G. Clima, J. A. Tamada, E. Wintermantel, *Biomaterials* **1990**, 11, 738–745.
- [5] R. Langer, *Mol. Ther.* **2000**, 1, 12–15.
- [6] R. Langer, *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 94–101.
- [7] N. Jaiswal, S. E. Haynesworth, A. I. Caplan, S. P. Bruder, *J. Cell. Biochem.* **1997**, 64, 295–312.
- [8] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, D. R. Marshak, *Science* **1999**, 284, 143–147.
- [9] S. P. Bruder, A. A. Kurth, M. Shea, W. C. Hayes, N. Jaiswal, S. Kadiyala, *J. Orthop. Res.* **1998**, 16, 155–162.
- [10] C. Zizelmann, R. Schoen, M. C. Metzger, R. Schmelzeisen, A. Schramm, B. Dött, K. H. Bormann, N. C. Gellrich, *Clin. Oral Implants Res.* **2007**, 18, 69–73.
- [11] J. P. Vacanti, M. A. Morse, W. M. Saltzman, A. J. Domb, A. Perez-Atayde, R. Langer, *J. Pediatr. Surg.* **1988**, 23, 3–9.
- [12] D. J. Mooney, S. Park, P. M. Kaufmann, K. Sano, K. McNamara, J. P. Vacanti, R. Langer, *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, 29, 959–965.
- [13] M. Martina, D. W. Huttmacher, *Polym. Int.* **2007**, 56, 145–157.
- [14] E. C. Peters, F. Švec, J. M. J. Fréchet, *Adv. Mater.* **1999**, 11, 1169–1181.
- [15] F. Sinner, M. R. Buchmeiser, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1491–1494; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1433–1436.
- [16] F. Sinner, M. R. Buchmeiser, *Macromolecules* **2000**, 33, 5777–5786.
- [17] M. Mayr, B. Mayr, M. R. Buchmeiser, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 3957–3960; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3839–3842.
- [18] M. R. Buchmeiser, *Polymer* **2007**, 48, 2187–2198.
- [19] R. Bandari, W. Knolle, A. Prager-Duschke, M. R. Buchmeiser, *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, 208, 1428–1436.
- [20] A. Greiner, J. H. Wendorff, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 5770–5805; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 5670–5703.
- [21] J. R. Jones, L. L. Hench, *J. Biomed. Mater. Res. Part B* **2003**, 68, 36–44.
- [22] M. Goldberg, R. Langer, X. Jia, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2007**, 18, 241–268.
- [23] H.-s. Yun, S.-e. Kim, Y.-t. Hyun, S.-j. Heo, J.-w. Shin, *Chem. Mater.* **2007**, 19, 6363–6366.
- [24] R. Bandari, W. Knolle, M. R. Buchmeiser, *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, 28, 2090–2094.
- [25] W. J. Bailey, S. R. Wu, Z. Ni, *Makromol. Chem.* **1982**, 183, 1913–1920.
- [26] R. Bandari, A. Prager-Duschke, C. Kühnel, U. Decker, B. Schlemmer, M. R. Buchmeiser, *Macromolecules* **2006**, 39, 5222–5229.
- [27] I. Halász, K. Martin, *Angew. Chem.* **1978**, 90, 954–961; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, 17, 901–908.