

Lehrstuhl für Medizintechnik mit Schwerpunkt biokompatible Materialien
und Prozesstechniken

Oberflächenmodifizierte Polymerschäume für die
dreidimensionale Zellkultur

Alexander Walter

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz

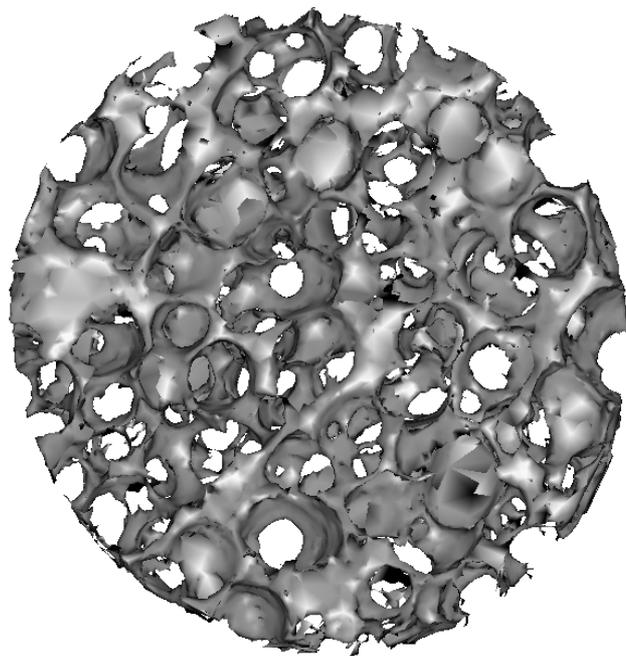
Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. med., Dr.-Ing. habil. Erich Wintermantel
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Hartmut Hoffmann

Die Dissertation wurde am 17.04.2007 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 26.06.2007 angenommen.

Oberflächenmodifizierte Polymerschäume für die dreidimensionale Zellkultur

Alexander Walter



Abstract

In this study three dimensional open porous structures have been made out of polystyrene by non toxic foam processing. The surfaces of the foam structures have been modified by plasma treatment in order to improve wettability. The effects of surface modification on the wettability of the foam structures have been investigated. The capability of surface modified foam structures to serve as a cell carrier has been investigated by use of mammal cells. Especially the effects of three dimensional cell culture on gene expression spectra and differentiation of fat cells have been shown using microarray analysis. As a result fat cells show in three dimensional cell culture in contrast to standard cell culture in flat culture dishes a higher expression of fat typical genes. This points to improved differentiation in three dimensional cell culture.

The open porous foams used in this study have been made out of polystyrene with methods of polymer processing like foam injection molding and foam extrusion and can be produced cost efficient in high quantities. Thus for the first time three dimensional cell culture can be used for large scale screening of pharmaceutical substances.

Kurzfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe nicht toxischer Schäumverfahren dreidimensionale offenporige Strukturen aus Polystyrol hergestellt. Die Oberflächen der Schaumstrukturen wurden zur Verbesserung der Benetzbarkeit durch Plasmabehandlungen modifiziert. Die Auswirkungen der Oberflächenmodifikation auf die Benetzbarkeit der Schaumstrukturen wurden untersucht und dargestellt. Anhand der erzeugten oberflächenmodifizierten Schaumstrukturen wurden umfangreiche Untersuchungen zu deren Besiedelbarkeit mit Säugetierzellen durchgeführt. Insbesondere die Auswirkungen dreidimensionaler Kultivierung auf das Genexpressionsspektrum und die Differenzierung von Fettzellen wurde mit Hilfe von Mikroarrays untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Fettzellen im Gegensatz zu konventioneller zweidimensionaler Kultivierung in ebenen Zellkulturschalen bei Kultivierung in räumlicher Anordnung eine erhöhte Expression der für Fett typischen Gene zeigen. Dies deutet auf verbesserte Differenzierung bei dreidimensionaler Kultivierung hin.

Die in den hier durchgeführten Untersuchungen eingesetzten offenporigen Schäume aus Polystyrol wurden mit Methoden der Kunststoffverarbeitung wie Schaumspritzguss und Schaumextrusion hergestellt und können auch in großen Stückzahlen kostengünstig gefertigt werden. Damit kann erstmalig dreidimensionale Zellkultur in großem Umfang für die Testung von pharmazeutischen Wirkstoffen eingesetzt werden.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die einen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Dr.-Ing. habil. Erich Wintermantel für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit. Herrn Professor Dr.-Ing. Hartmut Hoffmann danke ich für die Bereitschaft als Koreferent diese Arbeit wissenschaftlich zu begutachten. Ferner gilt mein Dank Herrn Professor Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Eine Vielzahl von Kollegen, Mitarbeitern und Studenten haben mich bei der Erstellung dieser Arbeit durch wertvolle Diskussionen oder durch ihre tatkräftige Mithilfe unterstützt. Stellvertretend danke ich Herrn M. Sc. Dipl.-Ing. Stefan Leicher für wertvolle Anregungen zu Schaumspritzguss und Schaumanalyse. Frau Dr. Michaela Kosmann danke ich für Hilfestellungen bei biologischen Fragestellungen. Frau Christine Göbel gebührt mein ganz besonderer Dank für die Durchführung der umfangreichen Zellkulturversuche, die im Rahmen dieser Arbeit notwendig waren. Ebenso möchte ich Herrn Dipl.-Ing. Jochen Boxleitner für die Durchführung von zahlreichen Versuchsreihen zur Oberflächenmodifikation dreidimensionaler Zellträger danken.

Diese Arbeit entstand im Rahmen eines Verbundprojektes zwischen dem Lehrstuhl für Medizintechnik an der TU München, der Wilden AG, Regensburg und der ITEM GmbH, Garching. Ich danke allen Beteiligten für die reibungslose Durchführung dieses Forschungsvorhabens. Der Landesgewerbeanstalt Nürnberg danke ich ganz besonders für die Bereitstellung von Mitteln aus der High-Tech-Offensive Bayern im Rahmen der „Leitprojekte Medizintechnik“. Ein ebensolcher Dank geht an die Wilden AG für Ihr überaus großzügiges finanzielles und ideelles Engagement in diesem Projekt. Den beteiligten Mitarbeitern der Wilden AG danke ich für die Bereitschaft ihre fundierten Kenntnisse der Kunststoffverarbeitung in dieses Forschungsprojekt einzubringen. Stellvertretend danke ich besonders Frau Dipl.-Ing. Angela Schubert und Herrn Dipl.-Ing. Udo Leuschner für ihren Einsatz zur erfolgreichen Durchführung dieses Forschungsvorhabens.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Professor Dr. Will W. Minuth vom Institut für molekulare und zelluläre Anatomie der Universität Regensburg für die Begutachtung des Forschungsprojektes und für seine wertvollen und Ziel führenden Anregungen zur Analyse von Genexpressionsspektren mit Hilfe von Microarrays.

Für die Durchführung der Microarray Analysen danke ich Herrn Dr. Christian Kaps aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Michael Sittinger an der Charité in Berlin.

Schließlich danke ich meinen Eltern, die mich in jeder Phase meiner schulischen und universitären Ausbildung unterstützt haben und meiner Frau Ute, die mich immer wieder motivierte diese Arbeit fertig zu stellen.

Inhalt

Abstract	3
Kurzfassung.....	4
Danksagung	5
Inhalt.....	7
Formelzeichen	9
Begriffserklärungen.....	11
1. Einleitung.....	12
2. Stand der Technik	14
2.1 Kultivierung von Säugetierzellen.....	14
2.2 Werkstoffe für Zellkulturanwendungen.....	15
2.3 Dreidimensionale Zellkultur.....	17
3. Materialien und Methoden	21
3.1 Kunststoffe	21
3.1.1 Polystyrol (PS).....	21
3.1.2 Thermoplastisches Polyurethan (TPU)	22
3.2 Herstellung poröser Zellträger für Zellkulturanwendungen	23
3.2.1 Anforderungen an den Prozess	23
3.2.2 Grundlagen des Schäumens von Polymeren	23
3.2.3 Verfahren zur Herstellung poröser Formkörper.....	26
3.2.4 Schaumspritzguss	28
3.2.5 Schaumextrusion.....	30
3.3 Oberflächenmodifikation offenporiger Zellträger	33
3.3.1 Überblick	33
3.3.2 Plasmabehandlung.....	33
3.3.3 Nasschemische Pfcopolymerisation	35
3.3.4 Plasmapolymerisation.....	37
3.4 Analyse der Porenstruktur.....	39
3.4.1 Ein- und zweidimensionale Porenanalyse.....	39
3.4.2 Dreidimensionale Porenanalyse	40

3.4.3 Messung der Offenporigkeit.....	41
3.5 Analyse der Oberflächeneigenschaften	42
3.6 Biologische Validierung dreidimensionaler Zellträger	43
3.6.1 Zelltypen.....	43
3.6.2 Kultivierung.....	45
3.6.3 Nachweis von 3D-Wachstum und Zellqualität	48
3.6.4 Nachweis der Zellanzahl.....	51
4. Ergebnisse.....	52
4.1 Poröse Zellträger	52
4.1.1 Spritzgegossene Zellträger.....	52
4.1.2 Extrudierte Zellträger	60
4.2. Analyse der Porenstruktur.....	62
4.3 Oberflächenmodifikation	65
4.3.1 Plasmabehandlung.....	65
4.3.2 Plasmaaktivierte Pfropfcopolymerisation	68
4.3.3 Plasmapolymerisation.....	70
4.4 Ergebnisse der Zellversuche.....	72
4.4.1 Inkubations- und Einwachsverhalten	72
4.4.2 Quantitative Ergebnisse.....	75
4.4.3 Ergebnisse der Genexpressionsstudie.....	76
5. Diskussion	81
5.1 Herstellung dreidimensionaler Strukturen für Zellkulturanwendungen ...	81
5.2 Oberflächenmodifikation	82
5.3 Analyse der Porenstruktur.....	83
5.4 Zellbesiedlung und Analyse des Zellwachstums.....	84
6. Zusammenfassung und Ausblick.....	87
7. Anhang	88
8. Literatur	92

Formelzeichen

W	Energie für die Keimbildung [J]
σ	Oberflächenspannung der Kunststoffschmelze [$\frac{N}{mm^2}$]
A	Oberfläche einer Pore [m^2]
P_g	Partialdruck des Treibgases [Pa]
P_∞	Umgebungsdruck [Pa]
P_l	Partialdruck der Schmelze [Pa]
V_p	Volumen einer Pore [mm^3]
n	Anzahl der Moleküle
μ_g	chemisches Potential der Gasmoleküle
μ_l	chemisches Potential der Moleküle in der Schmelze
r	Variable für den Porenradius
r^*	kritischer Porenradius
W_{hom}^*	für die homogene Keimbildung erforderliche Energie
R	Porenradius bis zur Grenzfläche zwischen Gas und Schmelze
R_f	äusserer Zellradius
τ_{rr}	Spannungskomponente in radialer Richtung
$\tau_{\theta\theta}$	Spannungskomponente in Umfangsrichtung
ρ	Dichte der Kunststoffschmelze
ρ_g	Dichte des Treibmittels
D	Diffusionskoeffizient [$\frac{cm^2}{s}$]
c	Gaskonzentration
t	Zeit für das Porenwachstum
c_0	Gaskonzentration zu Beginn des Porenwachstums
K_w	Konstante
P_{g0}	Gasdruck innerhalb der Pore zu Beginn des Porenwachstums
n_F	Flächenzelldichte [cm^{-2}]
N_0	Porenanzahl
A_0	Flächenausschnitt [cm^2]

n_R	räumliche Zelldichte [cm^{-3}]
ω	offenzelliger Volumenanteil
V_g	geometrisches Gesamtvolumen [mm^3]
V_i	gasdichtes Volumen [mm^3]
ϕ	gasdichter Volumenanteil [mm^3]
p	Gasdruck [Pa]
V	Gasvolumen [mm^3]
R	Gaskonstante
T	Temperatur

Begriffserklärungen

Fold change:	Mit der Basis zwei potenzierte Differenz der Fluoreszenzsignale zweier Proben bei der Bestimmung des Genexpressionsspektrums.
Zelllinie:	Durch Genmutation oder Genmanipulation veränderte Zellen, die sich kontinuierlich und unaufhörlich teilen.
Primäre Zellen:	Direkt aus Geweben oder Organen beispielsweise im Rahmen einer Biopsie isolierte Zellen.
Prädipozyten:	Vorläuferzellen der Fettzellen (Adipozyten). Prädipozyten können durch hormonelle Stimulation zu Fettzellen differenziert werden.
Adipozyten:	Fettzellen, die aus Vorläuferzellen (Prädipozyten) entstehen.
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle Medium, Standardmedium für viele Säugetierzellen
CLSM:	Confocal Laserscanning Microscope
DNA:	Desoxyribonucleinsäure
RNA:	Ribonucleinsäure
RT-PCR:	Vervielfältigung von RNA durch Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
Flowzytometer:	Gerät zur Bestimmung der Zellanzahl durch Messung der Impedanz während des Durchströmens mit einer Zellsuspension
WST:	Bestimmung der Stoffwechselaktivität durch Messung des Umsatzes an Tetrazolium Salz
LDH:	Laktatdehydrogenase-Test zur indirekten Bestimmung der Zellanzahl
REM:	Rasterelektronenmikroskop
EDX:	Elementbestimmung durch energiedispersive Röntgenanalyse
PLA:	Polylactid, Polymilchsäure
PLLA:	Poly(L)lactid, Polymilchsäure
PGA:	Polyglykolid
PS:	Polystyrol
PMMA:	Polymethylmethacrylat
PET:	Polyethylenterephthalat
PTFE:	Polytetrafluorethylen

1. Einleitung

Die Züchtung humaner und tierischer Zellen spielt sowohl im Labor als auch für klinische Anwendungen eine große Rolle. Einsatzgebiete für gezüchtete Zellen reichen dabei von der Testung pharmazeutischer Wirkstoffe und der Toxizität von Werkstoffen bis hin zum klinischen Einsatz als Implantat [1-4].

In der Entwicklung pharmazeutischer Wirkstoffe erlangt die frühzeitige Selektierung neuer Formulierungen aufgrund der im Entwicklungsverlauf steigenden Kosten zunehmende Bedeutung [5, 6]. Ziel ist es die Sensitivität und Selektivität der Testverfahren in frühen Entwicklungsphasen zu erhöhen und eine möglichst genaue Vorhersage über die Wirkung einer Substanz im Körper zu treffen. Nach einer Vorauswahl im Zellkulturversuch werden neuartige Pharmazeutika im Tierversuch auf ihre Wirkungen und Nebenwirkungen hin untersucht. Aufgrund der komplexen Wechselwirkungen im Organismus können die Ergebnisse aus dem Tierversuch zum Teil erheblich von den Ergebnissen aus dem Zellkulturexperiment abweichen. Mit Hilfe verbesserter Zellkulturtests kann die Vorhersagbarkeit der Wirkung von pharmazeutischen Wirkstoffen auf einen Zellverbund erhöht werden. Die Anzahl notwendiger Tierversuche kann damit reduziert werden.

Die Toxizität von Werkstoffen wird ebenfalls mit Hilfe von Zellkulturen und Tierversuchen überprüft. Durch verbesserte Zellkultursysteme können auch hier die Aussagekraft des Zellversuchs gesteigert und Tierversuche reduziert oder vermieden werden. Im Bereich der Zellzüchtung für therapeutische Zwecke wurden in den vergangenen Jahren beachtliche Erfolge erzielt. So konnten von Heimburg et al. erfolgreich Fettzellen auf dreidimensionalen abbaubaren Kunststoffgerüsten züchten und anschließend für Anwendungen in der plastischen Chirurgie einsetzen [1, 7-9]. Ähnlich positive Ergebnisse erzielten Kimura et al. [10]. Cima et al. verwendeten ebenfalls poröse Strukturen aus abbaubaren Kunststoffen zur Transplantation von ausserhalb des Körpers gezüchteten Zellen [11]. Chevallay et al. zeigten Möglichkeiten auf wie dreidimensionale Kollagenstrukturen zur Gewebezüchtung und für Anwendungen in der Gentherapie eingesetzt werden können [12]. Huss erzeugte eine dreidimensionale Kokultur von Fett- und Epithelzellen als Ersatz für nach Tumorentfernung fehlendes Gewebe der weiblichen Brust [13].

Mit Methoden der Zellkultivierung soll eine ausreichende Anzahl von qualitativ hochwertigen Zellen bereitgestellt werden. Bestimmend für die Qualität von Zellen sind vor allem deren Vitalität und deren Differenzierungsgrad, das heißt das Vorhandensein von zelltypischen Merkmalen. Bereits im 19. Jahrhundert wurden embryonale Hühnerzellen ausserhalb eines Organismus gezüchtet. Die isolierten Zellen wurden in Kulturgefäßen aus Glas und später in Einweggefäßen aus Kunststoff kultiviert. Heute stehen eine Reihe von speziell

funktionalisierten Oberflächen zur Kultivierung von direkt aus dem Körper isolierten Primärzellen und permanenten Zelllinien zur Verfügung. Ein weiterer Schritt zur Verbesserung der Kulturbedingungen stellt die Nachbildung des natürlichen dreidimensionalen Zellmilieus mit Hilfe von porösen Zellträgern dar.

Diese werden aus natürlichen und synthetischen Materialien, insbesondere aus Polymeren und aus Keramik gefertigt. Natürliche Materialien können Qualitätsschwankungen aufweisen oder verunreinigt sein. Dies erfordert einen hohen Aufwand für die Gewinnung, Aufreinigung und für die Qualitätssicherung. Synthetische Matrices imitieren die natürlichen Materialien und müssen somit oft einen Kompromiss bezüglich ihrer Biokompatibilität eingehen. Die heute gebräuchlichen Herstellverfahren für dreidimensionale Zellträger sind oft aufwendig und teuer wodurch eine weite Verbreitung dreidimensionaler Zellkulturmatrices eingeschränkt wird. Das Angebot ist heterogen und oft auf spezielle Anwendungen konzentriert.

Eine besondere Herausforderung stellt die Bestimmung von Zellanzahl und Zellqualität in dreidimensionalen Konstrukten dar. Die etablierten Analyseverfahren können nur teilweise übertragen werden [14].

In dieser Arbeit sollen Wege erarbeitet werden, wie dreidimensionale Zellkulturträger zur Verbesserung der Kulturbedingungen von Säugetierzellen mit Methoden der Kunststoffverarbeitung in großen Stückzahlen wirtschaftlich hergestellt werden können. Die Anzahl und die Qualität von dreidimensional kultivierten Zellen wird mit Hilfe moderner Analyseverfahren, wie z. B. Microarrays, dargestellt. Die so hergestellten und validierten Zellträger können nach einer geeigneten Besiedlung als leistungsfähiges Testsystem für pharmazeutische Wirkstoffe eingesetzt werden.

2. Stand der Technik

2.1 Kultivierung von Säugetierzellen

Säugetierzellen werden im Labor für vielfältige Anwendungen gezüchtet. Neben der Testung von Materialien auf ihre biologische Verträglichkeit werden vor allem pharmazeutische Wirkstoffe in der Wechselwirkung mit Zellen getestet [15-17]. Dies stellt die erste Stufe in der Entwicklung von neuen Arzneimitteln dar. Im Zellkulturversuch können bereits viele Wirkstoffe vor dem folgenden wesentlich aufwendigeren Tierversuch selektiert werden [5, 6]. Die Kultivierung findet unter sterilen Bedingungen vorwiegend in glatten Zellkulturgefäßen statt, unter anderem in Zellkulturflaschen, Petrischalen und Multiwellplatten [18]. Zur Verbesserung der Zelladhäsion werden die Oberflächen der Zellkulturschalen meist durch eine Plasmabehandlung hydrophilisiert [18-20]. Für die Kultivierung bestimmter Zelltypen werden die Oberflächen der Kulturgefäße mit wachstumsfördernden Komponenten aus der extrazellulären Matrix wie Kollagene, Fibronectin oder Laminin beschichtet [18, 21]. Die angewachsenen Zellen werden durch flüssige Nährmedien versorgt. Die Nährmedien enthalten neben Nährstoffen Fungizide und Antibiotika um ein Zellwachstum ohne schützendes Immunsystem zu ermöglichen [18, 21, 22]. Die Oberflächen von Zellkulturmaterialien werden meist modifiziert, um eine ausreichende Akzeptanz des künstlichen Materials durch das biologische System der Körperzelle zu erreichen.

Die fehlende Strukturkompatibilität aufgrund der unnatürlichen zweidimensionalen Umgebung [23] kann zu Dedifferenzierung der Zellen und damit zum Verlust typischer Eigenschaften wie Zellmorphologie oder Produktion spezifischer Proteine führen [24, 25].

Neben der Kultur von adhärenenten Zellen auf Kunststoffoberflächen existieren weitere Verfahren wie beispielsweise die Suspensionskultur oder die Perfusionskultur, in der Zellen permanent von Nährmedium umströmt werden und die Einstellung eines Gradienten der Zusammensetzung des Nährmediums möglich ist. Diese speziellen Kulturbedingungen können die Ausbildung von typischen Zelleigenschaften unterstützen [21, 26, 27].

2.2 Werkstoffe für Zellkulturanwendungen

Werkstoffe für Zellkulturanwendungen können in biogene und nicht biogene Materialien eingeteilt werden, Abbildung 2-1.

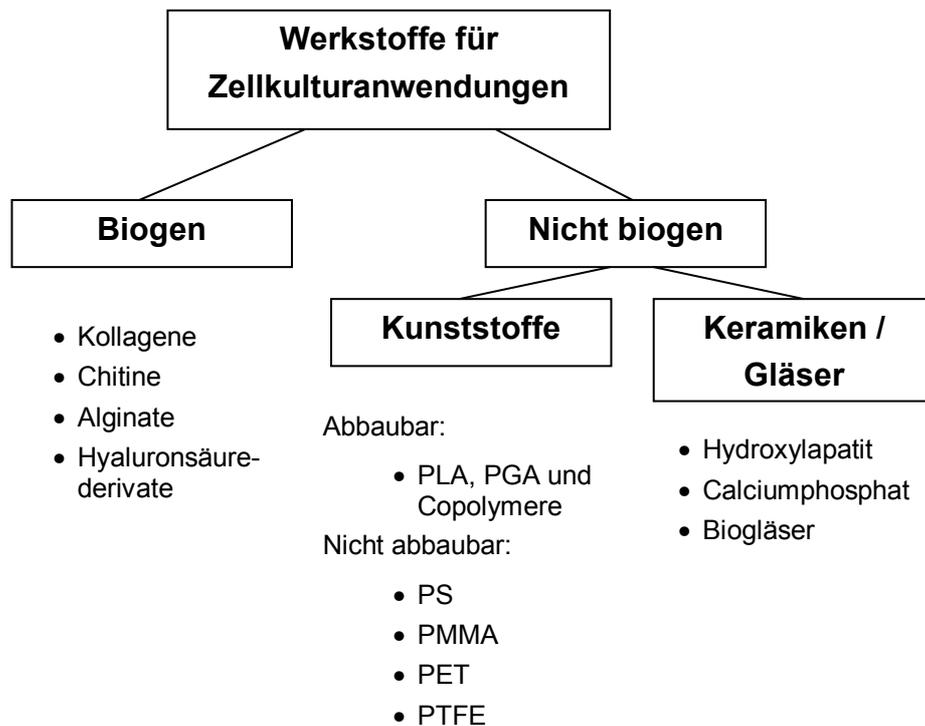


Abbildung 2-1: Einteilung der Werkstoffe für Zellkulturanwendungen in biogene und nicht biogene Werkstoffe. Biogene Werkstoffe wie Kollagene, Chitine oder Alginate sind natürlichen Ursprungs, nicht biogene Werkstoffe werden künstlich synthetisiert. Bei den Kunststoffen unterscheidet man abbaubare und nicht abbaubare Werkstoffe. Typische abbaubare Werkstoffe sind Polylactide (PLA) und Polyglycolide (PGA). Zu den in der Zellkultur verwendeten nicht abbaubaren Kunststoffen gehören Polystyrol (PS), Polymethylmethacrylat (PMMA), Polyethylenterephthalat (PET) und Polytetrafluorethylen (PTFE). Keramiken und Biogläser finden ebenfalls als synthetische Werkstoffe Anwendung in der Zellkultur.

Wie aus Abbildung 2-1 hervorgeht gehören zu den biogenen Materialien beispielsweise Kollagene oder Chitine [4, 28, 29] sowie Alginate und Hyaluronsäurederivate [30]. Im Bereich der nicht biogenen Materialien werden hauptsächlich Kunststoffe und Keramiken oder Composite dieser beiden Materialien [31] eingesetzt. Kunststoffe haben aufgrund Ihrer guten Verarbeitungseigenschaften und der geringen Rohstoffkosten eine weite

Verbreitung. Keramiken wie beispielsweise Hydroxylapatit oder Calciumphosphate werden aufgrund ihrer chemischen Ähnlichkeit zu natürlichem Knochengewebe bevorzugt für die Kultivierung von Osteoblasten eingesetzt. Okamoto et al. konnten auf porösen Scaffolds aus Hydroxylapatit die osteoinduktive Wirkung des keramischen Zellträgers auf Zellen aus dem Knochenmark von Ratten nachweisen [32]. Schantz et al. zeigten, dass keramische Zellträger die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Zellen unterstützen [31]. Petronis et al. nutzten bei der Kultivierung von Hepatozyten positive Eigenschaften keramischer Zellträger wie eine mikroporöse Struktur, gute Biokompatibilität und die Bildung von Zellaggregaten auf der keramischen Oberfläche [33].

Bei den Kunststoffen kann zwischen abbaubaren und nicht abbaubaren Kunststoffen unterschieden werden. Als Grundlage für abbaubare Materialien dienen häufig Polymilchsäuren und deren Copolymere [3]. Hutmacher gibt einen guten Überblick über die zur Herstellung dreidimensionaler Zellträger eingesetzten abbaubaren Kunststoffe [34]. Mikos et al. sowie Mooney et al. stellten Schäume aus Polymilchsäure (PLLA) beziehungsweise aus Copolymeren der Polymilchsäure mit Polyglykolid (PGA) zur Kultivierung von Zellen her [35-37]. Cima et al. verwendeten ebenfalls abbaubare Zellträger aus PLLA [11]. Der Einsatz von PGA und PLA zur Züchtung von Knorpelzellen wurde von Agrawal et al. beschrieben [38].

Bei den nicht abbaubaren Kunststoffen werden Polystyrol (PS) [18, 39], Polyethylenterephthalat (PET) [40, 41] oder Polytetrafluorethylen (PTFE) [42] eingesetzt. Häufig werden die Oberflächeneigenschaften durch spezielle Verfahren modifiziert. So behandelten beispielsweise Bisson et al. PET-Oberflächen durch Pfropfcopolymerisation, um selektiv Kollagen zu binden und somit die Zelladhäsion zu steuern [43]. Lampin et al. zeigten die Abhängigkeit der Zelladhäsion von der Oberflächenrauigkeit und Benetzbarkeit eines Zellkultursubstrates [19]. Die Benetzbarkeit von Kunststoffoberflächen kann wie von Lee et al. gezeigt durch Veränderung der Oberflächenladung mit Hilfe einer Coronaentladung modifiziert werden [44].

Biogene Materialien zeichnen sich durch einen hohen Grad an Biokompatibilität aus, wobei sie als Naturprodukte Verunreinigungen mit pathogenen Keimen unterworfen sein können. Nakagawa et al. fanden beispielsweise in Alginaten, Kollagenen und Chitinen natürlichen Ursprungs verschiedenste Endotoxine, die Entzündungsreaktionen hervorrufen können [45]. Ascher et al. zeigten, dass Produkte aus Hyaluronsäurederivaten trotz guter Biokompatibilität Rückstände aus dem Herstellungsprozess enthalten können [46]. Kanayama et al. entwickelten aus den vorgenannten Gründen einen speziellen Herstellprozess, um biogenes Material für therapeutische Zwecke mit geringen Endotoxingehalten herzustellen [47].

Optimale Werkstoffe für Zellkulturanwendungen sollten bei einfacher und kostengünstiger Herstellung maximale Oberflächen- und Strukturkompatibilität aufweisen [23]. Oberflächenkompatibilität bedeutet, dass die physikalischen und chemischen Eigenschaften einer Oberfläche Zellwachstum ermöglichen und optimal unterstützen. Strukturkompatibilität berücksichtigt zusätzlich die Wechselwirkung zwischen der mit einem Werkstoff herstellbaren Struktur und dem Zellwachstum.

2.3 Dreidimensionale Zellkultur

Durch die Kultivierung von Zellen in dreidimensionalen Konstrukten wird versucht, die natürlichen Wachstumsbedingungen der Zellen nachzubilden. Wie im natürlichen Gewebe sollen Wechselwirkungen der Zellen untereinander und mit der umgebenden Matrix ermöglicht werden [48, 49]. Dadurch soll ein natürliches Zellwachstum gefördert und Dedifferenzierung vermieden werden [26]. Kultivierung von Zellen in dreidimensionalen Wachstumsstrukturen führt zu einer veränderten Zellmorphologie [25, 50, 51], zu Veränderungen der Zell-Matrix-Interaktionen [49, 52] und in der Genexpression [50, 53-55]. Die Genexpression beschreibt das Ablesen und Weiterverarbeiten der im Erbgut gespeicherten Information und stellt die Grundlage für die Synthese zelltypischer Proteine dar. Hui und Krishnendu zeigten, dass dreidimensionale Kultivierung eine hämatopoetische Differenzierung von embryonalen Stammzellen fördern kann [56]. In ähnlicher Weise zeigten Liu et al. die positiven Auswirkungen dreidimensionaler Kultivierung auf die Genexpression von Mäusestammzellen [57]. Die Bildung von Knorpelzellen aus mesenchymalen Stammzellen bei dreidimensionaler Kultivierung wurde von Aung untersucht [58]. Abbildung 2-2 zeigt schematisch Unterschiede in der Zellmorphologie und der Zellorientierung bei zweidimensionaler und dreidimensionaler Kultivierung. Bei zweidimensionaler Kultivierung wird ein ausgebreiteter Zellmonolayer ausgebildet, der für die meisten Zellen nicht der natürlichen Wachstumsform entspricht. In dreidimensionaler Kultur bilden Zellen ein räumliches Netzwerk aus, das dem dreidimensionalen Zellwachstum *in vivo* entspricht.

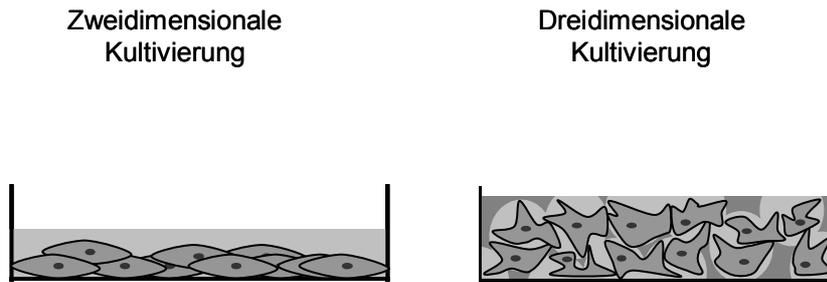


Abbildung 2-2: Kultivierung von Säugetierzellen in zweidimensionalen Zellkulturschalen (links) und in dreidimensionalen porösen Strukturen (rechts). Bei zweidimensionaler Kultivierung zeigen die Zellen eine flache Gestalt. Bei dreidimensionaler Kultivierung füllen die Zellen den zur Verfügung stehenden Raum weitgehend aus und können, unterstützt durch die Trägerstruktur, eine zelltypische dreidimensionale Morphologie ausbilden.

Organotypische Kulturen stellen eine weitere Möglichkeit dar, Zellen in einer dreidimensionalen Umgebung zu kultivieren. Hierbei wird aus Biopsien gewonnenes Gewebe in ebenen Zellkulturschalen kultiviert [59]. Die fehlende dreidimensionale Umgebung führt zu einem raschen Auflösen des Zellverbundes und zu einer nachfolgenden Dedifferenzierung [48]. Dreidimensionale Gerüste können helfen, die räumliche Organisation der Zellen aufrecht zu erhalten. Wie in der zweidimensionalen Zellkultur werden hierfür biogene und nicht biogene Materialien verwendet (vgl. Kapitel 2.2). Eine dreidimensionale Architektur wird häufig durch Schäumen oder durch dreidimensionale Anordnung von Fasern erzeugt. Schwammförmige Strukturen aus natürlichen Kollagenen [8] und Hydrogelen [50], aber auch aus Hyaluronsäurederivaten [7, 30] finden häufig Anwendung, wobei Kontaminationsproblematiken mit Endotoxinen bei Verwendung von biogenen Materialien bestehen. Die Rohstoffe müssen aufwendig gewonnen und gereinigt werden und daher sind die Kosten für derartige Kultursysteme hoch und der Einsatz ist begrenzt.

Wie in Abbildung 2-2 und Tabelle 2-1 dargestellt ist, bieten dreidimensionale Wachstumssubstrate neben verbesserter Differenzierung den Vorteil guter Zellverankerung, wodurch das Ablösen eines Zellrasens oder das Aufschwimmen von Zellen vermieden wird. Dies ist besonders bei Adipozyten von Bedeutung, da diese im differenzierten Zustand aufgrund der eingelagerten Fette eine geringere Dichte aufweisen als das umgebende Medium und somit zum Aufschwimmen neigen [60]. Zudem kann wie von Friedl gezeigt durch dreidimensionale Kultivierung ein natürliches Migrationsverhalten insbesondere von Tumorzellen simuliert werden [61].

Nach Hutmacher müssen die Versorgung der Zellen mit Medium und die Entsorgung von Stoffwechselmetaboliten in einer dreidimensionalen Struktur durch einen hohen Grad an

Offenporigkeit und eine hohe Interkonnektivität der Poren gewährleistet sein [34]. Eine optimale Ver- und Entsorgung der Zellen muss bereits in der Entwicklung eines dreidimensionalen Zellträgers berücksichtigt werden.

Tabelle 2-1 zeigt exemplarisch die wichtigsten Unterschiede bei der Kultivierung von Zellen auf zweidimensionalen und in dreidimensionalen Substraten. Die Strukturkompatibilität des dreidimensionalen Zellträgers mit der natürlicherweise dreidimensionalen Zellmorphologie unterstützt die Ausprägung räumlichen Zellwachstums. Zusätzlich können im Gegensatz zu nur wenigen Zelllagen bei zweidimensionaler Kultivierung in einem dreidimensionalen Zellträger mehrere Zelllagen ausgebildet werden. Bei dichter Zellbesiedlung kann sich ein Zellrasen von der Oberfläche eines Kulturgefäßes lösen. In einer dreidimensionalen Matrix sind die Zellen in der Regel gut mechanisch verankert, wodurch das Ablösen von Zellen verhindert wird. Fischbach weist auf deutlich reduzierte Ablösung von Fettzellen bei Langzeitkultivierung in dreidimensionalen PGA-Geweben im Vergleich zu zweidimensionaler Kultivierung hin [60]. Als Reaktion auf die physiologischen Umgebungsbedingungen in einer dreidimensionalen Matrix produzieren Zellen bei dreidimensionaler Kultivierung deutlich mehr extrazelluläre Matrix (ECM) als bei Kultivierung in ebenen Kulturgefäßen. Webb et al. konnten bei dreidimensionaler Kultivierung von Fibroblasten ein erhöhtes Expressionsniveau von Genen nachweisen, die für die Synthese von extrazellulärer Matrix verantwortlich sind [62]. Martin et al. zeigten erhöhte Produktion extrazellulärer Matrix bei dreidimensionaler Kultivierung von Stammzellen aus dem Knochenmark [63]. In einem dreidimensionalen Zellträger können höhere Differenzierungsgrade erreicht werden als bei zweidimensionaler Kultivierung. So fanden Hishikawa et al. erhöhte Produktion des für Knochen typischen Proteins Osteocalcin bei osteogener Differenzierung in dreidimensionalen Zellträgern im Vergleich zu zweidimensionaler Kultur. Levenberg et al. konnten die Differenzierung von embryonalen Stammzellen bei dreidimensionaler Kultivierung steigern [54] und Boo differenzierte in dreidimensionalen Zellträgern erfolgreich mesenchymale Stammzellen zu Knochenzellen [64].

Tabelle 2-1: Vergleichende Darstellung der Auswirkungen zweidimensionaler und dreidimensionaler Kultivierung auf die kultivierten Zellen.

Zweidimensionale Kultivierung	Dreidimensionale Kultivierung
<ul style="list-style-type: none">• Inkompatibilität zwischen ebenem Kultursubstrat und räumlicher Zellmorphologie• Flache Zellmorphologie• Wenige Zelllagen• Ablösung des Zellrasens bei dichter Besiedlung• Wenig ECM• Geringer Differenzierungsgrad	<ul style="list-style-type: none">• Kompatibilität zwischen räumlichem Kultursubstrat und räumlicher Zellmorphologie• Räumliche Zellmorphologie• viele Zelllagen• gute Verankerung der Zellen im Substrat• viel ECM• hoher Differenzierungsgrad

3. Materialien und Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten Materialien und Verfahren zur Herstellung dreidimensionaler Zellträger, zu deren Besiedlung und zur Analyse des Besiedlungsergebnisses beschrieben. Neben der allgemeinen Beschreibung der Verfahren wird jeweils auf die konkrete Versuchsplanung zur Herstellung, Optimierung und Validierung offenporiger Zellträger eingegangen. Ziel ist es, die Herstellung und Oberflächenmodifikation eines struktur- und oberflächenkompatiblen dreidimensionalen Zellträgers zu beschreiben. Ferner wird die Wechselwirkung des Zellträgers mit Adipozyten als Basis zur Herstellung eines Testsystems für lipophile Pharmazeutika dargestellt.

3.1 Kunststoffe

3.1.1 Polystyrol (PS)

Polystyrol ist ein amorpher Thermoplast. Der harte, spröde und formstabile Kunststoff wird aufgrund seiner optischen und mechanischen Eigenschaften häufig zur Herstellung von Verbrauchsmaterialien für Zellkulturanwendungen wie Zellkulturschalen verwendet. Polystyrol ist physiologisch unbedenklich und zeigt in vollständig polymerisiertem Zustand keine schädigende Wirkung auf Organismen. Abbildung 1 zeigt die chemische Strukturformel der Monomereinheit von Polystyrol mit dem charakteristischen Styrolring.

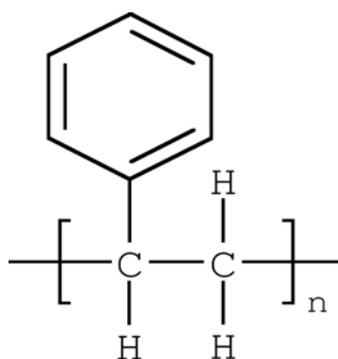


Abbildung 3-1: Strukturformel der Monomereinheit von Polystyrol. An einer Kette mit Kohlenstoffatomen sind Wasserstoffatome und der charakteristische Styrolring angeordnet. Während der Polymerisation werden endlich viele Monomereinheiten zu langen Kettenmolekülen verbunden. Die typische Struktur der Monomereinheit führt im polymerisierten Zustand zu den charakteristischen Eigenschaften des Polystyrols.

Polystyrol kann durch Spritzgießen und Extrusion verarbeitet werden. Beim Spritzgießen liegt die Schmelztemperatur zwischen 180 und 230 °C, in der Extrusion wird Polystyrol im Temperaturbereich von 150 – 180 °C verarbeitet [65]. Die in dieser Arbeit entwickelten Zellkulturschalen mit dreidimensionaler Porenstruktur bestehen aus einer Trägerplatte, die mit 24 Vertiefungen zur Aufnahme von runden porösen Zellträgern ausgestattet ist. Die Trägerplatte der Zellkulturschale mit dreidimensionaler Wachstumsstruktur besteht aus einem dünnwandigen Bauteil mit langen Fließwegen. Daher wurde für die Herstellung der Trägerplatte das leichtfließende PS 168N von BASF verwendet. Aufgrund der großen Auswahl an Polystyrolen für verschiedenste Anwendungen wurden durchgängig Polystyroltypen von BASF verwendet.

Die spritzgegossenen Schaumstrukturen wurden aufgrund der günstigen Eigenschaften beim Schäumen von PS 145D aus dieser Polystyroltype gefertigt. BASF bietet zusätzlich besonders für die Extrusion geeignete Polystyrole an. PS 158K aus dieser Reihe wurde für die Extrusionsversuche eingesetzt.

3.1.2 Thermoplastisches Polyurethan (TPU)

Thermoplastisches Polyurethan (TPU) weist aufgrund einer wechselnden Anordnung von harten und weichen Molekülsequenzen elastische Eigenschaften auf [66].



Abbildung 3-2: Abfolge von harten und weichen Sequenzen in thermoplastischem Polyurethan (nach [67]).

Die harten Bereiche bestehen aus einem Diisocyanat, das an ein weiches Polyetherdiol gebunden wird. Durch ein niedermolekulares Diol erfolgt eine Kettenverlängerung zu einem langkettigen Makromolekül.

Aufgrund seiner elastischen Eigenschaften ist TPU besonders für Anwendungen mit mechanischer Stimulation von Zellen geeignet. TPU wird von Bayer (USA) unter dem Handelsnamen Texin in medizinischer Reinheit angeboten. TPU kann mit Methoden der Kunststoffverarbeitung wie Spritzgießen oder Extrusion verarbeitet werden.

3.2 Herstellung poröser Zellträger für Zellkulturanwendungen

3.2.1 Anforderungen an den Prozess

An einen Prozess zur Herstellung poröser Zellträger für Zellkulturanwendungen werden verschiedene grundlegende Anforderungen gestellt. Es dürfen keine Zusatz- und Hilfsstoffe wie beispielsweise chemische Treibmittel verwendet werden, die als toxische Rückstände im Produkt zurückbleiben können. Das verwendete Material darf nicht durch thermische Einwirkungen verändert werden. Im Hinblick auf die notwendige Strukturkompatibilität muss der Prozess fähig sein, eine optimale Porengrößen und Porengrößenverteilungen bei optimaler Offenporigkeit zu liefern [23, 34]. Für die Produktion wettbewerbsfähiger Zellkulturartikel ist ein wirtschaftlicher Herstellungsprozess erforderlich, der möglichst wenig Arbeitsschritte für die Weiterverarbeitung benötigt.

3.2.2 Grundlagen des Schäumens von Polymeren

Alle Schäumverfahren können in die grundlegenden Schritte Gasbeladung, Nukleierung, Porenwachstum und Porenstabilisierung eingeteilt werden [68, 69]. Durch die Gasbeladung (Injektion) und die homogene Einmischung des Gases in die Schmelze wird eine homogene übersättigte Mischung erzeugt. Durch das Herbeiführen einer thermodynamischen Instabilität entstehen an Fehlstellen innerhalb der Polymermatrix (Eigennukleierung) oder an der Oberfläche von Partikeln (Fremdnukleierung) Nukleierungskeime [70]. Die Eigennukleierung wird als homogene, die Fremdnukleierung als heterogene Nukleierung bezeichnet [68]. Delale [71] und Abraham [72] beschreiben die theoretischen Vorgänge bei homogener Nukleierung, die den Versuchsbedingungen in dieser Arbeit am nächsten kommen. Eine thermodynamische Instabilität kann wie bei Park et al. beschrieben durch einen Druckabfall herbeigeführt werden [73]. Durch eine Temperaturerhöhung kann ebenfalls die Nukleierung gestartet werden [74]. Ein Nukleierungskeim ist dann stabil, wenn die zur Keimbildung nötige Energie kleiner als die freie Energie des Systems ist [74].

Die zur homogenen Keimbildung nötige Energie kann wie folgt beschrieben werden. Alle verwendeten Formelzeichen wurden zu Beginn der Arbeit beschrieben:

$$W = \sigma \cdot A - (P_g - P_l) \cdot V_p + n \cdot (\mu_g - \mu_l) \quad (\text{Gl. 3.1})$$

wobei μ das chemische Potential der Moleküle beschreibt. Im Gleichgewichtszustand der chemischen Potentiale der Gas- und Flüssigkeitsmoleküle vereinfacht sich (Gl. 3.1) zu:

$$W = 4\pi r^2 \sigma + \frac{4}{3}\pi r^3 (P_g - P_l) \quad (\text{Gl. 3.2})$$

Der kritische Radius r^* bezeichnet den Porenradius, ab dem ein weiteres Porenwachstum energetisch günstig für das Gesamtsystem ist. Er kann durch Bildung der ersten Ableitung von (Gl. 3.2) berechnet werden:

$$\frac{dW}{dr} = 0 \quad (\text{Gl. 3.3})$$

$$r^* = \frac{2\sigma}{P_g - P_l} \quad (\text{Gl. 3.4})$$

Die zur Erreichung des kritischen Porenradius erforderliche freie Energie beträgt:

$$W_{\text{hom}}^* = \frac{16\pi}{3(P_g - P_l)^2} \cdot \sigma^3 \quad (\text{Gl. 3.5})$$

Die zur heterogenen Keimbildung erforderliche freie Energie ist stets geringer als die zur homogenen Keimbildung erforderliche Energie [74].

Im Folgenden werden schematisch die Mechanismen der Schaumentstehung dargestellt. Abbildung 3-3 zeigt exemplarisch verschiedene Phasen der Einmischung eines physikalischen Treibmittels in eine Kunststoffschmelze mit nachfolgender Nukleierung und anschließendem Porenwachstum. Nach Injektion des im überkritischen Zustand vorliegenden Treibmittels in die flüssige Schmelze liegt ein 2-Phasen-Gemisch mit heterogener Verteilung der Gas- und Polymeranteile vor. Aus diesem entsteht durch Sorptions- und Diffusionsvorgänge, unterstützt durch die Rotation der Schnecke in der Plastifiziereinheit, ein homogenes Gemisch. Durch Druckabfall [73] oder Temperaturerhöhung [74] entsteht ein thermodynamisches Ungleichgewicht. Dieses wird durch Übergang des in der Schmelze gelösten Gases vom flüssigen in den gasförmigen Aggregatzustand ausgeglichen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Nukleierung [71, 75, 76]. Die Gasbildung beginnt bevorzugt an Fehlstellen innerhalb der Polymermatrix. Diese werden als Nukleierungskeime bezeichnet [74]. Sind diese Fehlstellen Fremdpartikel wie zum Beispiel Füllstoffe, so spricht man von heterogener

Nukleierung. Sind keine Fremdpartikel vorhanden, so handelt es sich um eine homogene Nukleierung .

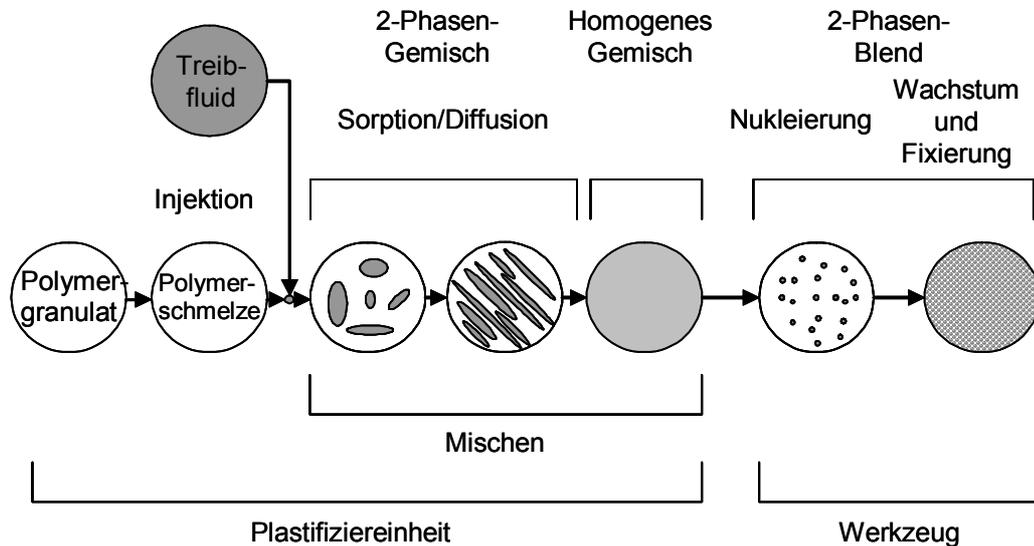


Abbildung 3-3: Mechanismen der Treibmittelbeladung und der Schaumstehung. Nach der Injektion eines Treibfluids in die flüssige Schmelze entsteht durch Sorptions- und Diffusionsvorgänge während des Mischens aus einem 2-Phasen-Gemisch ein homogenes Gemisch. Nach Induktion eines thermodynamischen Ungleichgewichts durch Druckabfall oder Temperaturerhöhung bilden sich in der Nukleierungsphase Porenkeime. Die Keime wachsen zu Poren. Durch Abkühlung der Schmelze nimmt die mechanische Festigkeit der Kunststoffanteile zu. Hierdurch werden die in der Wachstumsphase entstandenen Poren fixiert und bleiben nach Erkalten der Polymerschmelze erhalten (nach [77]).

Nach dem Beginn der Nukleierung besteht die Schmelze aus einem 2-Phasen-Blend aus Gasblasen und einem übersättigten Polymer-Treibmittel-Gemisch.

Auf die Nukleierung folgt das Porenwachstum. Shafi et al. [78] beschrieben wie Amon und Denson [79] die grundsätzlichen Mechanismen während des Porenwachstums. Aus der Schmelze diffundiert gelöstes Gas in die während der Nukleierung entstandenen Hohlräume und lässt die Poren wachsen, Abbildung 3-3. Treibende Kraft ist hierbei der Konzentrationsunterschied der in der Schmelze und in den wachsenden Poren enthaltenen Gasmolekülen [73]. Dem wachsenden Partialdruck im Inneren der Pore wirkt die Oberflächenspannung der flüssigen Schmelze an der Blasenoberfläche entgegen [80]. Das Energiegleichgewicht kann wie folgt beschrieben werden [81]:

$$\sigma \cdot dA = P_g \cdot dV$$

(Gl. 3.6)

Für kugelförmige Poren gilt:

$$\sigma \cdot 8 \cdot \pi \cdot r \cdot dr = P_g \cdot 4 \cdot \pi \cdot r^2 \cdot dr \quad (\text{Gl. 3.7})$$

Der Gasdruck innerhalb einer Pore kann wie folgt beschrieben werden [82]:

$$P_g - P_\infty - \frac{2\sigma}{R} + \int_R^{R_f} (\tau_{\gamma\gamma} - \tau_{\theta\theta}) \frac{dr}{r} = 0 \quad (\text{Gl. 3.8})$$

Die zeitliche Änderung des Porenwachstums ist:

$$\frac{d}{dt}(\rho_g R^3) = 3\rho_g DR^2 \left[\frac{\partial c}{\partial r} \right]_{r=R} \quad (\text{Gl. 3.9})$$

Die konzentrationsabhängige Diffusionsgleichung lautet:

$$\frac{\partial c}{\partial t} + V_r \frac{\partial c}{\partial r} = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} (Dr^2 \frac{\partial c}{\partial r}) \quad (\text{Gl. 3.10})$$

Diesen Berechnungen liegen folgende Rand- und Startbedingungen zugrunde:

$$c(r,0) = c_0 = K_w P_{g0} \quad (\text{Gl. 3.11})$$

$$c(R,t) = K_w P_g \quad (\text{Gl. 3.12})$$

Findet kein Gasverlust nach aussen statt (innenliegende Poren), so gilt:

$$\frac{\partial c}{\partial r} = 0 \quad (\text{Gl. 3.13})$$

Dem Porenwachstum wirken die während des Abkühlungsprozesses sinkende Viskosität und die zunehmende Festigkeit des Materials entgegen. Sobald ein Gleichgewicht zwischen der Festigkeit des Materials und dem Gasdruck innerhalb der Poren erreicht ist, findet kein weiteres Porenwachstum statt. Durch weiteres Abkühlen der Polymerschmelze wird die während des Porenwachstums entstandene Struktur fixiert.

3.2.3 Verfahren zur Herstellung poröser Formkörper

Verfahren zur Herstellung poröser Formkörper liegt meist die Schaffung von bleibenden Hohlräumen in der umgebenden Polymermatrix zugrunde. Die Hohlräume können dabei durch Festkörper, Flüssigkeiten oder Gase (Porenbildner) entstehen und müssen solange

stabilisiert werden bis durch Abkühlen der Polymerschmelze in einen Bereich unterhalb der Glasübergangstemperatur eine ausreichende Festigkeit der umgebenden Matrix erreicht ist. Verbliebene Festkörper müssen durch Verflüssigung oder Vergasung oder durch Lösen in einem geeigneten Lösemittel entfernt werden. Verbliebene Flüssigkeiten und Gase können beispielsweise durch Unterdruck abgesaugt werden, Abbildung 3-4.

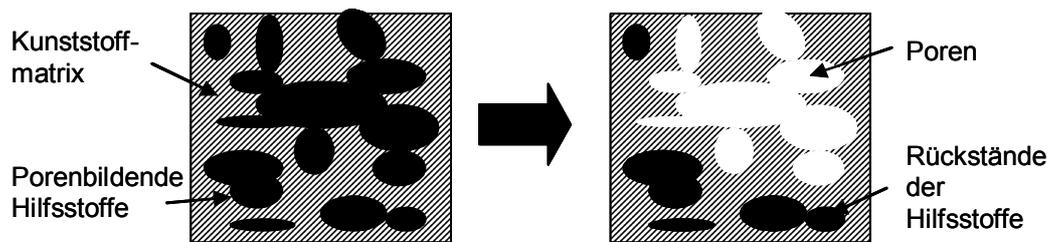


Abbildung 3-4: Entfernung von porenbildenden Hilfsstoffen (schwarz) aus einer Kunststoffmatrix. Die während des Verarbeitungsprozesses in eine Kunststoffmatrix eingebetteten porenbildenden Hilfsstoffe wie beispielsweise Salzpartikel werden durch Lösung aus der Kunststoffmatrix heraustransportiert. Je nach Effizienz des Lösungsverfahrens kann ein gewisser Anteil der Hilfsstoffe als Rückstand in der Matrix verbleiben (rechtes Bild).

Bei der Verarbeitung von Thermoplasten treten Temperaturen im Bereich von 150 – 250°C auf. Daher ist es erforderlich, dass auch die zur Porenbildung verwendeten Stoffe in diesem Temperaturbereich thermisch stabil sind.

Ein spezielles Verfahren zur Herstellung poröser Formkörper stellt salt leaching dar. Hierbei werden wasserlösliche Salzpartikel verwendet [83]. Mikos et al. stellten poröse Kunststoffmembranen her, indem sie Salzpartikel in eine Kunststoffschmelze mischten und nach dem Erstarren der Schmelze die Partikel aus der Kunststoffschmelze lösten [36]. Das Volumen der Salzpartikel verbleibt bei ausreichend hohem Füllgrad als offenes Porensystem innerhalb der Kunststoffmatrix.

Das Schäumen mit chemischen Treibmitteln kann zu den Verfahren mit gasförmigen Porenbildnern gezählt werden, da durch die Zersetzung des festen, flüssigen oder gasförmigen Treibmittels porenbildende Gase entstehen.

Schäumverfahren mit physikalischen Treibmitteln arbeiten mit überkritischen Gasen und gehören ebenfalls zu den Verfahren mit gasförmigen Porenbildnern, da hier ein Phasenübergang vom überkritischen Zustand zum gasförmigen Zustand stattfindet. Der Einsatz von nicht toxischen Treibmitteln bietet Vorteile bei Zellkulturanwendungen.

Neben Batchprozessen wie dem CESP (Controlled Expansion of Saturated Polymer) [84, 85], die hauptsächlich im Laborbereich Anwendung finden, existieren industrietaugliche Sonderverfahren für das Spritzgießen und für die Extrusion. Im Bereich Spritzgießen sind das MuCell Verfahren der Fa. Trexel [86, 87] und das Optifoam Verfahren der Fa. Sulzer verbreitet [88]. Im MuCell Verfahren wird ein überkritisches Gas über ein Nadelventil punktuell in die Kunststoffschmelze injiziert und durch eine Mischschnecke mit dem Kunststoff vermischt [87, 89]. Im Optifoam Verfahren wird ein überkritisches Gas über eine Sinterhülse in die aufgeweitete Ringströmung der Kunststoffschmelze dosiert [90]. Anschließend findet eine Homogenisierung des Gemisches durch statische Mischer statt. Die Fa. Berstorff, Hannover, hat speziell für die Extrusion das Schaumex Verfahren entwickelt [91, 92]. Hier wird ähnlich dem MuCell Verfahren punktuell Gas in den kontinuierlichen Schmelzestrom injiziert.

3.2.4 Schaumspritzguss

Spritzguss stellt ein diskontinuierliches Fertigungsverfahren dar. Beim Schaumspritzguss mit physikalischen Treibmitteln wird beispielsweise überkritisches CO₂ in die Kunststoffschmelze dosiert [77]. Beim Einspritzen in das Werkzeug expandiert das gelöste Gas und bildet Gasblasen [86]. Sind die Gasblasen stabil bis der erkaltete Kunststoff ausreichende Festigkeit erreicht hat, so entstehen Hohlräume. Die Größe und die Verteilung der Hohlräume hängen vor allem von der Massetemperatur, der Einspritzgeschwindigkeit, der Werkzeugtemperatur, dem eingespritzten Schmelzevolumen und der Abkühlungsgeschwindigkeit ab [87, 93].

Das überkritische Gas kann punktuell durch Hochdruckventile (MuCell) [94], Abbildung 3-5, oder flächig durch spezielle poröse Sinterdüsen (Optifoam) [95], Abbildung 3-6, zugegeben werden. In jedem Fall ist mit Hilfe von speziellen Mischschnecken oder statischen Mischern sicher zu stellen, dass das Gas homogen in der Schmelze verteilt wird. Der Gasexpansion wirkt der durch das abgeschlossene Werkzeugvolumen aufgebaute Werkzeuginnendruck entgegen [87]. Durch die Steuerung des Werkzeuginnendrucks über das eingespritzte Schmelzevolumen kann die Gasexpansion und damit das Porenwachstum gezielt beeinflusst werden.

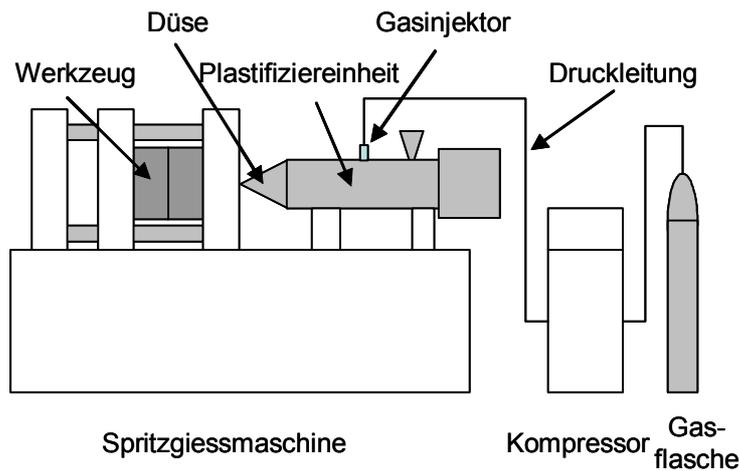


Abbildung 3-5: Schematischer Aufbau einer Spritzgussmaschine mit MuCell-Ausrüstung zum physikalischen Schäumen. Das als Treibmittel verwendete Gas wird aus einer Gasflasche entnommen und in einem Kompressor soweit verdichtet bis es im überkritischen Zustand vorliegt. Das komprimierte Gas wird durch eine Hochdruckleitung zum Gasinjektor geleitet. Dort wird das überkritische Gas in die Plastifiziereinheit injiziert und dort mit der flüssigen Kunststoffschmelze vermischt. Über die Düse wird das Polymer-Gas-Gemisch in das Werkzeug eingespritzt, wo das Gas expandiert und die Porenbildung beginnt (nach[94]).

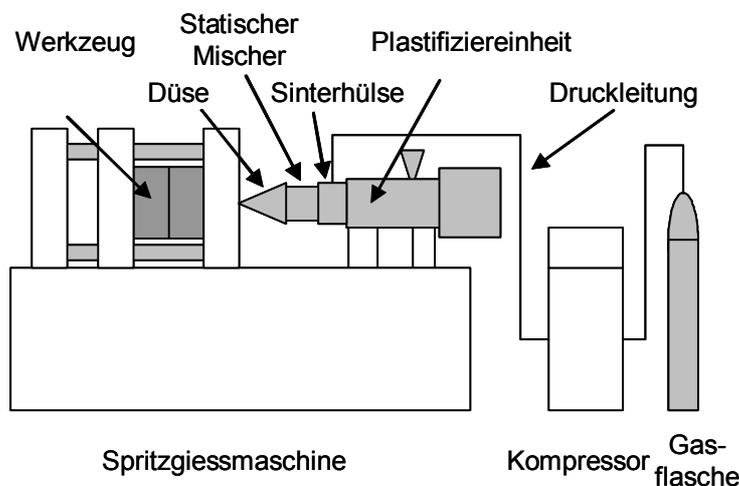


Abbildung 3-6: Schematischer Aufbau einer Spritzgussmaschine mit Optifoam-Düse zum physikalischen Schäumen. Das als Treibmittel verwendete Gas wird aus einer Gasflasche entnommen und in einem Kompressor soweit verdichtet bis es im überkritischen Zustand vorliegt. Das komprimierte Gas wird durch eine Hochdruckleitung zu einer vor der Düse angeordneten Sinterhülse geleitet. Dort wird das überkritische Gas über eine poröse Sinterhülse in die vorbeiströmende Kunststoffschmelze injiziert. In einem nachgelagerten statischen Mischelement wird das überkritische Gas mit der flüssigen Kunststoffschmelze vermischt. Über die Düse wird das Polymer-Gas-Gemisch in das Werkzeug eingespritzt, wo das Gas expandiert und die Porenbildung beginnt (nach [96]).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden mit dem in Abbildung 3-5 schematisch dargestellten Aufbau durchgeführt.

Das Werkzeug wurde mit wechselbaren Formeinsätzen hergestellt, um eine hohe Flexibilität bezüglich der Bauteilgeometrie sicher zu stellen.

3.2.5 Schaumextrusion

Ähnlich wie im Schaumspritzguss kann in der Schaumextrusion ein in der Kunststoffschmelze gut lösliches Gas (z. B. N_2 , CO_2) im überkritischen Zustand in die Schmelze eindosiert werden. Beim Austritt aus der Düse expandiert das gelöste Gas und führt zur Bildung von Hohlräumen, die je nach Prozessführung abgeschlossen oder offen sein können.

Die Gasinjektion kann punktförmig oder flächig erfolgen. Ein Beispiel für punktförmige Gaseinbringung ist der Foamex Extruder der Fa. Berstorff [92]. Eine Gaseinbringung über die Wandfläche eines Zylinders findet in der am Institut für Kunststoffverarbeitung (IKV), Aachen, entwickelten Optifoam Gasinjektionsdüse statt [90, 96]. Die Schaumstruktur wird hauptsächlich durch folgende Parameter beeinflusst [97, 98]:

- Art des Treibgases
- Schmelztemperatur
- Druckabfall an der Düse
- Druckabfallrate an der Düse.

Im Gegensatz zum Schaumspritzguss findet die Gasexpansion in der freien Extrusion gegen Atmosphärendruck und nicht gegen den Werkzeuginnendruck statt [99]. Hierdurch können in der Schaumextrusion deutlich höhere Aufschäumgrade erreicht werden als im Schaumspritzguss. Nach Verlassen der Extrusionsdüse können die Aussenabmessungen des extrudierten Strangs und damit auch die Porenstruktur durch geeignete Kalibriereinheiten eingestellt werden [100-103]. Nach Michaeli werden unter anderem Druckluftkalibrierungen und Vakuumkalibrierungen eingesetzt [104]. Bei Druckluftkalibrierungen wird ein Hohlprofil durch im Inneren des Profils angelegte Druckluft an die Wandung der Kalibrierung gedrückt. Bei der Vakuumkalibrierung wird zwischen Profil und Kalibrierungswand ein Vakuum angelegt [103]. In dieser Arbeit wurde nach Shafi et al. [78, 105] und Park et al. [73, 99, 106] ohne Kalibrierung extrudiert, da zunächst der Extrusionsprozess ohne Einflüsse aus der Kalibrierung betrachtet werden sollte.

Im Schaumspritzguss bieten sogenannte „atmende“ Werkzeuge die Möglichkeit den Werkzeuginnendruck zu reduzieren und somit das Porenwachstum zu begünstigen. Hierbei wird nach dem Einspritzen das Volumen der Kavität durch eine leichte Öffnungsbewegung des Werkzeugs vergrößert [107].

Abbildung 3-7 zeigt den prinzipiellen Aufbau eines Schaumextruders. Das Granulat wird über den Trichter eingezogen und mit Hilfe der Schnecke plastifiziert und komprimiert. Auf die Plastifizierung folgt eine Gasinjektionseinheit. Hier wird entweder punktuell oder flächig komprimiertes Gas in die Schmelze dosiert. Im Anschluss an die Gasinjektion wird das Gas-Polymer-Gemisch entweder durch Mischelemente auf der Schnecke oder durch einen statischen Mischer gemischt. Durch die Düse, deren Geometrie maßgeblich den Druckabfall und die Druckabfallrate bestimmt, entspannt sich das Gas-Polymergemisch und es entsteht ein poröses Extrudat mit typischer Porengeometrie und Porengröße. Xu et al. zeigten auf wie die Düsengeometrie Druckabfall und Druckabfallrate und damit die Porenstruktur bestimmt [98].

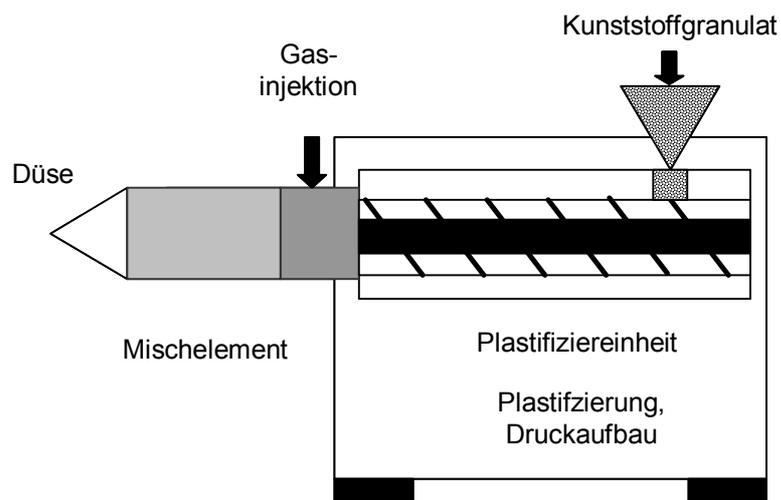


Abbildung 3-7: Prinzipieller Aufbau eines Schaumextruders. Das Kunststoffgranulat wird über einen Trichter der Plastifizierung zugeführt und dort aufgeschmolzen. Während der Plastifizierung wird Druck in der Schmelze aufgebaut. Am Ende der Plastifiziereinheit wird überkritisches Treibgas in die Schmelze dosiert. Das nun entstandene inhomogene 2-Phasen-Gemisch wird in einem statischen Mischer zu einem homogenen Gemisch verarbeitet. An der Düse verlässt die Schmelze durch die Düsenöffnung den Extruder. Induziert durch den Druckabfall nach Verlassen der Düse beginnt sofort die Gasexpansion und damit das Porenwachstum.

Abbildung 3-8 zeigt den Versuchsaufbau zur Extrusion offenporiger Schäume. Die Kunststoffschmelze tritt aus dem Extruder in die Gasinjektionsdüse. Dort wird Gas über eine Hochdruckleitung in die Schmelze dosiert. In einem anschließend angeordneten statischen Mischer wird das Gas in die Schmelze eingemischt. Über die Düse tritt das Polymer-Gas-Gemisch aus dem Extruder und das gelöste Gas kann expandieren.

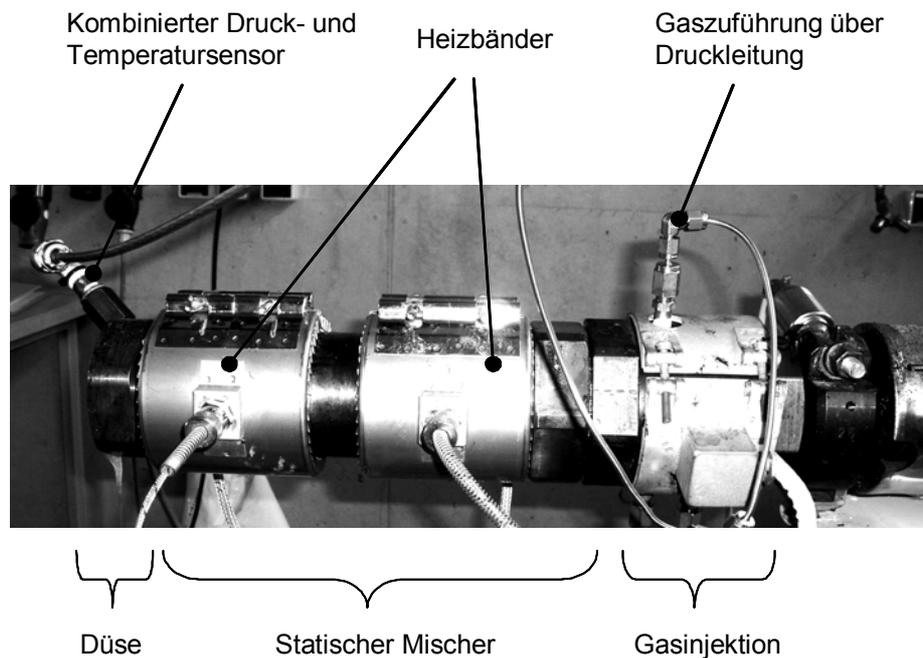


Abbildung 3-8: Detailansicht des Versuchsaufbaus zur Schaumextrusion. In die flüssige Schmelze wird im Bereich der Gasinjektion (rechts) überkritisches Gas dosiert. Das inhomogene 2-Phasen-Gemisch wird im Bereich des statischen Mixers (mitte) homogenisiert. An der Düse (links) verlässt die flüssige Schmelze den Extruder.

Während im Spritzguss das flüssige Gas-Schmelze Gemisch an der kalten Werkzeugwand sofort erstarrt und eine kompakte Aussenhaut bildet, entsteht in der Extrusion, bedingt durch den schlechten Wärmeübergang zwischen Kunststoffschmelze und der Umgebungsluft, nur eine dünne Haut an der Oberfläche des Extrudats. Die Dicke dieser Haut kann durch geeignete Kühlmaßnahmen (Wasser, Druckluft, flüssiges CO₂) beeinflusst werden. Das Extrudat wird über eine geeignete Abzugsvorrichtung transportiert, wobei die Abzugsgeschwindigkeit Einfluss auf den Durchmesser des extrudierten Strangs hat. Im Anschluss an eine Kühlstrecke können weitere Verarbeitungsschritte wie Ablängen, Schneiden oder Schälen folgen.

3.3 Oberflächenmodifikation offenporiger Zellträger

3.3.1 Überblick

Während mit Hilfe eines offenporigen Schaums Strukturkompatibilität erreicht wird, muss die Oberflächenkompatibilität offenporiger Zellträger durch eine Modifizierung der Kunststoffoberflächen optimiert werden. Ziel der Oberflächenmodifikation ist es, die Adhäsion von Zellen als Voraussetzung zu deren Wachstum zu fördern [108, 109]. Ohya et al. [110] zeigten ebenso wie Lee [44] den Einfluss reaktiver Gruppen und der Oberflächenladung auf das Zellwachstum. Van Wachem et al. [20] konnten einen Einfluss der Oberflächenladung und der Benetzbarkeit von Kunststoffoberflächen auf die Adhäsion von Endothelzellen nachweisen. Eine bereits bei glatten Zellkulturschalen bekannte Art reaktive Gruppen auf Kunststoffoberflächen zu schaffen, ist die Hydrophilisierung durch Plasmaentladung [111]. Durch die auf der Oberfläche erzeugten Radikale wird die Benetzung der Oberflächen mit Zellsuspension gefördert. Die in der Zellsuspension enthaltenen Zellen können somit leichter an hydrophile Oberflächen anwachsen als an vergleichbare hydrophobe Oberflächen. Durch die in Kapitel 3.3.3 beschriebene nasschemische Pfropfcopolymerisation können einzelne Moleküle eines hydrophilen Kunststoffs an eine hydrophobe Oberfläche gebunden werden, um somit die Benetzbarkeit des hydrophoben Kunststoffs zu verbessern. Das Ergebnis der in Kapitel 3.3.4 dargestellten Plasmapolymerisation ist ebenfalls eine dünne Schicht eines hydrophilen Kunststoffs auf einem hydrophoben Substrat. Hierbei wird der Kunststoff als Kondensat eines mit Monomer gesättigten Dampfs abgeschieden.

3.3.2 Plasmabehandlung

Plasmaentladungen werden standardmäßig zur Erhöhung der Benetzbarkeit von Kunststoffoberflächen eingesetzt [111-113]. In einer evakuierten Kammer wird mit Hilfe einer Hochfrequenzentladung das verwendete Prozessgas ionisiert. Die im Plasma enthaltenen Ionen und freien Elektronen treffen auf die zu modifizierende Oberfläche und rufen dort verschiedene Reaktionen hervor. Je nach Energie der auftreffenden Teilchen findet entweder ein Aufbrechen von Polymerketten, Radikalbildung auf der Oberfläche oder eine Implantation von Fremdatomen statt [113]. Abbildung 3-9 zeigt den Aufbau der Plasmaanlage, wie sie für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche verwendet wurde.

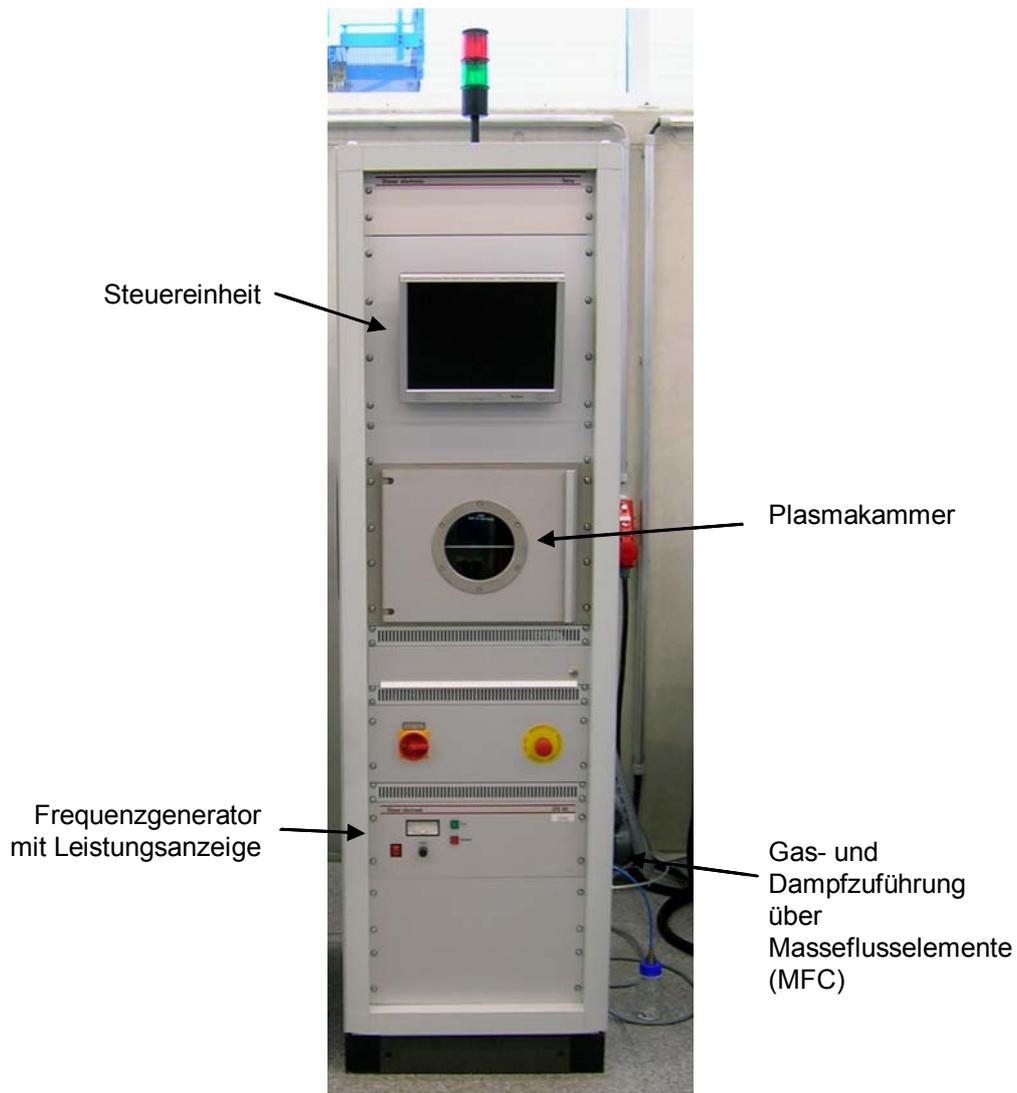


Abbildung 3-9: Plasmaanlage (Fa. Diener, Nagold) zur Plasmabehandlung dreidimensionaler Objekte. Das zu behandelnde Objekt wird in eine evakuierbare Plasmakammer eingelegt. In diese können über Masseflusselemente (MFC = mass flow controller) Gase oder Dämpfe eingeleitet werden. Über die Steuereinheit werden die Prozessparameter eingestellt. Ein Frequenzgenerator mit Leistungsanzeige erzeugt ein hochfrequentes Wechselfeld, mit dem die in der Plasmakammer befindlichen Prozessgase ionisiert werden.

Plasma wirkt bei Kunststoffen hauptsächlich in den oberflächennahen Bereichen bis in eine Tiefe von etwa $10\ \mu\text{m}$ [114]. Es findet Abtrag durch Ätzreaktionen, oberflächennahe Anlagerung aktivierter Gasmoleküle und Radikalbildung statt [111]. Bei einer mit organischen Molekülen gesättigten Atmosphäre kann Abscheidung von Polymeren auftreten [113]. Diese sogenannte Plasmapolymersation wird in Kapitel 3.3.4 näher beschrieben. Ein der Plasmabehandlung verwandtes Verfahren, bei dem Kunststoffoberflächen durch eine Hochspannungsentladung bei Atmosphärendruck hydrophilisiert werden, wird als Coronaentladung bezeichnet. Im Gegensatz zu einer reinen Coronaentladung, die bei

Umgebungsdruck stattfindet, können wie von Boxleitner gezeigt [115] in einer Plasmakammer auch dreidimensionale Objekte wie beispielsweise offenporige Schaumstrukturen modifiziert werden. In der in Abbildung 3-10 dargestellten evakuierten Plasmakammer erzeugt eine Hochspannungsentladung zwischen der Elektrode und der geerdeten Wand der Plasmakammer ein den gesamten Raum der Reaktionskammer und somit auch das Werkstück ausfüllendes Plasma. Mit diesem räumlichen Plasma können dreidimensionale Objekte behandelt werden.

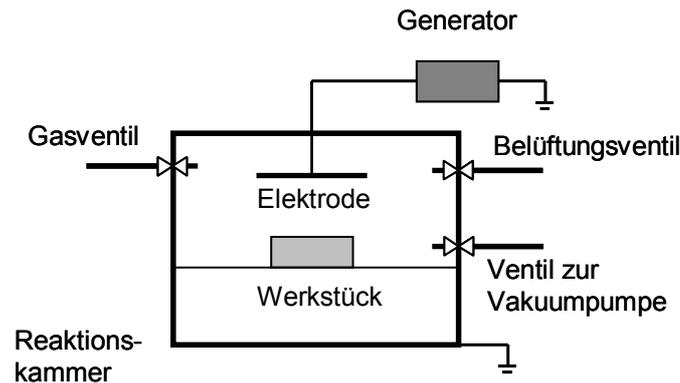


Abbildung 3-10: Aufbau einer Plasmakammer zur Behandlung von dreidimensionalen Objekten. Das zu behandelnde dreidimensionale Werkstück befindet sich in einer evakuierten Reaktionskammer, die über ein Gasventil mit einem Prozessgas beaufschlagt werden kann. Ein Hochspannungsgenerator erzeugt an der Elektrode ein hochfrequentes Wechselfeld. Zwischen der Elektrode und der geerdeten Wand der Reaktionskammer findet eine Hochspannungsentladung statt und erzeugt in der Reaktionskammer ein ionisiertes Gas (Plasma).

Der Plasmaprozess wird vom Prozessdruck, von der Dauer der Behandlung, von der Generatorleistung und von der Lage des zu behandelnden Objekts innerhalb der Plasmakammer beeinflusst. Der Abstand der zu modifizierenden Oberflächen von der Elektrode wurde konstant gehalten. Ebenso wurde der Prozessdruck bei Verwendung von Luft als Prozessgas konstant gehalten. Die Auswirkung der Behandlungsdauer und der Generatorleistung auf die Benetzbarkeit wurde untersucht.

3.3.3 Nasschemische Pfcopolymerisation

Während eine Plasmabehandlung die Oberflächeneigenschaften eines Kunststoffsubstrats verändert, wird mit nasschemischer Pfcopolymerisation eine dünne Schicht eines zweiten Kunststoffes auf eine meist durch Coronaentladung oder durch Plasma aktivierte Oberfläche aufgebracht. Der zu behandelnde Kunststoff wird mit Hilfe einer Coronaentladung oder der in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Plasmabehandlung aktiviert und in eine meist wässrige Monomerlösung getaucht. Die Monomere binden meist radikalisch an die während der

Aktivierung geschaffenen aktiven Gruppen [116]. Anschließend werden überschüssige Monomerreste abgewaschen [44].

Gupta et al. aktivierten beispielsweise PET-Oberflächen durch eine Plasmabehandlung mit nachfolgender Pfcopolymerisation in einer wässrigen Acrylsäurelösung [117].

Bisson et al. modifizierten PET-Oberflächen durch plasmaaktivierte Pfcopolymerisation mit Acrylsäure und konnten damit die Adhäsion glatter Muskelzellen auf den modifizierten Oberflächen verbessern [43].

Plasmaaktivierte Pfcopolymerisation bietet große Freiräume in der Wahl des zu beschichtenden Kunststoffes. Im Hinblick auf den Einsatz in der Zellkultur muss sichergestellt werden, dass alle Monomerreste rückstandsfrei entfernt werden. Insbesondere bei Schaumstrukturen bedeutet dies einen erhöhten Reinigungsaufwand.

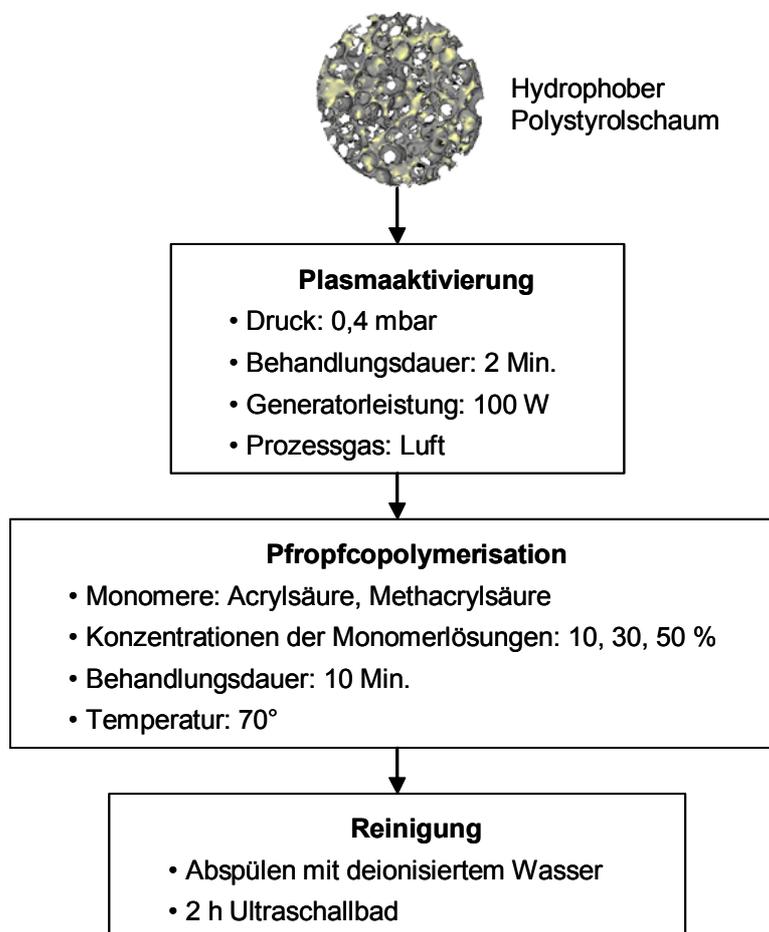


Abbildung 3-11: Vorgehensweise zur Hydrophilisierung hydrophober Polystyrolschäume durch nasschemische Pfcopolymerisation. Nach einer Plasmaaktivierung der Kunststoffoberflächen werden jeweils 10 geschäumte Proben durch nasschemische Pfcopolymerisation mit Acryl- und Methacrylsäure bei Konzentrationen von 10, 30 und 50 % hydrophilisiert. In den Proben verbliebenes Restmonomer wird durch einen abschließenden Reinigungsschritt aus der Schaumstruktur entfernt.

Abbildung 3-11 zeigt die Vorgehensweise, welche bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen angewendet wurde. Für jede der folgenden Parametereinstellungen wurden zehn offenporige Kunststoffschäume zwei Minuten bei einer Generatorleistung von 100 W und einem Druck von 0,4 mbar mit Luft als Prozessgas in der Plasmakammer aktiviert. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten in eine wässrige Lösung mit einem Volumenanteil von 10, 30 und 50 % Acrylsäure und Methacrylsäure eingetaucht. Die Pfropfcopolymerisation wurde bei einer Temperatur von 70° C durchgeführt. Die Proben wurden zunächst in deionisiertem Wasser vorgereinigt und anschließend für 2 Stunden in ein Ultraschallbad gegeben. Anschließend wurde die Benetzbarkeit der Proben entsprechend dem in Kapitel 3.5 vorgestellten Verfahren untersucht.

3.3.4 Plasmapolymerisation

Wie bei der Pfropfcopolymerisation (Kap. 3.3.3) wird in der Plasmapolymerisation eine dünne Schicht eines hydrophilen Kunststoffes auf ein hydrophobes Substrat aufgebracht. Es erfolgt eine plasmaaktivierte Abscheidung von Monomeren aus einem gesättigten Dampf organischer Moleküle [113, 118]. Es muss durch nachfolgende Reinigung des zu behandelnden Werkstücks ebenfalls sichergestellt werden, dass keine Monomere auf der behandelten Oberfläche verbleiben.

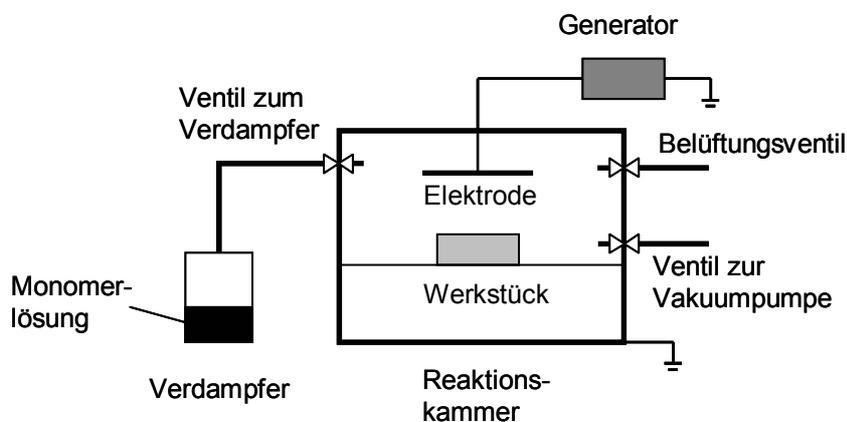


Abbildung 3-12: Aufbau einer Plasmakammer zur Plasmapolymerisation von dreidimensionalen Objekten. Das zu behandelnde dreidimensionale Werkstück befindet sich in einer evakuierten Reaktionskammer, die über ein Ventil mit einem Verdampfer verbunden ist. Der Verdampfer enthält eine Monomerlösung (z. B. Acrylsäure). Durch Evakuierung der Reaktionskammer wird bei geöffnetem Verdampferventil im Verdampfer ein Unterdruck erzeugt. Der Dampfdruck in der Monomerlösung reicht dann aus, um bei Raumtemperatur einen Dampf der Monomerlösung zu erzeugen. Dieser gelangt über das offene Verdampferventil in die Reaktionskammer. Dort erzeugt ein Hochspannungsgenerator an der Elektrode ein hochfrequentes Wechselfeld. Zwischen der Elektrode und der geerdeten Wand der Reaktionskammer findet eine Hochspannungsentladung statt, die zur Abscheidung der Monomere auf dem Werkstück führt.

Abbildung 3-12 zeigt den schematischen Aufbau einer Plasmaanlage zur Plasmapolymerisation. Im Gegensatz zur Plasmabehandlung unter Verwendung eines Prozessgases (Kapitel 3.3.2) wird bei der Plasmapolymerisation ein Dampf mit organischen Molekülen in die Reaktionskammer geleitet. Die organischen Moleküle binden an die während der Plasmabehandlung an einer Kunststoffoberfläche entstandenen Radikale und aktiven Gruppen.

In den hier durchgeführten Versuchen sollte eine Verbesserung der Benetzbarkeit offenporiger Polystyrolschäume durch Plasmapolymerisation erreicht und optimale Prozessparameter identifiziert werden. Hierfür wurden zunächst jeweils 10 offenporige Polystyrolschäume mit einem Durchmesser von 10 mm in einer Plasmakammer unter Zugabe des Prozessgases CO_2 bei einem Prozessdruck von 0,4 mbar und einer Generatorleistung von 500 W für eine Minute aktiviert. Die optimale Generatorleistung war aus Vorversuchen bekannt. Anschließend wurde das Verdampferventil geöffnet und aus einer Glasflasche mit 99%iger Acrylsäure wurden organische Moleküle verdampft. Die Prozessdrücke von 0,45, 0,55 und 0,60 mbar wurden über die Öffnung des Verdampferventils geregelt.

3.4 Analyse der Porenstruktur

3.4.1 Ein- und zweidimensionale Porenanalyse

Ein- und zweidimensionale Analyseverfahren auf Basis mikroskopischer Aufnahmen stellen einfache Möglichkeiten dar, den Aufbau einer Schaumstruktur zu erfassen. Mit einem Lichtmikroskop (Axioskop 2 MATmot, Zeiss, Oberkochen) mit Kamera (AxioCam MRc 5, Zeiss, Oberkochen) und mit einem Rasterelektronenmikroskop (JSM-6060LV, Jeol, Tokyo, Japan) wurden mikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch die Schaumstruktur angefertigt. Für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde der Kunststoffschäum auf einen leitfähigen Probenträger aufgeklebt und zur Verbesserung der Leitfähigkeit mit Hilfe eines Sputtercoaters (MED 020, BAL-TEC AG, Balzers, Liechtenstein) 60 Sekunden lang bei einem Strom von 40 Milliampere mit Gold beschichtet. Ausgehend von den mikroskopischen Aufnahmen wurde die eindimensionale und die zweidimensionale Porendichte bestimmt.

Bei der eindimensionalen Porenanalyse werden beliebige Strecken definierter Länge über das Schnittbild gelegt und die Anzahl der durch die Strecke geschnittenen Poren bestimmt. Diese Anzahl wird durch die Länge der Strecke geteilt und man erhält die eindimensionale Zelldichte in der Einheit „pores per inch“ (PPI). Ähnlich wird die zweidimensionale Zelldichte bestimmt. Durch Auszählen der in einem Flächenausschnitt A_0 enthaltenen Zellen erhält man die Zellanzahl N_0 . Der Quotient aus N_0 und A_0 wird als Flächenzellendichte n_F bezeichnet [119]:

$$n_F = \frac{N_0}{A_0}$$

(Gl. 3.14)

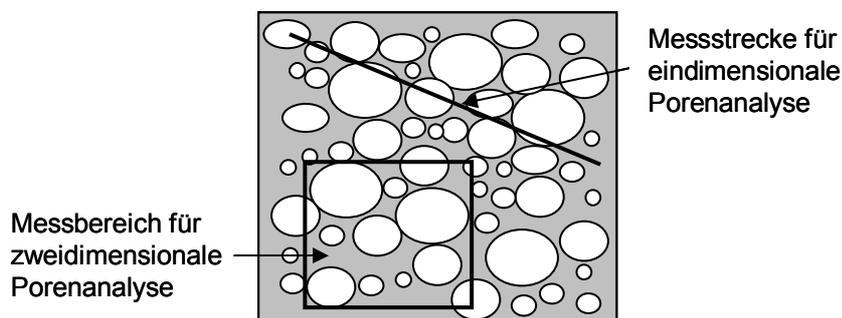


Abbildung 3-13: Schematische Darstellung der Vermessung von mikroskopischen Schnittbildern poröser Körper durch eindimensionale und zweidimensionale Porenanalyse. Bei der eindimensionalen Porenanalyse werden die von einer Messstrecke geschnittenen Poren gezählt und durch die Länge der Messstrecke geteilt. Bei der zweidimensionalen Porenanalyse werden die in einem Messbereich befindlichen Poren gezählt und durch die Fläche des Messbereiches geteilt.

Durch geeignete Annahmen wie gleichförmige Verteilung der Poren im Raum und mathematische Modelle kann von der zweidimensionalen Zelldichte auf die dreidimensionale Zelldichte n_R geschlossen werden:

$$n_R = n_F^{3/2} \quad (\text{Gl. 3.15})$$

Mit Methoden der Bildverarbeitung können zusätzlich zur Zelldichte die durchschnittlichen Porendurchmesser und die statistische Verteilung der Porendurchmesser über den analysierten Querschnitt bestimmt werden. Es wurden Auswertungen mit halbautomatischen und automatischen Auswertalgorithmen durchgeführt.

Für die halbautomatische Analyse wurden die Schnittbilder zunächst mit einem Raster markiert. Die Umfänge der an den Kreuzungspunkten des Rasters befindlichen Poren wurden markiert. Mit der Bildanalysesoftware ImageJ wurde die mittlere Fläche der markierten Poren gemessen und mit Hilfe eines Skalierungsfaktors f (Auflösung mal Vergrößerung) umgerechnet. Mit Excel wurden die erhaltenen Daten ausgewertet. Legt man ein kugelförmiges Porenmodell mit gleichmäßiger räumlicher Porenverteilung zugrunde, so kann aus den erhaltenen Daten der mittlere Porendurchmesser bestimmt werden.

Im automatischen Auswertalgorithmus basierend auf der Software Cellenger (Cellenger 4.0, Definiens AG, München) werden die Porengrenzen anhand von Helligkeitsunterschieden einzelner Bildpixel erkannt und markiert. Die Nutzung von Helligkeitsunterschieden an den Porenbegrenzungen zur automatischen Erkennung der Poren liegt ebenfalls dem am Institut für Kunststoffverarbeitung entwickelten Analyseprogramm OZELLA zugrunde [120]. Zusätzlich konnten Durchgänge zwischen benachbarten Poren als dunkle Flächen innerhalb der Poren identifiziert und vermessen werden.

3.4.2 Dreidimensionale Porenanalyse

Die dreidimensionale Analyse von Porengrößen und deren Verteilung liefert deutlich aussagekräftigere Ergebnisse über die Struktur eines Schaums als die rechnerische Extrapolation von zweidimensionalen Messwerten, sie ist allerdings mit erhöhtem apparativem Aufwand verbunden. Eine Möglichkeit die räumliche Struktur von Schäumen zu analysieren, ist die Einbettung von offenporigen Schäumen in geeignetes Einbettmaterial und die Anfertigung von Schliffbildern. Von jeder Ebene wird eine licht- oder elektronenmikroskopische Aufnahme angefertigt. Anschließend werden die Aufnahmen der einzelnen Ebenen mit geeigneter Software zu dreidimensionalen Darstellungen kombiniert [119].

Eine zerstörungsfreie alternative Analysemethode hierzu stellt das Mikro-CT dar. Hierbei werden schichtweise Röntgenaufnahmen der zu untersuchenden Probe angefertigt und anschließend zu dreidimensionalen Darstellungen zusammengefügt. Die mit kommerziell erhältlichen Systemen erzielbaren Auflösungen liegen im Bereich von 5 bis 10 μm . Tondorf gibt die erreichbare Genauigkeit von Geräten im Laboreinsatz mit 2 μm an [119]. Da die in dieser Arbeit erzeugten Poren Durchmesser von 100 – 300 μm aufweisen, kann mit diesem Verfahren eine zuverlässige Beurteilung der Porenstruktur vorgenommen werden. Von Müller et al. wurde beispielsweise bereits gezeigt, dass das MikroCT für die Analyse poröser Strukturen aus abbaubarem Kunststoff eingesetzt werden kann [121]. In ähnlicher Weise wurden von Illerhaus et al. poröse Materialien mittels Computertomographie untersucht [122]. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Mikro-CT Aufnahmen wurde das Gerät CT-Mini der Fa. Procon X-Ray verwendet. Dieses Gerät arbeitet mit einer Beschleunigungsspannung von 40 – 130 kV. Der Durchmesser des erzeugten Röntgenstrahls beträgt 5 μm bei einer Leistung von 4 W und 40 μm bei der Maximalleistung von 39 W.

3.4.3 Messung der Offenporigkeit

Der Grad der Offenporigkeit von geschäumten Proben wurde mit Hilfe eines Gaspyknometers (AccuPy 1330, Micromeritics Instrument Corporation, Norcross, USA) bestimmt. Eine poröse Probe mit definiertem geometrischem Volumen wird in einer Druckkammer von Helium umspült. Aus dem Druck des Heliums nach isothermer Überführung in eine Ausgleichskammer mit bekanntem Volumen kann aus der idealen Gasgleichung

$$pV = RT \quad (\text{Gl. 3.16})$$

das gasdichte Volumen V_i der porösen Probe bestimmt werden. Das geometrische Volumen V_g kann aus den Abmessungen der Probe berechnet werden.

Der offenzellige Volumenanteil ω am Gesamtvolumen wird wie folgt berechnet:

$$\omega = \frac{V_g - V_i}{V_g} \cdot 100[\%]. \quad (\text{Gl. 3.17})$$

Der gasdichte Anteil ϕ beträgt

$$\phi = 100 - \omega[\%]. \quad (\text{Gl. 3.18})$$

3.5 Analyse der Oberflächeneigenschaften

Die Analyse von Oberflächeneigenschaften in einer dreidimensionalen Porenstruktur stellt eine besondere Herausforderung dar, da viele Oberflächen für eine direkte Messung der Benetzbarkeit oder der chemischen Zusammensetzung an der Oberfläche nicht direkt zugänglich sind. Umso wichtiger sind die im Folgenden dargestellten indirekten Nachweismethoden. Für die Besiedlung mit Zellen sind sowohl chemische als auch physikalische Oberflächeneigenschaften von Bedeutung.

Zu den chemischen Oberflächeneigenschaften zählen die Zusammensetzung der Oberfläche und das Vorhandensein von auslösbaren Bestandteilen. Die chemische Zusammensetzung kann zunächst durch eine Analyse der enthaltenen Elemente mit energiedispersiver Röntgenanalyse (EDX) erfolgen. Der Nachweis von aktiven Gruppen auf der Oberfläche erfolgt durch die Verwendung von spezifisch bindenden Farbstoffen. Mit dem Farbstoff Nilblau A kann beispielsweise wie von Hartwig et al. gezeigt das Vorhandensein von Carboxylgruppen nachgewiesen und die Anzahl der aktiven Gruppen quantifiziert werden [123]. Eine Quantifizierung der Carboxylgruppen ist durch die Messung der Extinktion von Licht einer bestimmten Wellenlänge durch den Farbstoff Nilblau A in einem UV/VIS-Spektrometer möglich. Hierzu muss nach spezifischer Bindung des Farbstoffs an die Carboxylgruppen dieser mit Hilfe von Essigsäure aus dem Kunststoffschäum gelöst werden.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Quantifizierung der Carboxylgruppen an der Oberfläche plasmabehandelter Zellträger wurde zunächst eine Pufferlösung hergestellt. 2,2 g Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) wurden in 200 ml deionisiertem Wasser gelöst. Durch die Zugabe von 1,9 ml Natronlauge wurde die Lösung auf einen pH-Wert von 6 eingestellt. Durch Zugabe von 0,06 g Nilblau-Sulfat zur Pufferlösung wurde der Farbstoff Nilblau A hergestellt [123]. Fünf volumengleiche Proben eines extrudierten offenporigen Zellträgers wurden nach einer Plasmabehandlung 20 Minuten in die Färbelösung getaucht. Nach dem Abwaschen überschüssiger Färbelösung unter deionisiertem Wasser wurden die Proben für fünf Minuten in 10 ml 30 %iger Essigsäure entfärbt. Die Farbstoffmenge wurde in einem UV/VIS-Spektrometer (Specord 210 C, Analytik Jena) über die Extinktion von Licht einer Wellenlänge von 638 nm bestimmt. Die Messung erfolgte gegen eine mit 30 %iger Essigsäure gefüllte Referenzküvette.

Die physikalischen Eigenschaften einer Oberfläche bestimmen vor allem die Oberflächenladung und damit die Benetzbarkeit einer Oberfläche. Auf Oberflächen kann die Benetzbarkeit leicht durch die Bestimmung des Randwinkels zwischen der Tangente an einen Wassertropfen und der Oberfläche gemessen werden. In dreidimensionalen Schaumstrukturen kann die Benetzbarkeit nur indirekt über die Aufnahmefähigkeit für Wasser bestimmt werden

[124, 125]. Eine Schaumprobe wird hierfür in deionisiertes Wasser getaucht und die Gewichtsänderung des Schaums vor und nach dem Eintauchen bestimmt, Abbildung 3-14.



Abbildung 3-14: Ermittlung der Benetzbarkeit einer oberflächenmodifizierten Schaumstruktur durch Eintauchen in deionisiertes Wasser. Das Wasser wurde zur besseren Darstellung blau gefärbt. Die oberflächenmodifizierte Schaumstruktur wird in ein Becherglas mit gefärbtem deionisiertem Wasser eingetaucht (links) und verbleibt dort für kurze Zeit (mitte). Nach Ablauf der Verweilzeit wird die mit Flüssigkeit benetzte Schaumstruktur aus dem Becherglas entnommen (rechts). Das Gewicht des aufgenommenen Wassers ist ein Maß für die Benetzbarkeit der Schaumstruktur.

3.6 Biologische Validierung dreidimensionaler Zellträger

3.6.1 Zelltypen

Die biologische Validierung neuartiger Schaumstrukturen stellt einen wichtigen Schritt bei der Entwicklung optimierter dreidimensionaler Zellträger dar. Hier zeigt sich, ob ein Zellträger mit der Summe seiner Eigenschaften tatsächlich für das Kultivieren von Zellen geeignet ist. Neben quantitativen Messgrößen wie Zellanzahl oder Wachstumsgeschwindigkeit werden qualitative Zellreaktionen wie beispielsweise deren Differenzierungsgrad bestimmt. Insbesondere bei dreidimensionalen Zellträgern stellt die Darstellung des Differenzierungsgrades der kultivierten Zellen ein wichtiges Qualitätsmerkmal dar. Wie in Kapitel 2.3 gezeigt kann dreidimensionale Kultivierung zu einer Verbesserung des Differenzierungsgrades der Zellen beitragen. Umgekehrt kann eine gut differenzierte Zellpopulation *in vitro* nur auf einem dreidimensionalen Zellträger erzeugt werden.

Die Testung von Zellträgern kann mit Zelllinien oder mit primären Zellen durchgeführt werden. Zelllinien sind durch Ausschaltung der für den programmierten Zelltod (Apoptose) verantwortlichen Gene immortalisierte Zellen. Sie sind kommerziell über Zellbanken wie die American Type Culture Collection (ATCC) erhältlich [59]. Für Testzwecke im Labor werden aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit und der Robustheit bei der Kultivierung häufig Zelllinien

eingesetzt. Primäre Zellen werden durch Biopsien direkt aus lebenden Organismen isoliert [59]. Die durch Biopsien gewonnenen Zellverbände werden durch Enzyme wie Trypsin aufgelöst. Aus den so gewonnenen Zellagglomeraten werden einzelne Zelltypen selektiert. Diese stehen dann für die Kultivierung zur Verfügung. Im Gegensatz zu Zelllinien weisen primäre Zellen noch deutlich mehr zellspezifische Merkmale auf und sind daher für aussagekräftige Versuchsergebnisse beispielsweise bei der Testung neuer Medikamente oft unerlässlich. Primäre Zellen stellen allerdings deutlich höhere Anforderungen an die Kulturbedingungen wie Kultursubstrat oder Medium als Zelllinien. Daher ist die Auswahl des Zelltyps vor allem abhängig von der geplanten Zielsetzung des einzelnen Zellkulturexperiments.

Zelllinien und primäre Zellen sind aus praktisch allen Grundgeweben verfügbar. Für jedes Experiment muss dann der geeignete Zelltyp ausgewählt werden. Aufgrund ihrer hohen Teilungsraten und Robustheit werden für eine erste Beurteilung der Besiedelbarkeit von Zellträgern häufig Fibroblasten eingesetzt. Im Hinblick auf den geplanten Einsatz eines Zellträgers wird in einem zweiten Schritt die Besiedelbarkeit mit weiter spezialisierten Zelltypen wie Endothelzellen bei Fokussierung auf funktionelle Epithelien oder Osteoblasten bei *in vitro* Untersuchungen an Knochenzellen getestet. Der Fokus dieser Arbeit liegt in der Entwicklung eines leistungsfähigen Zellkultursystems zur Testung pharmazeutischer Wirkstoffe. Viele dieser Wirkstoffe sind fettlöslich [126, 127]. Daher wird die Wechselwirkung der neuartigen dreidimensionalen Zellträger mit Fettzellen untersucht. Zudem können mit Adipozyten wichtige Modelle für die Erforschung von Krankheiten wie Fettleibigkeit (Adipositas) oder Diabetes entwickelt werden, wie die Arbeiten von Goto [128], Janneh [126], Millar [129] oder LeLay [130] zeigen. Azain et al. untersuchten beispielsweise den Einfluss von Fettsäuren auf die Differenzierung von Fettzellen [131]. Im Labor können Fettzellen aus Vorläuferzellen, den sogenannten Präadipozyten [132] durch hormonelle Stimulation erzeugt werden [133-136]. Abbildung 3-15 zeigt schematisch die Differenzierung von Adipozyten aus pluripotenten Stammzellen.

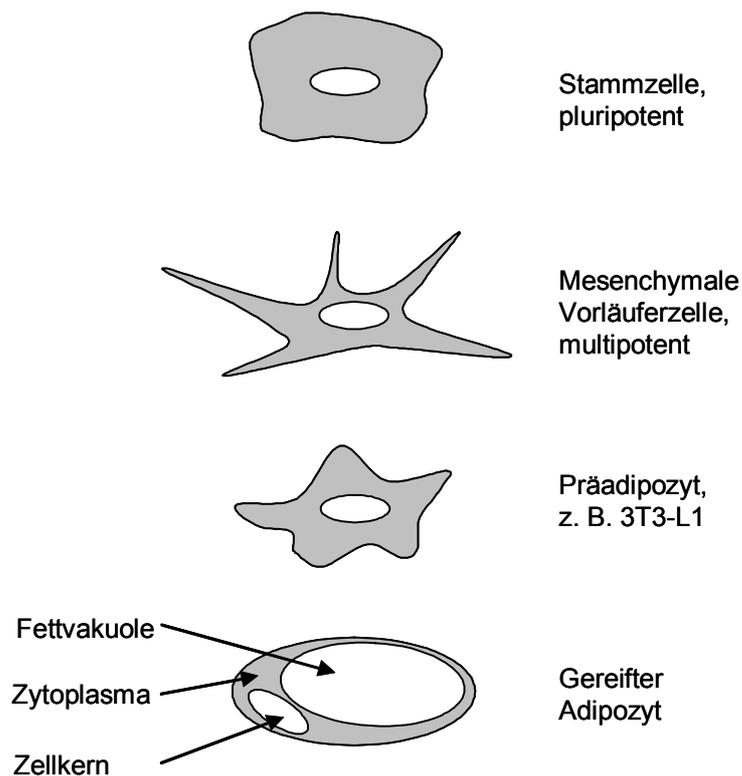


Abbildung 3-15: Differenzierung pluripotenter Stammzellen zu gereiften Adipozyten über multipotente mesenchymale Vorläuferzellen und Präadipozyten. Präadipozyten sind beispielsweise als Zelllinie 3T3-L1 verfügbar. Bei gereiften Adipozyten sind das Zytoplasma und der Zellkern durch die große Fettvakuole bis an den Rand der Zelle verdrängt (Schemazeichnung nach [137]).

Zur Darstellung der Übertragbarkeit der mit 3T3-L1 Fibroblasten gewonnenen Erkenntnisse auf weitere Zelllinien und primäre Zellen wurden quantitative Effekte wie das Anwachs- oder Proliferationsverhalten mit weiteren Zelltypen wie Fibroblasten, Osteosarkom- und Endothelzellen getestet.

3.6.2 Kultivierung

3T3-L1 Fibroblasten wurden nach dem Auftauen in niedriger Passage in Zellkulturflaschen kultiviert. Als Medium für die Kultivierung der Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit folgenden Zusätzen verwendet [22]:

- 10 % Fötale Kälberserum (FCS),
- 4,5 g/l Glucose,
- 1,5 g/l Natrium bicarbonate,
- 4 mM L-glutamine.

Zusätzlich wurden dem Medium Antibiotika und das Fungizid Patrizin zugesetzt.

Da diese Mediumzusammensetzung standardmäßig nicht erhältlich ist, wurde das Medium für jeden Versuch aus den genannten Zutaten frisch hergestellt.

Präadipozyten können durch hormonelle Stimuli zu Fettzellen differenziert werden [138].

Für die Differenzierungsversuche wurde das Medium mit folgenden Zusätzen nach [130] modifiziert:

1 μ M	Dexamethason,
0,01 mg/ml	Insulin (Sigma, I-6634),
0,5 mM	3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX) (Sigma),
0,17 μ M	DL-Pantothensäure,
3,3 μ M	D-Biotin.

Die vorgenannten Mediumzusätze bewirken eine Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten zu Fettzellen.

Die 3T3-L1 Fibroblasten wurden in zwei Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von je 25 cm² aufgetaut und drei Tage bis zu einem konfluenten Zellrasen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und auf sieben Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von je 75 cm² ausgesät. Dort wurden die Zellen weiter fünf Tage kultiviert bis eine Gesamtzellanzahl von 10 Millionen Zellen erreicht wurde. Die Zellanzahl wurde mit Hilfe eines Flowzytometers bestimmt. Die 3D-Strukturen wurden wie die ebenen Multiwellplatten mit jeweils 50.000 Zellen pro well inkubiert. Durch Zugabe von Zellkulturmedium wurde die erforderliche Zelldichte in der Zellsuspension eingestellt. Auf Kunststoffschäume mit einer Dicke von 1 mm wurde zunächst 200 μ l Zellsuspension pipettiert. Nach einer halben Stunde wurden 500 μ l Nährmedium zugegeben. Als Kontrollgruppe wurden Zellen auf glatten 6-well Platten kultiviert.

Die Differenzierungsversuche wurde entsprechend dem in Abbildung 3-16 dargestellten Schema durchgeführt. 3T3-L1 Fibroblasten wurden auf ebenen Zellkulturschalen (2D) und in extrudierten dreidimensionalen Zellträgern (3D) kultiviert. Jeweils eine Vergleichsgruppe wurde mit dem oben genannten Differenzierungsmedium zu Adipozyten differenziert

(induziert), die zweite Vergleichsgruppe wurde ohne Differenzierungsmedium (nicht induziert) kultiviert. Jede Vergleichsgruppe wurde bis zu fünf Wochen kultiviert, wobei nach einer und drei Wochen Kulturdauer der Differenzierungsgrad der Zellen mit Hilfe eines Mikroarrays untersucht wurde. Die in Abbildung 3-16 gelb dargestellten Nummern bezeichnen das jeweilige Differenzierungsexperiment. Beispielsweise stellt der Versuch mit Nummer 2 den Vergleich von nicht induzierten Zellen nach einer Kulturdauer von fünf Wochen in zweidimensionaler und dreidimensionaler Kultur dar. Der Erfolg der Differenzierung konnte im Lichtmikroskop durch Anfärben der Fettvakuolen mit Nilrot überprüft werden.

3.6.3 Nachweis von 3D-Wachstum und Zellqualität

Ein wesentliches Merkmal eines dreidimensionalen Zellträgers ist dessen Potential für räumliches Zellwachstum. Dieses kann mit etablierten Nachweismethoden wie Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie [139] nur schwer analysiert werden. Eine Möglichkeit die räumliche Anordnung von Zellen in einem dreidimensionalen Zellträger mit mikroskopischen Methoden zu untersuchen, besteht in der Anfertigung von schichtweisen Querschnittsaufnahmen. Der Zellträger wird mit den Zellen eingebettet und dann mit Hilfe eines Mikrotoms schichtweise geschnitten [125]. Von diesen Schnitten werden dann licht- oder rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt [139]. Die mikroskopischen Bilder können mit Hilfe von 3D Visualisierungsprogrammen wieder zu dreidimensionalen Objekten zusammengestellt werden.

Mit einem konfokalen Laserscannmikroskop (CLSM, Zeiss, Oberkochen) können schichtweise Aufnahmen von dreidimensionalen Zellträgern ohne Zerstörung des Zellträgers angefertigt werden. Diese Technik wurde beispielsweise von den Braber [140, 141], Cukierman et al. [142] und Roeder et al. [143] zur Darstellung dreidimensional wachsender Zellen eingesetzt. Die in einem dreidimensionalen Zellträger gezüchteten Zellen werden beispielsweise mit Glutaraldehyd fixiert. Hierdurch werden die Zell- und die Zellkernmembran durchlässig für Farbstoffe zur Anfärbung von Zellbestandteilen. Die Zellkerne können beispielsweise mit dem Farbstoff Ethidiumbromid gefärbt werden. Ethidiumbromid lagert sich in die im Zellkern enthaltene DNA ein und kann fluoreszenzoptisch analysiert werden. Im CLSM findet dann eine schichtweise Anregung einer fluoreszenzmarkierten Probe mit Laserlicht der Wellenlänge statt, die zur Anregung des verwendeten Farbstoffs notwendig ist. Ethidiumbromid kann mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von 302 nm angeregt werden. Die Emissionswellenlänge liegt im sichtbaren Bereich bei 602 nm. Im CLSM kann bis in eine Tiefe von 800 μm und bei geeigneten Bedingungen darüber hinaus die Fluoreszenz bei Anregung mit Laserlicht registriert werden. Allerdings wird mit zunehmender Eindringtiefe sowohl der anregende Laserstrahl als auch das vom Farbstoff emittierte Licht zunehmend abgeschwächt. Im Rechner können aus den gewonnenen schichtweisen Bildinformationen dreidimensionale Darstellungen der Zellverteilung oder andere grafische Darstellungen wie farbcodierte Tiefenprofile erzeugt werden.

Neben der direkten Darstellung des dreidimensionalen Zellwachstums mit Hilfe mikroskopischer Methoden kann indirekt von einem natürlichen Differenzierungsverhalten auf dreidimensionales Zellwachstum geschlossen werden. Die Darstellung von Genexpressionsprofilen mit Hilfe von Mikroarrays liefert ein sehr gutes Bild von den Vorgängen innerhalb des Zellkerns und lässt Schlüsse auf den Differenzierungsgrad einer Zelle zu. Kaps et al. setzten Mikroarrays zur Darstellung des Differenzierungsgrades kultivierter Knorpelzellen ein [144]. Liu et al. zeigten mit Hilfe von Mikroarrays den Einfluss

dreidimensionaler Kultivierung auf das Genexpressionsprofil von embryonalen Stammzellen der Maus auf [57]. Nakamura untersuchte Änderungen des Genexpressionspektrums im Verlauf der Entstehung von Fettzellen (Adipogenese) aus mesenchymalen Stammzellen [145]. Zur Darstellung des Einflusses dreidimensionaler Kultivierung auf die Genexpression von 3T3-L1 Präadipozyten mit und ohne hormonelle Stimulation wurden in dieser Arbeit Differenzierungsversuche entsprechend dem in Abbildung 3-16 dargestellten Schema durchgeführt.

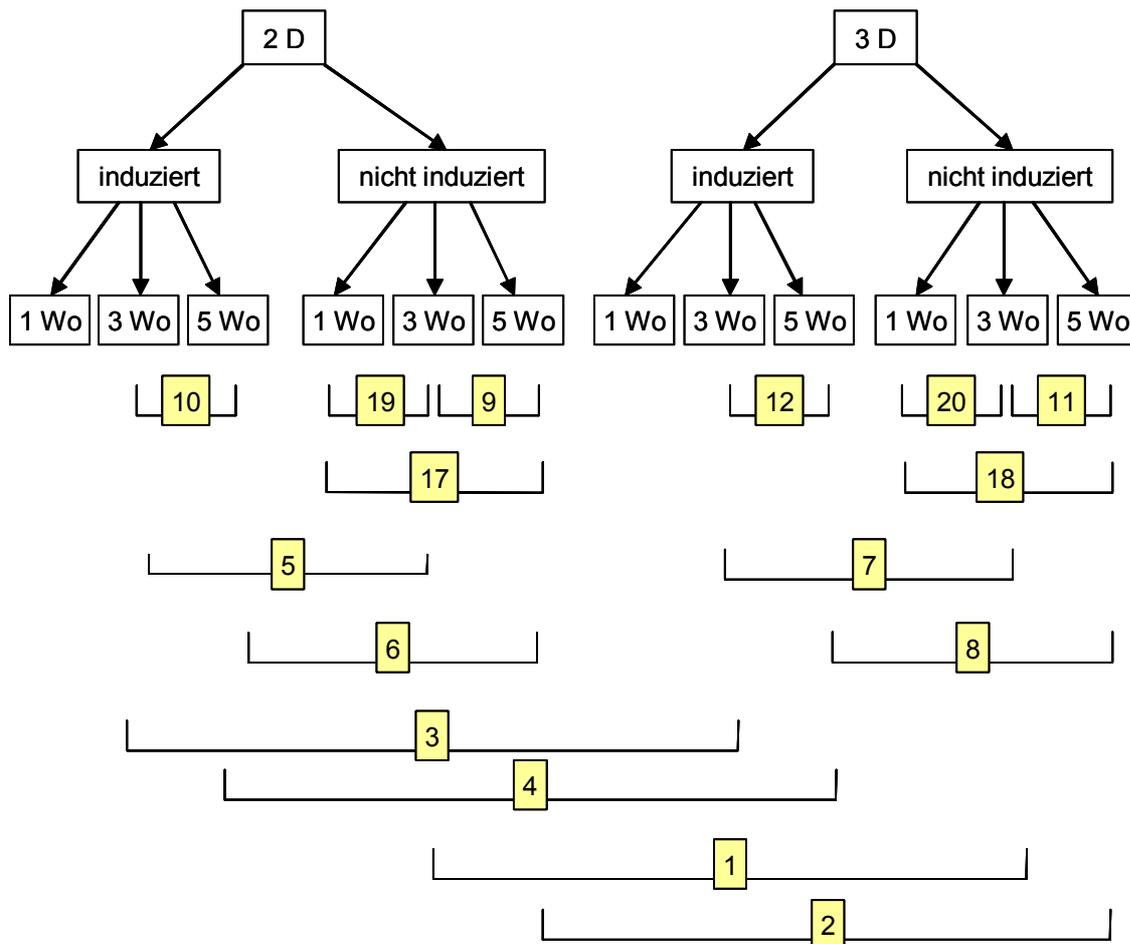


Abbildung 3-16: Versuchsschema zum Vergleich der Differenzierung von 3T3-L1 Fibroblasten zu Adipozyten auf glatten Oberflächen (2D) und in dreidimensionalen Kunststoffstrukturen (3D). Die Zellen wurden jeweils mit (induzierten) und ohne (nicht induzierten) Differenzierungsmedium 1, 3 und 5 Wochen lang kultiviert. Nach Ende der Kulturdauer wurden die Zellen lysiert und ein Mikroarray der DNA angefertigt. Die Zahlen von 1 bis 20 stellen die Nummer des jeweiligen Mikroarrays dar.

Für die Erstellung eines Genarrays muss die DNA der Zellen isoliert und amplifiziert werden, um eine ausreichende Menge Genmaterial zur Verfügung zu haben. Die Zellmembran der gezüchteten Zellen wird mit einem Lysispuffer aufgeschlossen und die im Zellkern enthaltene

DNA wird extrahiert. Die gewonnene DNA wird anschließend mit Hilfe einer RT-PCR vervielfältigt. Hierbei wird ausgehend von der DNA wiederholt RNA synthetisiert. Vor der Anfertigung eines Mikroarrays wird die Qualität der DNA überprüft. Auf einem Mikroarray-Chip wie in Abbildung 3-17 dargestellt, befinden sich Gensequenzen, an die, bei Vorhandensein von komplementären Genen, die zugegebene DNA binden kann. Der Mikroarray-Chip wird fluoreszenzoptisch ausgelesen. Aus den gewonnenen Daten kann auf die Anzahl bestimmter Gensequenzen geschlossen werden. Für spezifische Fragestellungen stehen Mikroarrays mit nur wenigen ausgewählten Gensequenzen zur Verfügung. Ist unbekannt, welche Gene exprimiert sind, dann wird ein „Whole-genome“ Mikroarray verwendet, auf dem alle Gene der untersuchten DNA vorhanden sind. Es wurde ein „Whole genome“-Array der Fa. Affymetrix (Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 A 2.0) verwendet. Ein Genarray liefert Hinweise darauf, welche Gene im Zellkern einer Zelle aktiv sind und abgelesen werden. Aktive Gene sind die Vorstufe zur Produktion von zellspezifischen Proteinen.



Abbildung 3-17: Mikroarray-Genchip der Firma Affymetrix. In dem quadratischen Feld in der Mitte des Chips befinden sich Gensequenzen, an die fluoreszenzmarkierte Gensequenzen aus der zu untersuchenden DNA binden können. Die Anzahl gebundener Gensequenzen kann fluoreszenzoptisch gemessen werden. Quelle: Affymetrix.

Die Auswertung der Genarrays erfolgte einerseits mit Hilfe der Software RMA (robust microarray analysis) und mit einem Programm des Herstellers Affymetrix (GCOS 1.2

software). Als Ergebnis der Auswertung wurde der fold change (FC) der Fluoreszenzsignale bei Vergleich der Probe A mit Probe B folgendermaßen berechnet:

$$FC = \frac{2^A}{2^B} = 2^{(A-B)}$$

Gl. 3.19

Die Differenz der Messwerte A und B beträgt damit:

$$A - B = \log_2(FC)$$

Gl. 3.20

Ist das Signal A kleiner als B, dann gilt:

$$FC = -\frac{2^B}{2^A} = -2^{(B-A)}$$

Gl. 3.21

und damit

$$A - B = -\log_2(FC)$$

Gl. 3.22

Werte des fold change größer als drei und kleiner als minus drei wurden als signifikante Unterschiede in der Genexpression registriert. Dabei entspricht ein fold change von drei einer Differenz des Expressionssignals von 1,58.

3.6.4 Nachweis der Zellanzahl

Der Nachweis der Zellanzahl kann direkt durch Ablösen der Zellen und Zählen in einer Zählkammer [125] oder in einem Flowzytometer (siehe Begriffserklärung) erfolgen oder indirekt durch die von der Zellanzahl abhängige Umsetzung einer chemischen Substanz. Ein weit verbreiteter Test hierfür ist der WST-Test der Fa. Roche. Tetrazoliumsalz wird von den Zellen zu Formazan umgewandelt. Dies bewirkt einen Farbumschlag im Kulturmedium. Die durch die Farbreaktion veränderte optische Dichte des Mediums kann photometrisch bestimmt werden und ist direkt proportional zur Zellanzahl. Eine weitere Methode zur indirekten Zellzahlbestimmung ist der als Proliferationsassay durchgeführte Lactatdehydrogenase Test (LDH). Nach Fixierung und Lysierung der Zellen wird die Menge an Lactatdehydrogenase im Lysat bestimmt. Diese Menge ist ebenfalls direkt proportional zur Zellanzahl. Eine weitere Möglichkeit, die Zellanzahl indirekt zu bestimmen, besteht in der Messung der DNA-Menge. Bei diesem so genannten Picogreen-Assay (Molecular Probes / Invitrogen) werden nicht nur die Zellmembranen, sondern auch die Kernmembranen lysiert. Hierdurch wird die in den Zellen enthaltene DNA frei gesetzt. Die Menge an DNA wird anschließend gemessen. Da in jeder Zelle die gleiche Menge DNA enthalten ist, kann mit Hilfe einer Referenzkurve von der gemessenen DNA-Menge auf die Zellanzahl geschlossen werden.

4. Ergebnisse

4.1 Poröse Zellträger

4.1.1 Spritzgegossene Zellträger

Mit dem in Abbildung 4-1 dargestellten Werkzeugeinsatz wurden poröse Zellträger durch Spritzguss in Form von radial um den Anguss angeordnete Zylinder hergestellt. Eine Schnittdarstellung des gesamten Spritzgusswerkzeuges ist im Anhang dargestellt.

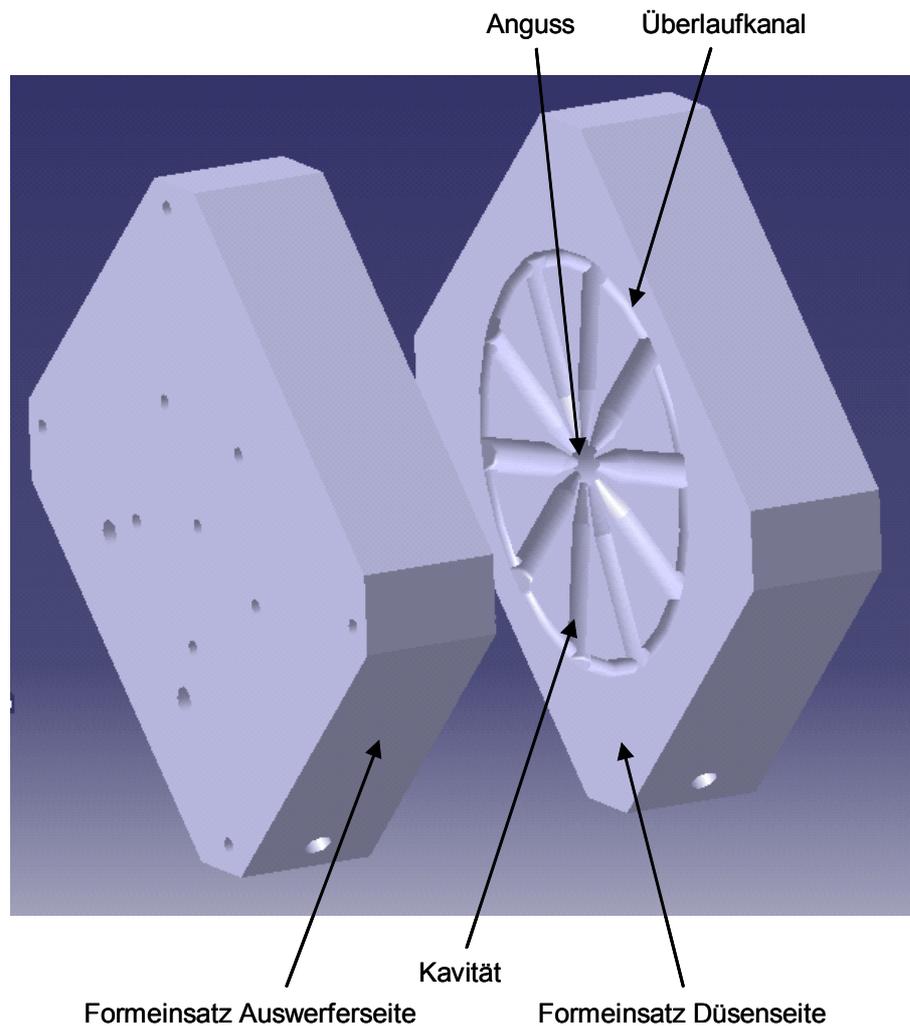


Abbildung 4-1: Explosionsdarstellung des Werkzeugeinsatzes zur Herstellung poröser Zellträger. Die Trennebene zwischen düsenseitigem und auswerferseitigem Formeinsatz stellt die Symmetrieebene der spritzgegossenen Probekörper dar. Die Kavität wird vom zentralen Angussbereich aus gefüllt bis die einzelnen Schmelzfronten in den Überlaufkanälen zusammentreffen.

Abbildung 4-2 zeigt das Bild eines Probenkörpers. Neun von zehn Zylindern haben einen Durchmesser von 10 mm, der Durchmesser eines Zylinders je Ronde beträgt 12,5 mm. Durch Vergrößerung des Zylinderdurchmessers wurde der Einfluss des Bauteildurchmessers auf den Anteil offener Poren untersucht. Jeweils am Ende der Zylinder wurde ein umlaufender Kanal vorgesehen. Damit wird einem Aufstauen des Materials am Ende der Zylinder vorgebeugt, was zu inhomogenen Strömungsverhältnissen mit nachfolgender Beeinträchtigung der Porenstruktur im Bereich der Zylinder führen kann. Im Gegensatz zum konventionellen Spritzguss steigt der Fließwegdurchmesser vom Angussbereich bis in das Bauteil hinein an. In Abbildung 4-2 ist dies als konusförmiger Bereich in der Nähe des Angusses sichtbar.

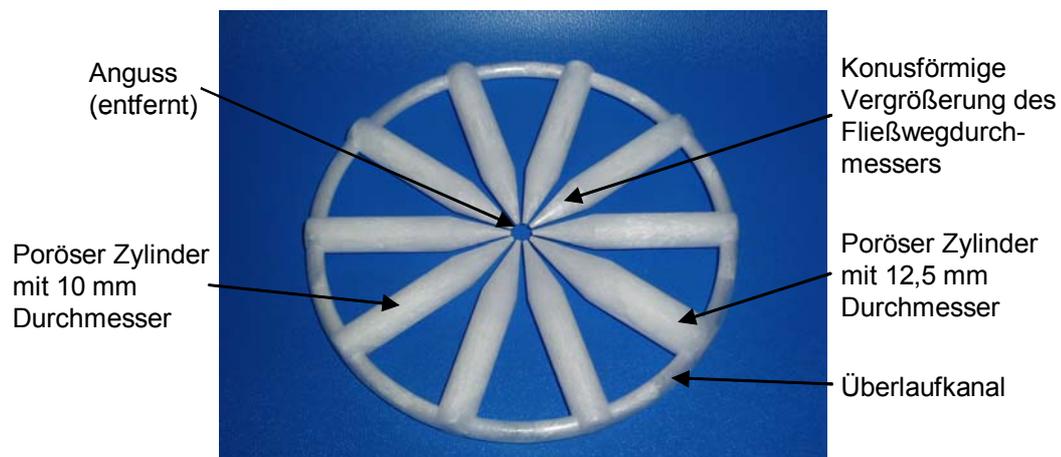


Abbildung 4-2: Durch Schaumspritzguss hergestellter poröser Probekörper bestehend aus radial angeordneten Zylindern mit 10 mm Durchmesser. Der Durchmesser eines Zylinders wurde zur Darstellung des Einflusses des Bauteildurchmessers auf die Porenstruktur auf 12,5 mm vergrößert. Der in der Mitte des Bauteils angeordnete Anguss wurde auf dieser Aufnahme bereits entfernt. Am Ende der Zylinder und damit am Ende des Fließweges befindet sich ein umlaufender Überlaufkanal, in dem die Schmelzefront abgefangen wird. Dies trägt zu einer gleichmäßigen Porenstruktur aufgrund laminarer Strömungsverhältnisse im Bereich der Zylinder bei.

Von den spritzgegossenen Bauteilen wird zunächst der Anguss entfernt. Der Übergangsbereich vom Anguss in den konusförmigen Bereich zu den porösen Zylindern ist als Sollbruchstelle ausgeführt und kann leicht abgetrennt werden.

Die Zylinder werden einzeln und dann senkrecht zur Zylinderachse in Scheiben geschnitten.

Die Herstellung offenporiger Zellträger durch Schaumspritzguss ist bestimmt durch die begrenzte Ausdehnung der gasbeladenen Schmelze an der Werkzeuginnenwand. An der kalten Werkzeugwand erstarrt die Schmelze sofort und führt zu einer kompakten Aussenhaut am geschäumten Spritzling. Diese verhindert eine weitere zur Porenöffnung notwendige Expansion. Bei einem geeigneten Verhältnis zwischen Abkühlrate der Schmelze und

Expansionsrate des Treibgases kann es zu einem Aufreißen der Wände zwischen den Poren kommen, vgl. Abbildung 4-3.

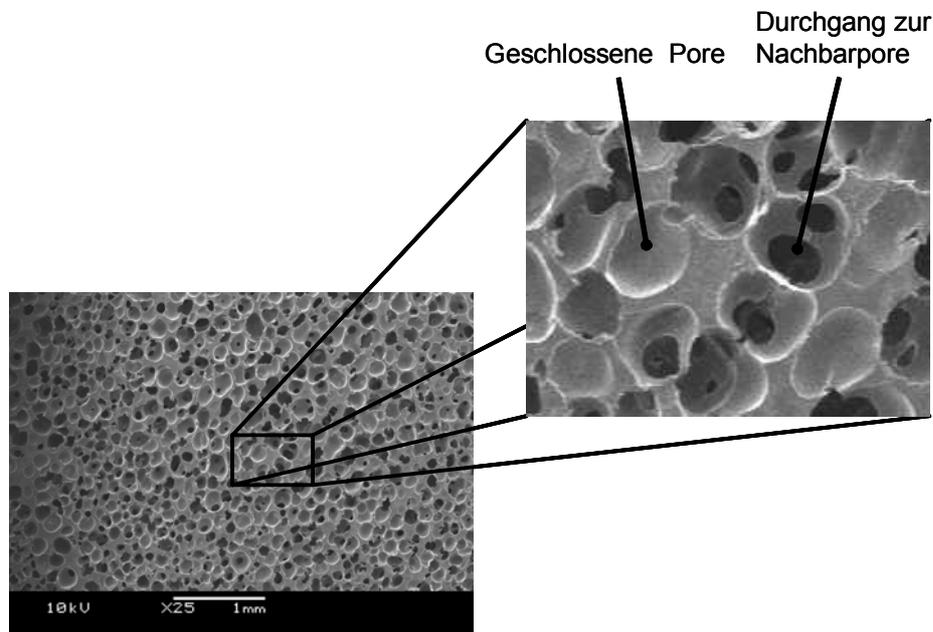


Abbildung 4-3: REM-Aufnahme mit Detailansicht einer durch Schaumspritzguss hergestellten offenporigen Schaumstruktur aus Polystyrol. Die Aufnahme zeigt einen Schnitt senkrecht zur Achse eines porösen Zylinders mit Blickrichtung in Richtung der Achse. Neben geschlossenen Poren finden sich eine Reihe Poren mit Durchgängen zu den Nachbarporen. Die Durchgänge sind in der REM-Aufnahme schwarz dargestellt, da aus den in die Bildebene hinein verlaufenden Durchgängen keine Elektronen emittiert werden.

Durch das Erkalten des Bauteils beginnend an der Werkzeugwand entsteht im Schaumspritzguss ein Gradient der Porengröße von der kompakten Außenwand bis hin zur maximalen Porengröße in der Mitte des Spritzlings. Während Abbildung 4-3 eine homogene Größenverteilung der Poren in der Mitte der porösen Zylinder zeigt, stellt Abbildung 4-4 einen deutlichen Gradienten der Porengrößen in den Randbereichen der porösen Zylinder dar.

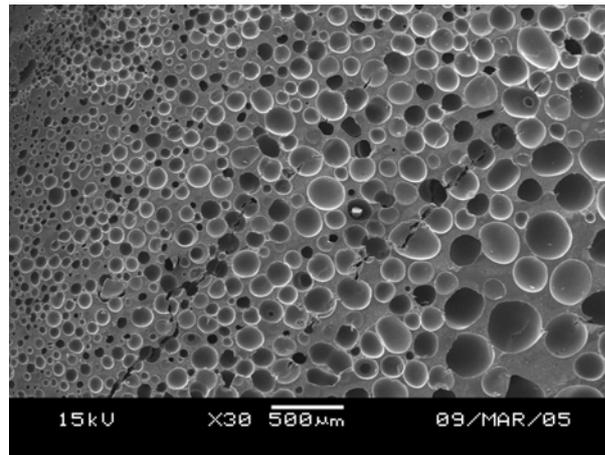


Abbildung 4-4: REM-Aufnahme aus dem Randbereich eines durch Schaumspritzguss hergestellten porösen Zylinders. Blickrichtung ist in Richtung der Zylinderachse. Die Porendurchmesser weisen einen positiven Gradienten auf, beginnend mit Porendurchmessern von kleiner $10\ \mu\text{m}$ an der Werkzeugwand (links oben) bis hin zu Porendurchmessern von bis zu $400\ \mu\text{m}$ zur Mitte des Spritzlings hin (rechts unten).

Die Porenstruktur wird vor allem durch die Parameter Einspritzvolumen, Massetemperatur und Einspritzgeschwindigkeit beeinflusst. Die Porengröße steigt mit zunehmender Massetemperatur, da durch die Restwärme im Spritzling ein weiteres Porenwachstum begünstigt wird [146]. Ein reduziertes Einspritzvolumen führt zu einer stärkeren Gasexpansion und damit zu einer erhöhten Gewichtsreduktion im Bauteil. Abbildung 4-5 zeigt den Einfluss zunehmender Gewichtsreduktion auf die mittlere Porengröße geschäumter Bauteile bei konstanter Schmelzetemperatur von 220°C und Einspritzgeschwindigkeit von $200\ \text{mm/s}$. Mit zunehmender Gewichtsreduktion bis zu $46\ \%$ des Gewichts eines kompakten Bauteils steigt die mittlere Porengröße auf Werte bis zu $39 \pm 18\ \mu\text{m}$ an. Bis zu einer Gewichtsreduktion von $46\ \%$ reicht der Gasdruck aus, um die Form zu füllen. Der Anteil offener Poren am Gesamtvolumen steigt bis zu einer Gewichtsreduktion von $45\ \%$ kontinuierlich bis auf $20\ \%$ an. Ab einer Gewichtsreduktion von $45\ \%$ steigt der Anteil offener Zellen sprunghaft von $20\ \%$ auf $50\ \%$ an, was mit der Entstehung größerer Hohlräume begründet werden kann.

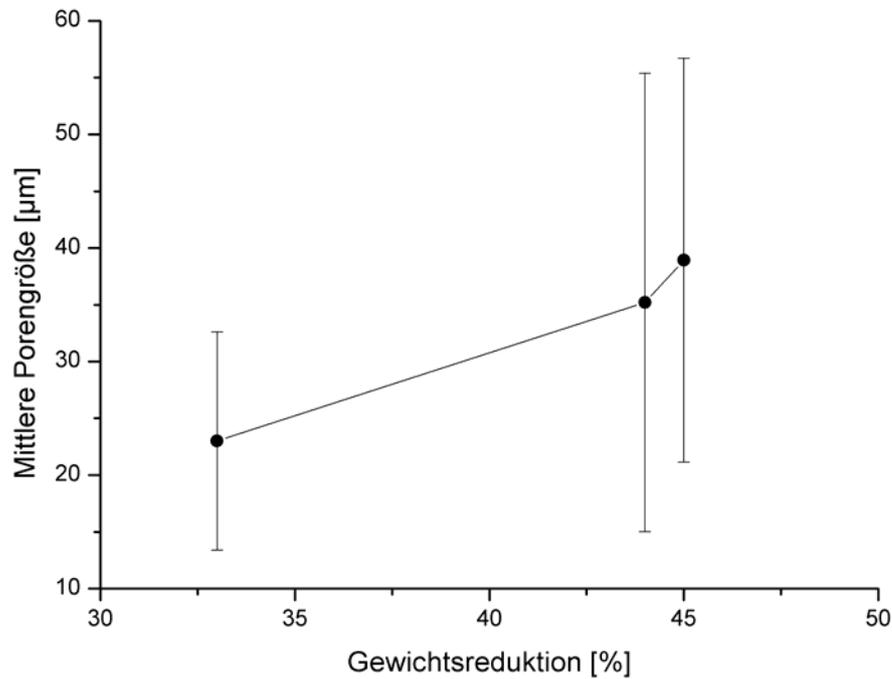


Abbildung 4-5: Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren Porengröße geschäumter Bauteile aus Polystyrol in Abhängigkeit der prozentualen Gewichtsreduktion bei Messung an zehn Bauteilen je Messwert. Die Einspritzgeschwindigkeit wurde mit 200 mm/s und die Schmelztemperatur mit 220° C konstant gehalten. Mit zunehmender Gewichtsreduktion von 33 – 46 % des Gewichts kompakter Bauteile steigt der mittlere Porendurchmesser von $23 \pm 10 \mu\text{m}$ bis auf $38 \pm 18 \mu\text{m}$ an. Die Standardabweichungen variieren von 43 % des Mittelwertes bei einer Gewichtsreduktion von 33 % bis zu 46 % des Mittelwertes bei einer Gewichtsreduktion von 46 %. Die Standardabweichungen geben die Bandbreite der Porengrößenverteilung dar und sind bedingt durch den statistischen Prozess der homogenen Nukleierung

Abbildung 4-6 zeigt den Einfluss steigender Schmelztemperatur auf die mittlere Porengröße geschäumter Bauteile aus Polystyrol. Die Porengröße steigt linear von $27 \pm 9 \mu\text{m}$ bei einer Schmelztemperatur von 200° C bis zu $74 \pm 26 \mu\text{m}$ bei einer Schmelztemperatur von 240° C an.

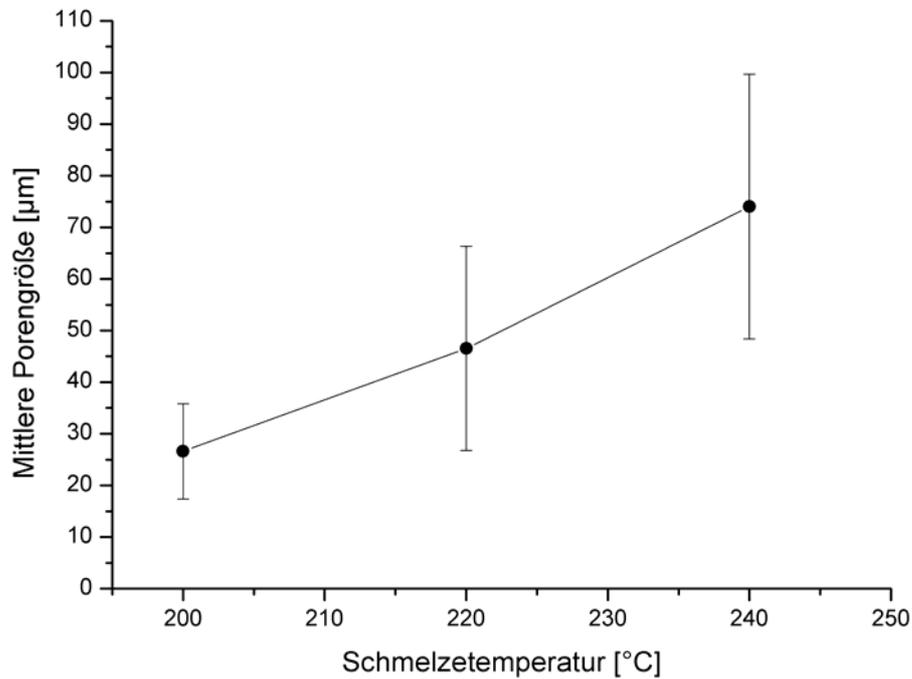


Abbildung 4-6: Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren Porengröße geschäumter Bauteile aus Polystyrol in Abhängigkeit der Schmelzetemperatur bei Messung an zehn Bauteilen je Messwert. Die Einspritzgeschwindigkeit wurde mit 200 mm/s und die Gewichtsreduktion mit 47 % konstant gehalten. Mit zunehmender Schmelzetemperatur von 200 – 240° C steigt der mittlere Porendurchmesser von $27 \pm 9 \mu\text{m}$ bis zu $74 \pm 26 \mu\text{m}$ an. Die Standardabweichungen variieren von 33 % des Mittelwertes bei einer Schmelzetemperatur von 200° C bis zu 35 % des Mittelwertes bei einer Schmelzetemperatur von 240° C. Die Standardabweichungen geben die Bandbreite der Porengrößenverteilung dar und sind bedingt durch den statistischen Prozess der homogenen Nukleierung

Abbildung 4-7 zeigt den Einfluss der Einspritzgeschwindigkeit auf die mittlere Porengröße geschäumter Bauteile aus Polystyrol. Die mittlere Porengröße wurde bei niedriger Einspritzgeschwindigkeit von 50 mm/s zu $92 \pm 61 \mu\text{m}$ gemessen. Die hohe Standardabweichung von 66 % resultiert aus der bei diesen Prozesseinstellungen inhomogenen Porenstruktur. Mit zunehmender Einspritzgeschwindigkeit kann eine deutlich homogenere Schaumstruktur mit mittleren Porengrößen von $41 \pm 17 \mu\text{m}$ hergestellt werden. Die Standardabweichung liegt hierbei mit 41 % des Mittelwertes deutlich unter der Standardabweichung bei einer Einspritzgeschwindigkeit von 50 mm/s. Abbildung 4-8 zeigt die Unterschiede in der Porenmorphologie bei niedriger und hoher Einspritzgeschwindigkeit.

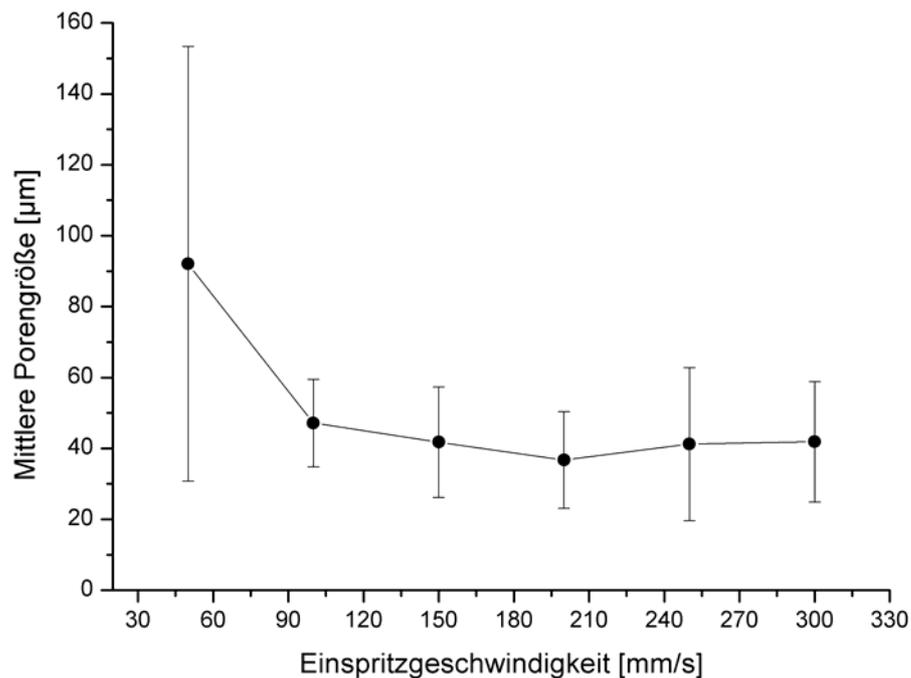


Abbildung 4-7: Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren Porengröße geschäumter Bauteile aus Polystyrol in Abhängigkeit der Einspritzgeschwindigkeit bei Messung an zehn Bauteilen je Messwert. Die Schmelzetemperatur wurde mit 220°C und die Gewichtsreduktion mit 47 % konstant gehalten. Mit zunehmender Einspritzgeschwindigkeit von 50 – 300 mm/s blieb die mittlere Porengröße in einem Bereich von 30 – 50 µm bei Standardabweichungen von 40 % des Mittelwertes weitgehend konstant. Bei niedriger Einspritzgeschwindigkeit von 45 mm/s war der Mittelwert der Porengröße mit 92 ± 61 µm größer als bei den übrigen Einspritzgeschwindigkeiten. Die Standardabweichungen geben die Bandbreite der Porengrößenverteilung dar und sind bedingt durch den statistischen Prozess der homogenen Nukleierung. Die hohe Standardabweichung von 66 % des Mittelwertes bei einer Einspritzgeschwindigkeit von 45 mm/s resultiert aus der inhomogenen Schaumstruktur bei dieser Prozesseinstellung. Höhere Einspritzgeschwindigkeiten führen zu deutlich homogeneren Schaumstrukturen.

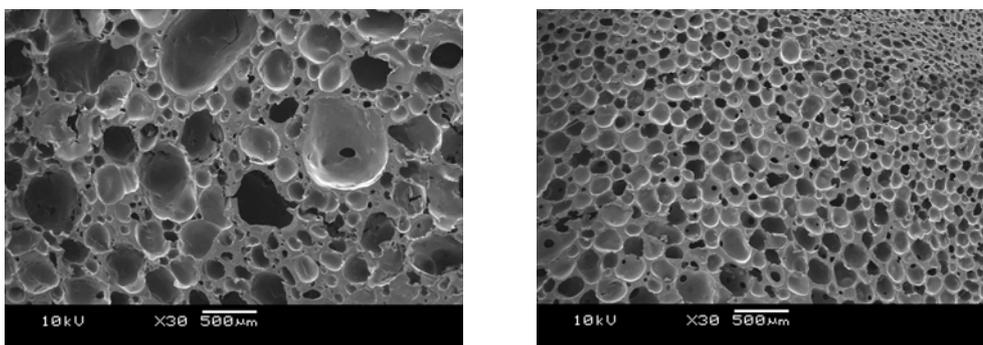


Abbildung 4-8: REM-Aufnahmen der Porenmorphologie geschäumter Bauteile bei Einspritzgeschwindigkeiten von 50 mm/s (links) und 300 mm/s (rechts). Die Schmelzetemperatur lag bei beiden Aufnahmen konstant bei 220°C und die Gewichtsreduktion bei 47 % des Gewichts eines kompakten Bauteils. Das rechte Bild zeigt bei höherer Einspritzgeschwindigkeit eine deutlich homogenere Porenverteilung und kleinere mittlere Porengrößen im Vergleich zu der links dargestellten Porenstruktur.

Bei geringer Einspritzgeschwindigkeit finden die Nukleierung und das Porenwachstum bereits während des Einspritzvorgangs statt. Es steht somit mehr Zeit für das Porenwachstum zur Verfügung. Bei hoher Einspritzgeschwindigkeit hat die Schmelze bereits in einer frühen Phase des Porenwachstums Kontakt mit der kalten Werkzeugwand. Die für das Porenwachstum zur Verfügung stehende Zeit ist reduziert. Damit wird eine weitere Expansion der Poren eingeschränkt.

Beim Schaumspritzguss von thermoplastischem Polyurethan (TPU) wird das Aufbrechen der Porenwände zusätzlich durch die elastischen Eigenschaften des Materials begünstigt, Abbildung 4-9. Die durch das Porenwachstum verursachte Dehnung der Wände zwischen den Poren führt zu einem lokalen Überschreiten der Streckgrenze des Materials. In der Mitte der Porenwand befindet sich der kleinste Querschnitt, was zu einem Aufreißen der Porenwand an dieser Stelle führt. Die im Material gespeicherte elastische Energie wird frei und führt zu einem weiteren Aufreißen des Durchbruchs in der Porenwand.

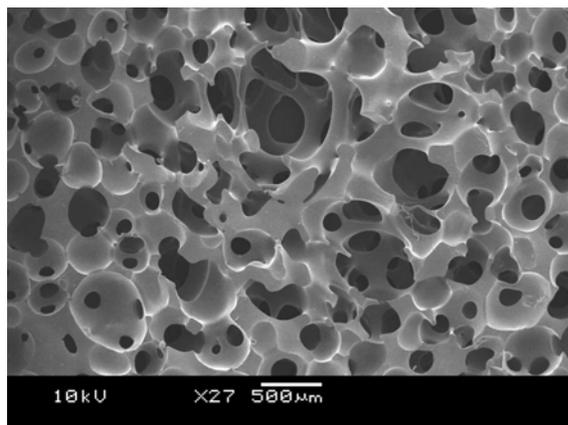


Abbildung 4-9: REM-Aufnahme einer durch Spritzguss hergestellten offenporigen Schaumstruktur aus TPU. Im Vergleich zu Polystyrol fördern die elastischen Eigenschaften von TPU das Aufreißen der Porenwände und führen somit zu einer Vielzahl von Durchgängen zwischen den Poren.

4.1.2 Extrudierte Zellträger

Schaumextrusion bietet im Gegensatz zum Schaumspritzguss den Vorteil der freien Expansion des gelösten Treibgases gegen den Druck der Atmosphäre. Somit kann eine kontinuierliche Ausdehnung der gasbeladenen Schmelze in Abhängigkeit von Schmelztemperatur und Druckabfall an der Extruderdüse erfolgen. Ein Gradient der Porengröße zum Rand des extrudierten Strangs sowie eine geschlossene Aussenhaut sind vorhanden, aber deutlich geringer ausgebildet als im Schaumspritzguss. Die wesentlichen Einflussfaktoren auf die Gestalt der extrudierten Schaumstruktur sind die Masstemperatur, der Druckabfall an der Düse und die Druckabfallrate. Mit PS 158K wurden auf einem Schaumex Extruder der Fa. Berstorff bei einer Masstemperatur von 146 °C und einem Druckabfall von 118 bar an einer Lochdüse mit 2 mm Durchmesser Schaumstränge mit einer gemessenen Offenporigkeit von 98 % hergestellt, Abbildung 4-10. Als nicht toxisches Treibmittel wurde CO₂ mit einer Flussrate von 0,4 g/s verwendet. Die Nukleierung wurde hierbei allein durch den Druckabfall induziert (Eigennukleierung). Durch den starken Druckabfall finden eine schnelle Expansion des gelösten Gases und damit ein Aufreißen der Porenwände statt. Zusätzlich wird die Schmelze mit 146 °C unterkühlt, das heißt nah an der Glasübergangstemperatur verarbeitet. Die offenporige Schaumstruktur erstarrt sehr schnell. Ein unerwünschter Zusammenschluss mehrerer Poren zu großen Gasblasen kann somit verhindert werden. Aufgrund der hohen Offenporigkeit sind einzelne Poren in Abbildung 4-10 kaum mehr erkennbar. Es bleiben alleine die Stege zwischen den Poren bestehen. Eine Quantifizierung der Porengröße erfolgt über die Vermessung des mittleren Abstands zweier benachbarter Stege. Bei Annahme einer kugelförmigen Porengeometrie kann damit der mittlere Porendurchmesser berechnet werden.

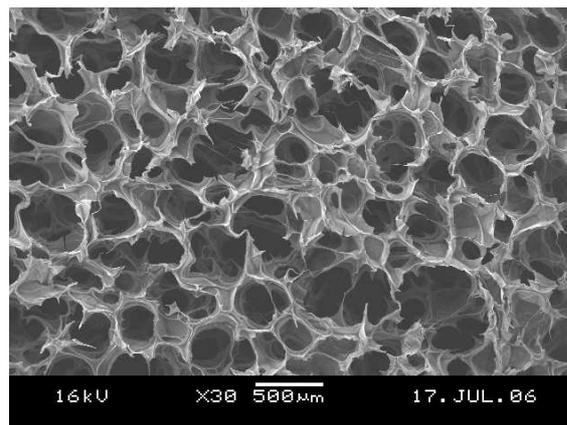


Abbildung 4-10: REM-Aufnahme einer extrudierten Schaumstruktur aus PS 158K mit einer Offenporigkeit von 98 %. Durch den raschen Druckabfall an der Extruderdüse haben sich eine Vielzahl von Gasblasen gebildet, die bis zur Erstarrung der umgebenden Polymermatrix expandierten und dabei teilweise die Wände zwischen den Poren aufbrachen. Der mittlere Porendurchmesser beträgt in dieser Aufnahme 300 µm.

Durch die Zugabe von Talkumpartikeln konnte das Porenwachstum durch Fremdnukleierung induziert werden. Wie Abbildung 4-11 zeigt, wurde gezielt eine deutlich feinere Porenstruktur erzeugt.

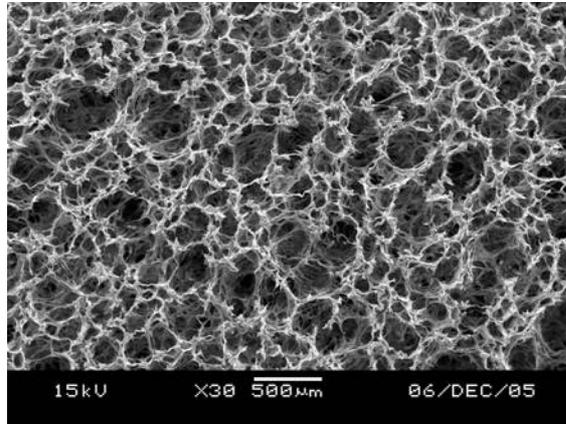


Abbildung 4-11: REM-Aufnahme einer extrudierten Schaumstruktur aus PS 158K mit Zugabe von 0,5 % Talkum als Nukleierungsmittel. Die Fremdnukleierung an den zugegebenen Talkumpartikeln führte zu einer deutlich reduzierten Porengröße im Vergleich zu Abbildung 4-10 bei gleichzeitig hohem Grad von 98 % Offenporigkeit.

4.2. Analyse der Porenstruktur

Die Porenstruktur der erzeugten dreidimensionalen Zellträger wurde mit Hilfe von Bilderkennung (vgl. Kapitel 3.4.1) und mittels Mikro-Computertomographie (vgl. Kapitel 3.4.2) analysiert.

Die wichtigsten zu erfassenden Parameter waren hierbei der durchschnittliche Porendurchmesser und die Verteilung der Porendurchmesser um den Mittelwert. Da Zellen im Durchschnitt Durchmesser von 10 – 30 μm aufweisen und da für dreidimensionale Kultivierung in jeder Pore mehrere Zellen wachsen müssen, ist ein durchschnittlicher Porendurchmesser von 100 – 300 μm erforderlich.

Die Bilderkennung wurde mit einem halbautomatischen und mit einem automatischen Auswertalgorithmus durchgeführt. Folgendes Bild einer Porenstruktur wurde exemplarisch mit Hilfe eines halbautomatischen Auswertalgorithmus analysiert.

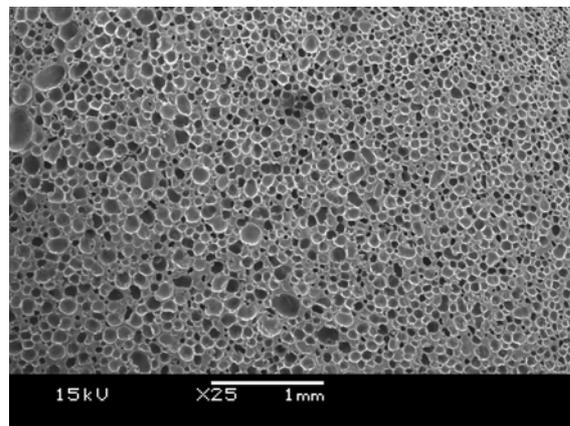


Abbildung 4-12: REM-Aufnahme einer spritzgegossenen Porenstruktur zur exemplarischen Analyse von Porengrößen und Porenverteilungen.

Nach repräsentativer Markierung einer Stichprobe der Poren wurde eine Darstellung der Umrisse exportiert:

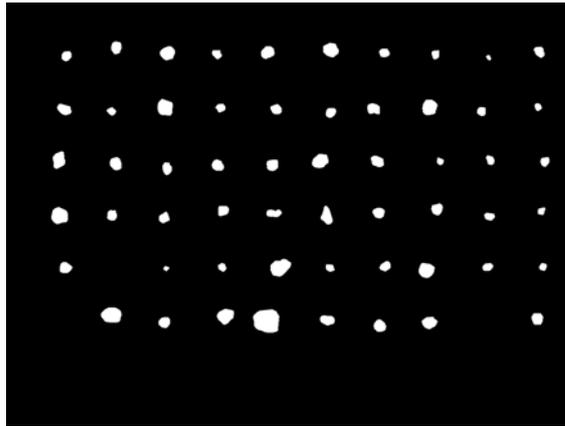


Abbildung 4-13: Umriss markierter Poren an den Schnittpunkten eines Rasters. Die Schnittfläche der Poren ist weiß, die umgebenden Flächen sind schwarz dargestellt. Die markierten Poren werden in einem nachfolgenden automatischen Algorithmus gezählt und vermessen. Die Ergebnisse dieser Messung dienen als Grundlage für die Bestimmung der mittleren Porengröße und der Porengrößenverteilung.

Die Gesamtfläche der Poren in Abbildung 4-13 beträgt $0,5560 \text{ mm}^2$ bei einer Anzahl von 57 Poren. Dies entspricht einer durchschnittlichen Fläche einer Pore von $0,0098 \text{ mm}^2$ oder bei Annahme von runden Poren einem durchschnittlichen Porenradius von $56 \text{ }\mu\text{m}$. Die in Abbildung 4-12 dargestellte Porenstruktur kann also mit einem durchschnittlichen Porendurchmesser von $112 \text{ }\mu\text{m}$ für die Kultivierung von Zellen kleinen Durchmessers (z. B. $10 \text{ }\mu\text{m}$) geeignet sein.

Abbildung 4-15 zeigt die durch einen automatischen Auswertalgorithmus in Abbildung 4-14 erkannten Poren (grün) und Durchgänge zwischen benachbarten Poren (rot). Hierbei wurden die Poren anhand der Helligkeitssprünge an den Porengrenzen und die Durchgänge als schwarze Flächen erkannt.

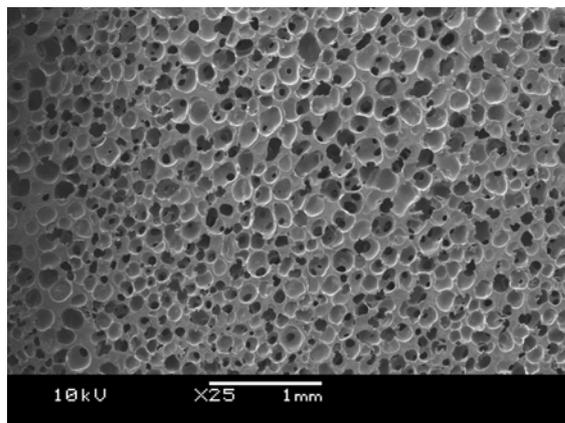


Abbildung 4-14: REM-Aufnahme einer spritzgegossenen Porenstruktur als Grundlage für die Vermessung mit Hilfe eines vollautomatischen Auswertalgorithmus. Die geschnittenen Poren können aufgrund von Grauwertunterschieden erkannt werden. Die offenporigen Verbindungen zwischen den Poren erscheinen als schwarze Bereiche und durch den Auswertalgorithmus eindeutig zugeordnet werden.

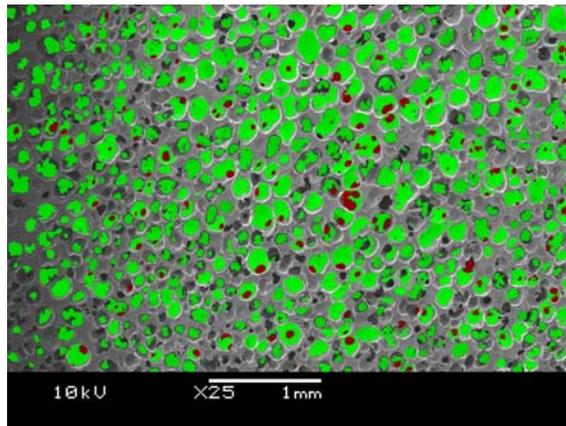


Abbildung 4-15: Durch Bilderkennung erkannte Poren (grün) und Durchgänge zwischen einzelnen Poren (rot) in Abbildung 4-14. Die Grauwerte der Porenflächen wurden durch Bilderkennung registriert und grün eingefärbt. Die in der REM-Aufnahme als schwarze Flächen dargestellten Durchgänge zwischen einzelnen Poren wurden rot markiert.

Die Mikro-Computertomographie bietet die Möglichkeit, zerstörungsfrei die tatsächliche Porenstruktur eines Kunststoffschlammes zu erfassen. Abbildung 4-16 zeigt die dreidimensionale Rekonstruktion von schichtweise angefertigten computertomographischen Aufnahmen eines offenporigen Polystyrolschlammes. Anhand dieser Aufnahmen können Porendurchmesser vermessen und die Volumina des Kunststoffes und der offenporigen Anteile bestimmt werden.

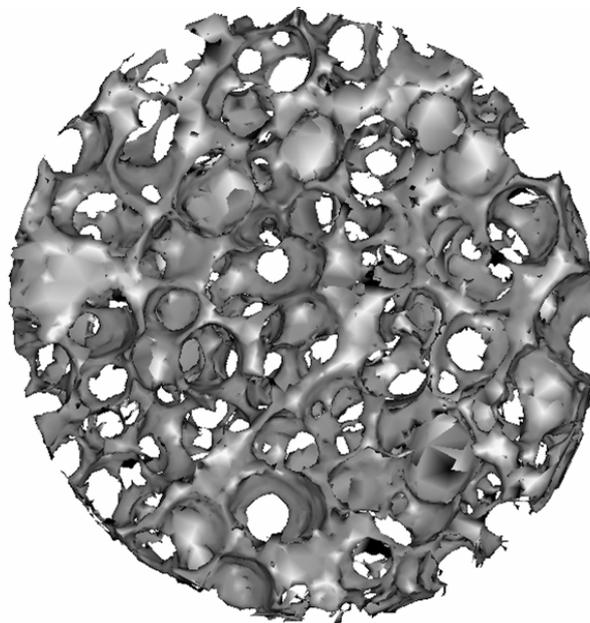


Abbildung 4-16: Dreidimensionale Rekonstruktion von schichtweisen computertomographischen Aufnahmen eines extrudierten offenporigen Polystyrolschlammes. Es zeigt sich ein hochgradig offenporiges Netzwerk aus untereinander verbundenen konkaven Poren. Durch die Verbindungen zwischen den einzelnen Poren kann eine effiziente Versorgung mit Nährstoffen und Entsorgung von Stoffwechselmetaboliten erfolgen. Die Porengrößen sind derart auf die Zellgröße abgestimmt, dass eine dreidimensionale Besiedelung der Poren mit Zellen möglich ist, ohne die für die Ernährung notwendigen Durchgänge zwischen den Poren zu blockieren.

4.3 Oberflächenmodifikation

4.3.1 Plasmabehandlung

Mit einer Plasmabehandlung kann die Benetzbarkeit von Oberflächen erhöht werden. Während ein nicht modifizierter hydrophiler Zellträger in etwa sein Eigengewicht an Wasser binden kann, wird die Aufnahmefähigkeit für Wasser durch eine 60 Sekunden dauernde Plasmabehandlung um den Faktor 20 gesteigert. Eine Behandlungsdauer von mehr als 60 s führt dabei zu keiner weiteren Steigerung der Benetzbarkeit, Abbildung 4-17.

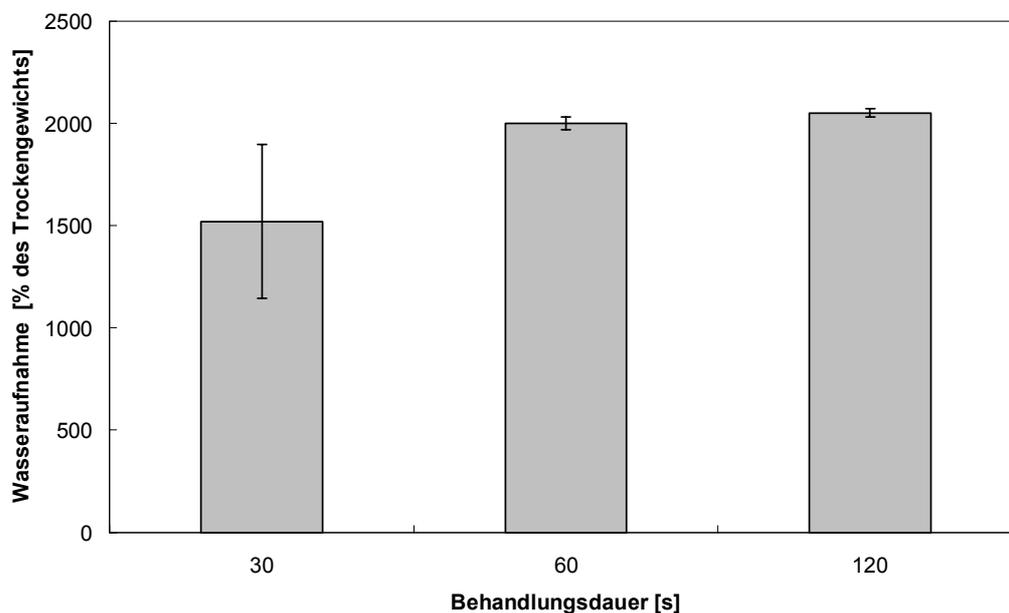


Abbildung 4-17: Mittelwerte und Standardabweichungen der Aufnahmefähigkeit plasmabehandelter offenporiger Polystyrolschäume für Wasser in Prozent des Eigengewichts bei Plasmabehandlung von 30, 60 und 120 s. Es wurden Messungen an 10 plasmabehandelten Proben gemittelt. Nach einer Behandlungsdauer von 30 s nehmen die Proben das 15-fache (1500 %) ihres Eigengewichts an Wasser auf bei einer Streuung der Messwerte um den Mittelwert von 50 %. Nach einer Behandlungsdauer von 60 s nehmen die Proben das 20-fache (2000 %) ihres Eigengewichts an Wasser auf. Die Streuung der Messwerte um den Mittelwert ist bei dieser Behandlungsdauer auf unter 3% reduziert. Eine weitere Erhöhung der Behandlungsdauer ergibt keine signifikante Verbesserung der Benetzbarkeit.

Abbildung 4-18 zeigt den Einfluss der Generatorleistung auf die Benetzbarkeit offenporiger Polystyrolschäume. Die Behandlungsdauer betrug jeweils 60 s. die Leistung des Generators beeinflusst das Ergebnis der Plasmabehandlung nur wenig. Die Standardabweichungen im niedrigen Leistungsbereich sind signifikant höher als im oberen und mittleren Leistungsbereich.

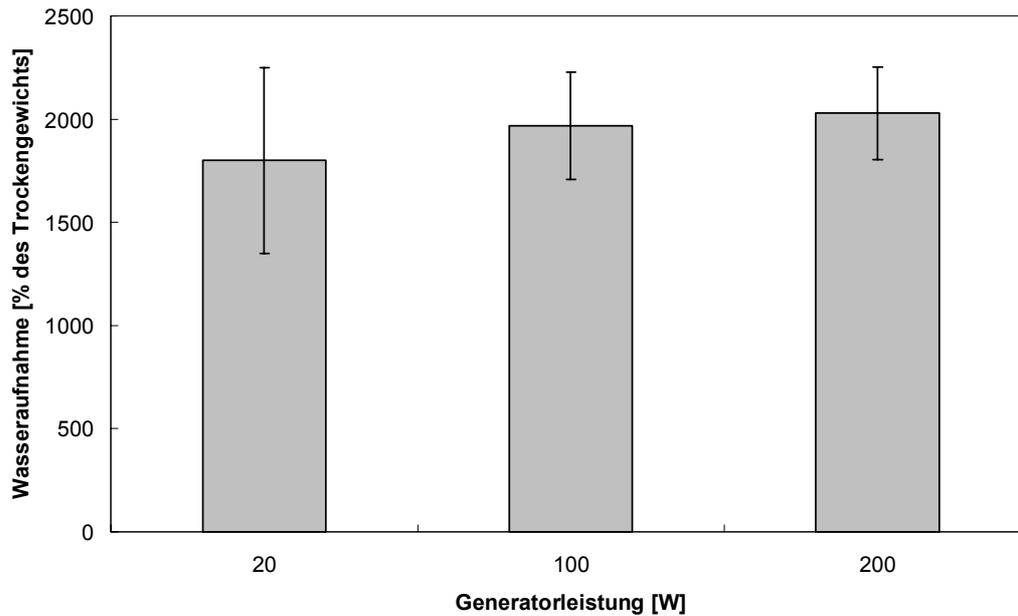


Abbildung 4-18: Mittelwerte und Standardabweichungen aus 10 Einzelmessungen der Benetzbarkeit poröser Zellträger in Prozent des Eigengewichts bei Generatorleistungen von 20, 100 und 200 W. Die Behandlungsdauer betrug konstant 60 s. Bei einer Generatorleistung von 20 W kann bereits eine Wasseraufnahme von 1800 % des Eigengewichts bei einer Standardabweichung von 50 % erreicht werden. Eine Generatorleistung von 100 W bewirkt eine Wasseraufnahme von 1970 % des Eigengewichts bei einer Streuung der Messwerte um den Mittelwert von 25 %. Eine weitere Steigerung der Generatorleistung erbringt weder eine Zunahme der Benetzbarkeit noch eine Reduktion der Standardabweichung.

Bei den in Abbildung 4-19 dargestellten Ergebnissen aus der Untersuchung der Langzeitstabilität der plasmabehandelten Proben über einen Zeitraum von 8 Wochen wurde eine durchschnittliche Abnahme der Benetzbarkeit um ca. 25 % gemessen.

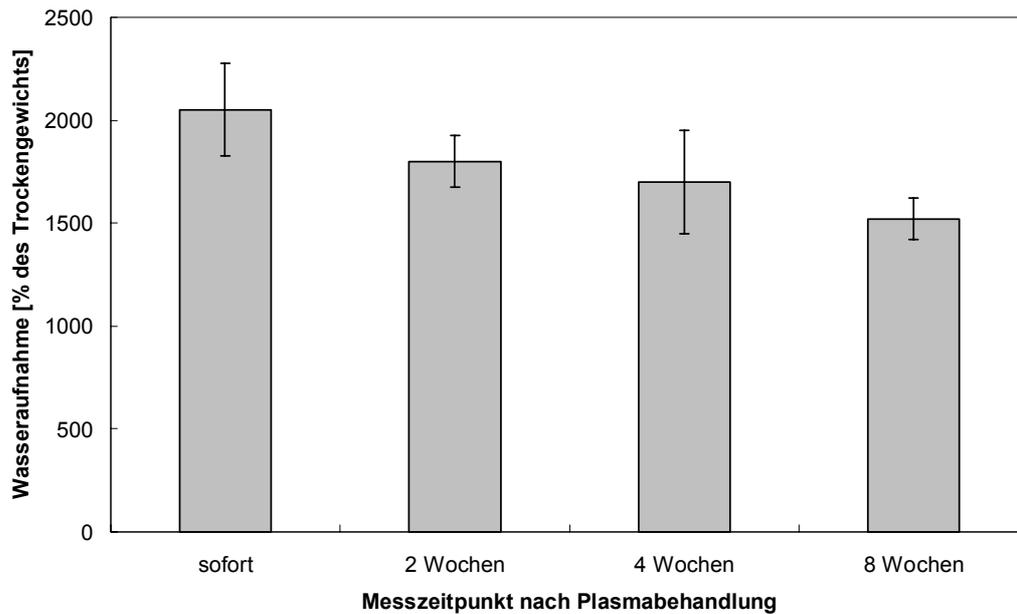


Abbildung 4-19: Mittelwerte und Standardabweichungen aus 10 Einzelmessungen der Benetzbarkeit von plasmabehandelten Proben aus Polystyrol in Prozent des Eigengewichts sofort, 2, 4 und 8 Wochen nach einer Plasmabehandlung. Der höchste Wert der Wasseraufnahme wird mit 2050 % des Trockengewichts bei einer Standardabweichung von 25 % direkt nach der Plasmabehandlung erreicht. Im Zeitraum von 8 Wochen nach der Plasmabehandlung reduziert sich die Wasseraufnahmefähigkeit der Polystyrolschäume um 25 % bis auf einen Mittelwert von 1520 % des Trockengewichts bei einer Standardabweichung von 7 %.

Durch die Plasmaaktivierung werden auf den Kunststoffoberflächen Carboxylgruppen angelagert. Ein Nachweis dieser Gruppen ist durch Färbung mit Nilblau A möglich. In einer photometrischen Messung mit einem UV/VIS-Spektrometer wurde die Extinktion des gebundenen Farbstoffs bei einer Wellenlänge von 638 nm zu $2,31 \cdot 10^{-2}$ bestimmt. Dies entspricht einer gebundenen Farbstoffmenge von $1,92 \cdot 10^{-9}$ mol.

Abbildung 4-20 stellt die Extinktion des Farbstoffes Nilblau A auf plasmapolymerisierten (blaue Kurve) und plasmaaktivierten (rote Kurve) Proben in Abhängigkeit der Wellenlänge im Bereich von 500 – 750 nm dar. Sowohl die plasmapolymerisierten, als auch die plasmaaktivierten Proben zeigen einen parabelförmigen Verlauf, der bei 638 nm seinen Scheitelpunkt erreicht und ab 638 nm schnell abfällt. Bei einer Wellenlänge von 750 nm wird keine Extinktion mehr gemessen. Der Extinktionswert bei 638 nm beträgt 0,023 und entspricht nach dem Gesetz von Lambert-Beer einer gebundenen Farbstoffmenge von $1,92 \cdot 10^{-9}$ mol. Die plasmapolymerisierten und die plasmaaktivierten Proben sind aufgrund der Abbildung 4-20 als gleich zu bewerten. Eine signifikante Abweichung beider Proben ist hier nicht feststellbar.

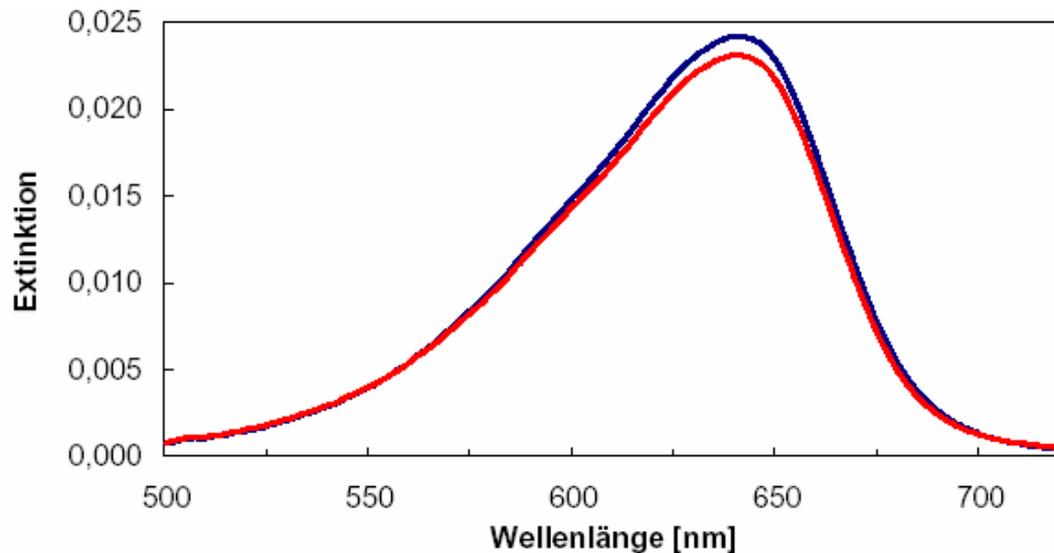


Abbildung 4-20: Extinktion des Farbstoffs Nilblau A auf plasmapolymerisierten (blaue Kurve) und plasmaaktivierten (rote Kurve) Proben im Wellenlängenbereich von 500 bis 750 nm. Ergebnis einer Messung an fünf Proben mit Hilfe eines UV/VIS Spektrometers. Die nahezu Überdeckung der beiden Kurven deutet auf eine ähnliche Anzahl an Carboxylgruppen nach Plasmapolymersation und nach Plasmaaktivierung hin.

4.3.2 Plasmaaktivierte Pfropfcopolymerisation

Die plasmaaktivierte Pfropfcopolymerisation ist eine weitere Möglichkeit, die Benetzbarkeit von hydrophoben Kunststoffoberflächen zu steigern. An die durch Plasmabehandlung geschaffenen aktiven Gruppen an der Kunststoffoberfläche werden Monomere eines hydrophilen Kunststoffs aus einer wässrigen Lösung heraus gebunden. Abbildung 4-21 zeigt sowohl bei Copolymerisation mit Acrylsäure als auch mit Methacrylsäure eine Abnahme der Benetzbarkeit bei zunehmenden Säurekonzentrationen. Die Generatorleistung hat nur geringen Einfluss auf die Effizienz der Copolymerisation.

Abbildung 4-21 a stellt die prozentuale Benetzbarkeit eines offenporigen Polystyrolschaumes im Verhältnis zum Trockengewicht nach plasmaaktivierter Pfropfcopolymerisation bei 20, 100 und 200 W Generatorleistung in Abhängigkeit der Acrylsäurekonzentration von 10, 30 und 50 % dar. Bei einer Generatorleistung von 20 W und einer Säurekonzentration von 10 % liegt die Benetzbarkeit bei 1500 %. Dieser Wert sinkt mit zunehmender Säurekonzentration bei 30 % auf 962 % und bei 50 % auf 905 % ab. Bei 100 W Generatorleistung und einer Acrylsäurekonzentration von 10 % wird mit 1600 % die höchste Benetzbarkeit des Versuches erreicht. Diese sinkt bei einer Konzentration 30 % Acrylsäure auf 1042 ab und steigt bei einer Acrylsäurekonzentration von 50 % auf einen Wert von 1240 an. Bei einer Generatorleistung von 200 W fällt die Benetzbarkeit von 1432 % bei einer Säurekonzentration von 10 % auf 1324 % bei 30 % und auf 1107 % bei 50 %

Acrylsäurekonzentration ab. Die Standardabweichungen sind bei allen drei Generatorleistungen und bei allen drei Acrylsäurekonzentrationen mit 10 % des Mittelwertes als gleich zu bewerten. In der Abbildung 4-21a wird deutlich, dass sich die höchste Benetzbarkeit offenerporiger Polystyrolschäume bei niedriger Säurekonzentration von 10 % Acrylsäure erzielen lässt. Die Höhe der Generatorleistung hat keinen signifikanten Einfluss auf die Benetzbarkeit des Polystyrolschaumes.

Die Abbildung 4-21b stellt die prozentuale Benetzbarkeit eines offenerporigen Polystyrolschaumes im Verhältnis zum Trockengewicht nach plasmaaktivierter Pfcopolymerisation bei ebenfalls 20, 100 und 200 W Generatorleistung in Abhängigkeit der Methacrylsäurekonzentration von 10, 30 und 50 % dar. Bei einer Methacrylsäurekonzentration von 10 % liegt die Benetzbarkeit des offenerporigen Schaumes zwischen 1064 % für eine Generatorleistung von 20 W und 1356 % bei einer Leistung von 200 W. Die Generatorleistung von 100 W weist einen mittleren Wert von 1238 % auf. Bei einer Methacrylsäurekonzentration von 30 % sinken die Werte auf 512 % für eine Generatorleistung von 20 W, auf 681 % bei 100 W und auf 750 % bei 200 W. Bei der höchsten Methacrylsäurekonzentration des Versuches von 50 % sinken die Werte auf 309, 436 und 427 % bei 20, 100 und 200 W Generatorleistung. Abbildung 4-21 b zeigt eine signifikante Abhängigkeit der Benetzbarkeit eines offenerporigen Polystyrolschaumes von der Säurekonzentration. Je niedriger die Methacrylsäurekonzentration ist, desto höher ist die Benetzbarkeit. Die Generatorleistung hat wie auch schon bei der vorher beschriebenen Abbildung 4-21 a keinen signifikanten Einfluss auf die Benetzbarkeit des Schaumes. Die Standardabweichungen sind wie auch in der vorigen Abbildung mit 10 % des Mittelwertes als gleich zu betrachten. Insgesamt ist mit Acrylsäure eine höhere Benetzbarkeit des offenerporigen Polystyrolschaumes als mit Methacrylsäure zu erreichen. In der Abbildung 4-21 a ergibt sich die höchste Benetzbarkeit mit einem Wert von 1600 %, wohingegen die höchste Benetzbarkeit in der Abbildung 4-21 b bei einem Wert von 1356 % liegt.

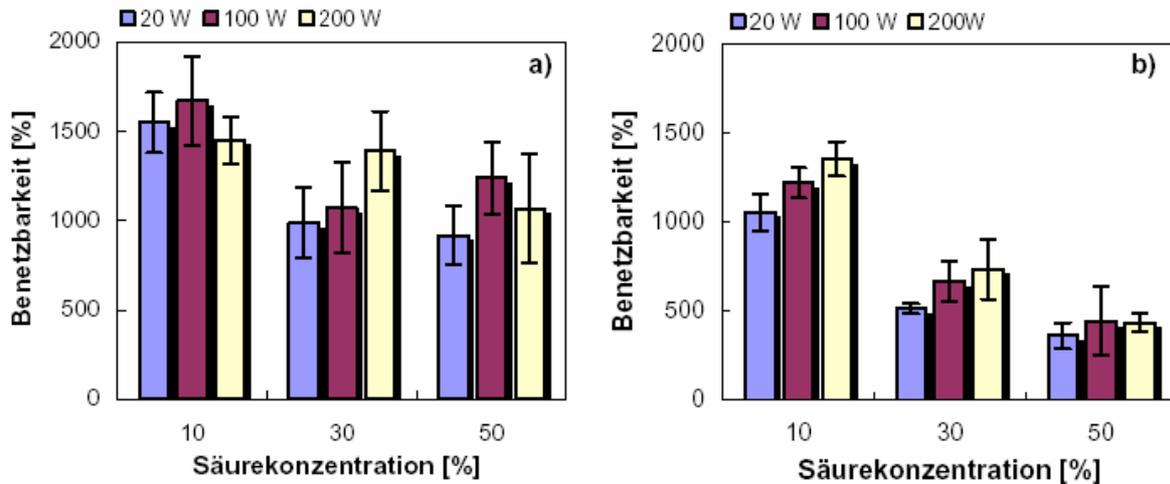


Abbildung 4-21: Benetzbarkeit offenporiger Polystyrolschäume in Prozent des Trockengewichts nach plasmaaktivierter Pfropfcopolymerisation bei unterschiedlichen Konzentrationen (10, 30 und 50 %) von Acrylsäure (a) und Methacrylsäure (b). Vor der Copolymerisation fand für 120 s eine Plasmaaktivierung in Luft bei Generatorleistungen von 20, 100 und 200 Watt statt.

4.3.3 Plasmapolymerisation

In der Plasmapolymerisation werden nach einer Plasmaaktivierung direkt Monomere eines hydrophilen Kunststoffes aus dem Dampf mit Hilfe von Niederdruckplasma auf einer hydrophoben Oberfläche abgeschieden. Abbildung 4-22 stellt die prozentuale Benetzbarkeit offenporiger Polystyrolschäume in Prozent des Trockengewichts in Abhängigkeit von unterschiedlichen Prozessdrücken von 0,45, 0,5, 0,55 und 0,6 mbar dar. In der Abbildung 4-22 wird ebenfalls die prozentuale Benetzbarkeit des Polystyrolschaumes in Abhängigkeit der Generatorleistungen von 500, 650 und 800 W dargestellt. Die höchste Benetzbarkeit mit 2227 % liegt bei einer Generatorleistung von 500 W und einem Prozessdruck von 0,45 mbar vor. Die geringste Benetzbarkeit wird mit einem Prozessdruck von 0,6 mbar und einer Generatorleistung von 800 W mit einem Wert von 1989 % erreicht. In diesem Fall ist auch die Standardabweichung höher als bei den anderen Messergebnissen, wo die Standardabweichung als gleich angesehen werden kann. Die Abbildung 4-22 zeigt eindeutig, dass die Höhe der Generatorleistungen und auch die Höhe der Prozessdrücke keinen signifikanten Einfluss auf die Benetzbarkeit eines offenporigen Polystyrolschaumes aufweisen.

Die plasmapolymerisierten Proben (Abbildung 4-22) sind mit einer maximalen Wasseraufnahmefähigkeit von mehr als 2227 % deutlich besser benetzbar als pfropfcopolymerisierte Proben (Abbildung 4-21 a und b), die bei günstigen Bedingungen maximal 1600 % ihres Eigengewichts an Wasser aufnehmen können.

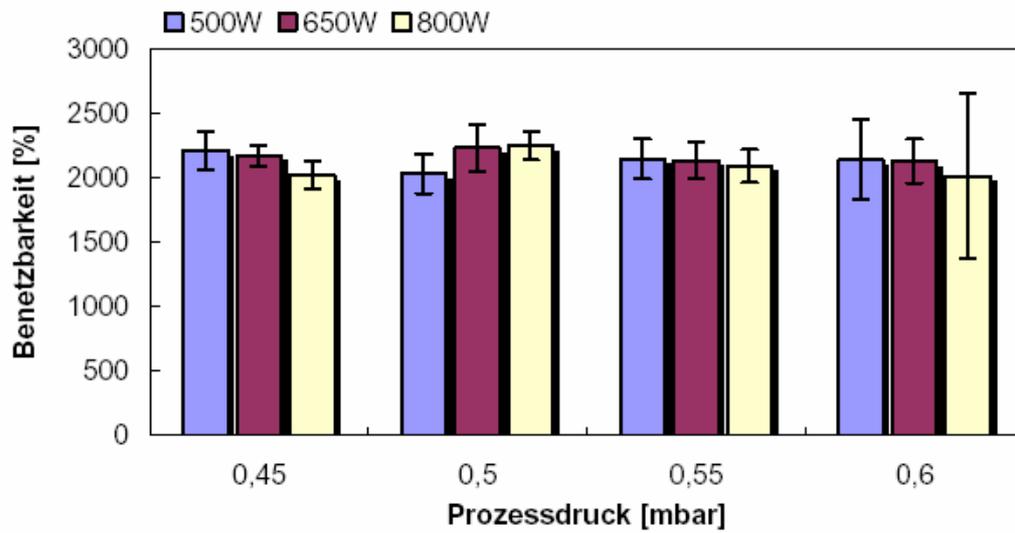


Abbildung 4-22: Benetzbarkeit offenporiger Polystyrolschäume in Prozent des Trockengewichts nach Plasmapolymerisation bei Generatorleistungen von 500, 650 und 800 Watt in Abhängigkeit von Prozessdrücken von 0,45, 0,5, 0,55 und 0,6 mbar.

4.4 Ergebnisse der Zellversuche

4.4.1 Inkubations- und Einwachsverhalten

Die Inkubation eines Zellträgers mit Zellsuspension steht am Anfang der Kultivierung. Die Anzahl angewachsener Zellen und die Geschwindigkeit des Anwachsens legen somit maßgeblich den Erfolg des Kulturexperiments fest. Die Inkubation der Zellträger mit Zellen wurde durch die plasmaaktivierte Steigerung der Benetzbarkeit deutlich verbessert. Die aufpipettierte Zellsuspension wurde komplett in den Zellträger absorbiert. Damit konnte der Anteil nicht adhärierter Zellen auf ein Minimum reduziert werden. Wie Abbildung 4-23 zeigt, ist die Geschwindigkeit des Anwachsens in dreidimensionalen Zellträgern mit dem Anwachsverhalten in klassischen Zellkulturschalen vergleichbar. Sowohl in dreidimensionalen Zellträgern als auch in ebenen Zellkulturschalen ist nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten ein Großteil der Zellen angewachsen, es finden sich also nur noch wenige Zellen im Überstand. Eine Messung nach 30 Minuten ergab bei dreidimensionaler Kultivierung 1560 und bei zweidimensionaler Kultivierung 1320 Zellen im Überstand, wobei die Messung beim dreidimensionalen Zellträger eine Standardabweichung von fast 30 % aufwies. Die Standardabweichungen sind bei den ebenen Kulturplatten durchgängig niedriger als bei den dreidimensionalen Zellträgern.

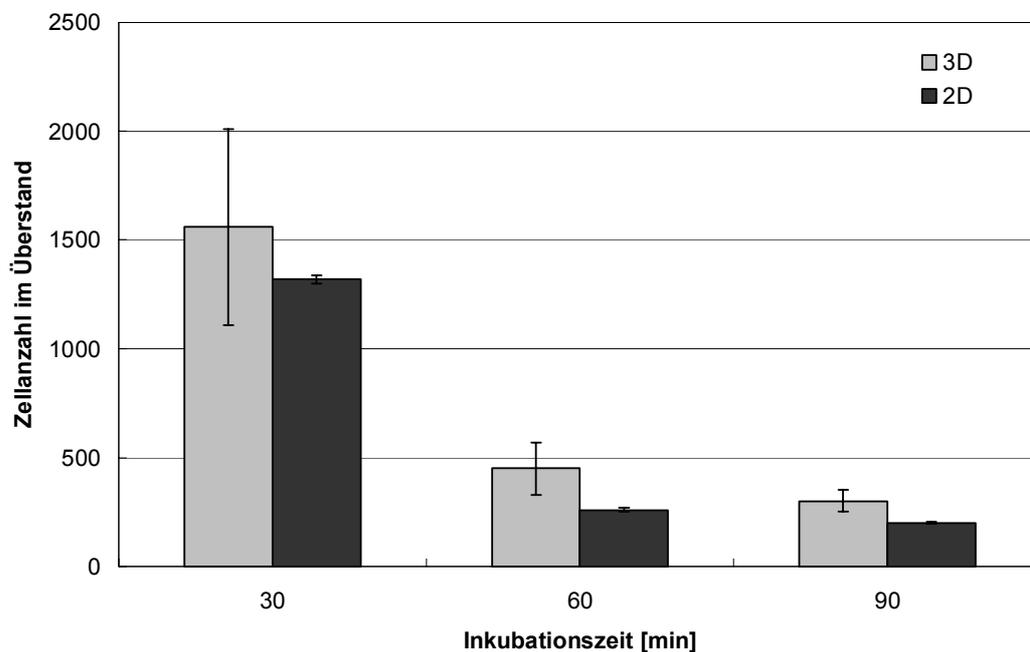


Abbildung 4-23: Mittelwerte und Standardabweichungen nicht angewachsener Zellen im Überstand nach einer Inkubationszeit von 30, 60 und 90 Minuten auf extrudierten dreidimensionalen Zellträgern (3D) und auf einer 6-well-Platte (2D). Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden auf Basis von Messungen an jeweils fünf unabhängigen Proben berechnet.

Neben der Geschwindigkeit des Anwachsens ist bei dreidimensionalen Zellträgern die Verteilung der Zellen innerhalb der Porenstruktur von Bedeutung. Ziel ist es, eine gleichmäßige Verteilung über das gesamte Volumen des Zellträgers zu erreichen. Lokale Zellanhäufungen beispielsweise an der Oberfläche des Zellträgers können zu mangelnder Versorgung der Zellen mit Medium und Entsorgung von Stoffwechselmetaboliten führen.

Die Tiefe, bis zu der Zellen in den dreidimensionalen Zellträger vordringen, kann mit Hilfe des Konfokalen Laserscanning Mikroskops (CLSM) bestimmt werden. Wie in Kapitel 3.6.3 beschrieben, wurden die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid markierten Zellen im CLSM schichtweise angeregt. Die Lichtemission des angeregten Farbstoffs wurde aufgezeichnet. Die gewonnenen Höheninformationen wurden in Abbildung 4-24 mit Hilfe einer Farbcodierung visualisiert. Man findet ausgehend von der Oberfläche bis in eine Tiefe von bis zu 650 μm Zellen. In Abbildung 4-24 sind die an der Oberfläche des Zellträgers wachsenden Zellen blau dargestellt. Weiterhin finden sich in einer Tiefe von 300 – 400 μm Zellen, die in Abbildung 4-24 grün dargestellt sind. Tiefer liegende Zellen sind bis in eine Tiefe von 650 μm gelb und rot dargestellt. Abbildung 4-24 zeigt eine homogene Besiedlung des Zellträgers bis in eine Tiefe von 650 μm , wobei einzelne Makroporen zur Ver- und Entsorgung der Zellen frei bleiben.

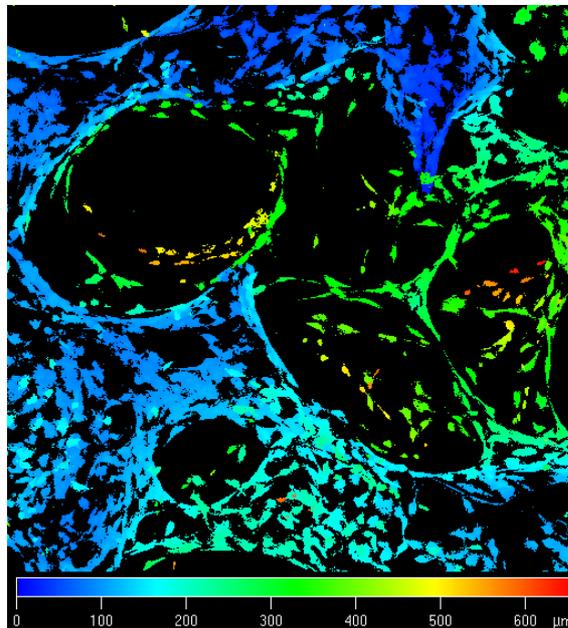


Abbildung 4-24: Tiefencodierte Darstellung der dreidimensionalen Verteilung von Zellen in einem extrudierten Zellträger. Blau markierte Zellen wachsen an der Oberfläche des Scaffolds, grün markierte Zellen wachsen in einer Tiefe von 300 – 400 μm und rot dargestellte Zellen wachsen in einer Tiefe von bis zu 650 μm .

Die Verteilung der Zellen über den Querschnitt einer Probe kann zusätzlich mit REM-Aufnahmen dargestellt werden. Abbildung 4-25 zeigt das Einwachsen von 3T3-L1 Fibroblasten in die poröse Struktur eines spritzgegossenen Zellträgers. Die Zellen sind in Abbildung 4-25 grün dargestellt. In Abbildung 4-25 wachsen Zellen in interkonnektierende Poren ein, während einzelne abgeschlossene Poren nicht besiedelt werden. Die konkave Gestalt der Poren führt zu einer sternförmigen Morphologie der Zellen, die der natürlichen Zellgestalt ähnelt. Die Zellen bilden sowohl mit den Porenwänden als auch mit den benachbarten Zellen ein dichtes räumliches Netzwerk aus.

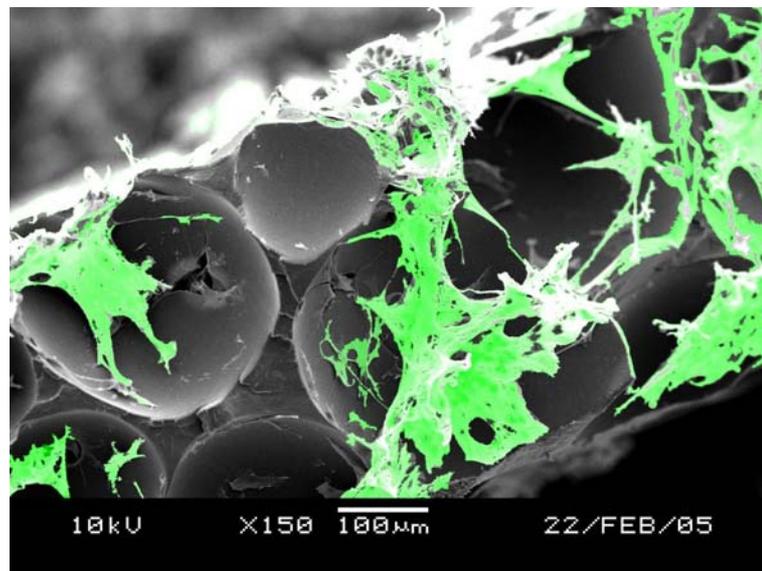


Abbildung 4-25: REM Aufnahme von vitalen Zellen (grün) im Querschnitt eines porösen Zellträgers.

4.4.2 Quantitative Ergebnisse

An die erste Phase der Inkubation (vgl. Kapitel 4.4.1) schließt sich die Phase des Zellwachstums an, in der die Zellanzahl durch kontinuierliche Zellteilung ansteigt.

Die Effizienz des Zellwachstums wurde durch die Ermittlung der Zellanzahl auf den Zellträgern zu bestimmten Zeitpunkten dargestellt. Da die Anzahl der Zellen abhängig ist von der Anzahl der Zellen am Anfang der Besiedlung und von der Dauer der Besiedlung, wurden die Zellanzahlen bei gleicher Besiedlungsdichte zu Beginn des Versuchs zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe eines WST-Tests untersucht. Die optische Dichte des Zellkulturmediums ist dabei direkt proportional zur Zellanzahl und steigt sowohl in den Standard Multiwellplatten als auch in der 3D Struktur bis zum Tag 3 an, wobei in der 3D Struktur ein höheres Niveau erreicht wird als auf den Standard Wellplatten. Dort wird am Tag 5 bei einer optischen Dichte von 0,5 eine Plateauphase mit leicht fallender Tendenz erreicht, während in der 3D Struktur eine weitere leichte Zunahme bis zu Werten der optischen Dichte von 0,9 messbar ist.

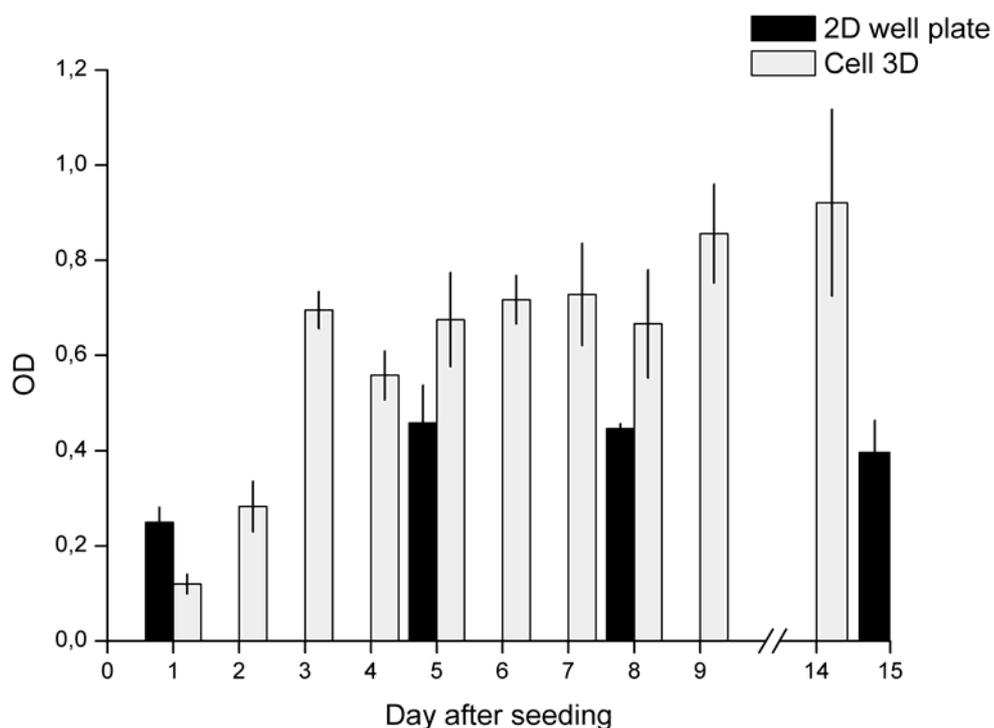


Abbildung 4-26: Optische Dichte (OD) des Mediums nach Zugabe von Tetrazoliumsalm auf Standard Multiwellplatte (2D well plate) und auf 3D Struktur (Cell3D). Messzeitpunkte 1 – 9, 14 und 15 Tage nach der Besiedlung.

Die in Abbildung 4-26 dargestellten Wachstumskurven zeigen, dass in den ersten Tagen nach der Inkubation auf ebenen Oberflächen mehr Zellen vorhanden sind als in dreidimensionalen Zellträgern. Ab Tag 5 sind jedoch die auf dreidimensionalen Zellträgern gemessenen Werte der optischen Dichte höher als die in ebenen Kulturschalen gemessenen Werte. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass sich in den dreidimensionalen Zellträgern mehr Zellen befinden als auf ebenen Zellkulturschalen. Zudem kann bis Tag 15 ein leichter Rückgang der Zellanzahl in ebenen Kulturschalen verzeichnet werden, während die Werte der optischen Dichte in den dreidimensionalen Zellträgern bis Tag 14 kontinuierlich ansteigen. Aufgrund dieses Ergebnisses eignen sich dreidimensionale Zellträger insbesondere für Langzeitexperimente, die eine Kultivierung über mehr als 5 Tage erfordern.

4.4.3 Ergebnisse der Genexpressionsstudie

Die Qualität der gezüchteten Zellen wurde anhand ihrer Genexpressionsmuster überprüft. Die verwendeten 3T3-L1 Fibroblasten können durch Zugabe bestimmter Substanzen (vgl. 3.) zu Adipozyten differenziert werden. Hierdurch kann der Vorgang der natürlichen Adipogenese nachgebildet werden. Der Erfolg der Differenzierung kann durch eine veränderte Zellmorphologie mit Ausbildung von Fettvakuolen überprüft werden. Im Rahmen der Differenzierung werden innerhalb der Zelle Veränderungen in der Genexpression ausgelöst. Diese Änderungen können mit Hilfe von Genarrays dargestellt werden. Abbildung 4-27 zeigt Änderungen im Genexpressionsprofil von undifferenzierten 3T3-L1 Fibroblasten nach fünfwöchiger Kultivierung auf ebenen und dreidimensionalen Oberflächen. Eine Reihe von Genen sind sowohl auf ebenen Flächen als auch in einer dreidimensionalen Umgebung hoch- bzw. herunterreguliert. Bei dreidimensionaler Kultivierung kann eine bis zu zehnfach erhöhte Expression von fetttypischen Genen wie beispielsweise *Adipoq* oder *Fabp4* beobachtet werden. Auf konventionellen Zellkulturoberflächen kann bei einzelnen Genen wie *Matn4* oder *Zfp423* eine Abnahme in der Genexpression beobachtet werden. Bei anderen Genen wie *Sap30* oder *Ero11* ist kein signifikanter Unterschied zwischen der Kultivierung auf glatten Oberflächen und in dreidimensionalen Strukturen messbar.

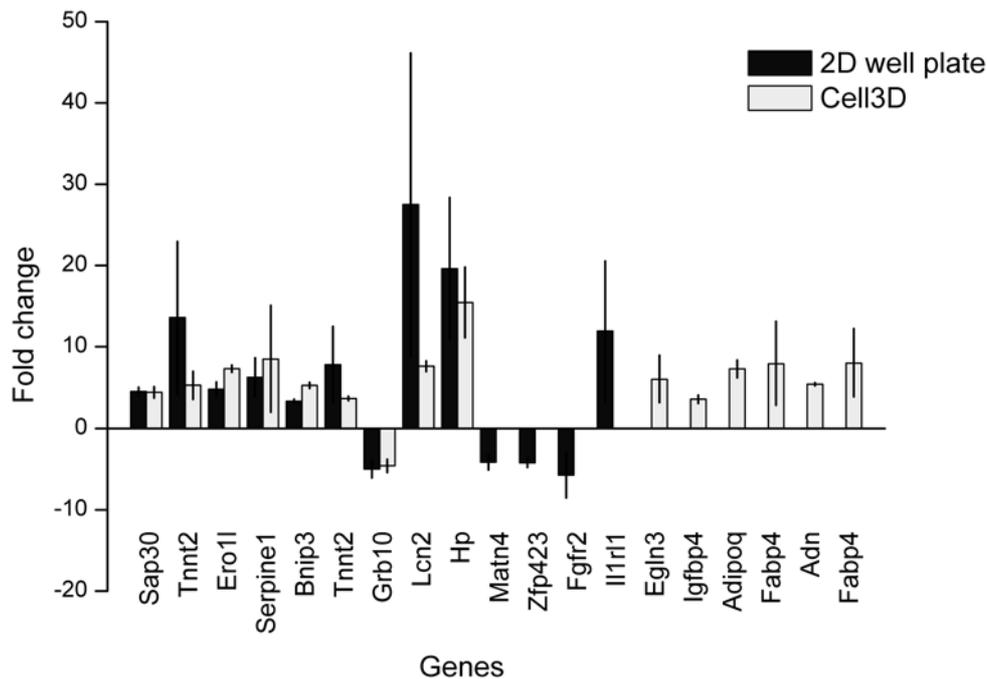


Abbildung 4-27: Fold change der Genexpression bei nicht induzierten Zellen nach fünfwöchiger Züchtung auf Standard Wellplatten (2D well plate) und in einem dreidimensionalen Zellträger (Cell3D). In dreidimensionaler Umgebung ist die Expression von Genen zur Synthese von extrazellulärer Matrix (EglN3, Igfbp4) und von typischen Genen für die adipogenen Differenzierung (Adipoq, Fabp4, Adn, Fabp4) erhöht. Für diese Faktoren lag bei zweidimensionaler Kultivierung der Wert des Fold change unterhalb des Schwellwerts von 2 und wurde daher nicht dargestellt.

Der Vergleich der Genexpression bei Kultivierung auf glatten Oberflächen und in einer dreidimensionalen Struktur zeigt bereits nach einer Kulturdauer von drei Wochen signifikante Unterschiede. In der dreidimensionalen Struktur kann bei dem im Fettstoffwechsel beteiligten Gen Adipsin (Adn) bereits nach einer Kulturdauer von drei Wochen ein fold change von 12,7 (RMA) gemessen werden. Adiponektin (Adipoq) weist ein fold change von 13,9 (RMA) beziehungsweise 16,7 (Affymetrix) auf. Bei Fabp4 beträgt der fold change nach drei Wochen 9,1 (RMA), Abbildung 4-28.

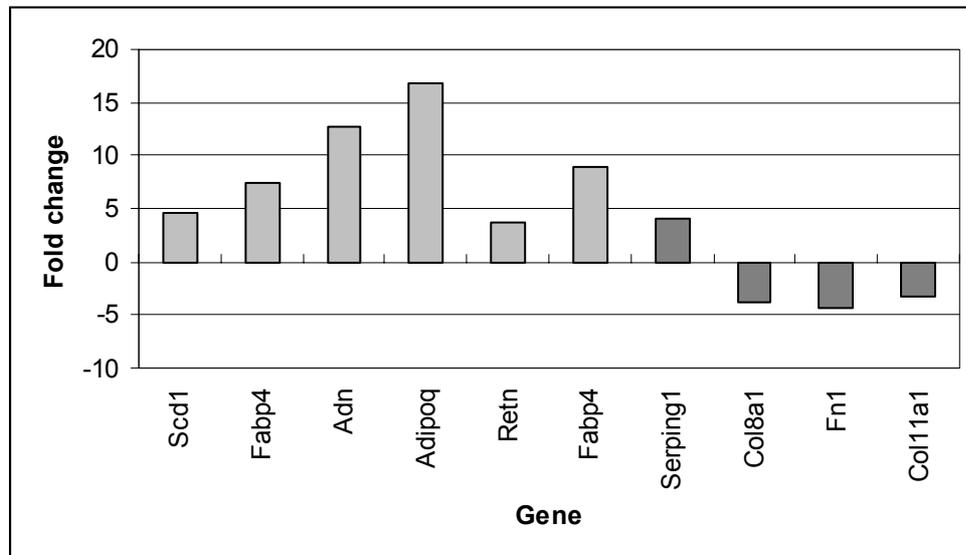


Abbildung 4-28: Fold change der Genexpression bei Vergleich von zweidimensionaler und dreidimensionaler Kultivierung ohne Differenzierungsmedium bei einer Kulturdauer von drei Wochen. Für die Differenzierung von Fettzellen typische Faktoren wie Fabp4, Adn oder Adipoq sind bei dreidimensionaler Kultivierung signifikant erhöht.

Bei einer dreidimensionalen Probe konnte ohne Differenzierungsmedium beim Vergleich zwischen fünfter und erster Kulturwoche bei Adn ein fold change von 54,9 und bei Adipoq von 158,2 festgestellt werden. Vergleichsproben unter zweidimensionalen Kulturbedingungen zeigen deutlich geringere positive fold changes, wie bei Apoc1 zum Teil sogar abnehmende Expressionslevels über den Verlauf der Kulturdauer, Abbildung 4-29.

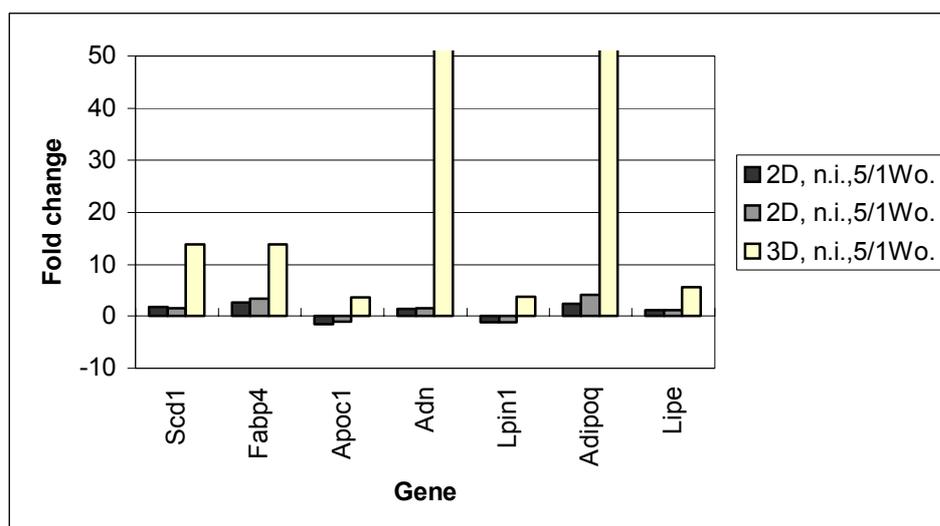


Abbildung 4-29: Fold change der Genexpression bei Kultivierung ohne Induzierung (n.i.) bei zweidimensionaler (2D) und dreidimensionaler (3D) Kultivierung; Vergleich zwischen fünfter und erster Kulturwoche.

Bei chemischer Stimulierung der Differenzierung können nach drei Wochen keine signifikanten Unterschiede in der Expression von fetttypischen Faktoren in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen beobachtet werden.

Nach fünf Wochen Kultivierung mit chemischer Stimulierung in dreidimensionalen Konstrukten sind erneut fettspezifische Gene höher exprimiert als bei Kultivierung auf zweidimensionalen Oberflächen. So beträgt der fold change bei Scd1 3,5 und bei Adipoq 6,4.

Kontrollversuche auf zweidimensionalen Oberflächen bestätigten die Wirkung des Differenzierungsmediums auf die Expression von Genen wie Fabp4 (fold change 29,2), Adn (fold change 55,5) und Adipoq (fold change 98,9). Nach fünf Wochen konnte auf zweidimensionalen Oberflächen keine erhöhte Expression von Fettgenen mehr beobachtet werden. Die Adipogenese war zu diesem Zeitpunkt offensichtlich bereits abgeschlossen. Dies kann wie Abbildung 4-31 zeigt ebenfalls lichtmikroskopisch dargestellt werden. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei Differenzierungsversuchen in dreidimensionalen Konstrukten. Der fold change zwischen den induzierten und nicht induzierten Proben fällt geringer aus als bei zweidimensionaler Kultivierung, was auf die bereits erhöhte Genexpression bei nicht induzierten Proben zurückzuführen ist, Abbildung 4-30. So betragen beispielsweise die Werte des fold changes bei Scd1 10,5, bei Fabp4 3,9, bei Adn 3,9 und bei Adipoq 7,1.

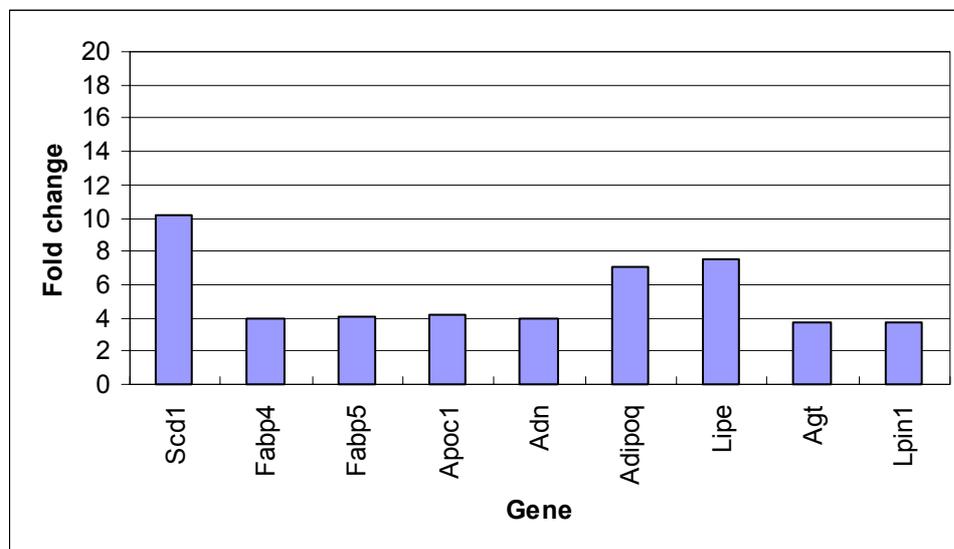


Abbildung 4-30: Fold change der Genexpression zwischen induzierten und nicht induzierten Proben bei Kultivierung in dreidimensionalen Konstrukten nach einer Kulturdauer von drei Wochen.

Auch nach fünf Wochen können noch hochregulierte Fettgene beobachtet werden, was auf eine weitere Differenzierungsleistung zu diesem Zeitpunkt schließen lässt.

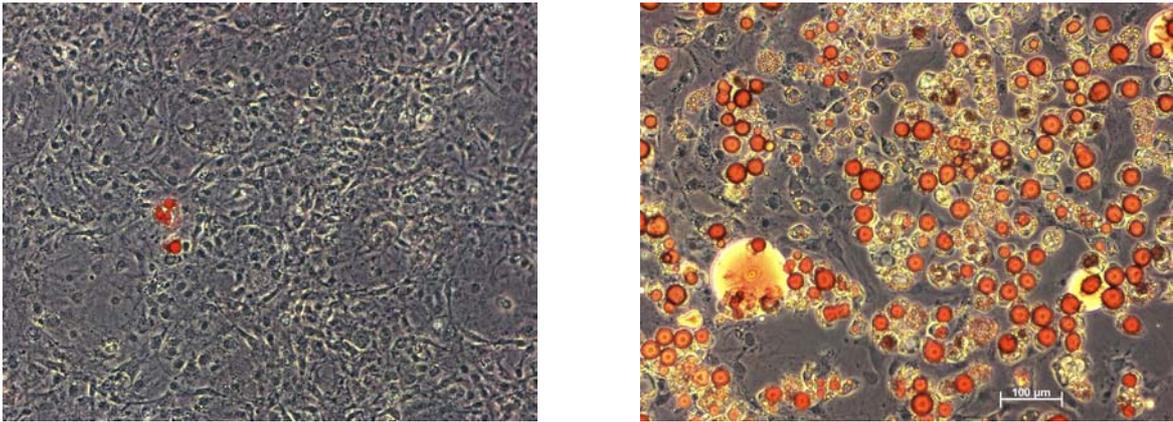


Abbildung 4-31: Lichtmikroskopische Aufnahmen von 3T3-L1 Fibroblasten zu Beginn der Kultivierung (links) und nach fünfwöchiger Kultur mit Differenzierungsmedium (rechts). Beide Bilder wurden mit Nilrot angefärbt. In der rechten Abbildung sind die durch Nilrot markierten Fettvakuolen als charakteristisches Zeichen für differenzierte Adipozyten als runde rote Objekte erkennbar.

5. Diskussion

5.1 Herstellung dreidimensionaler Strukturen für Zellkulturanwendungen

Mit Hilfe nicht toxischer Schäumverfahren wurden durch Spritzguss und durch Extrusion offenporige Schaumstrukturen hergestellt. Durch Modifikation von Prozessparametern wie Einspritzgeschwindigkeit, Einspritzvolumen, Schmelztemperatur, Gasanteil oder Druckabfall an der Extruderdüse konnten wie bereits von Park [73, 99, 106] oder Haugen [67] gezeigt, offenporige Kunststoffschäume mit unterschiedlichen Porengrößen und Graden der Offenporigkeit erzeugt werden.

Im Schaumspritzguss steigt sowohl die Porengröße als auch die Offenporigkeit mit zunehmendem Bauteildurchmesser und mit zunehmender Reduktion des Bauteilgewichts. Das Bauteilgewicht kann durch Verminderung des Einspritzvolumens bei gleich bleibendem Gasgehalt reduziert werden. Ab einer Gewichtsreduktion von 45 % kommt es zum Zusammenschluss kleinerer Poren und zur Bildung von Makroporen, Abbildung 5-1. Okamoto bestätigt diese Beobachtung [87]. Die Bildung von Makroporen zeigt sich auch in einem deutlichen Sprung in der Offenporigkeit bedingt durch verstärktes Eindringen von Gas während der Pyknometermessung.

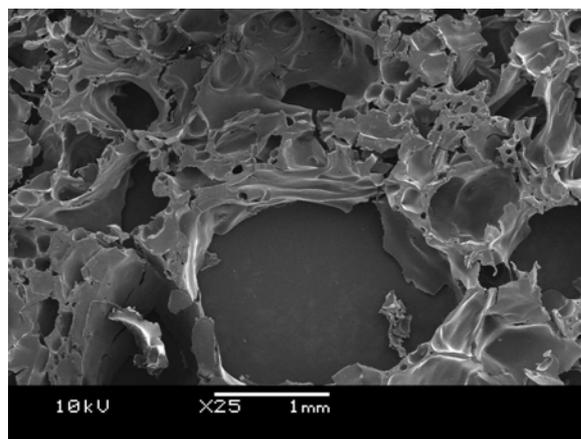


Abbildung 5-1: Makroporen in einem durch Schaumspritzguss hergestellten Bauteil bei einer Gewichtsreduktion von 63 %. Aufgrund der hohen Gewichtsreduktion wird das Werkzeug unzureichend gefüllt und es kann sich kein ausreichender Schmelzdruck aufbauen, um dem Zusammenschluss einzelner Poren zu Makroporen und dem Wachstum der Makroporen entgegenzuwirken.

Im Schaumspritzguss werden die Porenstruktur und die Offenporigkeit vor allem durch das Einspritzvolumen und die Einspritzgeschwindigkeit bestimmt. In der Schaumextrusion bestimmen die Schmelztemperatur, der Druckabfall und die Druckabfallrate an der Düse die Struktur und den Grad der Offenporigkeit des erzeugten Schaums. Beim Schaumspritzguss wird das Volumen eines geschäumten Körpers durch das Volumen der Kavität im Werkzeug vorgegeben. Während des Porenwachstums baut sich in der Schmelze ein Druck auf, der dem Porenwachstum entgegenwirkt. Bei der Schaumextrusion kann das Porenwachstum in der Regel gegen einen deutlich geringeren Widerstand expandieren. Die Folge ist eine höhere Offenporigkeit bei homogener Schaumstruktur in der Extrusion im Vergleich mit Schaumspritzguss. Durch den Einsatz „atmender“ Werkzeuge, die sich nach dem Einspritzvorgang leicht öffnen, um das Porenwachstum zu unterstützen, kann im Schaumspritzguss auch nach dem Einspritzen die Porenstruktur beeinflusst werden [107].

5.2 Oberflächenmodifikation

Kunststoffe sind aufgrund ihrer geringen Oberflächenenergie schlecht benetzbar und lassen sich ohne geeignete Oberflächenmodifikation nur schwer mit Zellen besiedeln [19, 147, 148]. Neben Beschichtungen mit Proteinen aus der extrazellulären Matrix und mit Wachstumsfaktoren [18, 21, 108, 149] werden die Oberflächen von Einmalartikeln für Zellkulturanwendungen hauptsächlich mit Corona- und Plasmabehandlungen hydrophilisiert [18, 21, 44, 111]. Neben der Plasmaaktivierung stehen noch weitere Verfahren zur Verbesserung der Benetzbarkeit wie plasmaaktivierte Pfcopolymerisation [116, 117] oder Plasmapolymerisation [113] zur Verfügung. Trotz deutlich aufwendigerer Prozesse im Vergleich mit einer Plasmabehandlung konnten wie im Abschnitt 4.3 gezeigt keine wesentlichen Vorteile der plasmaaktivierten Pfcopolymerisation und der Plasmapolymerisation im Hinblick auf den Grad der Benetzbarkeit oder die Haltbarkeit der Oberflächenbehandlung gefunden werden. Bei plasmaaktivierter Pfcopolymerisation besteht zudem die Gefahr des Zurückbleibens von nicht vollständig polymerisierten Monomeren. Diese können toxisch auf Zellen wirken und das Zellwachstum hemmen. In den hier durchgeführten Versuchen wurde gezeigt, dass eine Plasmabehandlung von 60 s die Wasseraufnahmefähigkeit eines Polystyrolschaums um den Faktor 20 erhöht. Durch Verlängerung der Behandlungsdauer oder Steigerung der Generatorleistung konnte die Benetzbarkeit der Proben nicht weiter gesteigert werden. Nach Kuzuya et al. werden durch eine Verlängerung der Behandlungsdauer über 60 Sekunden keine weiteren Radikale an einer Kunststoffoberfläche geschaffen [150]. Bei der plasmaaktivierten Pfcopolymerisation wurden die höchsten Werte der Benetzbarkeit bei einer Säurekonzentration von 10 % erreicht. Die Wasseraufnahmefähigkeit betrug hierbei 1500 % des Trockengewichts. Die Generatorleistung hatte bei Werten über 20 W keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis. Offenbar werden bereits bei geringer Generatorleistung ausreichend aktive Gruppen für das Anlagern der Monomere während der Pfcopolymerisation gebildet. Zunehmende

Säurekonzentrationen wirkten sich negativ auf die Benetzbarkeit aus. Beim Vergleich zwischen Acryl- und Methacrylsäure konnte mit Acrylsäure die Benetzbarkeit stärker gesteigert werden als mit Methacrylsäure. Durch Plasmapolymersation konnte die Benetzbarkeit ähnlich wie bei reiner Plasmabehandlung um den Faktor 20 gesteigert werden. Allerdings entfällt bei reiner Plasmabehandlung die Zuführung und Entsorgung mit toxischen Monomeren.

Insbesondere bei dreidimensionalen offenporigen Schaumstrukturen erweist sich wie von Boxleitner gezeigt [115] die im Gegensatz zur oberflächlich wirkenden Coronabehandlung räumlich aktivierende Plasmabehandlung als vorteilhaft. Weist der zu modifizierende Zellkulturträger einen hohen Grad an Offenporigkeit auf, so kann durch Niederdruckplasma das gesamte Volumen des porösen Kunststoffschlams hydrophilisiert werden.

Die Wirkung der Oberflächenmodifikationen auf die Benetzbarkeit dreidimensionaler Zellträger konnte in dieser Arbeit zuverlässig durch Eintauchen in deionisiertes Wasser und anschließende Gewichtsbestimmung des aufgenommenen Wassers im Verhältnis zum Trockengewicht des dreidimensionalen Zellträgers bestimmt werden. Diese Methode wurde von Park [124] und Lau [125] ebenfalls zur Bestimmung der Wasseraufnahmekapazität dreidimensionaler Schaumstrukturen angewendet. Ein weiteres Verfahren zur Quantifizierung aktiver Gruppen unter Verwendung selektiv bindender Farbstoffe [123] konnte wie in Kapitel 4.3.1 dargestellt ebenfalls erfolgreich zur Überprüfung des Erfolges der Oberflächenmodifikation eingesetzt werden.

Wie Abbildung 24 in Kapitel 4.3.1 zeigt, nimmt die Benetzbarkeit der oberflächenmodifizierten Zellträger in einem Zeitraum von 8 Wochen um bis zu 25 % ab. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass sich die Benetzbarkeit dann auf diesem Niveau stabilisiert. Dies wird durch die Untersuchungen von Kuzuya et al. bestätigt. Nach einem anfänglichen Abbau aktiver Gruppen findet keine weitere Reduktion der auf Kunststoffoberflächen erzeugten Radikale mehr statt [150]. Damit kann eine Plasmabehandlung als langzeitstabil angesehen werden.

5.3 Analyse der Porenstruktur

Eine aussagekräftige Analyse der erzeugten Porenstrukturen ist im Hinblick auf vergleichbare Bedingungen bei der Besiedlung poröser Zellträger unerlässlich. Neben dem prozentualen Anteil offener Poren am Gesamtvolumen eines Zellträgers sind die Durchmesser der Poren und die Verteilung der Porengrößen innerhalb eines Zellträgers entscheidend. [119] bietet einen guten Überblick über Verfahren zur Vermessung geschäumter Körper. Zweidimensionale Parameter wie ein- und zweidimensionale Zelldichte können durch die

Anfertigung von Schnitten durch eine Schaumstruktur und nachfolgende durch Software unterstützte Auswertungen ermittelt werden. Allerdings wird durch einen Schnitt jeweils nur ein kleiner Teil eines dreidimensionalen Körpers erfasst. Durch die Analyse vieler Schnitte kann die Aussagekraft zweidimensionaler Analyseverfahren erhöht werden.

Die in dieser Arbeit angewendeten halb- und vollautomatischen Bilderkennungsprogramme unter Verwendung des Programms Cellenger können sehr gut an eine individuelle Analysesituation angepasst werden und liefern reproduzierbare Ergebnisse. Für halbautomatische Auswertalgorithmen müssen bestimmte Merkmale manuell markiert werden. Dies erhöht den Analyseaufwand und begrenzt den Einsatz halbautomatischer Auswerteverfahren für eine größere Probenanzahl. Dreidimensionale Analysen können mit Hilfe der Computer Tomographie durchgeführt werden. Die Investitionen in Messgeräte liegen hierbei deutlich über den Kosten für zweidimensionale Messverfahren. Computer-Tomographie liefert allerdings ein realistisches Abbild dreidimensionaler Porenstrukturen. Die gewonnenen Daten können weiterverarbeitet und beispielsweise zur Vermessung dreidimensionaler Porenstrukturen verwendet werden. Es müssen hierfür weniger Annahmen und Vereinfachungen getroffen werden als bei zweidimensionalen Analysemethoden. Dies macht Computer Tomographie zu einem optimalen Instrument zur Analyse dreidimensionaler Schaumstrukturen.

5.4 Zellbesiedlung und Analyse des Zellwachstums

Die Besiedlung poröser Zellträger mit Zellen wird durch vorangegangene Oberflächenmodifikationen wie Hydrophilisierung im Niederdruckplasma verbessert [21, 44]. Die Zellsuspension und damit die Zellen werden vollständig in den porösen Zellträger aufgenommen. Das Zellwachstum kann somit innerhalb der porösen Struktur stattfinden. Diese Art der Besiedelung dreidimensionaler Zellträger ist einfacher und mit weniger apparativem Aufwand verbunden als andere Besiedelungsverfahren wie Besiedelung durch Zentrifugieren [60] oder durch Evakuieren [30].

Ausgehend von anfänglichen Erfolgen bei der Kultivierung von Zellen auf mikrostrukturierten [140, 141, 151-153], elastischen [154-156] oder speziell beschichteten [157, 158] Oberflächen konzentriert sich die aktuelle Forschung hauptsächlich auf die Kultivierung von Zellen in dreidimensionalen Strukturen. Die positiven Auswirkungen der Kultivierung von Zellen in dreidimensionalen Matrices wurden vielfach beschrieben [24, 49, 159]. Hui und Krishnendu zeigten, dass embryonale Stammzellen in dreidimensionalen Matrices verstärkte Neigung zu hematopoetischer Differenzierung zeigen [56]. Liu et al. zeigten ebenfalls positive Effekte dreidimensionaler Kultivierung auf das Differenzierungsverhalten embryonaler Stammzellen [57, 160]. Hishikawa et al. konnten

durch Analyse von Genexpressionsprofilen wie sie auch in dieser Arbeit durchgeführt wurden, osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen bei dreidimensionaler Kultivierung nachweisen [53]. Die in den vorgenannten Arbeiten verwendeten dreidimensionalen Zellträger sind oft aufwändig hergestellt und für massenhafte Anwendungen wenig geeignet oder stellen aufgrund ihres Herstellungsprozesses keine standardisierten Lösungen dar. Die in dieser Arbeit verwendeten offenporigen Zellträger aus Polystyrol bieten den Vorteil eines wirtschaftlichen Fertigungsverfahrens und vielfältiger Möglichkeiten der Oberflächenmodifikation. Somit können angepasste Lösungen für die Kultivierung verschiedenster Zelltypen entwickelt werden. Zudem können die dreidimensionalen Strukturen standardisiert hergestellt werden und bieten vergleichbare Versuchsbedingungen für Differenzierungsexperimente. Wie in Kapitel 4.4.3 gezeigt wurde, können mit den vorgestellten dreidimensionalen Zellträgern aus Polystyrol ähnlich positive Effekte auf das Differenzierungsverhalten kultivierter Zellen erreicht werden, wie sie bereits aus der Literatur bekannt sind. So nutzten Halbleib et al. [30], Hemmrich [7] oder Fischbach [60] ähnlich wie in dieser Arbeit dreidimensionale Matrices zur Differenzierung von Präadipozyten zu Fettzellen. Dreidimensional kultivierte Fettzellen können zum Aufbau neuartiger Testsysteme zur Untersuchung pharmazeutischer Wirkstoffe oder toxischer Substanzen eingesetzt werden. So verwendeten Viravaidya et al. 3T3-L1 Präadipozyten für Toxizitätstests [161]. Richter et al. untersuchten in vitro die Fettlöslichkeit von Peptid Hormonen [162] und Azain et al. fanden einen Einfluss von Fettsäuren auf die Differenzierung von Fettzellen [131].

Die Analyse des Zellwachstums auf dreidimensionalen Zellträgern stellt eine große Herausforderung dar, da die Zellen für mikroskopische Verfahren nicht direkt zugänglich sind und metabolische Verfahren wie der WST Test nicht direkt von zweidimensionalen auf dreidimensionale Bedingungen übertragen werden können. Kee et al. zeigen auf, welchen Abweichungen die für zweidimensionale Zellkultur etablierten Analysemethoden bei Anwendung auf dreidimensionale Experimente unterworfen sind [14]. Für metabolische Verfahren ist die Zugänglichkeit der Zellen für das Reagenz von entscheidender Bedeutung für die Qualität der Messergebnisse. Für die entwickelten offenporigen Zellträger kann aufgrund des hohen Grades an Offenporigkeit von einer guten Perfusion mit Nährmedien und mit Reagenzien metabolischer Tests ausgegangen werden. Ein mikroskopisches Verfahren, das eine direkte Analyse des Zellwachstums in dreidimensionalen Zellträgern ermöglicht, ist das konfokale Laserscanningmikroskop (CLSM). In dieser Arbeit wurde mit diesem Verfahren dreidimensionales Zellwachstum bis in eine Tiefe von 800 µm dargestellt. Durch Isolation der DNA kultivierter Zellen nach Lysierung der Zellmembran und der Zellkernmembran können Aussagen zu Zellanzahl und zur Qualität der gezüchteten Zellen getroffen werden. Die freigesetzte DNA kann leichter aus einem dreidimensionalen Zellträger

isoliert werden als ganze Zellen. Die DNA-Menge ist direkt proportional zur Zellanzahl und kann fluoreszenzoptisch bestimmt werden.

Nach Amplifizierung der RNA durch realtime Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ausgehend von der extrahierten DNA kann mittels Genarray das Genexpressionsspektrum dargestellt werden. Diese Methode wurde bereits von Kaps [144] und Sittinger [163] erfolgreich zur Darstellung des Differenzierungsgrades gezüchteter Knorpelzellen eingesetzt. Mit Hilfe dieser Methode wurde gezeigt, dass mit der entwickelten Matrix aus Polystyrol die Differenzierung von Präadipozyten zu Fettzellen unterstützt wird. Zudem wird die Produktion von extrazellulärer Matrix begünstigt. Somit kann mit der vorgestellten Polystyrolmatrix ein Fettmodell zur Testung lipophiler Pharmazeutika entwickelt werden. Dieses kann beispielsweise für das massenhafte Screening von potentiellen Wirkstoffen eingesetzt werden.

6. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine neuartige Zellkulturschale entwickelt, in deren offenporiger Schaumstruktur dreidimensionales Zellwachstum möglich ist. Im Gegensatz zu bekannten dreidimensionalen Zellträgern wurde als Material Polystyrol verwendet, das seit Jahrzehnten erfolgreich für die Kultivierung von Zellen eingesetzt wird. Die Vorteile dreidimensionalen Zellwachstums im Vergleich zu konventioneller Kultivierung in ebenen Zellkulturschalen wurden mit Hilfe moderner Analysemethoden wie beispielsweise Genarrays zur Analyse von Genexpressionsspektren dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass bei dreidimensionaler Kultivierung die Differenzierung von Fettzellen unterstützt wird. Die Struktur der offenporigen Schäume wurde mit Hilfe von automatisierter Bilderkennung und Mikro-CT-Aufnahmen analysiert. Neben optimaler Strukturkompatibilität durch eine an das Wachstumsverhalten der Zellen angepasste Porenstruktur konnte mit Hilfe von gezielter Oberflächenmodifikation Oberflächenkompatibilität des künstlichen Zellträgers mit dem biologischen System der Körperzelle erreicht werden.

Dreidimensionale Zellkulturschalen können im Bereich der Pharmazie und der Toxikologie eingesetzt werden. Es wurde gezeigt, dass Fettzellen bei Kultivierung in den vorgestellten Porenstrukturen zelltypische Genexpressionsmuster aufweisen. Dies kann genutzt werden, um ein Testsystem zur Untersuchung der Wirkmechanismen fettlöslicher Arzneimittel aufzubauen. Mit derartigen Systemen können bereits im Zellkulturexperiment aussagekräftige Rückschlüsse auf die Wirkung einer Substanz im Körper gezogen werden. Dies ist mit den momentan zur Verfügung stehenden Zellkulturmodellen nur bedingt möglich. Aufwändige, teure und ethisch bedenkliche Tierversuche können somit reduziert werden.

Ausgehend von den in dieser Arbeit vorgestellten Erkenntnissen kann das untersuchte dreidimensionale Zellkultursystem für den Einsatz in der pharmazeutischen Forschung validiert werden. Zudem ist zu untersuchen, inwieweit die gefundenen Auswirkungen dreidimensionaler Kultivierung auf weitere Zelltypen übertragen werden können.

Da bei dreidimensionaler Kultivierung deutlich höhere Zellanzahlen und Zelldichten auftreten als bei zweidimensionaler Kultivierung stellen die Versorgung der Zellen mit Medium und die Entsorgung von Stoffwechselmetaboliten begrenzende Faktoren dar. Durch die Kombination optimaler struktur- und oberflächenkompatibler dreidimensionaler Porenstrukturen mit einem leistungsfähigen Perfusionssystem können verbesserte dreidimensionale Testsysteme geschaffen werden.

7. Anhang

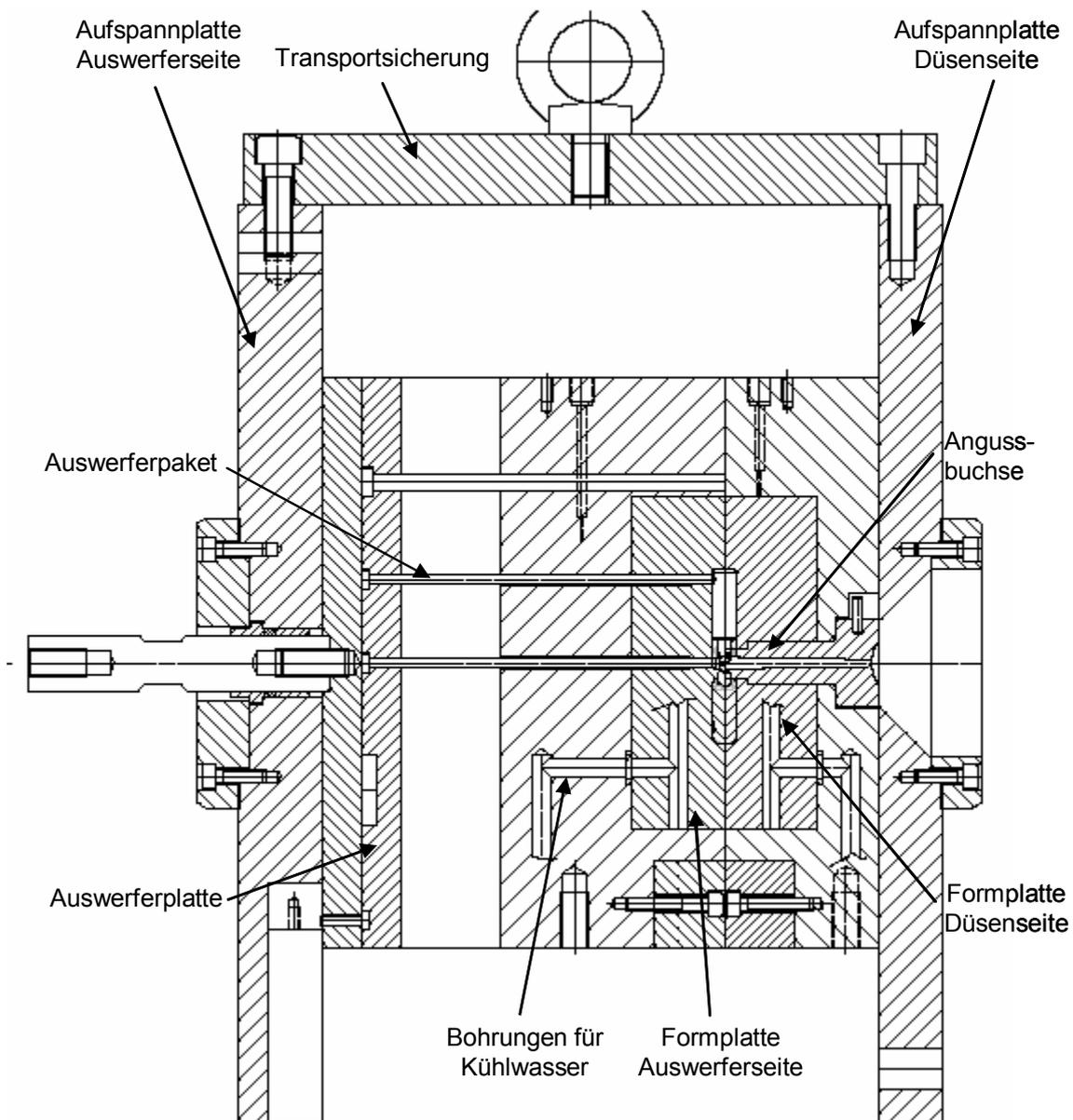


Abbildung 7-1: Spritzgießwerkzeug zur Herstellung poröser Schaumstrukturen. Das Werkzeug wird mit Hilfe der düsen- und auswerferseitigen Aufspannplatten auf einer Spritzgießmaschine montiert. Die Aufspannplatten sind während des Transports und während des Einbaus mit einem Steg als Transportsicherung verbunden. Die in der auswerfer- und düsenseitigen Formplatte befindliche Kavität wird über eine Angussbuchse gefüllt. Über Bohrungen für Kühlwasser kann der Formeinsatz temperiert werden. Das in der Auswerferplatte montierte Auswerferpaket stößt das fertige erkaltete Teil nach dem Spritzvorgang aus.



Abbildung 7-2: Zellkulturschale für dreidimensionales Zellwachstum im 24-well Format.

Ergänzende Ergebnisse aus der Analyse des Microarrays:

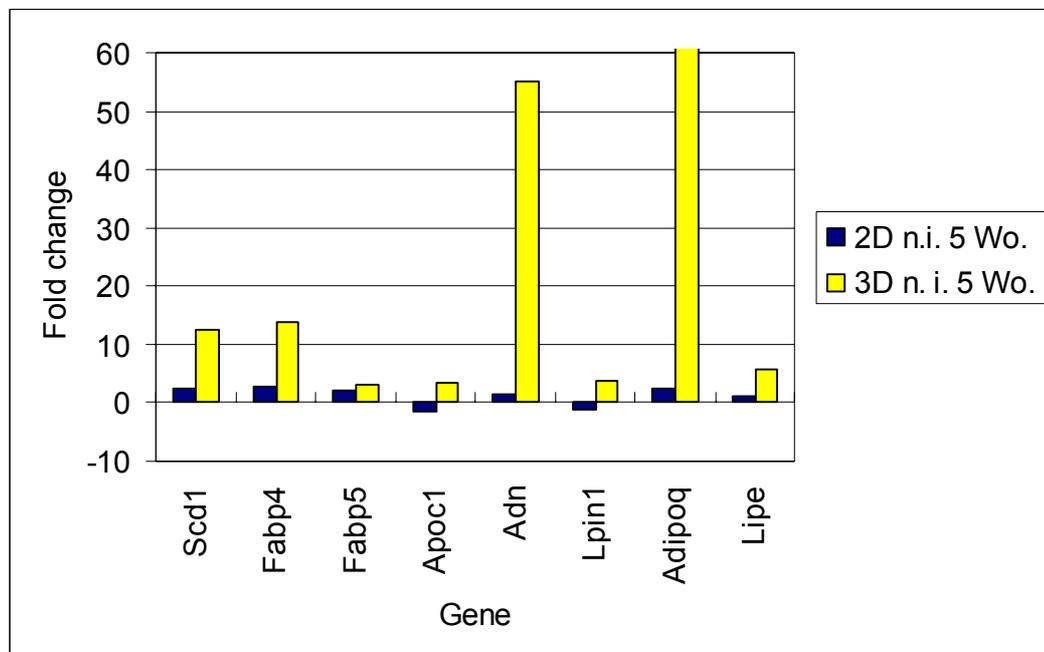


Abbildung 7-3: Gene des Fettstoffwechsels und fold change der Genexpression nach fünfwöchiger Kultivierung auf ebenen Oberflächen (2D) und in einer dreidimensionalen Struktur (3D).

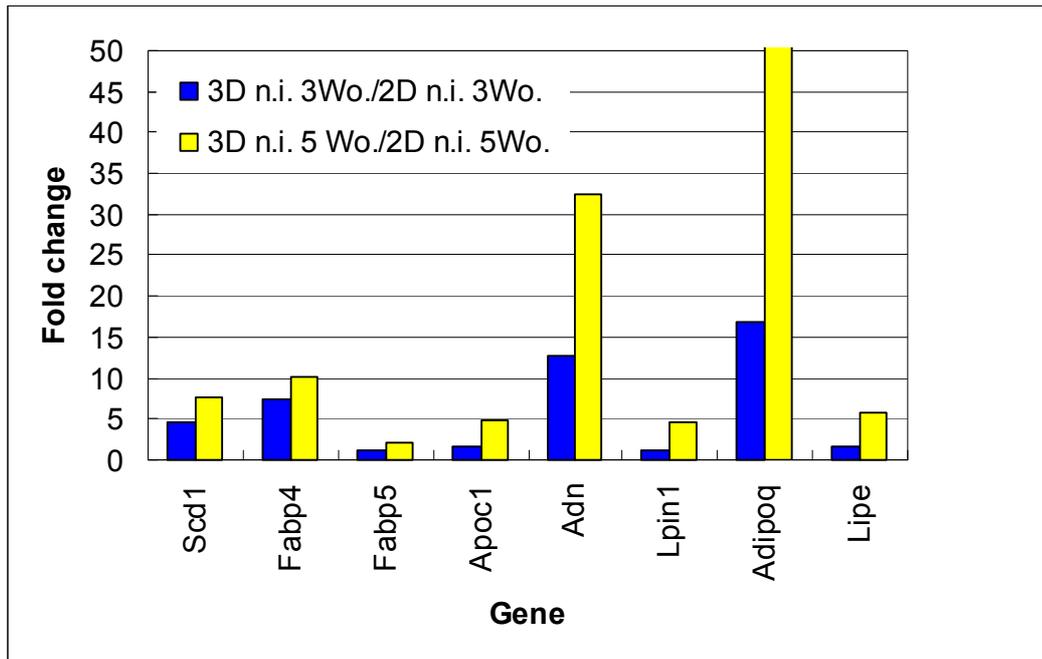


Abbildung 7-4: Gene des Fettstoffwechsels und fold change der Genexpression ohne Induzierung (n.i.) nach dreiwöchiger und fünfwöchiger Kultivierung auf ebenen Oberflächen (2D) und in einer dreidimensionalen Struktur (3D).

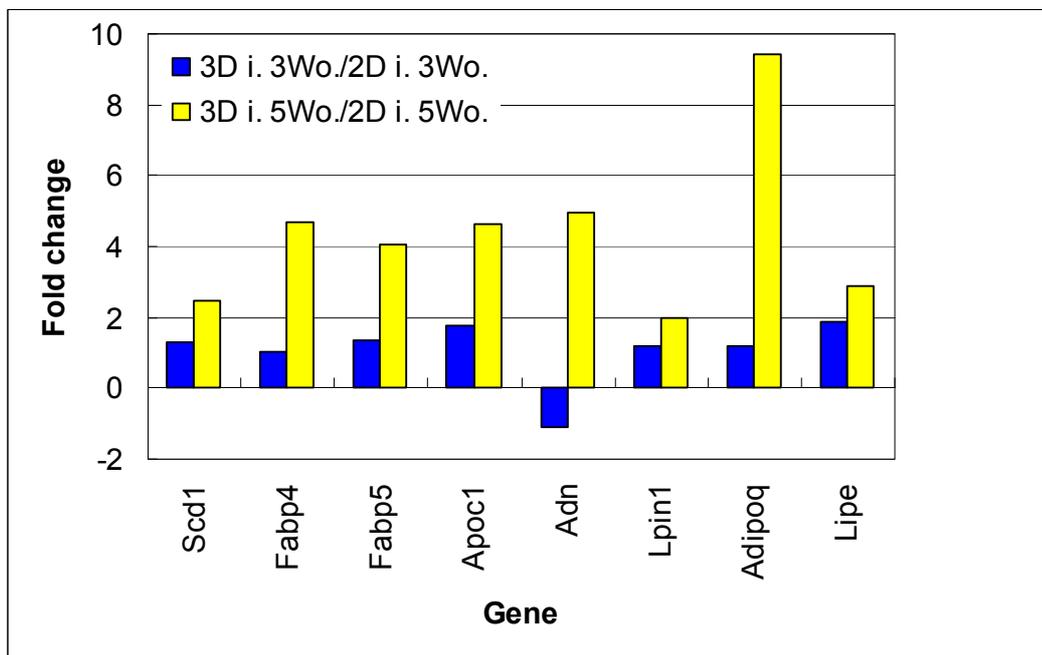


Abbildung 7-5: Gene des Fettstoffwechsels und fold change der Genexpression mit Induzierung (i.) nach dreiwöchiger und fünfwöchiger Kultivierung auf ebenen Oberflächen (2D) und in einer dreidimensionalen Struktur (3D).

***Tabelle 7-1:** Gene, die für den Fettstoffwechsel relevant sind, und bei denen Expressionsunterschiede bei dreidimensionaler Kultivierung festgestellt wurden mit zugehöriger Abkürzung und Funktion im Fettstoffwechsel.*

Gen	Abkürzung	Funktion
Pyruvate carboxylase	Pcx	Fettsäuresynthese
Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	Scd1	Tritt bei späterer Differenzierungsphase auf, Funktion bei Triglycerid-Metabolismus
Fatty acid binding protein 5	Fabp5	Fetttransport
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	Gpd1	Tritt bei späterer Differenzierungsphase auf, Funktion bei Triglycerid-Metabolismus
Apolipoprotein D	Apod	Transport
Fatty acid binding protein 4	Fabp4	Transport
Apolipoprotein C-I	Apoc1	Lipid-Transport
Adipsin	Adn	Von Adipozyten sezerniertes Protein
Lipin 1	Lpin1	Lipid-Metabolismus
Adiponectin	Adipoq	Ausschliesslich von Adipozyten sezerniertes Signalmolekül, Funktion beim Lipidstoffwechsel
Lipase	Lipe	Lipid-Metabolismus
Angiotensinogen	Agt	Von Adipozyten sezerniertes Protein
Resistin	Retn	Von Adipozyten sezerniertes Signalmolekül mit kontroverser Funktion
CD36 antigen	Cd36	Tritt bei späterer Differenzierungsphase auf, Fettsäuretransporter

8. Literatur

- [1] von Heimburg, D., et al., Preadipocyte-loaded collagen scaffolds with enlarged pore size for improved soft tissue engineering. *Int J Artif Organs*, 26, 12 (2003),pp. 1064-1076.
- [2] Mueller-Klieser, W., Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol*, 273, 4 Pt 1 (1997),pp. C1109-1123.
- [3] Patrick, C. W., Jr., et al., Preadipocyte seeded PLGA scaffolds for adipose tissue engineering. *Tissue Eng*, 5, 2 (1999),pp. 139-151.
- [4] Lanza, R. , Langer, R. , and Vacanti, J., *Principles Of Tissue Engineering. Volume 2.* Academic Press, San Diego, London 2000, pp. 1 - 15.
- [5] Gad, Shayne Cox, Introduction: Drug Discovery in the 21st century, In: *Drug Discovery Handbook*, Gad, S.C., Editor. John Wiley & Sons 2005, pp. 1 - 10.
- [6] Hillisch, A., Hilgenfeld, R., and Giersiefen, H., Modern methods of drug discovery: An introduction, In: *Modern methods of drug discovery*, Hillisch, A. and Hilgenfeld, R., Editors. Birkhäuser Verlag, Basel 2003, pp. 1-19.
- [7] Hemmrich, K., et al., Implantation of preadipocyte-loaded hyaluronic acid-based scaffolds into nude mice to evaluate potential for soft tissue engineering. *Biomaterials*, 26, 34 (2005),pp. 7025-7037.
- [8] von Heimburg, D., et al., Human preadipocytes seeded on freeze-dried collagen scaffolds investigated in vitro and in vivo. *Biomaterials*, 22, 5 (2001),pp. 429-438.
- [9] von Heimburg, D., et al., Influence of different biodegradable carriers on the in vivo behaviour of human adipose precursor cells. *Plast Reconstr Surg*, 108, 2 (2001),pp. 411-422.
- [10] Kimura, Y., et al., Adipose tissue engineering based on human preadipocytes combined with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 24, 14 (2003),pp. 2513-2521.

-
- [11] Cima, L.G., et al., Tissue engineering by cell transplantation using biodegradable polymer substrates. *Journal of biomedical engineering*, 113, (1991),pp. 143 - 151.
- [12] Chevally, B. and Herbage, D., Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Med Biol Eng Comput*, 38, 2 (2000),pp. 211-218.
- [13] Huss, F. R. and Kratz, G., Mammary epithelial cell and adipocyte co-culture in a 3-D matrix: the first step towards tissue-engineered human breast tissue. *Cells Tissues Organs*, 169, 4 (2001),pp. 361-367.
- [14] Kee W. NG, Leong D., and Hutmacher D., The challenge to measure cell proliferation in two and three dimensions. *Tissue Engineering*, 11, 1 (2005),pp. 182 - 191.
- [15] C.-M. Lehr, J. Hanes, U.F. Schaefer, R. Abu-Dahab, S. Fuchs, J. Fliegel, C. Erhardt, Drug absorption by the respiratory mucosa: Cell Culture Models and particulate drug carriers. *Journal of aerosol medicine*, 15, 2 (2002),pp. 131 - 139.
- [16] Robitzki, AA., Thielecke, H., and Reininger-Mack, A., 3D-biohybrid systems: applications in drug screening. *Trends in Biotechnology*, 20, 2 (2002),pp. 56-61.
- [17] Forth, W, et al., *Pharmakologie und Toxikologie*. BI Wissenschaftsverlag 1992, pp. 87 - 95.
- [18] Lindl, T., *Zell- und Gewebekultur*. Volume 3. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1994, pp. 20 - 35.
- [19] Lampin, M., et al., Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *J Biomed Mater Res*, 36, 1 (1997),pp. 99-108.
- [20] van Wachem, P.B., et al., Adhesion of cultured human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge. *Biomaterials*, 8, (1987),pp. 323-328.
- [21] Minuth, W. W. and Strehl, R., *3-D-Kulturen: Zellen, Kultursysteme und Environment*. Pabst Science Publisher, Lengerich 2006, pp. 127 - 147.
- [22] Lindl, T., *Zell- und Gewebekultur*. Volume 3. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1994, pp. 62 - 84.
- [23] Wintermantel, Erich, *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*, 3. überarb. und erw. Auflage Edition. Volume 3. Springer, Berlin 2002, pp. 296 - 303.
- [24] Grinnell, F., Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol*, 13, 5 (2003),pp. 264-269.

- [25] Grinnell, F., et al., Dendritic fibroblasts in three-dimensional collagen matrices. *Mol Biol Cell*, 14, 2 (2003),pp. 384-395.
- [26] Minuth, W. W. , Strehl, R. , and Schumacher, Von der Zellkultur zum Tissue engineering. Pabst 2002, pp. 109 - 133.
- [27] Minuth, W. W. and Strehl, R., 3-D-Kulturen: Zellen, Kultursysteme und Environment. Pabst Science Publisher, Lengerich 2006, pp. 196 - 233.
- [28] Li, Shu-Tung, Biologic Biomaterials: Tissue-Derived Biomaterials (Collagen), In: Biomaterials: principles and applications, Park, J.B. and Bronzino, J.D., Editors. CRC Press LLC, Boca Raton 2003, pp. 117 - 139.
- [29] Pachence, J. and Kohn, J., Biodegradable Polymers, In: Principles of Tissue Engineering, Lanza, R., Langer, R., and Vacanti, J., Editors. Academic Press, San Diego, London 2000, pp. 263 - 278.
- [30] Halbleib, M., et al., Tissue engineering of white adipose tissue using hyaluronic acid-based scaffolds. I: in vitro differentiation of human adipocyte precursor cells on scaffolds. *Biomaterials*, 24, 18 (2003),pp. 3125-3132.
- [31] Schantz, Jan-Thorsten, et al., Osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells in computer designed fibrin-polymer-ceramic scaffolds manufactured by fused deposition molding. *Journal of materials science: Materials in medicine*, 16, 9 (2005),pp. 807 - 819.
- [32] Okamoto, Masanori, et al., Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on in vitro and in vivo bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells. *Journal of materials science: Materials in medicine*, 17, 4 (2006),pp. 327 -336.
- [33] Petronis, S., et al., Microstructuring ceramic scaffolds for hepatocyte cell culture. *Journal of materials science: Materials in medicine*, 12, 6 (2001),pp. 523 - 528.
- [34] Hutmacher, Dietmar W., Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21, (2000),pp. 2529 - 2543.
- [35] Mikos, Antonios G., et al., Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. *Biomaterials*, 14, (1993),pp. 323 - 330.
- [36] Mikos, Antonios G., et al., Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams. *Polymer*, 35, 5 (1994),pp. 1068 - 1077.
- [37] Mooney, David J., et al., Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials*, 17, (1996),pp. 1417 - 1422.

- [38] Agrawal, C., et al., The use of PLA-PGA polymers in orthopaedics, In: *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering*. Marcel Dekker, New York 1995, pp. 2081 - 2115.
- [39] Baker, Simon C., et al., Characterisation of electrospun polystyrene scaffolds for three-dimensional in vitro biological studies. *Biomaterials*, 27, (2006),pp. 3136 - 3146.
- [40] Li, Y., et al., Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution and proliferation in nonwoven fibrous matrices. *Biotechnol Prog*, 2001, 17 (2001),pp. 935 - 944.
- [41] Grayson, W.L., Ma, T. , and Brunnell, B., Human mesenchymal stem cells tissue development in 3D PET matrices. *Biotechnol Prog*, 20, 3 (2004),pp. 905 - 912.
- [42] Kral, J. G. and Crandall, D. L., Development of a human adipocyte synthetic polymer scaffold. *Plast Reconstr Surg*, 104, 6 (1999),pp. 1732-1738.
- [43] Bisson, Isabelle, et al., Acrylic acid grafting and collagen immobilization on poly(ethyleneterephthalate) surfaces for adherence and growth of human bladder smooth muscle cells. *Biomaterials*, 23, (2002),pp. 3149 - 3158.
- [44] Lee, J. H., et al., Interaction of cells on chargeable functional group gradient surfaces. *Biomaterials*, 18, (1997),pp. 351 - 358.
- [45] Nakagawa, Y, et al., Endotoxin contamination in wound dressings made of natural biomaterials. *Journal of biomedical materials research B Applied Biomaterials*, 66, 1 (2003),pp. 347 - 355.
- [46] Ascher, B, et al., Soft tissue filling with hyaluronic acid. *Ann Chir Plast Esthet.*, 49, 5 (2004),pp. 465 -485.
- [47] Kanayama, Y., Aoki, C., and Sakai, Y., Development of low endotoxin gelatin for regenerative medicine. *Biol Pharm Bull*, 30, 2 (2007),pp. 237 - 241.
- [48] Wintermantel, E., et al., Tissue Engineering supported with structured biocompatible Materials: goals and achievements, In: *Materials in Medicine*, Speidel, M. and Uggowitz, P., Editors. VDF Hochschulverlag AG, Zürich 1998, pp. 1 - 136.
- [49] Cukierman, E., et al., Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 294, 5547 (2001),pp. 1708-1712.
- [50] Zajaczkowski, M. B., et al., Cell-matrix adhesions on poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Tissue Eng*, 9, 3 (2003),pp. 525-533.
- [51] Yamada, K. M. and Clark, K., Cell biology: survival in three dimensions. *Nature*, 419, 6909 (2002),pp. 790-791.

- [52] Li, Y. and Ma, T., Human cord cell hematopoiesis in three-dimensional nonwoven fibrous matrices: in vitro simulation of the marrow environment. *Journal of hematother stem cell research*, 10, 3 (2001),pp. 355 - 368.
- [53] Hishikawa, K., et al., Gene expression profile of human mesenchymal stem cells during osteogenesis in three-dimensional thermoreversible gelation polymer. *Biochem Biophys Res Commun*, 317, 4 (2004),pp. 1103-1107.
- [54] Levenberg, S., et al., Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 22 (2003),pp. 12741-12746.
- [55] Anders, M., et al., Disruption of 3D tissue integrity facilitates adenovirus infection by deregulating the coxsackievirus and adenovirus receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 4 (2003),pp. 1943-1948.
- [56] Hui, Liu and Krishnendu, Roy, Biomimetic three-dimensional cultures significantly increase hematopoietic differentiation efficacy of embryonic stem cells. *Tissue Engineering*, 11, 1 (2005),pp. 319 - 329.
- [57] Liu, Hui, Lin, Jian, and Roy, Krishnendu, Effect of 3D scaffold and dynamic culture condition on the global gene expression profile of mouse embryonic stem cells. *Biomaterials*, 27, (2006),pp. 5978 - 5989.
- [58] Aung, T., Chondroinduction of mouse mesenchymal stem cells in three-dimensional highly porous matrix scaffolds. *J Biomed Mater Res*, 61, 1 (2002),pp. 75 - 82.
- [59] Minuth, W. W. and Strehl, R., 3-D-Kulturen: Zellen, Kultursysteme und Environment. Pabst Science Publisher, Lengerich 2006, pp. 156 - 186.
- [60] Fischbach, C., et al., Three-dimensional in vitro model of adipogenesis: comparison of culture conditions. *Tissue Eng*, 10, 1-2 (2004),pp. 215-229.
- [61] Friedl, P. and Brocker, E. B., The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*, 57, 1 (2000),pp. 41-64.
- [62] Webb, K., et al., Comparison of human fibroblast ECM-related gene expression on elastic three-dimensional substrates relative to two-dimensional films of the same material. *Biomaterials*, 24, 25 (2003),pp. 4681-4690.
- [63] Martin, I., et al., Selective differentiation of mammalian bone marrow stromal cells cultured on three-dimensional polymer foams. *J Biomed Mater Res*, 55, 2 (2001),pp. 229-235.
- [64] Boo, J. S., Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofac Surg*, 13, 2 (2002),pp. 231-239.

- [65] Franck, Kunststoff-Kompendium. Vogel 2000, pp. 324 - 325.
- [66] N., N., Desmopan, the link between rubber and engineering thermoplastics. (1998).
- [67] Haugen, H. J., Development of an implant to treat gastro-oesophageal reflux disease. Ph. D. Thesis, TU München, München 2004.
- [68] Lee, Shau-Tarng, Foam nucleation in gas-dispersed polymeric systems, In: Foam extrusion, Lee, S.-T., Editor. Technomic Publishing, Lancaster, Basel 2000, pp. 81 - 124.
- [69] Goel, S K. and Beckman, E J., Nucleation and growth in microcellular materials: supercritical CO₂ as foaming agent. International Journal of Multiphase Flow, 22, (1996),pp. 93 - 97.
- [70] Colton, J. S. and Suh, N. P., Nucleation of microcellular foam: theory and practice. Polymer engineering and science, 21, (1987),pp. 500.
- [71] Delale, C. F., Hruby, J., and Marsik, F., Homogenous bubble nucleation in liquids: The classical theory revisited. The Journal of Chemical Physics, 118, 2 (2003),pp. 792-806.
- [72] Abraham, F. F., Homogeneous nucleation theory, In: Advances in theoretical chemistry, Supplement 1, Eyring, H. and Henderson, D., Editors. Academic Press, New York 1974, pp. 80 - 108.
- [73] Park, Chul B. , Baldwin, Daniel F., and Suh, N P., Effect of the pressure drop rate on cell nucleation in continuous processing of microcellular polymers. Polymer engineering and science, 35, 5 (1995),pp. 432-440.
- [74] Klempner, Daniel and Frisch, Kurt C., Handbook of Polymeric Foams and Foam Technology. Hanser, München, Wien, New York 1991, pp. 5 - 13.
- [75] Blander, M. and Katz, J. L., Bubble nucleation in liquids. American Institute of chemical Engineers Journal, 21, 5 (1975),pp. 830 - 848.
- [76] Ruckenstein, E. and Nowakowski, B., A kinetic theory of nucleation in liquids. Journal of Colloid and Interface Science, 137, 2 (1990),pp. 583 - 592.
- [77] Schumacher, Holger, Grundlagen des physikalischen Schäumens. In: Thermoplastische Schaumstoffe-Verarbeitungstechnik und Möglichkeiten der Prozessanalyse, (2004), Aachen.
- [78] Shafi, M. A., Joshi, K., and Flumerfelt, R. W., Bubble size distributions in freely expanded polymer foams. Chemical Engineering Science, 52, 4 (1997),pp. 635 - 644.

- [79] Amon, M. and Denson, C. D., A study of the dynamics of foam growth: analysis of the growth of closely spaced spherical bubbles. *Polymer engineering and science*, 24, 13 (1984),pp. 1026 - 1034.
- [80] Street, J. R., Arthur, L. F., and Reiss, L. P., Dynamics of phase growth in viscous, non-Newtonian liquids - Initial stages of growth. *Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals*, 10, 1 (1971),pp. 54 - 64.
- [81] Huang, Quan, Lösemittelfreie Herstellung von porösen polymeren Membranen durch Schaumextrusion. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg 2000.
- [82] Ramesh, N.S., Foam growth in polymers, In: *Foam extrusion*, S.-T., L., Editor. Technomic Publishing, Lancaster, Basel 2000, pp. 125 - 145.
- [83] Rutkowsky, Gregory E., Miller, Cheryl A., and Mallapragada, K., Processing of polymer scaffolds: solvent casting, In: *Principles of Tissue Engineering*, Lanza, R.P., Editor. Academic Press 2000, pp. 681 - 685.
- [84] Wong, Chang-Ming, et al., Porous polystyrene foam produced at supercritical conditions. *Journal of cellular plastics*, 40, (2004),pp. 421 - 429.
- [85] Doroudiani, Saeed and Kortschot, Mark T., Polystyrene foams. I. Processing-Structure Relationships. *Journal of Applied Polymer Science*, 90, (2003),pp. 1412 - 1420.
- [86] Martini, J., Waldmann, F., and Suh, N. P., The production and analysis of microcellular thermoplastic foams. *SPE ANTEC Proceedings*, 28, (1982),pp. 674 - 676.
- [87] Okamoto, Kelvin T., *Microcellular processing*. Hanser, Munich 2003, pp. 1 - 37.
- [88] Michaeli, Walter and Habibi-Naini, Sasan, Development of an alternative process technology for foam injection molding with physical blowing agents. *Journal of polymer engineering*, 24, (2004),pp. 215 - 227.
- [89] Michaeli, Walter, Pfannschmidt, O, and Habibi-Naini, Sasan, Wege zum mikrozellulären Schaum - Grundlagen zu Material und Prozessführung. *Kunststoffe*, 92, (2002),pp. 48 - 51.
- [90] Michaeli, Walter and Habibi-Naini, Sasan, Foam injection molding (FIM) - a new nozzle for fluid injection. In: *ANTEC 2002*, (2002), San Francisco.
- [91] Reimker, M., Ausgewählte Einsatzgebiete des Einschneckenextruders. In: *Der Einschneckenextruder - Grundlagen und Praxis*, (2002), Bad Dürkheim.

-
- [92] Reimker, M., Zweischnckenextruder in der Schaumtandemlinie. In: Thermoplastische Schaumstoffe - Verarbeitungstechniken und Möglichkeiten der Prozessanalyse, (2004), Aachen.
- [93] Kawashima, H. and Shimbo, M., Effect of key process variables on microstructure of injection molded microcellular polystyrene foams. Cellular polymers, 22, 3 (2003),pp. 175-190.
- [94] Gruber, Marco, Schaumspritzgießen mit physikalischen Treibmitteln - Maschinenausrüstung und Prozessführung. In: Thermoplastische Schaumstoffe - Verarbeitungstechnik und Möglichkeiten der Prozessanalyse, (2004), Aachen.
- [95] Habibi-Naini, Sasan, Schäumen auf flexible Weise. In: Thermoplastische Schaumstoffe - Verarbeitungstechnik und Möglichkeiten der Prozessanalyse, (2004), Aachen.
- [96] Michaeli, Walter and Habibi-Naini, Sasan, Schaumspritzgießen mit physikalischen Treibmitteln - Maschinenkonzepte und Prozessuntersuchungen. In: Thermoplastische Schaumstoffe Verarbeitungstechnik und Prozessanalyse, (2003), Aachen.
- [97] Han, Xiangmin, et al., Continuous microcellular polystyrene foam extrusion with supercritical CO₂. Polymer engineering and science, 42, 11 (2002),pp. 2094 - 2106.
- [98] Xu, Xiang, et al., Effects of die geometry on cell nucleation of PS foams blown with CO₂. Polymer engineering and science, 43, 7 (2003),pp. 1378 - 1390.
- [99] Park, Chul B., Behravesch, Amir H., and Venter, Ronald D., Low density microcellular foam processing in extrusion using CO₂. Polymer engineering and science, 38, 11 (1998),pp. 1812 - 1823.
- [100] Rauwendaal, Chris, Polymer extrusion. Volume 4. Hanser, Munich, Cincinnati 2001, pp. 572 - 575.
- [101] Fritz, Hans-Gerhard, Fang, Shizeng, and Krause, Ralph, Rechnergestützte Auslegung von Kalibrierwerkzeugen, In: Extrusionswerkzeuge: Schwerpunkt Profilwerkzeuge, Verein deutscher Ingenieure, V.-G.K., Editor. VDI-Verlag, Düsseldorf 1996, pp. 187 - 242.
- [102] Lichti, G., Kalibrieren von Profilen. Extrusionswerkzeuge. VDI-Verlag, Düsseldorf 1993.
- [103] Schwarz, Otto, Ebeling, Friedrich-Wolfhard, and Furth, Brigitte, Kunststoffverarbeitung. Volume 9. Vogel, Würzburg 2002, pp. 54 - 55.
- [104] Michaeli, Walter, Extrusionswerkzeuge für Kunststoffe. Hanser, München 1979.

- [105] Shafi, Muhammad A., Lee, James G., and Flumerfelt, Raymond W., Prediction of cellular structure in free expansion polymer foam processing. *Polymer engineering and science*, 36, 14 (1996), pp. 1950 - 1959.
- [106] Park, Chul B. and Suh, Nam P., Filamentary extrusion of microcellular polymers using a rapid decompressive element. *Polymer engineering and science*, 36, 1 (1996), pp. 34-48.
- [107] Cramer, Axel, Verfahrensvarianten und Werkzeugkonzepte beim Schaumspritzgießen mit physikalischen Treibmitteln. In: *Thermoplastische Schaumstoffe - Verarbeitungstechnik und Möglichkeiten der Prozessanalyse*, (2004), Aachen.
- [108] Ratner, Buddy D., Surface modification of polymers for biomedical applications: chemical, biological and surface analytical challenges, In: *Surface modification of polymeric biomaterials*, Ratner, B.D. and Castner, D.G., Editors. Plenum Press, New York 1996, pp. 1 - 9.
- [109] Schamberger, P. C. and Gardella, J. A., Surface chemical modifications of materials which influence animal cell adhesion - a review. *Coll. Surf. B.: Biointerfaces*, 2, (1994), pp. 209 - 223.
- [110] Ohya, Yuichi, Matsunami, Hideaki, and Ouchi, Tatsuro, Cell growth on the porous sponges prepared from poly(depsipeptide-co-lactide) having various functional groups. *Journal of biomaterials science polymer edition*, 15, 1 (2004), pp. 111 - 123.
- [111] Wertheimer, M, Plasma treatment of polymers to improve adhesion, adhesion promotive techniques, technological applications, In: *Adhesion promotion techniques*, Mittal, K.L. and Pizzi, A., Editors. Marcel Dekker, New York 1999, pp. 139 - 173.
- [112] Gleich H., Zusammenhang zwischen Oberflächenenergie und Adhäsionsvermögen von Polymerwerkstoffen am Beispiel von PP und PBT und deren Beeinflussung durch die Niederdruckplasmatechnologie. Dissertation, Duisburg-Essen, Duisburg 2004.
- [113] Inagaki N., Plasma surface modification and plasma polymerization. Technomic Publishing Co., Lancaster 1996, pp. 21 - 41.
- [114] Rieß, K., Plasmamodifizierung von Polyethylen. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, Wittenberg 2001.
- [115] Boxleitner, Jochen, Optimierung der Benetzbarkeit eines Polystyrolschaums für den Einsatz als Zellkulturträger. Diplomarbeit, Fachhochschule München, München 2006.
- [116] Kang, E. T., et al., Surface graft copolymerization and grafting of polymers for adhesion improvement, In: *Adhesion promotion techniques*, Mittal, K.L. and Pizzi, A., Editors. Marcel Dekker, New York 1999, pp. 289 - 313.

- [117] Gupta, B., et al., Plasma induced graft polymerisation of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) films. *J Appl Polym Sci*, 81, (2001),pp. 2993 - 3001.
- [118] Lee, S., Plasma-induced grafted polymerisation of acrylic acid and subsequent grafting of collagen onto polymer film as biomaterials. *Biomaterials*, 17, (1996),pp. 1599 - 1608.
- [119] Tondorf, Andreas, Möglichkeiten zur 3D Schaumstrukturanalyse mittels digitaler Bildverarbeitung. In: *Thermoplastische Schaumstoffe - Verarbeitungstechniken und Möglichkeiten der Prozessanalyse*, (2004), Aachen.
- [120] Peters, R., Schaumstrukturanalyse mit digitalen Bildverarbeitungsmethoden. Dissertation, RWTH Aachen, Aachen 2003.
- [121] Müller, B., et al., Non-destructive three-dimensional evaluation of a polymer sponge by micro-tomography using synchrotron radiation. *Biomol. Eng.*, 19, 2 - 6 (2002),pp. 73 - 78.
- [122] Illerhaus, B., Jasiuniene, E., and Goebbels, J., Messungen von Eigenschaften poröser Materialien in 3D mittels Mikro-Computertomographie. BAM, (2001).
- [123] Hartwig, A. and Albinsky, K., Oberflächencharakterisierung durch Farbreaktionen. *Adhäsion kleben & dichten*, 44, 1 - 2/2000 (2000),pp. 38 - 43.
- [124] Park, S N, et al., Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid cross-linking. *Biomaterials*, 23, (2002),pp. 1205 - 1212.
- [125] Lau, Carsten Udo, Biologische und physikochemische Charakterisierung sowie 3D-Wachstum von Zellen auf Matrices aus nativem Kollagen für den Einsatz in der Medizin. Dissertation, Rheinisch Westfälische Technische Hochschule, Aachen 2005.
- [126] Janneh, O., Intracellular disposition and metabolic effects of zidovudine, stavudine and four protease inhibitors in cultured adipocytes. *Antivir Ther*, 8, 5 (2003),pp. 417 - 426.
- [127] Di Francesco, C. and Bickel, M. H., Uptake in vitro of lipophilic model compounds into adipose tissue preparations and lipids. *Biochem Pharmacol*, 34, 20 (1985),pp. 3683 - 3688.
- [128] Goto, Y., et al., Inhibitory effects of diazoxide or polymyxin B on glucose transport by isolated rat erythrocytes or adipocytes. *Acta Paediatr Jpn*, 36, 6 (1994),pp. 637-641.
- [129] Millar, C. A., et al., Adipsin and the glucose transporter GLUT4 traffic to the cell surface via independent pathways in adipocytes. *Traffic*, 1, 2 (2000),pp. 141-151.

- [130] LeLay, S, et al., Insulin and sterol regulatory element binding protein-1c regulation of gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 277, (2002),pp. 35625 - 35634.
- [131] Azain, M. J., Role of fatty acids in adipocyte growth and development. *J Anim Sci*, 82, 3 (2004),pp. 916-924.
- [132] Klein, J., Novel adipocyte lines from brown fat: a model system for the study of differentiation, energy metabolism, and insulin action. *Bioessays*, 24, 4 (2002),pp. 382 - 388.
- [133] Burkhard, Thomas, Gene expression analyses of 3T3-L1 cell lines during differentiation. Master Thesis, University of Technology, Graz 2003.
- [134] Cowherd, R.M., Lyle, R.E., and McGehee, R.E., Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol*, 10, 1 (1999),pp. 3 - 10.
- [135] Green, H. and Meuth, M., An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*, 3, 2 (1974),pp. 127 - 133.
- [136] Shillabeer, G., et al., A novel method for studying preadipocyte differentiation in vitro. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 20 Suppl 3, (1996),pp. S77-83.
- [137] Gregoire, F. M., Smas, C. M., and Sul, H. S., Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*, 78, 3 (1998),pp. 783 - 809.
- [138] Vegusdal, A., et al., An in vitro method for studying the proliferation and differentiation of Atlantic salmon preadipocytes. *Lipids*, 38, 3 (2003),pp. 289-296.
- [139] Minuth, W. W. and Strehl, R., 3-D-Kulturen: Zellen, Kultursysteme und Environment. Pabst Science Publisher, Lengerich 2006, pp. 447 - 452.
- [140] den Braber, E. T., et al., Scanning electron microscopic, transmission electron microscopic, and confocal laser scanning microscopic observation of fibroblasts cultured on microgrooved surfaces of bulk titanium substrata. *J Biomed Mater Res*, 40, 3 (1998),pp. 425-433.
- [141] den Braber, E. T., et al., Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces. *J Biomed Mater Res*, 40, 2 (1998),pp. 291-300.
- [142] Cukierman, E., Pankov, R., and Yamada, K. M., Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol*, 14, 5 (2002),pp. 633-639.
- [143] Roeder, B. A., et al., Tensile mechanical properties of three-dimensional type I collagen extracellular matrices with varied microstructure. *J Biomech Eng*, 124, 2 (2002),pp. 214-222.

- [144] Kaps, Christian, et al., Gene expression profiling of human articular cartilage grafts generated by tissue engineering. *Biomaterials*, 27, (2006),pp. 3617 - 3630.
- [145] Nakamura, T., Temporal gene expression changes during adipogenesis in human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 303, 1 (2003),pp. 306 - 312.
- [146] Leicher, Stefan, et al., Key processing parameters for microcellular molded polystyrene material. *Cellular polymers*, 25, 2 (2006),pp. 63 - 72.
- [147] Lee J. H., et al., Interaction of cells on chargeable functional group gradient surfaces. *Biomaterials*, 18, (1997),pp. 351 - 358.
- [148] Wertheimer M. et al., Plasma treatment of polymers to improve adhesion, adhesion promotive techniques, technological applications, In: *Adhesion promotion techniques*, A., P., Editor. Marcel Dekker, New York 1999.
- [149] Lindl, T., *Zell- und Gewebekultur*. Spektrum 2000.
- [150] Kuzuya, M., et al., Electron spin resonance study of free-radical formation and its decay of plasma-irradiated poly(methacrylic acid) and its esters. *J. Phys. Chem.*, 95, (1991),pp. 2398 - 2403.
- [151] Chehroudi, B., McDonnell, D., and Brunette, D. M., The effects of micromachined surfaces on formation of bonelike tissue on subcutaneous implants as assessed by radiography and computer image processing. *J Biomed Mater Res*, 34, 3 (1997),pp. 279-290.
- [152] Chen, C. S., et al., Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function. *Biotechnol Prog*, 14, 3 (1998),pp. 356-363.
- [153] Goessl, A., Bowen-Pope, D. F., and Hoffman, A. S., Control of shape and size of vascular smooth muscle cells in vitro by plasma lithography. *J Biomed Mater Res*, 57, 1 (2001),pp. 15-24.
- [154] Balaban, N. Q., et al., Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol*, 3, 5 (2001),pp. 466-472.
- [155] Beningo, K. A. and Wang, Y. L., Flexible substrata for the detection of cellular traction forces. *Trends Cell Biol*, 12, 2 (2002),pp. 79-84.
- [156] Folch, A., et al., Microfabricated elastomeric stencils for micropatterning cell cultures. *J Biomed Mater Res*, 52, 2 (2000),pp. 346-353.
- [157] Corey, J. M. and Feldman, E. L., Substrate patterning: an emerging technology for the study of neuronal behavior. *Exp Neurol*, 184 Suppl 1, (2003),pp. S89-96.

-
- [158] Bhatia, S. N., Yarmush, M. L., and Toner, M., Controlling cell interactions by micropatterning in co-cultures: hepatocytes and 3T3 fibroblasts. *J Biomed Mater Res*, 34, 2 (1997),pp. 189-199.
- [159] Abbott, A., Cell culture: biology's new dimension. *Nature*, 424, 6951 (2003),pp. 870-872.
- [160] Liu, Hui, Collins, Scott F., and Suggs, Laura J., Three-dimensional culture for expansion and differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biomaterials*, 27, (2006),pp. 6004 - 6014.
- [161] Viravaidya, K. and Shuler, M. L., Incorporation of 3T3-L1 cells to mimic bioaccumulation in a microscale cell culture analog device for toxicity studies. *Biotechnol Prog*, 20, 2 (2004),pp. 590-597.
- [162] Richter, W. O., Robl, H., and Schwandt, P., On the in vitro lipolytic activity of peptide hormones in human adipose tissue. *Horm Metab Res Suppl*, 19, (1988),pp. 44-49.
- [163] Sittinger, M., et al., Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomaterials*, 17, 3 (1996),pp. 237-242.