Universität Stuttgart
Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik

Fraunhofer IGB

Charakterisierung des Zellverhaltens primärer humaner Endothelzellen auf neu entwickelten 3D-verdruckbaren Biopolymeren

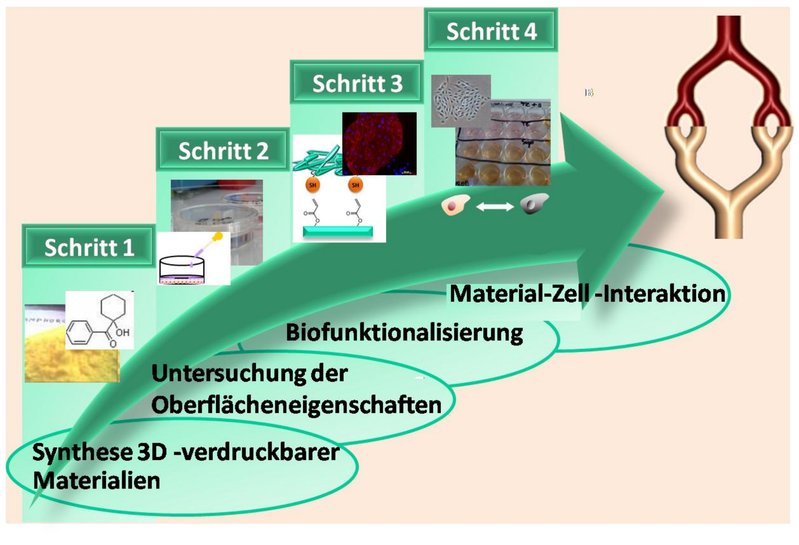
[1]**E.C. Novosel,** [2]**N.Klechowitz,** [3]**W. Meyer,** [3]**M. Wegener,** [3]**H. Krüger,** [2]**K. Borchers,**[1,2]**G.E.M. Tovar,** [2]**P.J. Kluger,** [2] **H. Walles,** [1,2]**T. Hirth**
[1]Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik IGVT, Universität Stuttgart, Nobelstraße 12, 70569 Stuttgart, Deutschland
[2]Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB, Nobelstraße 12, 70569 Stuttgart, Deutschland
[3]Fraunhofer Institut für angewandte Polymerforschung IAP, Geiselbergstrasse 69, 14476 Potsdam-Golm, Deutschland

Einleitung

Biomaterialien müssen in Hinblick auf ihr Ermüdungsverhalten, ihre Funktionalität und Biokompatibilität einer Reihe von Anforderungen genügeleisten [1,2]. In unserer Arbeit wurden neue, über 3-dimensionale (3D)-Inkjetverfahren verdruckbare Polymere zum Aufbau eines künstlichen Blutgefäßsystems synthetisiert. Die Polymeroberflächen wurden mit Thioheparin funktionalisiert und mit Endothelzellen besiedelt. Die Zell-Material-Interaktion wurde in Zellkulturexperimenten systematisch analysiert.

Material und Methoden

Es wurden verschiedene α,ω-Hydroxyoligoether unterschiedlicher Kettenlängen mit endständigen Acrylatgruppen synthetisiert. Die nachgehärteten Materialien wurden in Hinblick auf ihr E-Modul, die Viskosität und ihr Quellungsverhalten untersucht. Die Biofunktionalisierung der Substrate erfolgte über die kovalente Bindung von Thioheparinsulfat (THS) an die acrylierte Oberfläche mittels Michael-Addition. Als Kontrolle diente unfunktionalisiertes Heparin ohne Thiolgruppen. Die Menge an gebundenem THS wurde mittels XPS und photometrisch über einen Toluidinblau-Test quantifiziert. Es folgte die Aussaat von primären humanen mikrovaskulären Endothelzellen (mvEC)

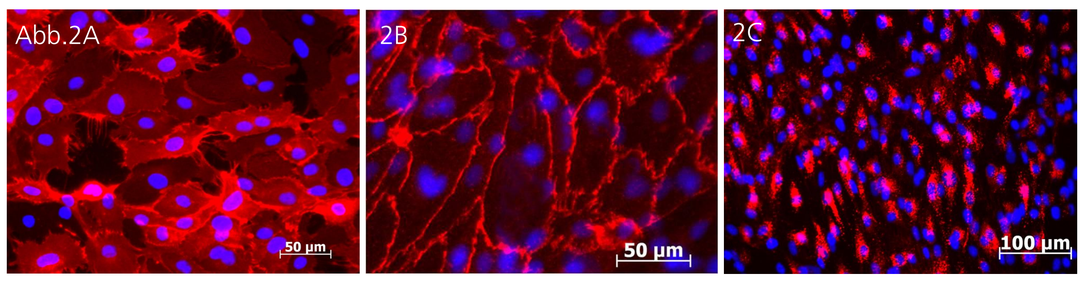


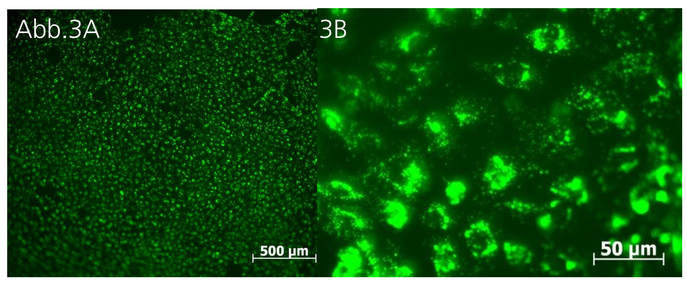
auf biofunktionalisierte und unfunktionalisierte Substrate. Dem schloss sich die Evaluation des Adhäsionsverhalten, der Morphologie, der Proliferation und der Funktionalität der Zellen auf den neu entwickelten Polymeren mittels Lichtmikroskopie und einem WST-1 Proliferationstests an. Zusätzlich erfolgte mittels eines Assays die Bestimmung der acLDL (actetyliertes Low Density Lipoprotein)-Aufnahme der Zellen. Nach 48 h Kultivierung auf den Materialien wurden zudem immunhistochemische Färbungen der endothelzellspezifischen Marker CD31, vWF (von Willebrand Faktor) und VE-Cadherin angefertigt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Herstellung der 3D-verdruckbaren Polymere mit der erwünschten Viskosität, Oberflächenspannung, Flexibilität und Biokompatibilität war erfolgreich. Eine oberflächendeckende Funktionalisierung mit THS konnte über den steigenden Schwefelgehalt mittels XPS und der kolorimetrischen Detektion von Sulfatgruppen mittels Toluidinblau nachgewiesen werden (Abb. 1). Endothelzellen auf thioheparinfunktionalisierten Substraten zeigten eine höhere Viabilität und Konfluenz, als Zellen auf den unfunktionalisierten Oberflächen (Abb. 4 und 5). Für die auf den Substraten waschsenden Endothelzellen, konnten die spezifischen Marker CD31, vWF und VE-Cadherin über Immunhistochemie angefärbt werden (Abb.2). Die Zellfunktionalität vitaler mvEC auf den Materialien wurde durch den acLDL-Aufnahme Test belegt (Abb. 3).

Abb. 2 und 3 : Immunfluoreszenzfärbung (Abb.2) und acLDL Aufnahme (Abb. 3) von Endothelzellen nach 48h auf 3D-verdruckbarem Polymer Abb. 2 A) Zellen gefärbt mit anti-CD31, 2 B) mit anti-VE-Cadherin und in 2C) mit anti-vWF. Abb. 3 A und B: Endothelzellen nehmen acLDL auf (A 50x, B 400x Vergrößerung.) Endothelzell-marker in rot, Zellkerne in blau, acLDL in grün





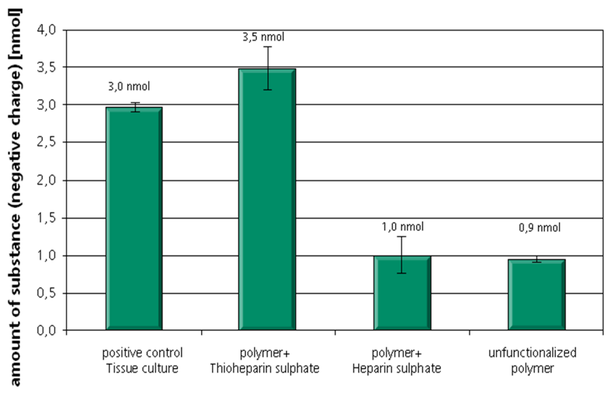
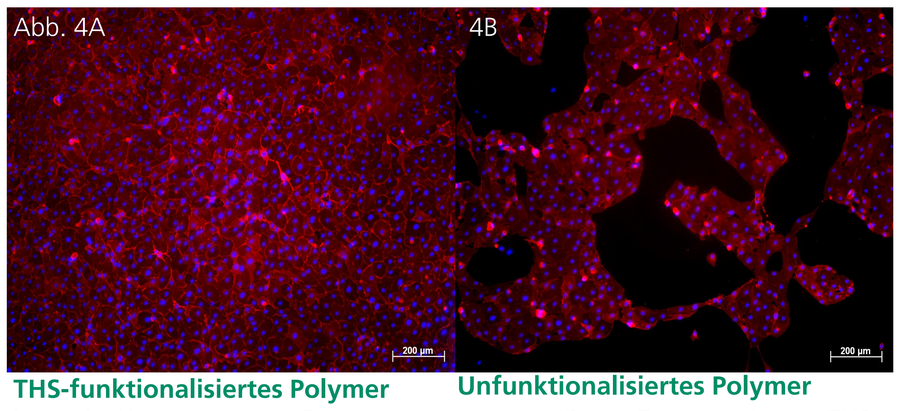


Abb. 1: Kolorimetrische Detektion der Sulfatgruppen von THS mit Toluidinblau. Das mit THS funktionalisierte Polymer weist die höchste negative Ladung auf.



THS-funktionalisiertes Polymer **Unfunktionalisiertes Polymer**

Abb. 4: Konfluenz der Endothelzellen nach 48 h. Zellen auf der THS-Oberfläche (4A) zeigen signifikant höhere Konfluenz, als auf dem unfunktionalisierten Kontrollsubstrat. (4B)

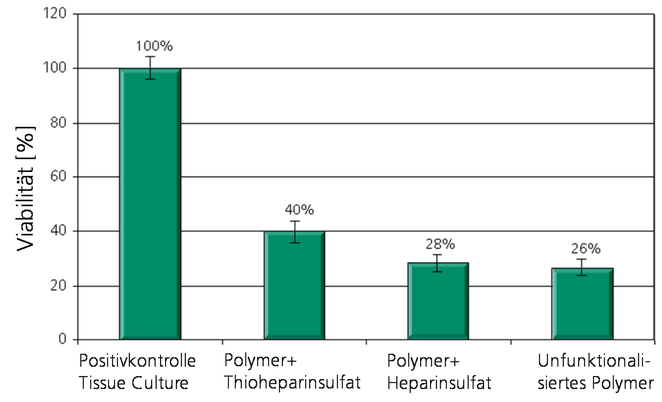


Abb. 5: Viabilität der Endothelzellen nach 48 h. Zellen auf der THS Oberfläche zeigen 14 % höhere Viabilität, als auf unfunktionalisiertem Material.

Zusammenfassung und Ausblick

Die Untersuchung der Zell-Material-Interaktion zeigt, dass unsere neuartigen 3D-verdruckbaren Polymere für die Herstellung von artifizieller Blutgefäße geeignet sein könnten. Weitere Experimente sind notwendig, um die Adhäsion und Vitalität der Zellen auf den Materialien zu verbessern. Dazu sollen die Oberflächen mit Adhäsionspeptiden und Wachstumsfaktoren funktionalisiert werden. Weiterhin soll ein Bioreaktor für die dynamische Kultivierung der endothelialisierten 3D-Röhrenstrukturen entwickelt werden.

Referenzen

[1] *M. S. Conte*: The ideal small arterial substitute: a search for the Holy Grail? FASEB J **12** 1, 43-5, (1998)
[2] N. Koike, D. Fukumura, O. Gralla, P. Au, J. Schechner and R. Jain, Creation of long-lasting blood vessels, *Nature* **428** 138–139 (2004)

Danksagung

Wir danken der Fraunhofer Gesellschaft und der Landesgraduierten-förderung Baden-Württemberg für die Finanzierung des Projektes.

Kontakt



Kontakt:
Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB
Nobelstraße 12, 70569 Stuttgart
www.igb.fraunhofer.de

Dipl.Biol.t.o. Esther Novosel
Telefon: -49 (0) 7 11 / 9 70-4025
esther.novosel@igb.fraunhofer.de