Verbundprojekt

Biofunktionale nanostrukturierbare Implantate zur Stimulation der Osteo- und Chondrogenese bei der Behandlung skeletaler Defekte (Bionanoplant)

Teilvorhaben

Erforschung und Funktionsnachweis nanostrukturierbarer Biomaterialien zur Generierung von biphasischen Systemen mittels 2-PP-Prozess

FKZ: 13N10034

Schlussbericht
erstellt durch

INNOVENT e.V. Technologieentwicklung
Prüssingstr. 27B
07745 Jena

Erforschung und Funktionsnachweis nanostrukturierbarer Biomaterialien zur Generierung von biphasischen Systemen mittels 2-PP-Prozess

- Schlussbericht-

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung

Das Ziel der Arbeiten im Teilvorhaben bestand in der Entwicklung funktionalisierter, mittels lasergestützter Verfahren (2-Photonen-Polymerisation, 2-PP) vernetzbarer und nanostrukturierbarer Biomaterialien für das Tissue Engineering von Knochen- (Osteophase) bzw. Knorpeldefekten (Chondrophase). Im weiteren waren Kupplungsstrategien auszuarbeiten, um die mittels 2-PP generierte Osteo- und Chondrophase zu verbinden. Um die Zelladhäsion innerhalb des Scaffolds für die Osteo- bzw. Chondrophase zu stimulieren war zusätzlich vorgesehen, bioaktive Liganden, die eine zelladhäsionsfördernde Wirkung besitzen, an die polymerisationsfähigen Edukte zu binden und mehrschalige, biodegradierbare CaP-Nanopartikel für die gezielte Freisetzung von Wachstumsfaktoren und kurzen Oligonukleotiden in die polymere Osteophase zu integrieren. Die hergestellten Substanzen/Gele wurden hinsichtlich ihrer mechanischen Festigkeit und Belastbarkeit charakterisiert werden. Des Weiteren waren die hydrolytische Degradation und die Entwicklung geeigneter Reinigungsmethoden sowie grundlegende Untersuchungen zur Zytotoxizität Gegenstand der Projektarbeiten.
Wieterhin sollten wasserlösliche Photoinitiatoren für die 2-PP synthetisiert werden und ihre Eignung für die Vernetzung wasserlöslicher Monomere überprüft werden.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Eine wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Umsetzung der angestrebten Projektziele bildete das innovative Netzwerk bestehend aus zwei Forschungseinrichtungen (*Iba, INNOVENT*) und zwei KMU (*co.don AG, aap Biomaterials GmbH & Co. KG)*, die entsprechend ihren bisherigen Arbeiten über umfassende Qualifikationen und Kompetenzen sowie die notwendige technische Labor/Geräte-Ausstattung verfügten (siehe Antrag).
Unter diesen Voraussetzungen wurden für alle Partner des Verbundvorhabens entsprechende Teilvorhaben mit detaillierter Vorhabensbeschreibung und Arbeitsplanung erarbeitet, die sich in einem Gesamtarbeits- und Zeitplan zusammenfügen und die Rahmenbedingungen sowie die grundsätzliche Arbeitsaufteilung im Projekt beschrieben.

Entsprechend dem zu Projektbeginn bestehenden Stand von Wissenschaft und Technik sowie der am Markt existierenden Produkte stellte das Vorhaben eine wissenschaftlich sehr anspruchsvolle Forschungsaufgabe dar, die mit hohen Anforderungen an die Scaffold-Generierung und die dafür zugrundeliegende komplexe Materialentwicklung verbunden war.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Der erstellte Arbeitsplan für das Teilprojekt ist in Tabelle 1 gezeigt. Die einzelnen Arbeitspakete konnten fristgerecht bearbeitet werden.

	Jahr 2008					Jahr 2009												Jahr 2010												Jahr 2011							
APs	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	PM/AP
AP1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5																											6
AP2						0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75																								6
AP3								0,5	0,5	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0	0,5	0,5																					6
AP4														0,75	1,25	1,25	1,75	M 1,0																			6
AP5																		0,75	1,75	1,75	1,75																6
AP6																						1,75	1,75	0,75	0,75	0,5											5,5
AP7																								1,0	1,5	1,75	1,25										5,5
AP8																											1,0	1,5	0,75	0,75	0,75	0,75					5,5
AP9																												0,75	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		5,25
AP10																															0,5	0,5	1,25	1,25	1,25	1,0	5,75
AP11												0,5												0,5												0,75	1,75
PM	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	175	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	59,25

Tabelle 1: Arbeitsplan für das Teilprojekt von INNOVENT

Darüber hinaus wurden Scaffolds für die Chondrophase über das Electrospinning-Verfahren, das bei INNOVENT etabliert ist, generiert und zur Testung an die co.don AG übergeben, wo die Eignung elektrogesponnener Konstrukte für die Chondrophase gezeigt werden konnte.
Zusätzlich wurde auch ein Verfahren entwickelt, mit dem das vom Projektpartner aap entwickelte kollagenbasierte Knochenkonstrukt mit den von INNOVENT entwickelten Materialien verbunden werden kann.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Mit neuen Untersuchungsmethoden konnten in den letzten Jahren große Fortschritte bei der Aufklärung der Funktion extrazellulärer Matrixstrukturen erzielt werden. Neben dem Einfluss der chemischen Zusammensetzung konnte gezeigt werden, dass auch die Struktur der Matrix

einen wesentlichen Beitrag auf die Entwicklung von Zellen hinsichtlich Zelldifferenzierung, -proliferation und -migration leistet. Diese Erkenntnisse haben zu intensiven Bemühungen geführt, derartige Strukturen in Form artifizieller Matrices strukturell und unter Verwendung ECM-analoger Materialien nachzubilden und diese z. B. für eine Optimierung von Implantaten oder Zellkulturmaterialien einzusetzen [1,2].

Zur Generierung artifizieller Matrices wurden auch verstärkt Fabrikationsverfahren des Rapid Engineering getestet, die es ermöglichen, aus einer Computer-generierten Modellstruktur direkt ein reales dreidimensionales Objekt zu erzeugen [3]. Die bisher eingesetzten Verfahren umfassen vor allem lithographische Techniken wie beispielsweise Photolithographie oder Mikro-Kontakt-Printing [4,5] und spezielle Plotting- und Inkjet-Techniken [6,7]. Bei diesen Verfahren werden in den meisten Fällen in einem Verfahrensschritt zweidimensionale Strukturen generiert. Durch beliebige Wiederholung des strukturbildenden Verfahrensschritts können auch dreidimensionale Objekte generiert werden. Demgegenüber stellt die 2-Photonen-Polymerisation ein Verfahren dar, das es gestattet, dreidimensionale Mikro- und Nanostrukturen direkt vom Computermodell in photosensitive Materialien zu schreiben. Ein besonderer Vorteil dieser Methode im Vergleich zu den oben genannten Inkjet-und Plotting-Techniken besteht in der hohen Auflösung der erzeugten Strukturen bis in den Bereich kleiner 100 nm [8]. Somit bietet das Verfahren eine vielversprechende Option für die computergestützte Generierung mikro- und nanostrukturierter 3D-Strukturen. Für eine Anwendung dieser Technologie zur Fabrikation artifizieller ECM ist die Bereitstellung geeigneter Substanzen eine wesentliche Voraussetzung. Besonders geeignet erscheinen Derivate ECM-analoge Substanzen, die photovernetzbar sind und gleichzeitig zu biokompatiblen Materialien führen.

Während für technische Applikationen bereits eine Vielzahl an photovernetzbaren Monomeren bekannt ist, die sich jedoch nicht für die Generierung artifizieller ECM eignen, beschränkt sich die Anzahl der im Biomaterialbereich bisher untersuchten photovernetzbaren Monomere auf Grund der speziellen Anforderungen auf nur wenige Vertreter. Wesentliche Faktoren, die eine Materialauswahl limitieren, sind insbesondere die notwendige Zytokompatibilität und Resorbierbarkeit. Polyethylenglykoldiacrylate [9] oder Makromere auf der Basis unterschiedlicher Acrylat-terminierter Oligolactone [5,10] wurden bisher als photovernetzbare Substanzen getestet. Auch in Rapid Engineering-Verfahren zur Herstellung artifizieller ECM ist die Anzahl an Komponenten oder Strukturanaloga der ECM bis auf wenige Ausnahmen (Gelatine [7], Hyaluronsäure [11]) begrenzt.

In der 2-PP wurden bisher unterschiedliche Acrylatsysteme als Ausgangsmaterialien eingesetzt [12-15]. Zur Herstellung von Biomaterialien wurde allerdings bisher nur der Einsatz von anorganisch-organischen Hybridmaterialien auf ORMOCERE-Basis beschrieben [14]. Zwar erwiesen sich die Materialien in ersten In-vitro-Untersuchungen als zytokompatibel [16], erscheinen aber zur Fabrikation von ECM-analogen Strukturen mit Hydrogeleigenschaften auf Grund der chemischen Zusammensetzung nur als bedingt geeignet. Für die breite Nutzung der 2-PP im Biomaterialbereich einschließlich der Herstellung artifizieller ECM besonders für die Osteo- und Chondrophase ist zwingend eine entsprechende Materialentwicklung erforderlich, welche die Fabrikation entsprechender Hydrogelstrukturen erlaubt. Neben den Anforderungen, die an Biomaterialien hinsichtlich Bioverträglichkeit und Resorbierbarkeit gestellt werden, müssen auch die Parameter Berücksichtigung finden, welche durch das 2-PP-Verfahren determiniert sind. Dazu zählen besonders die optische Transparenz im Wellenlängenbereich des Verfahrens (nahes Infrarot-Licht) und die Vernetzbarkeit bei geringer Laserenergie, wodurch die erzeugten Strukturen bzw. zusätzlich eingebrachte Wirksubstanzen nicht zerstört werden sowie die Wahl geeigneter, nicht-toxischer Photoinitiatoren [17].

Mit der Entwicklung neuer Ausgangsmaterialien für das 2-PP-Verfahren ergeben sich zusätzlich weitreichende Möglichkeiten zur Oberflächenstrukturierung von Biomaterialien, nicht nur ausschließlich mittels 2-PP, sondern auch für weitere auf dem Prinzip der photochemischen Vernetzung beruhenden Strukturierungsmethoden.

Literatur

[1] B. D. Ratner, S. J. Bryant: Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going. Ann. Rev. Biomed. Eng. 6 (**2004**), 41-75.

[2] M. M. Stevens, J. M. George: Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. Science 310 (**2005**), 1135-1138.

[3] V. L. Tsang, S. N. Bhatia: Three-dimensional tissue fabrication. Adv. Drug Delivery Rev. 56 (**2004**), 1635–1647.

[4] Z. Ademovic, P. Kingshott: Micro- and nanoscale surface patterning techniques for localising biomolecules and cells: the essence of nanobiotechnology. In: Surfaces and interfaces for biomaterials (Hrsg.: P. Vadgama), CRC Press, Boca Raton, **2005**, 150-180.

[5] E.Leclerc, K.S.Furukawa, F.Miyata,Y.Sakai, T.Ushida, T.Fujii: Fabrication of microstructures in photosensitive biodegradable polymers for tissue engineering applications. Biomaterials 25 (**2004**), 4683 4690.

[6] D. W. Hutmacher, M. Sittinger, M. V. Risbud: Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. Trends Biotechnol. 22 (**2004**), 354-362.

[7] R. Landers, U. Hübner, R. Schmelzeisen, R. Mülhaupt: Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. Biomaterials 23 (**2002**), 4437 4447.

[8] R. J. Narayan, C. Jin, Tim. Patz, A. Doraiswamy, R. Modi, D. B. ChriseyY.-Y. Su, S. J. Lin, A. Ovsianikov, B. Chichkov: Laser Processing of Advanced Biomaterials. Adv. Mater. Proc. **2005**, 39-42.

[9] K. Itoga, M. Yamato, J. Kobayashi, A. Kikuchi,T. Okano: Cell micropatterning using photopolymerization with a liquid crystal device commercial projector. Biomaterials 25 ***(***2004***), 2047-2053.***

[10] T. Matsuda, M. Mizutani: Liquid acrylate-endcapped biodegradable poly(ε -caprolactone-co-trimethylene carbonate). II. Computer-aided stereolithographic microarchitectural surface photoconstructs. J. Biomed. Mater. Res. 62: (**2002**), 395–403.

[11] K. Y. Suh, A. Khademhosseini, J. M. Yang, G. Eng, R. Langer: Soft Lithographic Patterning of Hyaluronic Acid on Hydrophilic Substrates using Molding und Printing. Adv. Mater. 16 (**2004**), 584-588.

[12] S. Wu, M. Straub, M. Gu: Single-monomer acrylate-based resin for three-dimensional photonic crystal fabrication. Polymer 46 (**2005**), 10246–10255.

[13] X.-M. Duan, H.-B. Sun, K. Kaneko, S. Kawata: Two-photon polymerization of metal ions doped acrylate monomers and oligomers for three-dimensional structure fabrication. Thin Solid Films 453 –454 (**2004**), 518 –521.

[14] A. Doraiswamy ,C. Jin, R. J. Narayan, P. Mageswaran, P. Mente, R. Modi, R. Auyeung, D. B. Chrisey, A. Ovsianikov, B. Chichkov: Two photon induced polymerization of organic inorganic hybrid biomaterials for microstructured medical devices. Acta Biomater. 2 (**2006**), 267 275.

[15] Linjie Li and J. T.Fourkas: Multiphoton polymerization. Materialstoday 10 (6), **2007**, 30-37.

[16] A. Doraiswamy, T. Patz, R. Narayan, B. Chichkov, A. Ovsianikov, R. Houbertz, R. Modi, R. Auyeung, D. B. Chrisey: Biocompatibility of CAD/CAM ORMOCER polymer scaffold structures. Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 845 (**2005**), **AA2.4.1-*AA2.4.6.***

[17] S. M. Kuebler, M. Rumi, T. Watanabe, K. Braun, B. H. Cumpston, A. A. Heikal, L. L. Erskine, S. Thayumanavan, S. Barlow, S. R. Marder and J. W. Perry: Optimizing Two-Photon Initiators and Exposure Conditions for Three-Dimensional Lithographic Microfabrication. Pre-print for J. Photopolym. Sci. and Tech., special issue for the 18th Conf. of Photopol. Sci. and Tech. and the Internat. Symp. on Mat. and Proc. for Adv. Giga-Bit-Scale Lithography **2001**, Chiba, Japan.

Im Verlauf der Projektbearbeitung wurde regelmäßig der aktuelle Literaturstand ausgewertet, wobei Literaturrecherchen im Scifinder, Beilstein und in Pubmed durchgeführt wurden. Patentrecherchen wurden über das Internet und die Informationsstelle der Friedrich-Schiller-Universität in diversen Patentdatenbanken (z. B. Espacenet, Depatisnet, PatentStorm) durchgeführt.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen der Projektbearbeitung wurden wissenschaftliche Kontakte mit zahlreichen Forschergruppen gepflegt, die in mehreren Fällen (Prof. H. Witte, TU Ilmenau, Dr. S. Schneider, MPI für Chemische Ökologie Jena, Prof. B. Sigusch, Universitätsklinikum Jena, zu konkreten gemeinsamen Arbeiten geführt haben und zum Teil gegenwärtig noch andauern bzw. zu eigenständigen Forschungsprojekten geführt haben. Darüber hinaus fand ein intensiver Informationsaustausch mit an der Problematik strukturierte Scaffolds für die Implantologie interessierten Firmen statt.

II. Eingehende Darstellung

1. Wissenschaftliche Ergebnisse

1.2. Überblick über die synthetisierten Substanzen/Stoffklassen

Im Projekt wurden 62 Substanzen für das Tissue Engineering von Knochen- (Osteophase) sowie für Knorpeldefekte (Chondrophase) hergestellt. Prinzipiell lassen sich alle hier aufgeführten Substanzen mittels 2-Photonen-Polymerisation strukturieren.

Jedoch zeigen vor allem die stärker quellbaren Biopolymere bezüglich der Formstabilität der erzeugten Struktur und der meist geringeren Schreibgeschwindigkeit während des 2-PP-Prozesses einige unvorteilhafte Eigenschaften hinsichtlich der Anforderungen für ein geeignetes biphasiges Scaffoldmaterial.

In Tabelle 2 sind die Komponenten der synthetisierten Substanzgruppen für die Osteo- und Chondrophase basierend auf Poly- und Oligolactonen sowie modifizierten Biopolymeren aufgeführt.

Parameter	Osteophase	**Chondrophase**
Substanzen	**Methacrylierte Oligolactone** **Urethanmethacrylierte Oligolactone** **Urethanmethacrylierte PEG** **Methacryliertes Polyglycerin**	**Biopolymere:** **Alginat** **Hyaluronsäure** **Gelatine** **Chondroitinsulfat** **Chitosan** **Dextran**

Oligolakton-Basis	**Lactid** **Caprolacton** **p-Dioxanon**	
Starter	**Glycerin** **Pentaerytritol** **Dipentaerythritol**	
Modifizierung	**Methacrylsäureanhydrid** **2-Isocyanatoethylmethacrylat**	**Methacrylsäureanhydrid** **Glycidylmethacrylat** **2-Isocyanatoethylmethacrylat**

Tabelle 2: Komponenten für die Synthesen der Osteo- und Chondrophase basierend auf Poly- und Oligolactonen sowie modifizierten Biopolymeren

1.3 Synthese vernetzbarer und nanostrukturierbarer Materialien für die Osteo- und Chondrophase auf der Basis von urethanmethacrylierten und methacrylierten Oligolactonen

Die Vorteile dieser Substanzgruppen können wie folgt beschrieben werden:

- Schnelles Aushärten mit Blaulichtbestrahlung (20-60 s)
- Nur geringe Quellbarkeit
- Hohe mechanische Stabilität

Diese modifizierten Oligolactone enthalten spaltbare Estergruppen im Molekül und sollten somit hydrolytisch sowie enzymatisch mittels Esterasen abgebaut werden können. Der Syntheseweg dieser abbaubaren Materialien ist in Abbildung 1 aufgezeigt.

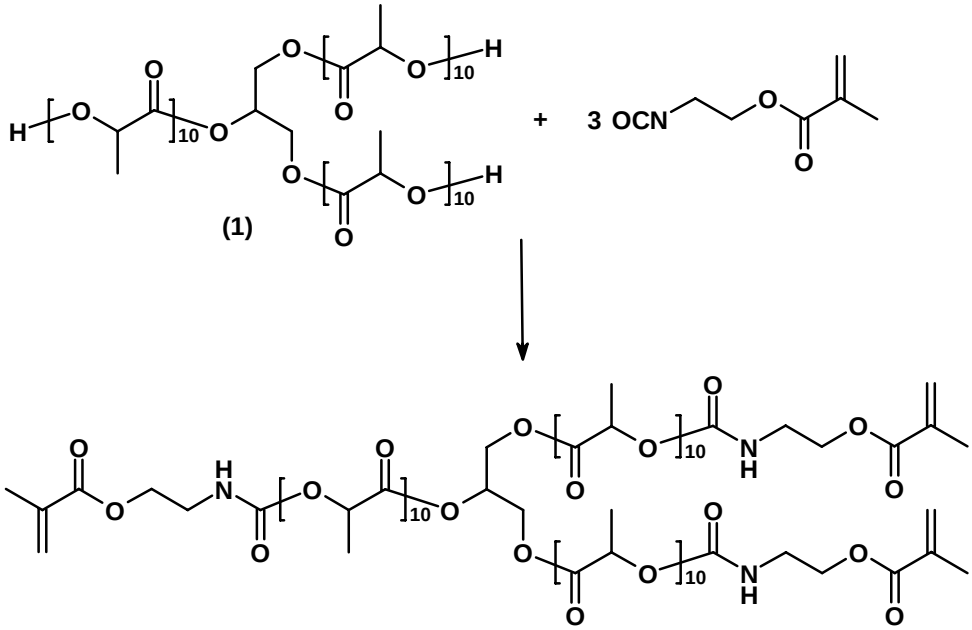


Abbildung 1: Syntheseweg zur Herstellung abbaubarer Urethanmethacrylate

Zunächst werden in einer ersten Stufe (1) durch Ringöffnungspolymerisation von Lactonen (D,L-Lactid, ε-Caprolacton, p-Dioxanon) in Anwesenheit eines OH-gruppenhaltigen Startermoleküls entsprechende Oligomere synthetisiert. Die freien OH-Gruppen werden im 2. Reaktionsschritt mit 2-Isocyanatoethylmethacrylat bei 50°C umgesetzt. Dabei entsteht ein urethangruppenhaltiges Monomer mit polymerisationsfähigen terminalen Methacrylat-funktionen.

Die Zusammensetzungen der synthetisierten Urethanmethacrylate sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Bezeichnung	Starter	D,L-Laktid	Caprolakton	p-Dioxanon
RK 1002	**Glycerin**	**30**		
RK 1003	**Glycerin**	**12**		
RK 1004	**Glycerin**		**15**	
RK 1005	**Glycerin**		**6**	
RK 1006	**Glycerin**	**12**	**6**	
RK 1007	**Glycerin**			**6**
RK 1008	**Glycerin**			**15**
RK 1009	**Glycerin**	**30**		**12**
RK 1010	**Glycerin**		**15**	**12**
RK 1033	**Pentaerythrit**			**8**

RK 1034	**Pentaerythrit**			**8**
RK 1036	**Dipentaerythrit**			**12**
CN 46	**PEG 200**		**1**	**1a**
CN 48	**PEG 200**		**1a**	**1**
TH 141	**PEG 200**	**1**		**1a***
TH 143	**PEG 200**	**1a**		**1**
RK 1150	**Glycerin**		**1a**	**1**
RK 1151	**Glycerin**	**1a**		**1**
RK 1152	**Glycerin**	**1**		**1a**
RK 1154	**Glycerin**		**1**	**1a**

*** kurzkettige Derivate, a = dieser Baustein ist zuerst am Starter gebunden**

Tabelle 3: Zusammensetzung ausgewählter Vertreter synthetisierter Urethanmethacrylate

Eine zweite interessante Substanzklasse für die Synthese vernetzbarer und nanostrukturierbarer Materialien für die Osteo- und Chondrophase stellen methacrylierte Oligolactone dar. Ihre Synthese erfolgt ähnlich der Urethanmethacrylate mit dem Unterschied, dass in der zweiten Stufe der Synthese Methacrylsäurechlorid bzw. Methacrylsäureanhydrid anstatt des 2-Isocyanatoethylmethacrylates zur Einführung polymerisationsfähiger Methacrylatendgruppen verwendet werden.

Diese Substanzklasse zeichnet sich durch eine gute Polymerisierbarkeit, vorzugsweise im UV-Bereich (360- 490 nm) aus. Als Photoinitiatoren können Irgacure® 369, 2959 und das System Campherchinon/Diethylaminobenzoesäureethylester bei 440-490 nm (Blaulicht-bereich) eingesetzt werden. Ebenfalls ist eine klassische radikalische Polymerisation in Gegenwart von Dibenzoylperoxid (DBPO) möglich. Sowohl die photochemisch als auch die mittels Peroxid vernetzten Polymere sind hart und wenig quellbar.

Der Syntheseweg zur Herstellung der Methacrylate ist in Abbildung 2 dargestellt.

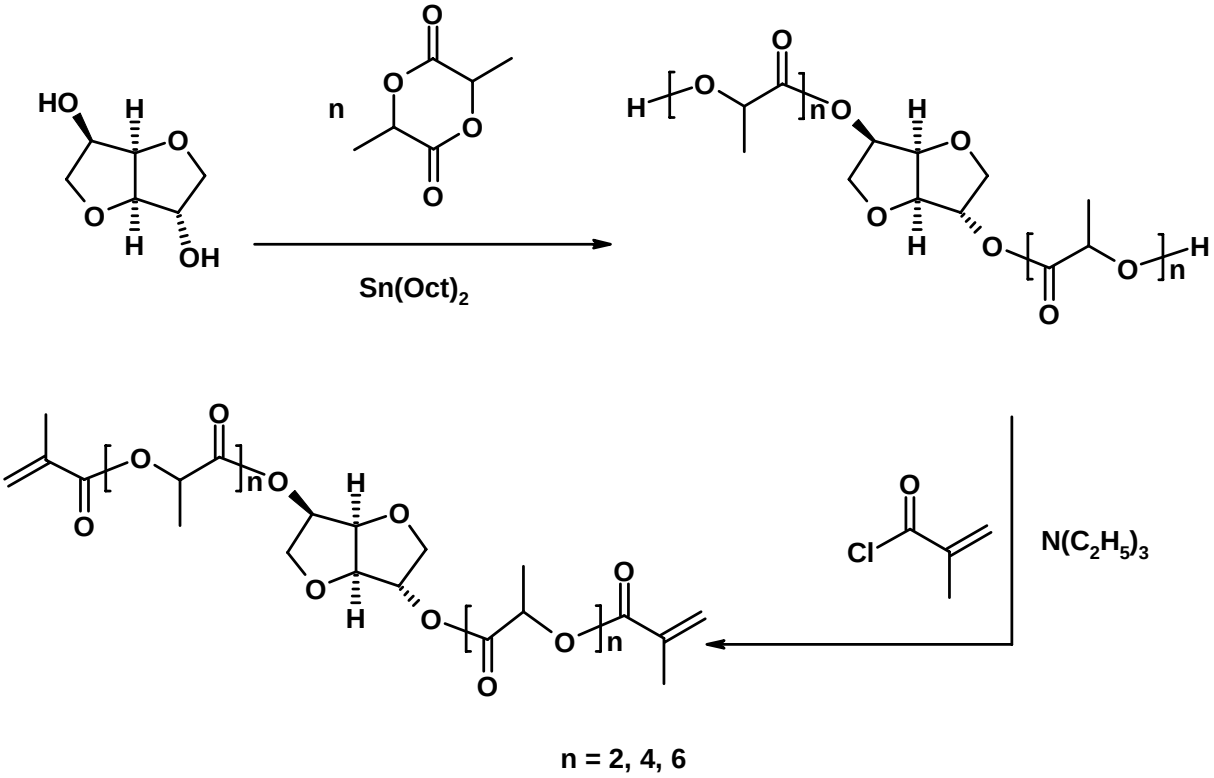


Abbildung 2: Synthese methacrylierter Oligolaktone

Die Zusammensetzungen einiger ausgewählter Vertreter dieser Substanzgruppe sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Bezeichnung	Starter	D,L-Laktid	Caprolakton
AB 001	**Dianhydroglucitol**	**4**	
AB 002	**Dianhydroglucitol**	**10**	
AB 003	**1,8 Oktandiol**	**4**	
AB 004	**1,8 Oktandiol**	**10**	**10**
AB 005	**Tris(hydroxymethyl)ethan**	**9**	**9**

Tabelle 4: Ausgewählte Vertreter der synthetisierten methacrylierten Oligoester

1.4 Physikalisch-chemische Eigenschaften dieser Systeme

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften sind wichtige Parameter für die geplante Anwendung der hergestellten Materialien bei der Behandlung von Knochen- und Knorpeldefekten. Daher wurden diese Parameter mit unterschiedlichen Messmethoden wie Dynamisch-Mechanischer Analyse (DMA) und Messgeräten wie Zugprüfmaschine sowie Textur Analyser umfassend ermittelt.

Glasübergangstemperatur: Die Glasübergangstemperatur ist die Temperatur, bei der das Polymer seine größten Eigenschaftsänderungen erfährt und stellt somit einen wichtigen Einsatzparameter dar. Die Glasübergangstemperatur T_g wurde mittels DMA bestimmt.

Die Glasübergangstemperaturen der bei INNOVENT synthetisierten Substanzen decken den Bereich von -29 - 36°C ab. T_g ausgewählter Urethanmethacrylate sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Bezeichnung	T_g [°C]	D,L-Laktid	Caprolakton	p-Dioxanon
RK 1002	**26,5**	**30**		
RK 1003	**35,6**	**12**		
RK 1004	**-20,3**		**15**	
RK 1005	**8,9**		**6**	
RK 1006	**0,9**	**12**	**6**	
RK 1007	**24,4**			**6**
RK 1008	**8,5**			**15**
RK 1009	**11,6**	**30**		**12**
RK 1010	**-29,0**		**15**	**12**

Tabelle 5: Glasübergangstemperaturen der synthetisierten Urethanmethacrylate

Elastizitätsmodul: Der Elastizitätsmodul ist ein Materialkennwert aus der Werkstofftechnik, welcher den Zusammenhang zwischen Spannung und Dehnung bei der Verformung eines festen Körpers beschreibt. Zur Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der hergestellten Materialien wurden deren Elastizitätsmoduln an einer Zugprüfmaschine (Stauchung/Dehnung) über das Hook`sche Gesetz bestimmt:

$$F / A = h = E \times G$$

F = Kraft in N
h = Zug- / Druckspannung in N / mm^2
G = Dehnung / Stauchung %
l = Längenänderung in mm
$G = l / l_0$
l_0 = Ausgangslänge in mm

Zur Ermittlung des E-Moduls und der Biegefestigkeit wurden zylinderförmige bzw. stäbchenförmige Probekörper hergestellt. Die mechanischen Untersuchungen erfolgten an einer Zugprüfmaschine vom Typ Instron 4467 (Instron GmbH, Darmstadt, Germany) sowie an einem Texture Analyser (Stable Micro Systems, Godalming, UK) ausgestattet mit einer 50 kN sowie einer 0, 5 kN Messzelle.
Der Versuchsaufbau zur Bestimmung des E-Moduls und der Biegefestigkeiten mittels Textur Analyser ist in folgender Abbildung (Abb. 3) exemplarisch dargestellt.

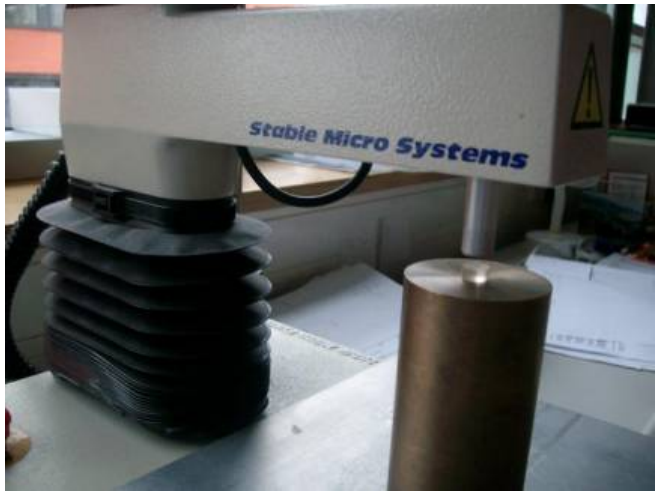


Abbildung 3: Textur Analyser zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften

Der E-Modul für die Urethanmethacrylate liegt im Bereich von 0,4 - 2,4 GPa. Niedrigere Werte erreichen die über Esterbindungen methacrylierten Oligolaktone mit 0,3 - 1,7 GPa.
Die E-Moduln und Biegefestigkeiten sind in Tabelle 6 dargestellt.

Bezeichnung	E-Modul [GPa]	Biegefestigkeit [MPa]
RK 1002	**2,4**	**2,1**
RK 1003	**1,6**	**11,2**

RK 1004	**0,6**	**1,8**
RK 1005	**1,9**	**3,6**
RK 1006	**0,4**	**3,8**
RK 1007	**1,5**	**0,9**
RK 1008	**0,9**	**1,2**
RK 1009*	**-**	**-**
RK 1010	**0,4**	**0,2**
AB 001	**0,5**	**8,9**
AB 002	**1,2**	**4,2**
AB 003	**1,7**	**7,9**
AB 004	**0,3**	**0,6**
AB 005	**0,3**	**2,0***

*nicht messbar

Tabelle 6: E-Moduln und Biegefestigkeiten ausgewählter Biomaterialien

Die mechanischen Eigenschaften der kurzkettigen Urethanmethacrylate sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Bezeichnung	E-Modul [GPa]	Bruchkraft [kN]
CN 46	**0,93**	**9,98**
CN 48	**1,37**	**15,18**
TH 141	**0,98**	**16,37**
TH 143	**2,14**	**35,21**
RK 1150	**1,54**	**10,32**
RK 1151	**2,46**	**27,99**
RK 1152	**2,27**	**28,53**
RK 1154	**1,94**	**21,43**

Tabelle 7: E-Modul und Bruchkraft kurzkettiger Urethanmethacrylate

Der Vergleich der E-Module zwischen den lang- und kurzkettigen Urethanmethacrylaten zeigt, dass die kurzkettigen Monomere in der Regel einen höheren E-Modul aufweisen und

somit kompakter sind. Diese Substanzen wären für eine Anwendung für die Knochenphase sehr gut geeignet.

Die synthetisierten laser- und photovernetzbaren Substanzen stellen hinsichtlich ihrer Eigenschaften eine breite Palette in-situ-aushärtbarer Hart- und Knorpelgewebematerialien dar.
Für die Chondrophase sind bekanntermaßen Substanzen mit niedrigerem E-Modul vorteilhaft, wodurch sich insbesondere die Substanzen RK 1005 und AB 008 eignen. Die Substanz AB 008 ist ein Urethanmethacrylat mit Polyethylenglykol 400 als Starter und zeigt folgende Eigenschaften: E-Modul = 0,22 GPa, Bruchkraft = 10,1 kN, T_g = 32,4 °C.
Die Strukturformel ist in Abbildung 4 dargestellt.

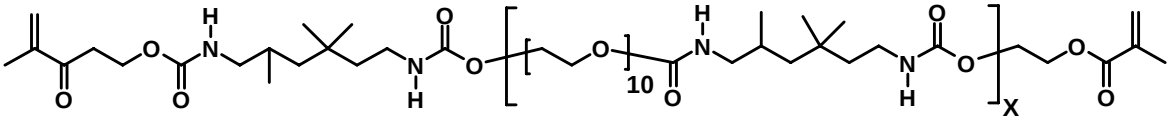


Abbildung 4: Strukturformel von AB 008

Aufgrund der besseren Prozessierbarkeit während der 2-Photonen-Polymerisation wurde AB 008 für die In-vivo-Testung ausgewählt und entsprechende 2-PP-Scaffolds im Tierversuch für den „Proof of Concept“ verwendet, obwohl die Abbaubarkeit von AB 008 gegenüber RK 1005 geringer ist.

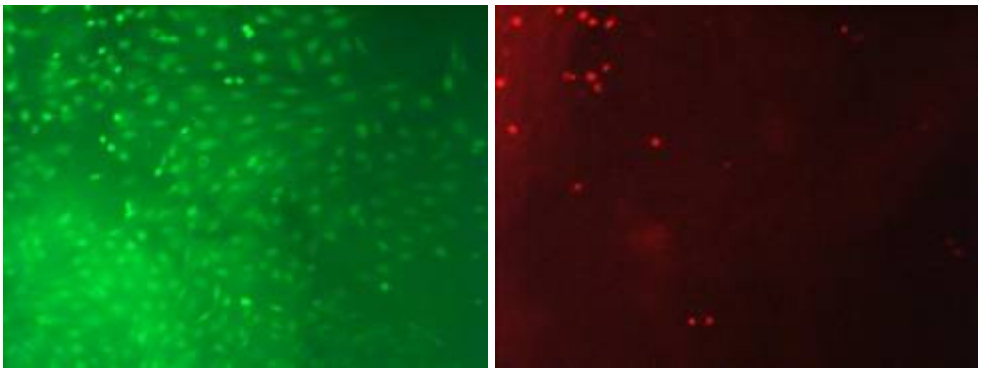
1.5 Untersuchungen zur *In-vitro*-Zytotoxizität der synthetisierten Systeme

Zur Untersuchung zytotoxischer Effekte wurden ein Live/Dead-Test und ein WST-1-Test für ausgewählte Proben durchgeführt. Der Live/Dead-Test spiegelt die Zytotoxizität durch direkten Kontakt von Zellen mit den Probekörpern wieder und im WST-1-Test werden eluierbare toxische Substanzen detektiert.

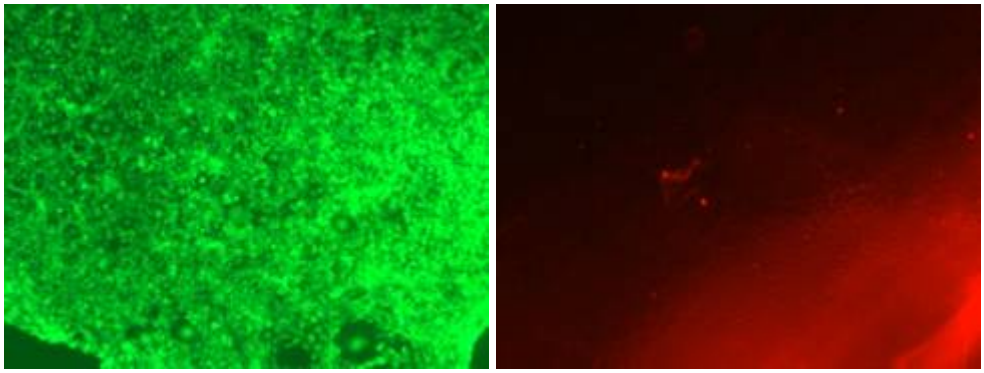
Live/Dead-Test: Zur Durchführung der Tests wurden die Probekörper (7 x 5 mm, H x B) mit UV-Licht (2 h) sterilisiert und in die Kavitäten einer 6-Well-Zellkulturplatte gelegt. Anschließend werden die Probekörper zweimal für jeweils 30 min mit PBS und einmal mit DMEM + 10% FBS + 25 mg/ml Gentamicinsulfat gespült. Die Proben werden mit 3T3-Zellen einer Dichte von 25.000 Zellen/cm^2 besiedelt und unter täglichem Mediumwechsel kultiviert.

Nach 1 bzw. 4 Tagen wurden die Probekörper entnommen und in einem Live/Dead-Assay basierend auf der kombinierten Fluoreszenzfärbung mit Fluoreszeindiacetat (FDA) und GelRed® angefärbt, wobei lebende Zellen eine grüne und Kerne toter Zellen eine rote Fluoreszenz zeigen. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiotech, Zeiss). Der Anteil toter Zellen kann im Rotfilter gesondert erfasst werden. Er dient als Maß für die Zytotoxizität, wobei bereits Normalkulturen einen Anteil bis zu 5% toter Zellen enthalten können.

Abbildung 5 enthält exemplarisch Live/Dead-Bilder der Zytotoxizitätsuntersuchung mittels FDA/GelRed®-Färbung an photovernetzten Probekörpern ausgewählter Materialvarianten.



RK 1003



RK 1002

Abbildung 5: FDA/GelRed®-Färbung auf 2 unterschiedlichen Probekörpern, lebende Zellen (grün) und Kerne toter Zellen (rot)

Diese orientierenden Zytotoxizitätstests zeigten bei den meisten Materialien eine gute Zytokompatibilität. Für Probekörper, die eine mäßige Zytotoxizität aufwiesen, konnte durch

Nachbehandlung mit 70%igem Ethanol und anschließende Spülung mit Wasser/PBS-Medium die Zytokompatibilität verbessert werden.

In Abbildung 6 ist die Verbesserung der Zytokompatibilität der mäßig zytotoxischen Substanz RK 1004 vor und nach der Behandlung mit 70%igem wässrigem Ethanol und 3maliger Spülung mit PBS-Medium dargestellt. Trotz Eigenfluoreszenz der Probekörper sind die Unterschiede nach dem Reinigungsprozess deutlich zu erkennen.

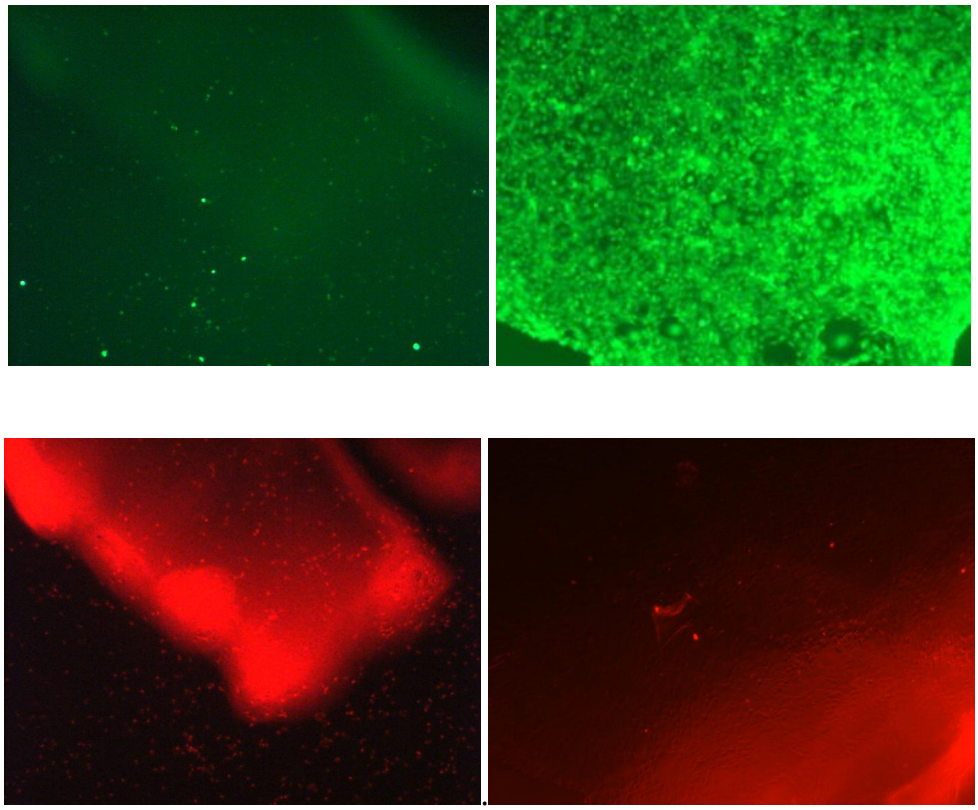


Abbildung 6: Ergebnisse der Live/Dead-Untersuchung an Probekörpern der Substanz RK 1004 links vor und rechts nach dem Reinigungsprozess

WST 1-Test: Für die Untersuchung eluierbarer toxischer Substanzen wurden jeweils ca. 200 mg des entsprechenden Materials (Probekörper) in einem 1 ml Zellkulturmedium (DMEM + 10% FBS + 25 µg/ml Gentamicinsulfat) inkubiert, welches anschließend als Nährmedium auf die Zellen gegeben wird. Die hierfür verwendeten MC3T3-E1-Preosteoblasten-Zellen wurden bereits einen Tag vor Zugabe des gewonnenen Eluats in einer 96-Well-Platte (Zelldichte: 8.000 Zellen pro Kavität) angesiedelt. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit dem

Probeneluat, wird dieses gegen Phenolrot-freies DMEM ausgetauscht und das WST-1-Substrat zugesetzt. Lebende Zellen setzen das Substrat enzymatisch zu einem Formazan um, welches nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C durch eine Absorptionsmessung bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 595 nm) quantifiziert wird. Abbildung 7 zeigt die WST-1-Untersuchungen an ausgewählten Materialproben.

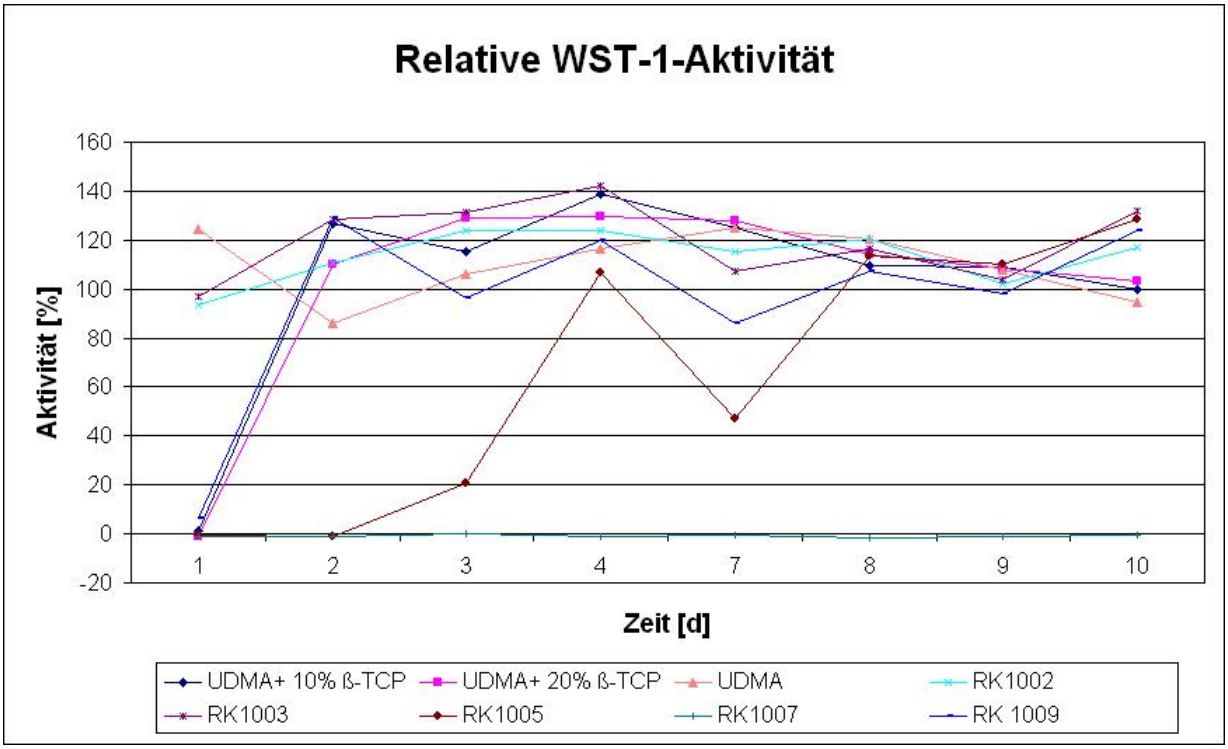


Abbildung 7: WST-1-Aktivität von MC3T3 Zellen mit Eluaten ausgewählter Materialproben

Die Substanzen RK 1005 und RK 1007 zeigten im WST-1-Test zytotoxische Effekte. Mögliche Ursache ist eine unvollständige Aushärtung, wodurch toxische Methacrylate eluiert werden konnten. Dagegen zeigten alle anderen getesteten Biomaterialien eine gute bis sehr gute Verträglichkeit.

1.6 Hydrolytische Abbauversuche in SBF-Medium und Sörensen-Puffer bei 37°C

Ein essentieller Parameter zur Beurteilung von Biomaterialien zur Applikation im humanen Bereich ist deren Abbaubarkeit in einem vertretbaren Zeitraum. Dazu wurden in einer Silikonform (5 x 7 mm, H x B) zylinderförmige Probekörper (n = 3) photochemisch in Gegenwart des Photoinitiatorsystems Campherchinon/Diethylaminobenzoesäureethylester bei

einer Wellenlänge von 440 - 490 nm ausgehärtet. Der Abbau der ausgehärteten Probekörper erfolgte in SBF-Medium (simulated body fluid) bei 37 °C. Der Masseverlust wurde gravimetrisch bestimmt.

Auffällig ist der schnelle Abbau von RK 1008 und RK 1009, welche p-Dioxanon als eine Komponente enthalten. Urethanmethacrylate ohne p-Dioxanon im Molekül zeigten einen deutlich langsameren Abbau von 5 - 48 % über einen Zeitraum von 182 Tagen. Eine Ausnahme bildet hierbei RK 1002, welches nur D,L-Lactid enthält. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.

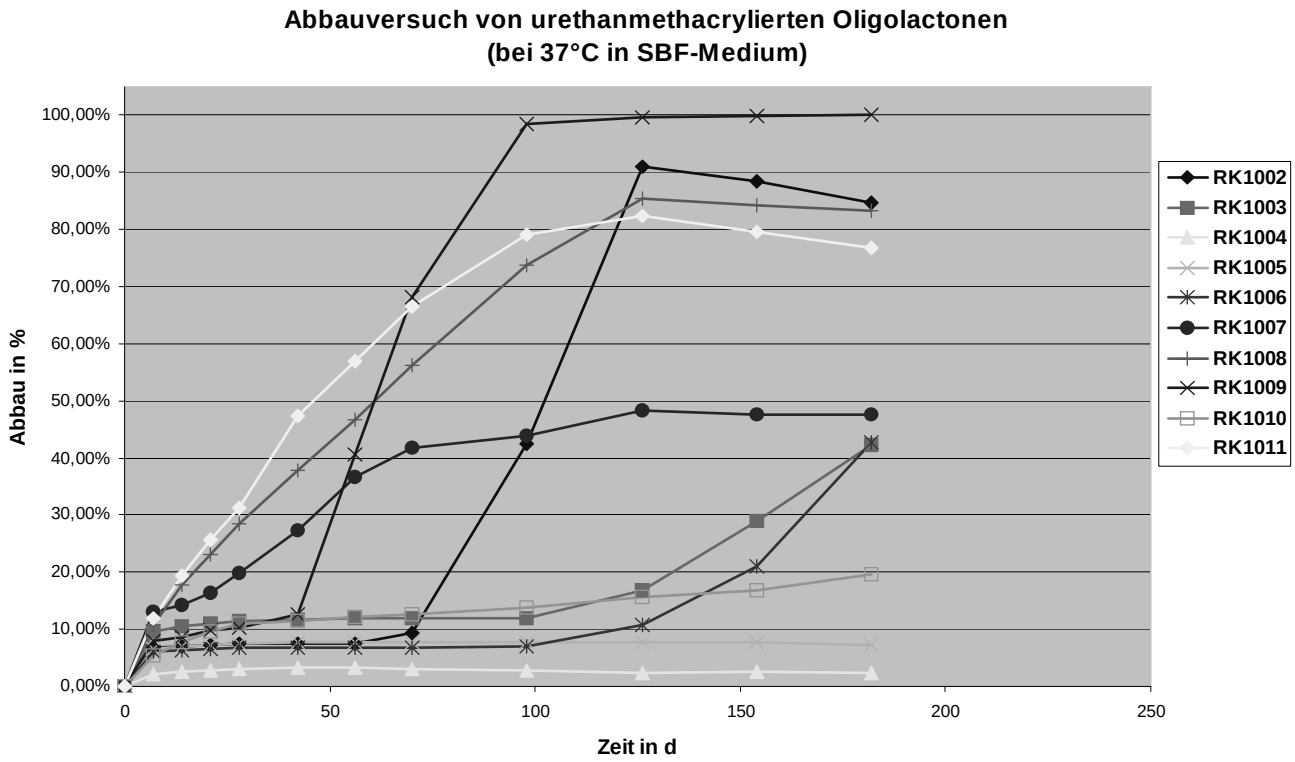


Abbildung 8 Abbau urethanmethacrylierter Biomaterialien in SBF-Medium bei 37 °C

Eine Ausnahme bildet die Substanz AB 008, welche innerhalb des Untersuchungszeitraumes einen Gewichtsverlust um 1 % aufweist und somit als schwer abbaubar eingestuft werden kann.

Der Abbau der methacrylierten Oligoester AB 001-AB 004 verlief ebenfalls nur sehr langsam, sowohl im SBF-Medium als auch in Sörensen-Puffer. Nach 28 Wochen konnten Abbauraten von 1,2-1,4 % nachgewiesen werden.

1.7 Einbau von CaP-Nanopartikel bzw. Hydroxylapatit zur Verbesserung der Oberflächenrauheit

Mit dem Ziel einer besseren Zelladhärenz auf den relativ glatten Probekörpern der abbaubaren Urethanmethacrylate sollte die Oberflächenrauheit erhöht werden. Dazu wurden Calciumphosphat-Nanopartikel (CaP-Nanopartikel) bei der Herstellung der Probekörper einpolymerisiert. Der Einbau von Calciumphosphat (CaP)-Nanopartikeln zur Erhöhung der Oberflächenrauheit in dünnen Polymerschichten konnte nach anfänglichen Schwierigkeiten (Konglomerat-Bildung der Nanopartikel, inhomogene Durchmischung) durch den Einbau von bis zu 60 Ma% CaP-Nanopartikel bezüglich einer homogenen Verteilung wesentlich verbessert werden.

Die Konglomeratbildungen lassen sich durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM) nachweisen wie in Abbildung 9 ersichtlich ist.

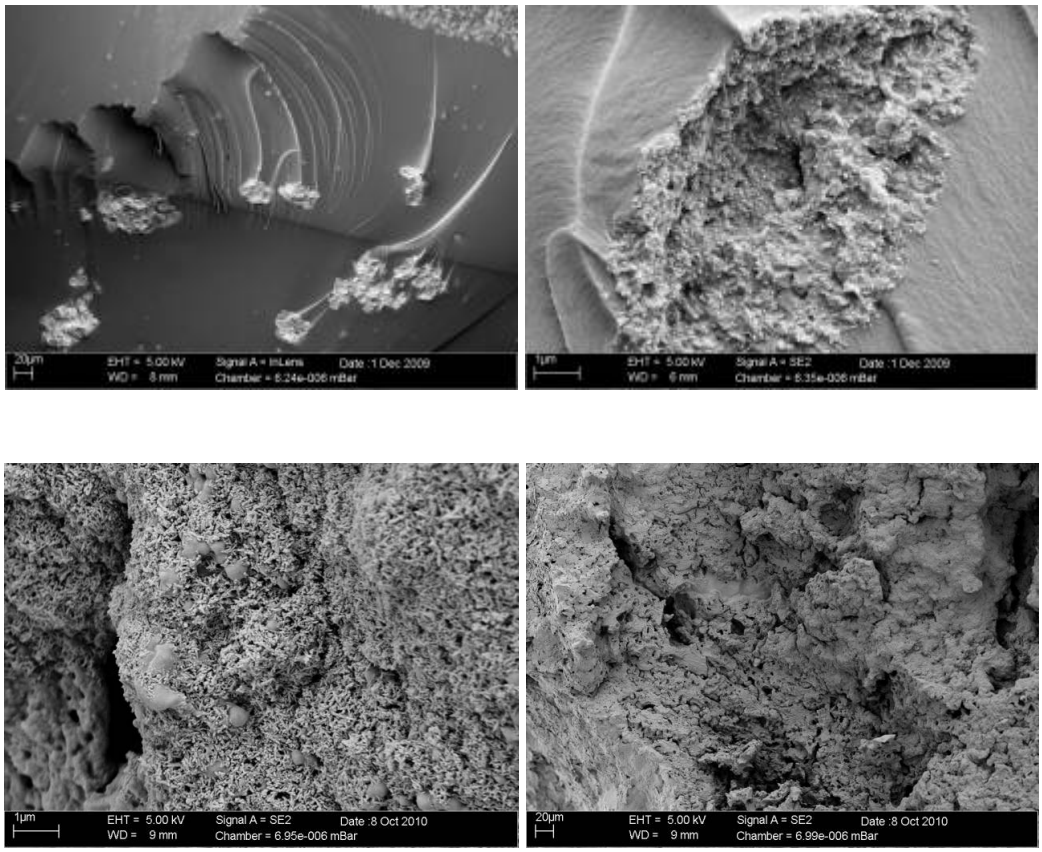


Abbildung 9: Nachweis der Konglomeratbildung der CaP-Nanopartikel im Probekörper (oben) und homogene Verteilung der Nanopartikel im Probekörper (unten) bei 60 Ma% Füllstoff

Des Weiteren wurde eine Fragestellung vom Projektpartner aap bearbeitet, die klären sollte wieviel Hydroxylapatit (HA) einem photovernetzbaren Monomer zugemischt werden kann, so dass das Monomer noch aushärtet bzw. eine poröse Oberfläche entsteht. Für diese Untersuchungen wurden von aap HA-Granulate mit unterschiedlicher Körnung (0,5 - 1 mm und 1 - 2 mm) zur Verfügung gestellt. Es konnte gezeigt werden, dass in beiden Fällen bis 50 Ma% in das Monomer zumischbar sind. Die Ergebnisse der Bruchkraftexperimente zeigten in Abbildung 10 allerdings, dass mit steigendem HA-Anteil die Bruchkraft der Probekörper sinkt. Für die Zerstörung der zylindrischen Probekörper ohne Zusatz von HA musste eine Kraft von 9 kN aufgewendet werden. Im Gegensatz zu den Probekörpern mit 50 Ma% HA-Anteil sind nur noch Kräfte zwischen 1,6 und 2,4 kN notwendig.

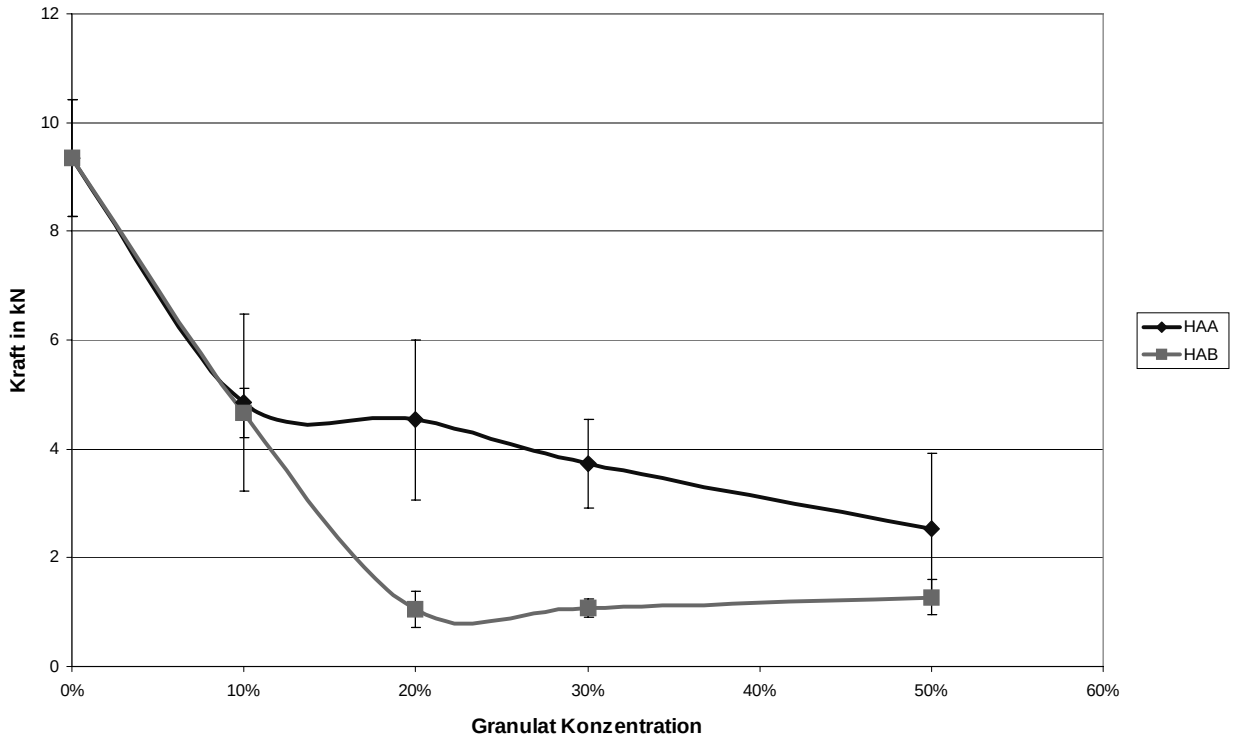


Abbildung 10: Bruchkraftexperimente bei unterschiedlicher Granulatkonzentration

Abbildung 11 zeigt die Probekörper mit unterschiedlichen HA-Konzentrationen als Füllmaterial zur möglichen Verbesserung der Adhärenz von Zellen auf der Materialoberfläche.

Abbildung 11 Probekörper mit unterschiedlichen HA-Konzentrationen als Füllmaterial, Obere Reihe: Körnung 0,5 - 1 mm, untere Reihe: Körnung 1-2 mm, HA-Konzentration von links nach rechts steigend (10 % bis 50 %)

Die Abbildung 12 zeigt ein REM Mapping der enthaltenen Elemente eines Urethandimethacrylat (UDMA)-Probekörpers mit einem β-TCP-Anteil von 30 Ma%. Die grün-gelbe Färbung entspricht den β-TCP-Partikeln mit einer Größe < 50 µm.

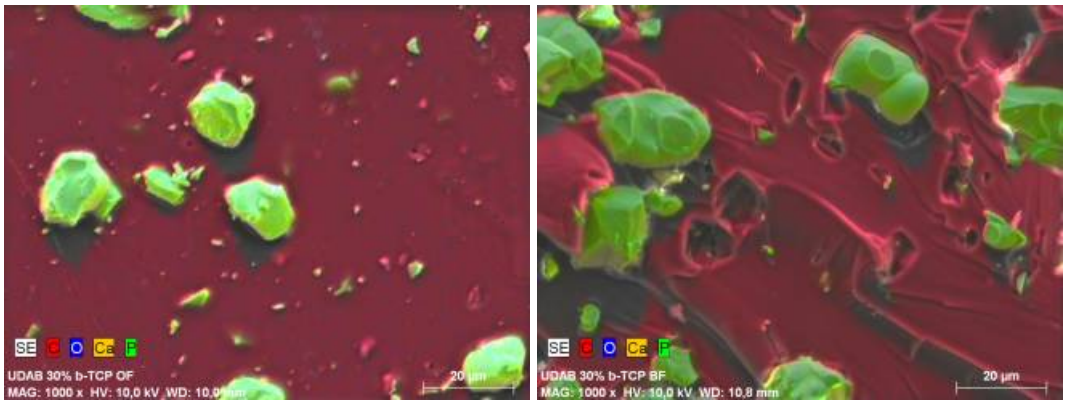


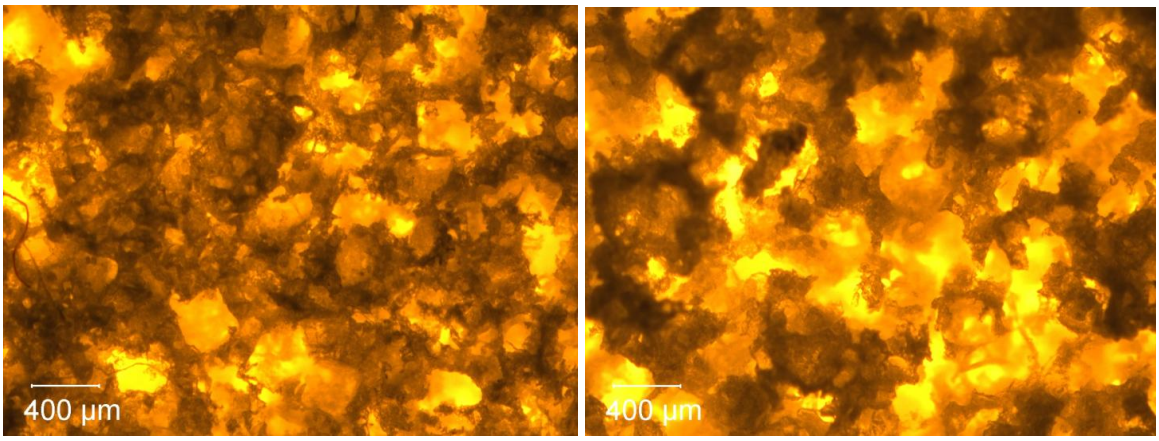
Abbildung 12: Elementverteilung auf der Oberfläche (links) und an einer Bruchkante eines UDMA-Probekörpers mit einem β-TCP-Anteil von 30 Ma%

Diese erhöhte Oberflächenrauheit kann den Knochenzellen zusätzliche Haftstellen für ein verbessertes Anwachsen auf dem Biomaterial bieten.

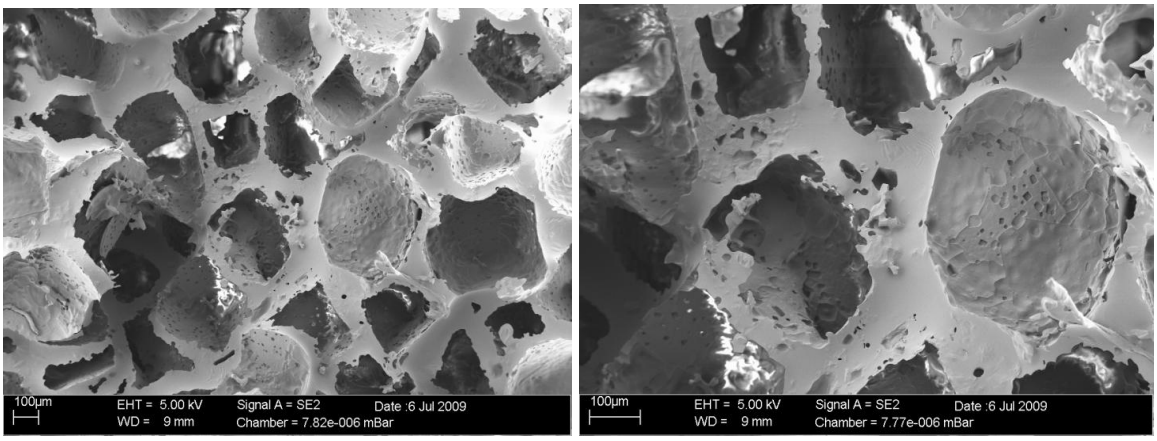
Für den Einsatz als Implantatmaterial sind poröse Strukturen mit interkonnektierenden Poren von Vorteil. Für die Herstellung derartiger poröser Strukturen zur Zellzüchtung für die Co.don AG wurden in den Versuchen Porogene eingesetzt. Dabei konnten poröse Probekörper mit „durchgehenden Kanälen“ durch Einpolymerisation von Natriumchlorid (bis 90 Ma%) in das Polymer mit anschließender Auslaugung mittels Wasser über einen Zeitraum

von 5 Tagen hergestellt werden. Eine Zelladhärenz konnte nicht nur auf der Oberfläche sondern auch in den Poren der Probekörper durch Anfärbung der Zellen mit Alexa488 nachgewiesen werden. Als Monomere wurden bevorzugt die Urethanmethacrylate AB 008 und RK 1005 verwendet.

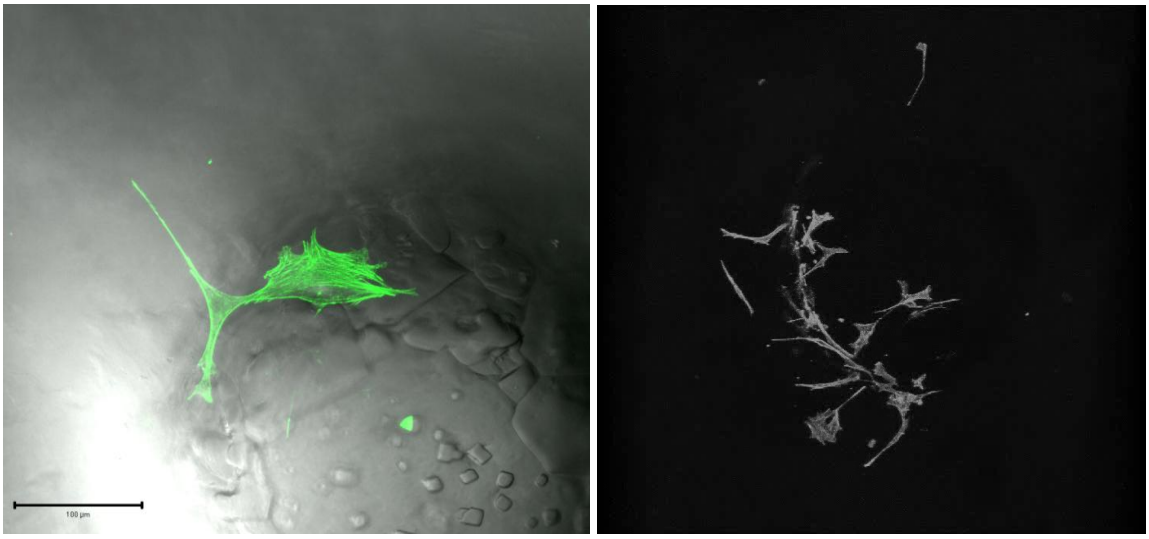
Abbildung 13 zeigt die Mikroskop- und REM-Aufnahmen sowie Ergebnisse der Zellbesiedelung der mittels Porogenen erzeugten porösen Scaffolds.



Unter- und Oberseite der porösen Scaffolds im Mikroskop



REM-Aufnahmen der interkonnektierenden Poren (Porendurchmesser 100 - 600 µm)



Zellbesiedelung am Rand einer Pore (links) und auf dem Probekörper (rechts)

Abbildung 13: Mikroskopaufnahmen, REM-Aufnahmen und Zellbesiedelung der porösen Scaffolds

1.8 Synthese und Charakterisierung von modifizierten Biopolymeren für die Chondrophase

Bei der Scaffoldentwicklung für die Chondrophase dienten als Ausgangsmaterialien Biopolymere auf Basis von Polysacchariden (Dextran), Glycosaminoglycanen (Hyaluronsäure) und Gelatine, die nach Einführung von Methacrylatgruppen zu Hydrogelen photovernetzt werden können und damit die extrazelluläre Matrix des Knorpels in geeigneter Weise nachbilden.

Die Methacrylat-funktionalisierten Biopolymere wurden mittels analytischer Methoden wie FT-IR, NMR-Spektroskopie sowie Titration der Carboxylgruppen umfassend charakterisiert. Der Aminogruppengehalt in den synthetisierten Aminodextranen wurde mittels Ninhydrintest nach Kaiser photometrisch bestimmt.

Die Modifizierung und Charakterisierung des weniger komplex aufgebauten Homopolysaccharids Dextran diente der Erarbeitung geeigneter Synthesemethoden zur Einführung vernetzungsfähiger Gruppen in Polysaccharide. Aufbauend auf diesen Modellreaktionen wurde eine Funktionalisierung von Hyaluronsäure, Alginat, Chitosan und Chondroitinsulfat durchgeführt. Unter Verwendung der in größeren Mengen herstellbaren,

methacrylierten Dextranderivate wurde ebenfalls die Evaluierung geeigneter Photoinitiatorsysteme überprüft (Arbeitspaket 4).

Die Synthese photochemisch vernetzbarer Hyaluronsäurederivate, die zu strukturierbaren Hydrogelen verarbeitet werden können, erfolgte unter optimierten Bedingungen in Analogie zu den ausgearbeiteten Dextran-Synthesen durch Umsetzung mit methacrylathaltigen Reagenzien.

Zur Verfügung stand zunächst das kommerziell erhältliche Natriumsalz der Hyaluronsäure mit einer durchschnittlichen Molmasse von 1.000.000 g/mol. Nachteilige Eigenschaften dieser Hyaluronsäure sind deren geringe Wasserlöslichkeit und die Instabilität daraus hergestellter Gele. Eine Möglichkeit der Stabilisierung besteht in der Vernetzung über Methacrylatgruppen. Zur Herstellung vernetzbarer Derivate wird Hyaluronsäure in Wasser gelöst und mit Glycidylmethacrylat bei 50°C umgesetzt. Während der Reaktion erfolgt die Addition der Methacrylatfunktion an die OH-Gruppen der Hyaluronsäure. Aufgrund unzureichender mechanischer Eigenschaften bzw. der übermäßigen Quellung der vernetzten Hydrogele aus hochmolekularer Hyaluronsäure sollten weitere Derivate mit niedermolekularer Hyaluronsäure synthetisiert werden (Arbeitspaket 3). Zur Herstellung geeigneter Ausgangsmaterialien wurde eine Methode gewählt, bei der Hyaluronsäure 90 min bei 130°C in Wasser gespalten wird. Dabei wurde eine abgebaute Hyaluronsäure mit einer durchschnittlichen Molmasse von 65.000 bzw. 90.000 g/mol erhalten und für weitere Synthesen verwendet. Für die Methacrylierung wurde diese Hyaluronsäure in einem Boratpuffer (pH = 8,5) gelöst und mit Methacrylsäureanhydrid umgesetzt (Abbildung 14).

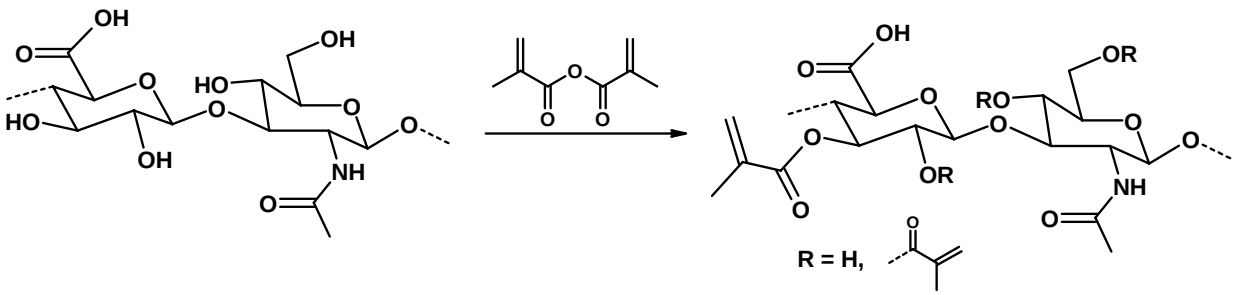


Abbildung 14: Derivatisierung von Hyaluronsäure mit Methacrylsäureanhydrid

Chondroitinsulfat ist ein sulfatiertes Glycosaminoglycan, welches aus einer Kette sich abwechselnder Zucker-Bausteine (N-Acetyl-Galactosamin und Glucuronsäure) besteht. Chondroitinsulfat ist ein wichtiger Bestandteil des Knorpelgewebes (Chondrophase) und trägt zu dessen Widerstand gegen Kompression bei. Daher stellt die Synthese funktionalisierter

Chondroitinsulfat-Derivate ebenfalls einen Forschungsschwerpunkt bei der Generierung vernetzter Hydrogelstrukturen dar. Die Synthesen zur Herstellung Methacrylat-substituierter Glycosaminoglycane konnten mit den oben aufgeführten Reagenzien (Methacrylsäureanhydrid bzw. Glycidylmethacrylat) auf Chondroitinsulfat übertragen werden. Für die Vernetzung zu stabilen Hydrogelen ist der Substitutionsgrad hinsichtlich der eingeführten Methacrylatgruppen ein wesentlicher Parameter. Die Bestimmung des DS erfolgt durch Auswertung der ^{1}H-NMR-Spektren. Im Falle des Chondroitinsulfates wurden DS-Werte zwischen 0,13-0,24 erreicht.

Gelatine ist ein Polypeptid und wird aus Kollagen gewonnen. Da die Peptideketten auch Lysin, eine natürliche Aminosäure mit zusätzlicher Aminofunktion, enthalten, sind auch primäre Aminogruppen im Polypeptid vorhanden. Diese Aminogruppen lassen sich durch Umsetzung mit 2-Isocyanatoethylmethacrylat über Harnstoffbindungen in polymerisationsfähige Substanzen überführen. Eine weitere Möglichkeit zur Einführung von Methacrylatgruppen besteht in der Reaktion mit Methacrylsäureanhydrid in Boratpuffer.

Zusätzlich wurden die vernetzungsfähigen Biopolymere, vor allem die Dextranderivate, teilweise mit Natriumperiodat oxidiert. Dabei entstehen Aldehydgruppen, welche als Ankergruppen für die Herstellung biphasischer Systeme dienen können. Hierbei soll das Prinzip der Azomethinbildung zwischen Aldehyd- und Aminogruppen genutzt werden.

In Abhängigkeit vom erreichten Substitutionsgrad wurden die Quellung, Stabilität und die Zytokompatibilität der Gele untersucht. Für orientierende Untersuchungen wurden die Derivate mit Redoxinitiatoren (Kaliumperoxydisulfat/Triethanolamin) oder photochemisch mit dem System EosinY/Triethanolamin (16W Neonleuchte) bzw. Irgacure® 369 oder 2959 (UV, 440 - 480 nm) ausgehärtet, um eine Eigenschaftsabschätzung durchzuführen.

Die Formstabilität dieser Hydrogele ist ein wichtiger Aspekt für die Strukturierbarkeit mittels Femtosekundenlaser bei der 2-Photon-Polymerisation. Beispielweise bildet modifizierte Hyaluronsäure nur wenig formstabile Gele und man muss zur Erhöhung der Gelstabilität z. B. Polyethylenglykoldiacrylat bzw. -methacrylat in bestimmten Mischungsverhältnissen zusetzen.

Auf der Suche nach weiteren neuen Substanzen für die Generierung nanostrukturierter Implantate zur Stimulation der Osteo- und Chondrogenese wurde gefunden, dass die Modifizierung von Polyglycerin mit Glycidylmethacrylat zu einem weiteren interessanten Ausgangsmaterial für die Laservernetzung führt. Hierbei wurden durchschnittliche Substitutionsgrade (DS) zwischen 0,2 und 0,8 erreicht. Dies bedeutet, dass 20 - 80% der Hydroxylgruppen des Polyglycerins (16 bzw. 32-OH-Gruppen im Molekül) derivatisiert

worden sind. Der Substitutionsgrad lässt sich durch Variation der Molverhältnisse zwischen Methacrylierungsreagenz und Polyglycerin einstellen. Höhere DS-Werte führen zu einer Selbstvernetzung und sind deswegen ungeeignet.

Es wurden zahlreiche anspruchsvolle Synthesen zur Generierung von Biopolymer-Hydrogelen durchgeführt.

Die Abkürzungen in den folgenden Tabellen bedeuten:

M-HYA	Methacrylierte Hyaluronsäure
M-PG	Methacryliertes Polyglycerin
M-DEX	Methacryliertes Dextran
M-AMD	Methacryliertes Aminodextran
M-ALG	Methacryliertes Alginat
M-CH	Methacryliertes Chitosan
M-GE	Methacrylierte Gelatine

Zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften wurden zylinderförmige Probekörper (5 x 7 mm, H x B) hergestellt. Dazu wurden die Substanzen mit dem entsprechenden Photoinitiatorsystem vermischt und in einer Silikonform durch Lichtbestrahlung bei unterschiedlichen Wellenlängen ausgehärtet. Abbildung 15 zeigt eine Silikonform und die daraus hergestellten Probekörper.

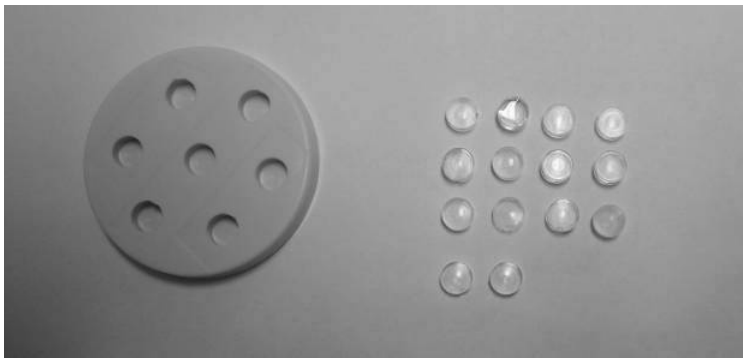


Abbildung 15: Zylinderförmige Probekörper zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften

Tabelle 8 zeigt die mechanischen Eigenschaften der hergestellten Scaffolds ausgewählter Substanzen basierend auf Methacrylaten bezüglich Photoinitiatorsystem, Topfzeit, Bruchkraft und E-Modul.

Substanzklasse	Photoinitiator	Topfzeit [s]	Bruchkraft [MPa]	E-Modul [MPa]
M- HYA	EY / TEA	60	0,023 ± 0,007	0,014 ± 0,006
M- PG	Irgacure® 369	40	1,97 ± 0,79	5,43 ± 1,38
M- DEX	EY / TEA	600	0,006 ± 0,002	0,057 ± 0,020
M- AMD	EY / TEA	700	0,005 ± 0,002	0,049 ± 0,22
M- ALG	EY / TEA	180	1,20 ± 0,47	3,52 ± 1,12
M- CH	EY / TEA	200	1,33 ± 0,30	4,45 ±1,25
M- GE	EY / TEA	240	1,34 ± 0,65	4,34 ± 1,76

Tabelle 8: Mechanische Eigenschaften der unstrukturierten Scaffolds ausgewählter Substanzgruppen

Die E-Moduln wurden, wie bereits auf Seite 12 für vernetzte Polylactonmethacrylate beschrieben, mittels Zug-Dehnungs-Messungen bestimmt.

Es wurde gefunden, dass Unterschiede in den mechanischen Eigenschaften nicht nur zwischen den einzelnen Substanzklassen sondern auch innerhalb einer Substanzklasse gefunden werden. Dieses Ergebnis wird in Tabelle 9 am Beispiel der methacrylierten Biopolymere Hyaluronsäure und Dextran verdeutlicht. In Abhängigkeit vom Substitutionsgrad erhöhen sich die Maximalkraft zur Zerstörung des Probekörpers sowie die Bruchfestigkeit mit steigendem Methacrylierungsgrad (DS_{MA}). Gründe dafür sind, dass mit der Erhöhung des DS_{MA} mehr vernetzungsfähige Gruppen zur Verfügung stehen und somit ein dichteres Netzwerk bei der Lichtaushärtung entstehen kann bzw. der Verschlaufungsgrad erhöht wird, was die Kompaktheit der Probekörper steigert.

Probe	Vernetzung	Maximalkraft [N]	Bruchfestigkeit [N/mm^2]
M- HYA DS = 0,16	formstabil, weich	0,105	6,3 x 10^{-3}
M- HYA DS = 0,19	formstabil	0,403	0,024
M- HYA	formstabil, fest	0,752	0,045

DS = 0,24			
M- DEX DS = 0,47	formstabil	1,48	0,169
M- DEX DS = 0,62	formstabil, fest	1,81	0,186
M- DEX DS = 1	formstabil, fest	2,10	0,270

Tabelle 9: Abhängigkeit der Maximalkraft und Bruchfestigkeit vom Substitutionsgrad

Bevorzugte Photoinitiatorsysteme zur Aushärtung der synthetisierten vernetzungsfähigen Materialien sind:

Eosin Y / Triethanolamin (TEA), Irgacure® 369 und Irgacure® 2959

Zusammenfassend lässt sich aus den mechanischen Untersuchungen ableiten, dass die Biopolymer-Hydrogele für eine Zellbesiedlung geeignet sind, sich aber nur bedingt für Applikationen mit hoher Belastung z. B. als Knochen-Knorpelimplantate eignen.

1.9 Synthese von multifunktionellen Biopolymeren und Kupplung mit zelladhäsionsfördernden Peptiden

Entsprechend Arbeitspaket 7 wurden ausgewählte Biopolymere mit multifunktionalen Gruppierungen zur Herstellung biphasiger Scaffolds und deren Kupplung mit zelladhäsionsfördernden Peptiden synthetisiert.

Hierzu wurde zunächst Dextran mittels Periodatoxidation zu einem aldehydgruppenhaltigen Derivat umgesetzt. In einer zweiten Stufe erfolgt die Methacrylierung des Dextranderivates um zusätzlich photochemisch vernetzbare Gruppen einzuführen. In Abbildung 16 ist der Syntheseweg dargestellt. Mit dem hergestellten Dextranderivat können zwei Vernetzungsvarianten kombiniert werden. Die enthaltenen Aldehydgruppen werden bevorzugt mit aminogruppenhaltigen Substanzen unter Bildung von Azomethinen vernetzt. Photochemisch oder radikalisch kann zusätzlich die Vernetzung der Methacrylatgruppen erfolgen.

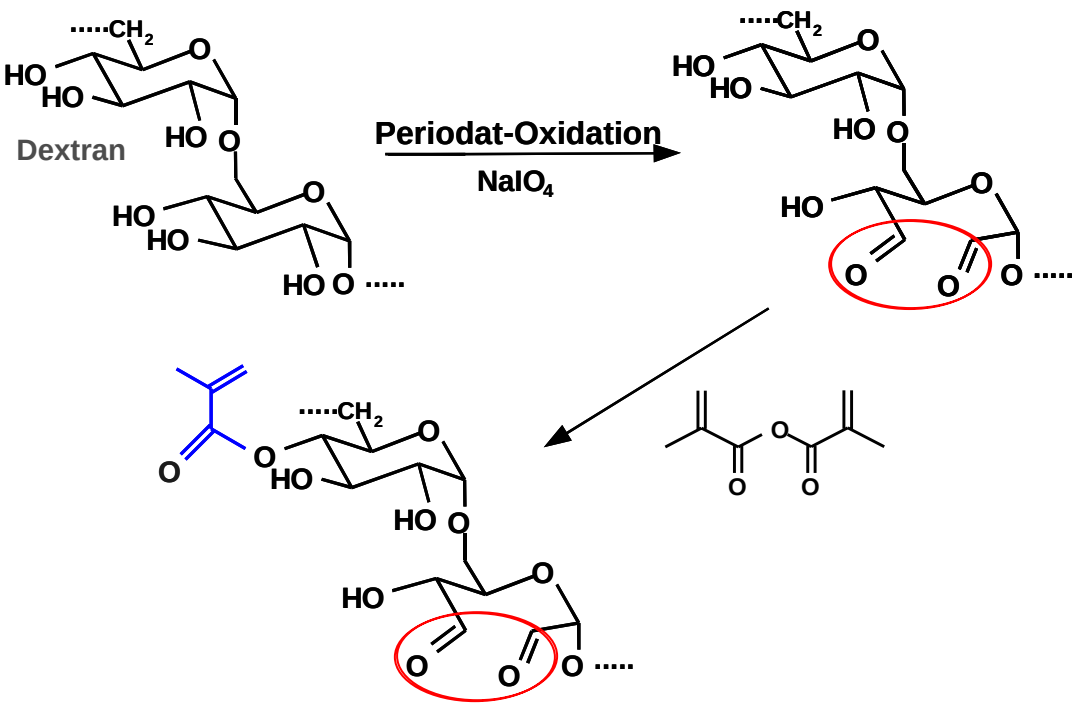


Abbildung 16: Multifunktionales Dextranderivat zur Herstellung biphasiger Scaffolds

Das aldehydgruppenhaltige Dextranderivat ist ebenfalls zur Kupplung mit zelladhäsionsfördernden Peptiden wie z. B. RGD-Peptiden (Sequenz: Arg-Gly-Asp) über Azomethinbindungen geeignet. Hintergrund der Biofunktionalisierung der Hydrogele mit derartigen Peptidsequenzen ist die Verbesserung einer Integrin-vermittelten Adhärenz von Zellen wie Chondrozyten auf der Oberfläche der Hydrogele. In den Untersuchungen wurde für die Hydrogel-Modifizierung die ebenfalls zelladhäsionsfördernde Peptidsequenz Isoleucin-Lysin-Valin-Alanin-Valin (Ile-Lys-Val-Ala-Val: IKVAV) verwendet.

Zunächst wurden die synthetisierten Peptidsequenzen durch HPLC- und MALDI-TOF – Untersuchungen auf ihre Reinheit untersucht. Abbildung 17 zeigt das MALDI-TOF-Spektrum und das HPLC-Chromatogramm der Peptidsequenz Ile-Lys-Val-Ala-Val.

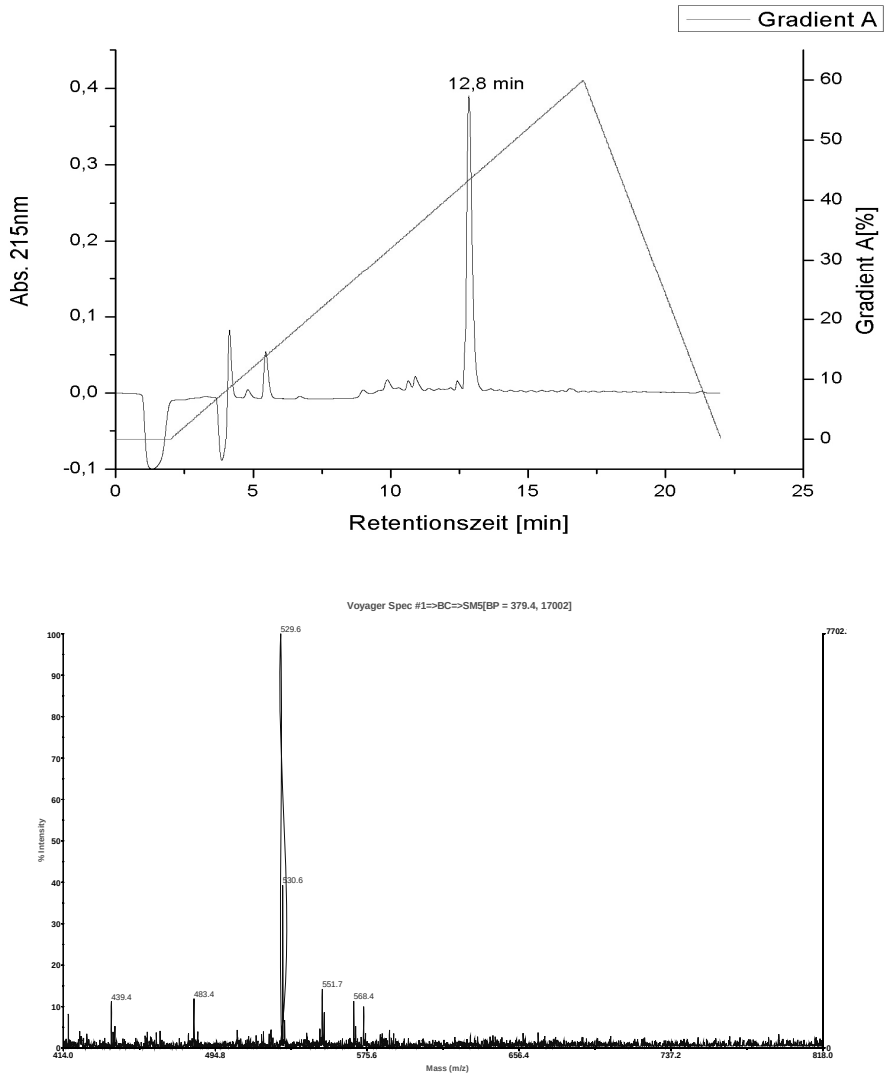


Abbildung 17: HPLC-Chromatogramm und MALDI-TOF-Spektrum der Peptidsequenz IKVAV

Erfolgreiche Kupplungsreaktionen mit diesem Peptid über eine Azomethinbindung wurden im wässrigen Milieu bei unterschiedlichen pH-Werten im Bereich pH = 4,5 - 7 durchgeführt.

Durch Auswertung des ^{1}H-NMR Spektrums kann der durchschnittliche Substitutionsgrad (DS) des Peptides bezogen auf die Biopolymerwiederholungseinheit bestimmt werden. Im Falle der Azomethinkupplung wurde ein DS_{Peptid} = 0,1 ermittelt.

Die qualitativ verbesserte Zelladhärenz von 3T3-Zellen auf den Hydrogelscaffolds konnte nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen und anschließender Färbung mittel FDA und GelRed® (Live/Dead-Test) gezeigt werden (Abbildung 18). Diese vorläufigen Ergebnisse stellen eine gute Basis für weiterführende In-vitro- und biochemische Untersuchungen dar, die aber nicht Gegenstand dieses Projektes waren.

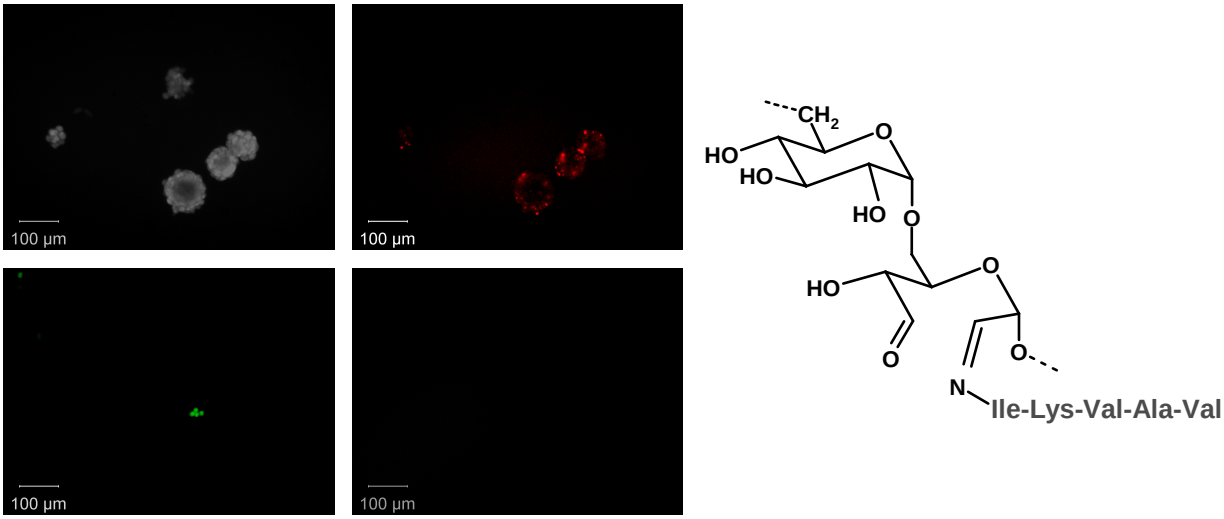


Abbildung 18: 3T3-Zellbesiedelung mit gebundenem Peptid (obere Reihe) und ohne Biofunktionalisierung (untere Reihe)

1.10 Herstellung von Vliesen mittels Electrospinning

Zur Herstellung von Vliesmaterialien mit einem sehr großen Oberflächen/Volumen-Verhältnis hat sich besonders die Methode des Electrospinning etabliert, wobei Fasern mit Durchmessern im Nanometerbereich generierbar sind.

Das Prinzip des Electrospinning beruht darauf, dass ein Tropfen einer Polymerlösung oder -schmelze an einer Düse, die gleichzeitig als Elektrode dient, einem starken elektrischen Feld bei Hochspannungen von 10 - 60 kV ausgesetzt wird. Bei einer definierten Spannung wird die Oberflächenspannung des an der Düse hängenden Polymertropfens überwunden und es tritt ein dünner Flüssigkeitsjet aus, der auf dem Weg zur Gegenelektrode eine Faser bildet, die im Kraftfeld zusätzlich verstreckt wird. Auf der Gegenelektrode werden die Fasern als Vliesmaterial abgeschieden. Trotz des einfachen Apparatedesigns stellt das Electrospinning jedoch einen sehr komplexen Prozess dar. Faserformen und -abmessungen sowie Oberflächenmorphologien der Fasern hängen von diversen Parametern ab. Polymereigenschaften, wie Molmasse, Molmasseverteilung, Glaspunkt, Löslichkeit, Viskosität der Lösungen, Konzentrationen, Oberflächenspannung, elektrische Leitfähigkeit, Dampfdruck des Lösungsmittels und die relative Luftfeuchtigkeit beeinflussen den Prozess und müssen für jedes Polymermaterial neu bestimmt werden. Ebenfalls sind Elektrodengeometrien entscheidende Faktoren, die die Form des resultierenden elektrischen

Feldes und somit den Spinnprozess beeinflussen. Unter definierten Bedingungen stellt das Electrospinning aber einen sehr gut reproduzierbaren Prozess dar.
Die Methode ist für synthetische und natürliche Polymere (Biopolymere) sowie auf Polymerblends anwendbar und es können hinsichtlich der Faserstärken Strukturen generierirt werden, wie sie auch in natürlichen Geweben gefunden werden. In diesem Zusammenhang stellt das Elektrospinnen ein interessantes Verfahren zur Erzeugung nanostrukturierter sowohl flächiger als auch tubulärer Fasernetzwerke dar, die in struktureller Hinsicht die extrazelluläre Matrix (ECM) von Zellen nachbilden können. Daher lag es nahe, mittels Electrospinning aus biodegradierbaren Polymeren nanofasrige Scaffolds für die Chondrophase zu erzeugen. Für die Herstellung geeigneter elektrogesponnener Fasern wurden abbaubare Polymere wie Polylactide untersucht. Es wurden verschiedene Lösungsmittel getestet, die hinsichtlich Viskosität geeignete verspinnbare Lösungen bilden. Für die geplante Anwendung hat sich besonders ein System aus einem Polylactid in einem Gemisch aus Chloroform/MeOH oder reinem Aceton bewährt. Die Hochspannung wurde im Bereich von 18-22 kV geregelt. Die Flussrate betrug 1-1,5 ml/h. Als Kollektor diente eine Glasplatte oder Aluminiumfolie. Die Faserstärken wurden lichtmikroskopisch und mittels Rasterelektronenmikroskopie bestimmt. Unter geeigneten Bedingungen konnten Fasern mit einem mittleren Durchmesser von 800 nm erzeugt werden. Nach Feintuning der Prozessparameter wurden Vliese in der Größe von etwa 80 cm^2 generiert. Die Vliese wurden als Scaffolds für die Kultivierung von Chondrozyten der co.don AG übergeben und zeigten in deren Untersuchungen positive Ergebnisse.
Aufbauend auf den guten In-vitro-Ergebnissen ist eine weitere Forschung auf diesem Gebiet angezeigt. Da Electrospinning aber nicht direkt im Fokus des Projektes lag, konnte der ebenfalls vielversprechende Ansatz nicht weiter verfolgt werden.

1.11 Synthese von wasserlöslichen Photoinitiatoren für die 2-PP

Bei der Scaffoldentwicklung für die Chondrophase dienten als Ausgangsmaterialien Biopolymere auf Basis von Polysacchariden (Dextran), Glycosaminoglycanen (Hyaluronsäure) und Gelatine, die nach Einführung von Methacrylatgruppen zu Hydrogelen photovernetzt werden können und damit die extrazelluläre Matrix des Knorpels in geeigneter Weise nachbilden (Arbeitspaket 2). Für diese wasserlöslichen photovernetzbaren Hydrogele sind für eine ausreichende Vernetzung besonders Photoinitiatoren (PI) erforderlich, die sich in ausreichender Konzentration in Wasser lösen. Mit dem Ziel, eine verbesserte

Wasserlöslichkeit zu erreichen, wurden verschiedene PI auf Polystyryl-Thioxanthon-, Anthrachinon-, Benzophenon- und Stilbenbasis synthetisiert, wobei einige Vertreter, die Methacrylatgruppen enthalten, auch als Comonomer dienen können. Unter UV bzw. Blaulicht-Bedingungen im Bereich 390 – 490 nm konnten damit methacrylierte Biopolymere z. T. in Gegenwart von Polyethylen(dimeth)acrylat vernetzt werden. Es sind für das neue PI-System noch Optimierungen bezüglich PI-Konzentration und Hydrogelkonzentration möglich. In Abbildung 19 sind exemplarisch wasserlösliche Photoinitiatoren mit ihren Absorbtionsmaxima aufgeführt.

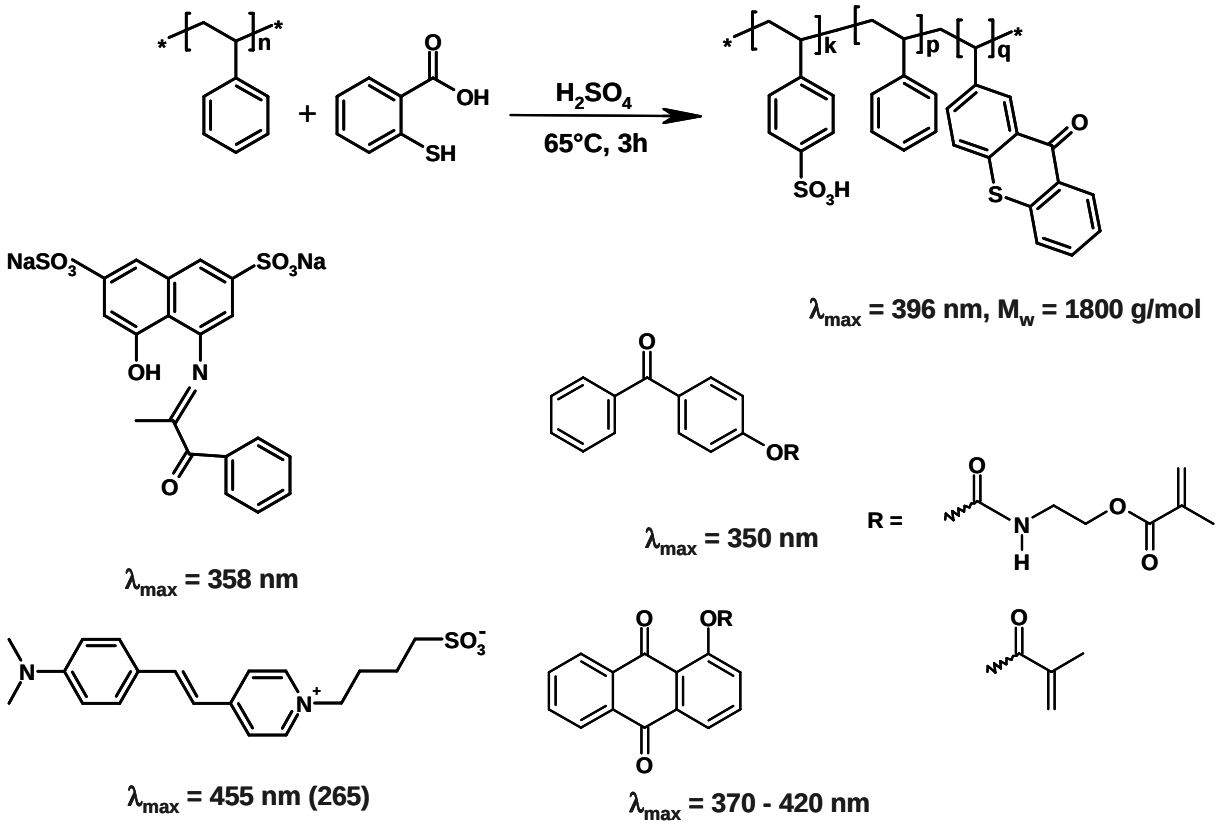


Abbildung 19: Wasserlösliche Photoinitiatoren für die 2-PP

Ein weiterer effektiver Photoinitiator konnte in einer Zweistufenreaktion hergestellt werden. Hierbei handelt es sich um das literaturbekannte Lithiumsalz des Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat (LAP). Der sehr gut wasserlösliche Photoinitiator kann bei einer Wellenlänge von 354 nm eingesetzt werden. Die Strukturformel ist in Abbildung 20 dargestellt.

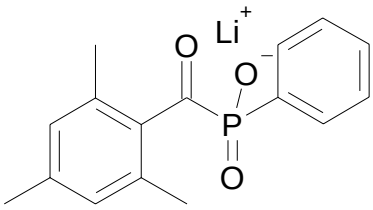


Abbildung 20: Wasserlöslicher Photoinitiator Lithium(phenyl-2,4,6- trimethylbenzoyl-phosphinat) (LAP)

1.12 Herstellung der biphasigen Scaffolds für den In-vivo-Versuch

In Vorversuchen für den bevorstehenden Tierversuch wurden biphasige Scaffolds unter „Klebung“ zusammengefügt. Vom Projektpartner aap wurden hierfür zylinderförmige Scaffolds (8 x 4 mm) aus einem Komposit Kollagen/Hydroxylapatit, für die Osteophase bereitgestellt. Vom Projektpartner iba wurden 2-PP-strukturierte Probekörper (würfelförmig 4 x 4 x 2 mm) für die Chondrophase geliefert (Abbildung 21). Als günstig für die Verbindung der Scaffolds erwies sich in den Untersuchungen eine „3-Punktklebung“ der Chondrophase auf der Osteophase mit dem photovernetzbaren Monomer AB 008, aus dem auch die Chondrophase generiert wurde. Anschließend wurden die Fixierungspunkte mit einer Blaulichtlampe photochemisch ausgehärtet. Die bisherige Lagerung im wässrigen Milieu über 7 Monate zeigt, dass trotz leichter Quellung der Kollagen/Hydroxylapatit-Scaffolds sich die photovernetzte Verbindung zwischen den beiden Scaffolds nicht löst.

Abbildung 21: Runde Kollagen/Hydroxylapatit- und eckige 2-PP-strukturierte Scaffolds

Im Ergebnis der Vorversuche bestand die Anforderung an den Projektpartner iba, runde 2-PP-Scaffolds bereitzustellen, die eine passgenaue Verklebung auf den Kollagen/Hydroxylapatit-Scaffolds ohne Überstände bzw. unbedeckte Stellen ermöglichen. Nach Bereitstellung entsprechender 2-PP-Scaffolds konnten entsprechende zylinderförmige biphasische Implantate mittels „Photoverklebung“ für die In-vivo-Versuche generiert werden.

1.13 Zusammenfassung und Kooperationen

Ergebnisse: Die im Projektzeitraum erzielten Resultate lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Synthese und Charakterisierung von 62 Substanzen für die potentielle Verwendung als Implantatmaterial im Knochen-/Knorpelbereich
2. Charakterisierung der wichtigsten mechanischen Eigenschaften (E-Modul, Biegefestigkeit, Bruchkraft, Topfzeiten) sowie deren Abbauverhalten in SBF-Medium bei 37°C
3. Einbau von bis zu 50 Ma% Hydroxylapatit (HA)-Granulat in verschiedenen Partikelgrößen als Füllstoff in die Polymerscaffolds
4. Realisierung des Einbaus von bis zu 60 Ma% Calciumphosphat-Nanopartikel (Ca-NP) als Füllstoff in die Polymerscaffolds
5. Synthese von multifunktionalen Biopolymeren und deren Kupplung mit zelladhäsionsfördernden Peptiden zur Verbesserung der Zelladhärenz
6. Bestätigung der Zytokompatibilität für die synthetisierten Substanzen anhand von Zytotoxizitäts-Untersuchungen
7. Herstellung biphasiger Scaffolds für den In-vivo-Versuch durch eine photopolymerisierbare Verklebung
8. Synthese und Bereitstellung von 8 wasserlöslichen bzw. als Comonomer nutzbare Photoinitiatoren (UV-Bereich: 200 - 550 nm)
9. Bereitstellung größerer Substanzmengen im Labormaßstab von 3 - 20 g

Die Projektziele wurden entsprechend den Arbeitspaketen im vollen Umfang erfüllt.

Interaktion: Die interdisziplinäre Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern aus unterschiedlichen Bereichen hat sich im Laufe des Projektes sehr gut entwickelt. Im Rahmen der Projektarbeiten ergaben sich vielfältige übergreifende Kooperationen und neue

Lösungsansätze, die zum Erfolg des Projektes geführt haben. Dabei wurde von Seiten INNOVENT insbesondere der Materialbedarf der Partner mit geeigneten applikationsrelevanten Monomeren/Polymeren und neuen Photoinitiatoren abgedeckt. Zusätzlich erfolgten umfassende Testungen von Photoinitiatorsystemen sowie biologische Untersuchungen.

Neben den gemeinsamen Meetings mit allen Projektpartnern wurden bilaterale Treffen durchgeführt, um die bisher erreichten Ergebnisse und das weitere Vorgehen zu diskutieren.

Für die Überführung der entwickelten Techniken oder das Prozessieren neuer Substanzen wurden gegenseitige Arbeitsaufenthalte abgehalten, um dem Partner effektiv das notwendige Know-how für den Fortgang der Arbeiten zu vermitteln.

Aus der erfolgreichen Kooperation zwischen den Projektpartnern iba e.V. Heiligenstadt, co.don AG, aap Biomaterials GmbH und INNOVENT e.V. und den daraus resultierenden gemeinsamen Aktivitäten hinsichtlich der wissenschaftlichen Verwertung entstanden zahlreiche Poster, Vorträge und Publikationen, welche der Öffentlichkeit zugänglich gemacht worden sind.

2. Darstellung des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Es wurde ein biphasiges Knochen-Knorpel-Konstrukt entwickelt, dass geeignet ist, *in vitro* vorkultivierte Chondrozyten in die Knorpelphase des Scaffolds aufzunehmen und das in der porösen Knochenphase durch anwachsende Zellen aus dem umgebenden Gewebe besiedelbar ist. Zusätzlich wird die osteogene Differenzierung von Knochenvorläuferzellen unterstützt. Da dieses Konstrukt γ-sterilisierbar ist und über eine ausreichende zeitliche und mechanische Stabilität verfügt, sind wichtige Voraussetzungen erfüllt, es nach dem ersten positiv abgeschlossenem In-vivo-Versuch umfassend tierexperimentell und klinisch prüfen zu lassen. Durch weiteres Optimieren der Herstellungstechnologie erscheint die Produktion eines innovativen Medizinproduktes gegeben.

Die wirtschaftliche Verwertung der Ergebnisse liegt hauptsächlich im Verantwortungsbereich der am Projekt beteiligten Unternehmen aap Biomaterials GmbH und co.don AG. Beide Firmen besitzen als innovative Unternehmen auf dem Gebiet der Knochenersatz- und Implantatmaterialien sowie der In-vitro-Zellkultivierung die erforderlichen Voraussetzungen für die erfolgreiche Markteinführung von Medizinprodukten. INNOVENT kann zur

Unterstützung der Unternehmen Arbeiten für eine mögliche Markteinführung begleiten, was insbesondere die Synthese bzw. Herstellung von Produktmustern sowie die wissenschaftlichen Beratung betrifft.

Ungeachtet der durch die Unternehmen zu realisierende Verwertung wurde mit den Projektergebnissen eine umfangreiche wissenschaftliche Basis für weitergehende Forschungs- und Entwicklungsarbeiten auf dem Gebiet der Reparatur osteochondraler Defekte bei INNOVENT geschaffen. Die Bearbeitung des Projektes führte zu einem beträchtlichen Kompetenzgewinn auf dem Gebiet der Implantatmaterialien und biphasigen Scaffolds sowie insbesondere auch auf dem Gebiet der Entwicklung in situ photovernetzbarer Biomaterialien bei INNOVENT. Das erworbene Know-how bildet die Grundlage für mögliche weitere Projekte auf diesem Forschungsgebiet, die gegenwärtig Gegenstand von Projektplanungen sind. INNOVENT kann sich damit die Voraussetzungen erarbeiten, auf einem zukunftsorientierten Technologiefeld zu forschen und ein kompetenter Ansprechpartner für Anwender zu sein, womit nicht zuletzt auch die Sicherung hochqualifizierter wissenschaftlicher Arbeitsplätze verbunden ist.

3. Darstellung des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Die Entwicklung osteochondraler Konstrukte wird weltweit intensiv bearbeitet. Zahlreiche Veröffentlichungen zeigen, dass dabei besonders intensiv an biphasigen Scaffolds zur Behandlung von Knochen-/Knorpeldefekten gearbeitet wird.

Fortschritte werden besonders im Bereich der Entwicklung verbesserter Materialieneigenschaften verzeichnet. In gegenwärtigen Forschungsschwerpunkten wird versucht, positive Eigenschaften bereits bewährter Materialien wie z. B. Oligolactide, Hydroxylapatit (HA) und andere Calciumphosphatverbindungen sowie Hyaluronsäure oder auch Chitosan beizubehalten und bestehende Nachteile durch Kombinationen verschiedener Materialien auszugleichen. Es wird auch intensiv an verbesserten Strukturierungstechniken gearbeitet, um eine optimale Grenzfläche zwischen artifizieller Matrix und umgebendem Gewebe zu schaffen oder bewährte Substanzen werden in nanoskalige Materialien überführt, die sich aufgrund des Oberflächen/Volumen-Verhältnisses durch neue Eigenschaften auszeichnen.

Ein deutlicher Trend, der allerdings in der Bearbeitung des Projektes noch keine besondere

Rolle spielte, ist die Einbeziehung von Stammzellen zur Besiedelung der Knorpelphase, insbesondere mesenchymalen Stammzellen als Progenitorzellen für Chondrozyten [1-10].

Folgende Arbeiten beinhalten Teilaspekte für ein osteochondrales Konstrukt, die einen Bezug zu den im Projekt angestrebten Lösungen aufweisen. Ähnliche Scaffoldmaterialien und Herstellungstechnologien für die knöcherne Phase sowie den Knorpelbereich wurden beschrieben [11-13]. Insbesondere Polylactid- und Polyglycolid-basierte Materialien wurden als Grundbaustein oder Kompositbestandteil in Knochenersatzmaterialien und Scaffolds für die Knochenphase untersucht [14-16]. Auch für die Knorpelphase wurden Untersuchungen auf ähnlicher stofflicher Basis durchgeführt. Dabei wird besonders untersucht, inwieweit sich Modifikationen beispielsweise mit Chondroitinsulfat auf die Chondrozyten-Dedifferenzierung auswirken [17].

Ein beschriebener Ansatz zur Entwicklung biphasiger osteochondraler Konstrukte baut auf einer subchondralen Phase aus einem Hydroxyapatit-Kollagen-Komposit oder einem Polylactid auf und es werden Chondrocyten direkt auf einem dieser Träger unter Bildung einer Neo-Knorpelschicht kultiviert, ohne dass ein weiterer Scaffold für die Knorpelzellen Verwendung findet [18]. Biphasige Scaffolds zusammengesetzt aus Calciumphosphat-Kollagen-Kompositen wurden auch zur simultanen Kultivierung von Osteoblasten und Chondrocyten in einem speziellen Bioreaktor eingesetzt [19].

Eine Reihe von Arbeiten belegt, dass Chitosan als eine geeignete Komponente betrachtet wird, eine artifizielle Matrix für Chondrozyten zu generieren [20-25]. Zu diesem Zweck werden auch Versuche unternommen, Chitosan und Alginat miteinander zu kombinieren [22, 26, 27]. Ebenso gibt es Untersuchungen, Hyaluronsäure in die Entwicklung eines Knorpel-Trägermaterials einzubeziehen [28-30]. Als hoch aktuell werden die Untersuchungen von Kasahara et al. herausgestellt. Dabei wird ein recht ähnlicher Lösungsansatz, wie im vorliegendem Projekt bearbeitet, verfolgt [31]. Die Kombination von Chitosan und Alginat wurde bereits als Konzept für die Knorpelreparatur von Zwischenwirbelscheiben beschrieben [26]. Auch in einer von Oliveira et al. [32] publizierten Arbeit werden Teillösungen ähnlich wie im Projekt entwickelt. Zwar besteht dort die Knochenphase aus HA und die Knorpelphase aus reinem Chitosan, wodurch die gegenwärtige Lösung nicht vorweggenommen wird, doch bestätigen diese Veröffentlichungen und andere [21, 29, 33-38] die hohe Aktualität des Themas und den hohen Wettbewerbsdruck.

Literatur

1. Tuli, R., et al., *Human mesenchymal progenitor cell-based tissue engineering of a single-unit osteochondral construct.* Tissue Eng, 2004. **10**(7-8): p. 1169-79.
2. Shao, X., et al., *Repair of large articular osteochondral defects using hybrid scaffolds and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model.* Tissue Eng, 2006. **12**(6): p. 1539-51.
3. Radice, M., et al., *Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors.* J Biomed Mater Res, 2000. **50**(2): p. 101-9.
4. Fan, H., et al., *Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a PLGA-gelatin/chondroitin/hyaluronate hybrid scaffold.* Biomaterials, 2006. **27**(26): p. 4573-80.
5. Zhou, X.Z., et al., *Mesenchymal stem cell-based repair of articular cartilage with polyglycolic acid-hydroxyapatite biphasic scaffold.* Int J Artif Organs, 2008. **31**(6): p. 480-9.
6. Oshima, Y., et al., *Variation of Mesenchymal Cells in Polylactic Acid Scaffold in an Osteochondral Repair Model.* Tissue Eng Part C Methods, 2009.
7. Li, Z., et al., *Chondrogenesis of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Fibrin-Polyurethane Composites.* Tissue Eng Part A, 2008.
8. Hannouche, D., et al., *Engineering of implantable cartilaginous structures from bone marrow-derived mesenchymal stem cells.* Tissue Eng, 2007. **13**(1): p. 87-99.
9. Janjanin, S., et al., *Mold-shaped, nanofiber scaffold-based cartilage engineering using human mesenchymal stem cells and bioreactor.* J Surg Res, 2008. **149**(1): p. 47-56.
10. Pasquinelli, G., et al., *Mesenchymal stem cell interaction with a non-woven hyaluronan-based scaffold suitable for tissue repair.* J Anat, 2008. **213**(5): p. 520-30.
11. Keeney, M. and A. Pandit, *The Osteochondral Junction and Its Repair via Bi-Phasic Tissue Engineering Scaffolds.* Tissue Eng Part B Rev, 2009.
12. Safran, M.R., H. Kim, and S. Zaffagnini, *The use of scaffolds in the management of articular cartilage injury.* J Am Acad Orthop Surg, 2008. **16**(6): p. 306-11.
13. Chung, C. and J.A. Burdick, *Engineering cartilage tissue.* Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(2): p. 243-62.
14. Hong, Z., et al., *Nano-composite of poly(L-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: mechanical properties and biocompatibility.* Biomaterials, 2005. **26**(32): p. 6296-304.
15. Jiang, C.C., et al., *Repair of porcine articular cartilage defect with a biphasic osteochondral composite.* J Orthop Res, 2007. **25**(10): p. 1277-90.
16. Kim, S.S., et al., *Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering.* Biomaterials, 2006. **27**(8): p. 1399-409.
17. Lee, C.T., C.P. Huang, and Y.D. Lee, *Biomimetic porous scaffolds made from poly(L-lactide)-g-chondroitin sulfate blend with poly(L-lactide) for cartilage tissue engineering.* Biomacromolecules, 2006. **7**(7): p. 2200-9.
18. Wang, X., et al., *Tissue engineering of biphasic cartilage constructs using various biodegradable scaffolds: an in vitro study.* Biomaterials, 2004. **25**(17): p. 3681-8.
19. Chang, C.H., et al., *Cartilage tissue engineering on the surface of a novel gelatin-calcium-phosphate biphasic scaffold in a double-chamber bioreactor.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2004. **71**(2): p. 313-21.
20. Griffon, D.J., et al., *Chitosan scaffolds: interconnective pore size and cartilage engineering.* Acta Biomater, 2006. **2**(3): p. 313-20.

21. Hsieh, C.Y., et al., *Fabrication and release behavior of a novel freeze-gelled chitosan/gamma-PGA scaffold as a carrier for rhBMP-2.* Dent Mater, 2006. **22**(7): p. 622-9.
22. Marsich, E., et al., *Alginate/lactose-modified chitosan hydrogels: a bioactive biomaterial for chondrocyte encapsulation.* J Biomed Mater Res A, 2008. **84**(2): p. 364-76.
23. Malafaya, P., et al., *Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells.* J Mater Sci Mater Med, 2005. **16**(12): p. 1077-85.
24. Subramanian, A., et al., *Synthesis and evaluation of scaffolds prepared from chitosan fibers for potential use in cartilage tissue engineering.* Biomed Sci Instrum, 2004. **40**: p. 117-22.
25. Wu, H., et al., *Proliferation of chondrocytes on porous poly(DL-lactide)/chitosan scaffolds.* Acta Biomater, 2008. **4**(1): p. 76-87.
26. Shao, X. and C.J. Hunter, *Developing an alginate/chitosan hybrid fiber scaffold for annulus fibrosus cells.* J Biomed Mater Res A, 2007. **82**(3): p. 701-10.
27. Li, Z. and M. Zhang, *Chitosan-alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering.* J Biomed Mater Res A, 2005. **75**(2): p. 485-93.
28. Grigolo, B., et al., *Down regulation of degenerative cartilage molecules in chondrocytes grown on a hyaluronan-based scaffold.* Biomaterials, 2005. **26**(28): p. 5668-76.
29. Yamane, S., et al., *Effect of pore size on in vitro cartilage formation using chitosan-based hyaluronic acid hybrid polymer fibers.* J Biomed Mater Res A, 2006.
30. Yamane, S., et al., *Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hybrid biomaterial for a novel scaffold in cartilage tissue engineering.* Biomaterials, 2005. **26**(6): p. 611-9.
31. Kasahara, Y., et al., *Development of mature cartilage constructs using novel three-dimensional porous scaffolds for enhanced repair of osteochondral defects.* J Biomed Mater Res A, 2008. **86**(1): p. 127-36.
32. Oliveira, J.M., et al., *Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: Scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells.* Biomaterials, 2006. **27**(36): p. 6123-37.
33. Sendemir-Urkmez, A. and R.D. Jamison, *The addition of biphasic calcium phosphate to porous chitosan scaffolds enhances bone tissue development in vitro.* J Biomed Mater Res A, 2006.
34. Wu, J., et al., *Water soluble complexes of chitosan-g-MPEG and hyaluronic acid.* J Biomed Mater Res A, 2006.
35. Thein-Han, W.W. and Y. Kitiyanant, *Chitosan scaffolds for in vitro buffalo embryonic stem-like cell culture: an approach to tissue engineering.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2007. **80**(1): p. 92-101.
36. Jiang, T., W.I. Abdel-Fattah, and C.T. Laurencin, *In vitro evaluation of chitosan/poly(lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering.* Biomaterials, 2006. **27**(28): p. 4894-903.
37. Zhang, Y., et al., *In-situ hardening hydroxyapatite-based scaffold for bone repair.* J Mater Sci Mater Med, 2006. **17**(5): p. 437-45.
38. Zhang, Y.F., et al., *Three-dimensional Nanohydroxyapatite/Chitosan Scaffolds as Potential Tissue Engineered Periodontal Tissue.* J Biomater Appl, 2006.

4. Darstellung der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 8

Poster

Libera J, Fiedler S, Schade R, Hildebrand G, Liefeith K, Schnabelrauch M, Berg A, Wyrwa R, Dingeldein E, Zukowski D, Epple M, Schnettler R, Lips KS: **BioNanoPlant - Biofunktionale und mittels 2-Photonenpolymerisation (2PP) nanostrukturierte Implantate zur Stimulation der Osteo- und Chondrogenese bei der Behandlung von skeletalen Defekten.**
BMBF-Konferenz WING-nano.DE, Ulm, 01.-03.04.2009.
Fiedler S, Schade R, Hildebrand G, Liefeith K, Schnabelrauch M, Berg A, Wyrwa R: **Production of scaffolds for tissue engineering applying two-photon polymerisation.** World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, 29.-31.10. 2009. in: *Regenerative Medicine 4*, 2009, Suppl. 2, S177.
Fiedler S, Schade R, Rothe H, Hildebrand G, Liefeith K, Schnabelrauch M, Berg A, Wyrwa R: **Microfabrication of polymeric scaffolds for tissue engineering applying two photon polymerization.**
BONETEC, Hannover, 07.-09.10.2010.
L. Heimann, E. Dingeldein, D. Zukowski, S. Fiedler, R. Schade, G. Hildebrand, K. Liefeith, M. Schnabelrauch, A. Berg, R. Wyrwa, J. Libera, G.-C. Bulwin, M. Meixner, M. Epple, K.S. Lips, R. Schnettler: **Biofunktionale nanostrukturierte Implantate zur Stimulation der Osteo- und Chondrogenese bei der Behandlung skeletaler Defekte**
BMBF-Symposium "*Medi-WING* – Medizintechnik im BMBF-Förderprogramm WING". 04.07. – 05.07.*2012*, NCC Ost, Nürnberg Messe.

Vorträge

Berg A, Wyrwa R, Schnabelrauch M: **Klebstoffe und Materialien für die Zellzüchtung.**
IFAM Bremen, 16.12.2009: Schade R, Weiss T, Fiedler S, Hildebrand G, Berg A, Wyrwa R, Schnabelrauch M, Liefeith K: **Influence of laser optical parameters on 2PP microstructuring of 3D biointerfaces.** FOM 2011, Konstanz, 18.04.2011.
Fiedler S, Schade R, Rothe H, Hildebrand G, Liefeith K, Berg A, Wyrwa R, Schnabelrauch M, Libera-Körner J: **Herstellung von 3D-Trägerstrukturen mittels 2-Photonen-Polymerisation für die Behandlung von Knorpeldefekten.**
DGBM-Jahrestagung, Giessen, 10.-12.11.2011.

Publikationen

Weiss T, Berg A, Fiedler S, Schade R, Hildebrand G, Schnabelrauch M, Liefeith K: **Two-Photon Polymerization for Microfabrication of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Application.**
O. Dössel und W.C. Schlegel (Eds.): WC 2009, *IFMBE Proceedings*, 2009 25/X, 140-142.

Fiedler S, Schade R, Hildebrand G, Liefeith K, Schnabelrauch M, Berg A, Wyrwa R: **Production of scaffolds for tissue engineering applying two-photon polymerisation.** *Future Medicine*, 2009 November 4(6), Suppl. 2, 177, ISSN: 1746-0751

Fiedler S, Schade R, Rothe H, Hildebrand G, Liefeith K, Berg A, Wyrwa R, Schnabelrauch M, Libera-Körner J: **Herstellung von 3D-Trägerstrukturen mittels 2-Photonen-Polymerisation für die Behandlung von Knorpeldefekten.**
BIOMATERIALIEN 2011. Volume 12, Number 1- 4, 27.