



Entwicklung von 3D-Herzschrittmacher-Elektroden auf Basis von Kohlenstoffnanofasern

Development of 3D pacemaker electrodes based on carbon nano fibers

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Klinische Wissenschaften

vorgelegt von

Tobias Maximilian Weigel

geboren in
Kempten

angefertigt am
Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin
Universitätsklinikum Würzburg

Würzburg 2018

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitee:

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Seibel

1. Betreuer: Dr.-Ing. Jan Hansmann

2. Betreuer: Prof. Dr. Jürgen Groll

3. Betreuer: Prof. Dr. Heike Walles

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis.....	IV
II.	Abbildungsverzeichnis	VII
III.	Tabellenverzeichnis	X
IV.	Zusammenfassung	XI
V.	Abstract.....	XIII
1.	Einleitung.....	1
1.1.	Stand der Technik.....	1
1.2.	Kohlenstoff-Nanofaser Synthese	4
1.2.1.	Erzeugung von Nanofasern durch Elektrospinnen	4
1.2.2.	Kohlenstofffasern – Eigenschaften und Herstellung.....	6
1.3.	Charakterisierung von nanoskaligen Elektroden Scaffolds.....	9
1.3.1.	Rasterelektronenmikroskopie	9
1.3.2.	Raman Spektroskopie	11
1.3.3.	Spannungs-Dehnungs-Diagramm.....	13
1.3.4.	Impedanz Spektroskopie	14
1.3.5.	Cyclovoltametrie	19
1.4.	Strategien zur Reduzierung der Verkapselung von Implantaten.....	21
1.5.	Aufbau und Generierung von kardialem Gewebe.....	23
2.	Ziel der Arbeit	27
3.	Material und Methoden.....	29
3.1.	Materialien.....	29
3.2.	Herstellung der Kohlenstofffaser-Scaffolds	37
3.2.1.	Elektrospinnen von Polyacrylnitril-Fasern mit verschiedenen Durchmessern und deren Umwandlung zu Kohlenstofffasern.....	37
3.2.2.	Salz-Modifikation des Faser-Scaffolds.....	40
3.2.3.	Oberflächenaktivierung durch Sauerstoff-Plasma	41
3.3.	Material Charakterisierung.....	42
3.3.1.	Raster-Elektronen-Mikroskopie	42
3.3.2.	Vermessung der Maschen.....	43
3.3.3.	Raman Spektroskopie	44
3.3.4.	Mechanische Testung	44

3.3.5.	Kontaktwinkelmessung	45
3.4.	Elektrische Charakterisierung	46
3.4.1.	Leitfähigkeit	46
3.4.2.	Impedanz Spektroskopie	47
3.4.3.	Cyclovoltametrie	48
3.5.	Zellkultur	49
3.5.1.	Ethische Zulassung	49
3.5.2.	Standard Zellkultur Bedingungen	49
3.5.3.	Isolation von Fibroblasten und deren Vermehrung	49
3.5.4.	Zellkultur von humanen Fibroblasten auf den Kohlenstofffaser-Scaffolds	50
3.5.5.	Kardiomyozyten-Mono- und Co-Kultur	51
3.6.	Herstellung und Charakterisierung einer hybriden kardialen Elektrode	52
3.6.1.	Generierung einer hybriden Elektrode und deren elektrophysiologische Testung	52
3.6.2.	Einwachsen der hybriden Elektrode in kardiales Gewebe	53
3.6.3.	Charakterisierung der Funktionalität des Elektroden-Gewebe Konstrukts	54
3.7.	Histologie	55
3.8.	Konfokal-Mikroskopie	58
3.9.	Statistik	58
4.	Ergebnisse	59
4.1.	Herstellung von Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds mit verschiedenen strukturellen Eigenschaften	59
4.2.	Material-Charakterisierung der Scaffolds	69
4.2.1.	Charakterisierung der Kohlenstoffstruktur in den Nanofasern	69
4.2.2.	Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds	72
4.2.3.	Benetzungseigenschaften der Kohlenstoff-Nanofaser -Scaffolds	74
4.3.	Elektrische Charakterisierung	76
4.4.	Biokompatibilität und Migrationsverhalten der Scaffolds	83
4.5.	Generierung einer hybriden Gewebe Elektrode und deren Integration in funktionelles kardiales Gewebe	93
5.	Diskussion	101
5.1.	Eigenschaften der Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds	101
5.2.	Elektrische Eigenschaften der Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds	110

5.3. Zellkompatibilität und -Migration der Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds	115
5.4. Gewebeintegration von 3D Kohlenstoff-Nanofaser Elektroden	120
6. Fazit und Ausblick	127
7. Literatur.....	129
8. Anhang	143
8.1. Lebenslauf.....	143
8.2. Publikationen und Konferenzbeiträge	144
8.3. Danksagung.....	147
8.4. Eidesstattliche Erklärung	149

I. Abkürzungsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Ausgeschriebene Form
%wt	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius (Einheit, Temperatur)
2D	Zwei-Dimensional
3D	Drei-Dimensional
A	Ampere (Einheit, Stromstärke)
Ag/AgCl	Silber/Silberchlorid
B	Zeitkonstante
bar	Bar (Einheit, Druck)
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Coulomb (Einheit, Ladung)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid (chemische Formel)
CPE	<i>constant phase element</i> , Konstantes Phasenelement
cTnC	<i>cardiac Troponin C</i> , Kardiales Troponin C
cTnT	<i>cardiac Troponin T</i> , Kardiales Troponin T
CV	Cyclovoltametrie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
D-Bande	ungeordnete (<i>disordert</i>) Bande
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethyl diamintertraessigäure
e-Funktion	Exponential-Funktion
EIS	elektrochemische Impedanz Spektroskopie
E-Modul	Elastizitäts-Modul
EtOH	Ethanol (chemische Formel)
EZM	Extrazelluläre Matrix
F	Farad (Einheit, elektrische Kapazität)
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fötale Kälberserum

Abkürzung	Ausgeschriebene Form
FDA	Fluoresceindiacetat
FeSO ₄	Eisensulfat (chemische Formel)
g	Gramm (Einheit, Masse)
G-Bande	graphitische Bande
h	<i>Hour</i> , Stunde (Einheit, Zeit)
HCN	Hydrogencyanid, Blausäure (chemische Formel)
hdF	humane dermale Fibroblasten
HE	Hämatoxilin und Eosin
hiPSC-CM	Kardiomyozyten, abgeleitet aus humanen induziert pluripotenten Stammzellen
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
Hz	Hertz (Einheit, Frequenz)
Im	Imaginärteil
iPSCs	Induziert pluripotente Stammzellen
K	Kelvin (Einheit, Temperatur)
L	Liter (Einheit, Volumen)
m	Meter (Einheit, Länge)
M	Molar (Einheit, Konzentration)
MEA	Multi-Elektroden-Array
min	Minute (Einheit, Zeit)
NaCl	Natriumchlorid (chemische Formel)
Pa	Pascal (Einheit, Druck/Spannung)
PAN	Polyacrylnitril
PBS-	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Magnesium und Calcium
PEDOT:PSS	Poly(3,4-Ethylendioxythiophen): Polystyrolsulfonat
Pen/Strep	Penicilin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
Pt	Platin (chemische Formel)
Q	Admittanzparameter (im Zusammenhang mit EIS)
Q	Ladung (im Zusammenhang mit CV)

I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Ausgeschriebene Form
R_{CT}	Widerstand der Ladungstransfers, Charge Transfer Widerstand
Re	Realteil
REM	Rasterelektronenmikroskopie
R_{sol}	Widerstand des Elektrolyten
s	Sekunde (Einheit, Zeit)
sccm	Standartkubikzentimeter
TiN	Titannitrid (chemische Formel)
U	<i>Unit</i> (Einheit, Aktivität von Enzymen)
U	Spannung (im Zusammenhang mit Strom)
U	Umdrehungen (im Zusammenhang mit rotierenden Objekten)
V	Volt (Einheit, elektrische Spannung)
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
W	Watt (Einheit, Leistung)
Z	Wechselstromwiderstand, Impedanz
σ	Spannung (Bezogen auf Belastungen)
v	Vorschubgeschwindigkeit
φ	Phasenunterschied
Ω	Ohm (Einheit, elektrischer Widerstand)

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau und Prinzip des Elektrosinnens.....	5
Abbildung 2: Chemische Prozesse während der Temperierung und Umwandlung von PAN-Fasern zu Kohlenstofffasern.....	8
Abbildung 3: Aufbau und Prinzip der Bildgebung der Rasterelektronenmikroskopie.	10
Abbildung 4: Raman-Eigenschaften von Kohlenstoff.	12
Abbildung 5: Spannungs-Dehnungs-Diagramme eines plastisch verformbaren und eines spröden Materials.	14
Abbildung 6: Beispiele für einfache Nyquist-Plots mit den zugehörigen Ersatzschaltbildern.	17
Abbildung 7: Beispiel einer cylovoltametrischen Messung.	19
Abbildung 8: Poröses Scaffold für verbesserte Gewebeintegration.....	22
Abbildung 9: Hierarchischer Aufbau von humanem Herzgewebe mit Fokus auf die kardialen Muskelfasern.	26
Abbildung 10: Aufbau und Komponenten des Elektropinners.	38
Abbildung 11: Aufbau zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit.	46
Abbildung 12: Aufbau zur Messung der Impedanz und des Cyclovoltagramms.	48
Abbildung 13: Aufbau der Elektrode und Zellkrone für die Zellkultur.....	53
Abbildung 14: Generierung von Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds mit unterschiedlichen Faserdurchmessern.	60
Abbildung 15: Modifikation der Scaffold Faser-Struktur durch Einbetten der Fasern in NaCl.	61
Abbildung 16: Herstellung von porösen Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds. ...	63
Abbildung 17: REM-Analyse der porösen Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds. .	65
Abbildung 18: Größe der Maschenweiten der Kohlenstoff-Nanofaser- Scaffolds.	67

Abbildung 19: Größe und Morphologie der Maschen in den Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds.	68
Abbildung 20: Charakterisierung der Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds durch Raman Spektroskopie.	69
Abbildung 21: Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds.	73
Abbildung 22: Mechanische Werte der Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds bestimmt aus den Spannungs-Dehnungs-Diagrammen.	74
Abbildung 23: Bilder der Kontaktwinkelmessung auf Scaffold 8 und 12P.	75
Abbildung 24: Impedanz-Messungen zur Charakterisierung der elektrischen Übergänge der Elektroden-Scaffolds in PBS.	79
Abbildung 25: Fit-Ergebnisse der Kohlenstofffasern und der Vergleichsmaterialien TiN und Platin.	80
Abbildung 26: Cyclovoltogramme der Scaffolds mit Geschwindigkeiten von 0,005 bis 0,1 V/s in PBS:	82
Abbildung 27: Kompatibilitätstest nach 2 Tagen mit humanen dermalen Fibroblasten.	84
Abbildung 28: Migrationsverhalten von hdF auf den Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds nach 5 Tagen.	85
Abbildung 29: Migrationsverhalten von hdF auf den Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds noch 6 Wochen.	86
Abbildung 30: Migrationsverhalten von hdF auf den porösen Scaffolds 12P.	87
Abbildung 31: Kompatibilitätstest der Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds mit Kardiomyozyten, differenziert aus humanen induziert-pluripotenten Stammzellen.	89
Abbildung 32: Erweiterung der Zellkultur zur Generierung von kardialem Gewebe.	90
Abbildung 33: Langzeitkultur aus hiPS-CM, hdF und hMSC zur Beobachtung der Organisation von Kardiomyozyten und Bildung von kardialem Gewebe.	91
Abbildung 34: Konzeptzeichnung für die Erstellung einer hybriden kardialen Elektrode mit anschließender Integration in einen parallel generierten kardialen Patch.	93

Abbildung 35: Entwicklung der hybriden kardialen Gewebe Elektrode.....	95
Abbildung 36: Messung der elektrischen Signale der hybriden Gewebe Elektrode auf einem Multi-Elektroden-Array Chip.....	96
Abbildung 37: Migration und Bildung von kardialem Gewebe im porösen Elektronen Scaffold 12P nach vier Wochen.....	97
Abbildung 38: Integration der hybriden Gewebe Elektrode in einen kardialen Patch.	99
Abbildung 39: Mechanische Testung der zellulären Verbindung des zusammengewachsenen Konstrukts.	100
Abbildung 40: Kontraktions- und Stimulationsmessung des fusionierten Konstrukts.....	100
Abbildung 41: Qualitative und Quantitative Auftragung der Abgase während der Pyrolyse und Karbonisierung von PAN-Fasern.	105

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.	29
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.	31
Tabelle 3: Labormaterial.	33
Tabelle 4: Chemikalien.	33
Tabelle 5: Antikörper.	35
Tabelle 6: Präputium-Biopsate zur Isolation von hdF.	36
Tabelle 7: Software.	36
Tabelle 8: Protokoll zu HE-Färbung.	56
Tabelle 9: Flächenanteile der Peaks in Prozent aus durch die Peakanalyse aus den Ramanspektren mit den zugehörigen Peakpositionen.	70
Tabelle 10: Intensitätsverhältnisse zur Bestimmung der geordneten Strukturen in den Fasern, gebildet aus den Werten aus Tabelle 7.	71
Tabelle 11: Spezifische Leitfähigkeit der verschiedenen Kohlenstofffaser-Scaffolds.	76
Tabelle 12: Kathodische und anodische Ladungskapazität durch Integration des CV bei einer Geschwindigkeit von 0,03 V/s.	81

IV. Zusammenfassung

Herzschrittmachersysteme sind eine weitverbreitete Möglichkeit Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu behandeln. Wegen der natürlichen Reaktion des Immunsystems auf Fremdkörper, erfolgt aber eine fortschreitende Verkapselung der Herzschrittmacherelektrode. Die Folge ist eine ansteigende Verminderung der Stimulationseffizienz durch Erhöhung der Anregungsschwelle. Die Integration der Elektrode in das Gewebe ist dabei mangelhaft und wird bestimmt durch Implantateigenschaften wie Größe, Flexibilität und Dimensionalität. Um die Integration zu verbessern, stellen dreidimensionale (3D) bzw. gewebeartige Elektroden eine Alternative zu den derzeit verwendeten planaren Metallelektroden dar. Zur Entwicklung einer leitfähigen, 3D und faserförmigen Elektrode wurden in dieser Arbeit Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds über Elektrosponnen hergestellt. Durch die Modifikation des Fasergerüsts mit Natriumchlorid (NaCl) während der Scaffoldherstellung, konnte das Fasernetzwerk aufgelockert und Poren generiert werden. Die Kohlenstofffaser-Elektroden zeigten einen effizienten Energieübertrag, welcher vergleichbar mit heutigen Titannitrid (TiN) -Elektroden ist. Die Auflockerung des Fasergewebes hatte eine verbesserte Flexibilität des Faserscaffolds zu Folge. Neben der Flexibilität, konnte auch die Infiltration von Zellen in das poröse Faserscaffold erheblich verbessert werden. Dabei konnten Fibroblasten durch das gesamte Scaffold migrieren. Die Kompatibilität mit kardialen Zellen, die Grundvoraussetzung von Herzschrittmacherelektroden, wurde *in vitro* nachgewiesen. Durch die Kombination aus dem 3D-Elektrodengerüst mit einer Co-Kultur aus humanen Kardiomyozyten, mesenchymalen Stammzellen und Fibroblasten, erfolgte eine Einbettung der Elektrode in funktionelles kardiales Gewebe. Dadurch konnte ein lebender Gewebe-Elektroden-Hybrid generiert werden, welcher möglicherweise die Elektrode vor Immunzellen *in vivo* abschirmen kann. Eine Zusammenführung der hybriden Elektrode mit einem Tissue-Engineerten humanen kardialen Patch *in vitro*, führte zu Bildung einer nahtlosen Elektronik-Gewebe-Schnittstelle. Die fusionierte Einheit wurde abschließend auf ihre mechanische Belastbarkeit getestet und konnte über einen Elektroden-Anschluss elektrisch stimuliert werden.

V. Abstract

The application of pacemaker systems is a widespread treatment of cardiovascular diseases. The inflammatory interaction of the immune system and the implant results in the formation of a fibrous capsule around the pacemaker's electrode. The consequence is a progressing reduction of the stimulation efficiency by an increased excitation threshold. The primary cause of the encapsulation is the deficient integration of the electrode into the cardiac tissue, which is induced by the incompatible implant properties like size, flexibility and dimensionality. To improve the electrode's integration, the application of three dimensional and tissue imitating electrodes represent an improvement of currently implanted planar electrodes. To develop a conductive and fibrous 3D-electrode, carbon nanofiber scaffolds were generated by electrospinning. By modifying the fiber network with NaCl during the scaffold preparation, the mesh openings could be loosened and pores generated. An efficient energy transfer of the resulting carbon fiber electrodes was demonstrated and is comparable to today's TiN electrodes. The loosening of the fiber network resulted in improved flexibility of the scaffold. In addition to the flexibility, the infiltration of cells into the porous fiber scaffold could be significantly enhanced. Thereby, fibroblasts were enabled to migrate through the entire scaffold. For application as a pacemaker electrode, the compatibility of the tissue electrode with cardiac cells *in vitro* was demonstrated. The combination of the 3D electrode Scaffold with a co-culture of human cardiomyocytes, mesenchymal stem cells and fibroblasts led to a partially embedded electrode in functional cardiac tissue. As a result, a living tissue-electrode hybrid could be generated which could possibly shield the electrode from immune cells *in vivo*. Implantation of the hybrid electrode into a tissue engineered human heart patch *in vitro* resulted in a seamless electronic tissue interface. This fused unit was conclusively tested for its functionality, like mechanical stability and the electrical stimulation of the patch by the in grown hybrid electrode.

1. Einleitung

1.1. Stand der Technik

Mit der gezielten Abgabe von kleinen elektrischen Stößen steuern Herzschrittmacher die Kontraktionsfrequenz des Herzens und retten jedes Jahr Millionen von Menschen [1]. Seit der erste implantierbare Herzschrittmacher 1958 eingesetzt wurde [2], entwickelte sich das Produkt zu Massenware und wird heutzutage zu hunderttausenden pro Jahr implantiert. Allein in den USA sind es jährlich 400000 Implantationen (Stand 2011) [1] und knapp 140000 in Deutschland (2016) [3]. Da aber nach ca. 10 Jahren die Energieversorgung des Implantats erschöpft ist, erfordert dies einen chirurgischen Eingriff zur Erneuerung der Batterie. Mit ca. 65000 Eingriffen zum Wechsel oder Korrektur eines Herzschrittmachers in Deutschland (2016) [4], führt dies jährlich zu hohen Kosten und stellt ein erhebliches Risiko, durch Narkoseunverträglichkeiten und Infektionen, für den Patienten dar. Um die Lebensdauer der Batterie zu verlängern, werden Herzschrittmacher Systeme stetig weiterentwickelt. Daher wurden in den letzten 50 Jahren Batterien mit immer höherer Ladungskapazität entwickelt und durch verbesserter Elektronik des Geräts der laufende Energieverbrauch gesenkt [2]. Als Schnittstelle zwischen Körper und Herzschrittmacher wurden ebenfalls die Elektroden kontinuierlich weiterentwickelt. Dies erfolgte beispielsweise über die Erhöhung der Oberfläche über Mikro- und Nanostrukturen, zur Verringerung der Impedanz und der Verbesserung der sensorischen Eigenschaften [5, 6]. Ebenfalls wurde versucht, über verschiedene Materialien den Ladungstransfer an der Elektrodengrenzfläche zu optimieren. Heutige Elektroden bestehen unter anderem aus Platin (Pt), welches sich durch einen hohen Ladungs-Transfer-Widerstand und hohe Impedanz auszeichnet. Durch den hohen elektrischen Widerstand an der Grenzfläche ist der Übergang der Ladungen erschwert, was zu einem geringeren Ladungsverbrauch der Batterie führt. Über die Zeit, sowie bei höheren Leistungen, führt dieses Material aber zu schnell zu Nebenreaktionen und Korrosion auf der Elektrode [7, 8]. Mit der Entwicklung von TiN-Elektroden konnte der Ladungs-Transfer-Widerstand erheblich gesenkt werden. Dadurch ist es möglich, die erforderliche elektrische Leistung für die Stimulation des Herzens zu reduzieren.

1. Einleitung

Ebenfalls ist dieses Material in einem größeren Spannungsfenster korrosionsstabil [5]. Vergleicht man diese beiden Elektrodenmaterialien an Hand der Lebensdauer der Herzschrittmacher-Batterie, betragen die Unterschiede allerdings nur wenige Monate über einen Zeitraum von ca. 8 Jahren [9]. Der Grund dafür ist der geringe aber stetige Anstieg der Impedanz und des Ladungsverbrauchs an der Elektrodengrenzfläche [9]. Die Ursache für den Anstieg des elektrischen Widerstandes ist die Fremdkörperreaktion. Diese immunologische Reaktion stellt einen natürlichen Mechanismus dar, der den Körper vor dem Fremdkörper schützen soll. Das Immunsystem erkennt dabei die Elektrode als Fremdkörper und versucht, über die Generierung einer fibrösen Kapsel, die Elektrode vom umgebenden Gewebe zu isolieren. Bereits in den 80er Jahren erfolgten die ersten Implantationen von Elektroden mit freisetzenden Wirkstoffen (Steroidhormonen) [2], welche die immunologische Reaktion der Kapselbildung aktiv verlangsamten [10]. In heutigen Verbesserungsätzen werden vermehrt die Auslöser der Fremdkörperreaktion untersucht, um anschließend das Material und die Struktur der Elektrode anzupassen. Dabei wurden drei Hauptursachen identifiziert, welche das mangelhafte Integrationspotential der Elektrode mit sich bringen. Ein Auslöser der Fremdkörperreaktion ist dabei der große Unterschied im Elastizitäts-Modul (E-Modul) zwischen Elektrode und Gewebe. Da Zellen über ihre Adhäsionskomplexe sensorisch die Elastizität von Implantaten erkennen, führt der Unterschied im E-Modul zwischen metallischen Elektroden und Weichgewebe, von bis zu 4 Größenordnungen, zu einer stärkeren Aktivierung von Makrophagen [11]. Eine Verkleinerung der Elektroden in den Nanometer-Bereich könnten die Elastizitätserkennung der Zellen verändern, da diese nur noch teilweise daran adhäreren. Ein Beispiel dafür sind Kollagengele, welche über die Konzentration ein E-Modul zwischen 1 und 20 kPa [12], die einzelnen Fasern oder Fibrillen aber bis zu 21,5 GPa erreichen können [13]. Ein weiterer Grund für die Fremdkörperreaktion ist die mangelnde Flexibilität der Elektroden. Da die starren Metallelektroden von Herzschrittmachern der Bewegung des Herzgewebes nicht folgen können, besteht die Gefahr der Perforation, was eine funktionelle Integration über die gesamte Fläche der Elektrode unmöglich macht [14]. Konzepte zur Verbesserungen der Flexibilität beinhalten dünne Leiterbahnen mit Silikonummantelung kombiniert mit kleinen Elektroden aus Gold [15, 16]. Die dritte Ursache zur Fremdkörperreaktion

ist die zweidimensionale (2D) Oberfläche der Elektroden, welche es Zellen verwehrt in die Elektrode zu migrieren und diese in das Gewebe zu integrieren. Die Anwendung eines porösen 3D Implantats mit einer Porengröße von etwa 30 µm ermöglicht es den Zellen den Fremdkörper komplett zu durchwandern, ein Gefäßnetzwerk darin zu errichten und diesen besser in das umliegende Gewebe zu integrieren [17]. Eine weitere Möglichkeit die Gewebeintegration zu verbessern, ist die Kombination aus Elektrode und biologischem zellulärem Gewebe. Dabei wird das Zielgewebe, kardial [15] oder neuronal [18], *in vitro* auf der Elektrode erzeugt, indem die betreffenden Zellen in Kombination mit geeigneten Nanofasern oder Hydrogelen auf der Elektrode kultiviert werden. Die Generierung von lebendigen hybriden Elektroden beherbergt das Potential, die eigentliche Elektrode vor dem Immunsystem des Körpers abzuschirmen. Dadurch kann eine direkte Integration und eine direkte zelluläre elektrische Kontaktierung des Zielgewebes mit der Elektrode ermöglicht werden. Für die weitere Entwicklung von implantierbaren Elektroden ist die Kombination der beiden Elektroden-Ansätze, Dreidimensionalität und Dekoration mit Zielgewebe, erforderlich. Daher wird in dieser Arbeit die Entwicklung von hochporösen und flexiblen 3D-Elektrodenscaffolds auf Nanofaserbasis behandelt und zu einer hybriden Elektrode mit kardialem Gewebe kombiniert.

1. Einleitung

1.2. Kohlenstoff-Nanofaser Synthese

1.2.1. Erzeugung von Nanofasern durch Elektrospinnen

Die Herstellung von 3D Gewebe als Trägerstrukturen für Zellen bzw. dem Tissue Engineering ist ein Gebiet, in welchem aktuell viele Publikationen erscheinen. Diese Trägerstrukturen bzw. Scaffolds ahmen die extrazelluläre Matrix (EZM) nach und bieten den Zellen ein körperähnliches Milieu. Je nach Gewebetyp, ist diese bereitgestellte Umgebung unterschiedlich und bietet den Zellen die Möglichkeit zu proliferieren, sowie das Gewebe spezifisch zu entwickeln. Dafür muss das Scaffold für die Zellen materialspezifische Eigenschaften, wie z.B. E-Modul, Porosität, Strukturierung oder chemische Abbaubarkeit bereitstellen. Des Weiteren sind ebenfalls biologisch aktive Eigenschaften der Scaffolds, wie z.B. funktionelle Gruppen, Proteinfunktionalitäten oder andere Wirkstoffe, für die Entwicklung der Zellen und des Gewebes wichtige Faktoren [19, 20]. Zur Generierung von Scaffolds existieren zwei Möglichkeiten. Die erste Möglichkeit beschreibt die Erstellung eines ursprünglich biologischen Gewebes, durch die Dezellularisierung explantierter tierischer Organe [21-23], oder die Erzeugung von Gelen und Beschichtungen aus gelösten Proteinen spezifischer EZM [24, 25]. Zum anderen wird versucht diese Strukturen über den synthetischen Weg zu erzeugen. Erforderlich sind dabei die Generierung neuer synthetischer Materialien, sowie die Entwicklung von Fertigungstechniken zum Aufbau und Strukturierung der Scaffolds. Durch die Anwendung von 3D-Druck-Systemen und Entwicklung gel-bildender Polymere können neuartige und gewebespezifische 3D-Konstrukte mit direkt eingebetteten Zellen aufgebaut werden [26-29]. Ein anderer Weg ist die Erzeugung von Faserscaffolds über verschiedene Spinnprozesse, welche mit einem Faserdurchmesser von 100 nm bis 10 µm aber um ein vielfaches größer sind als die Fasern, die man bei Trägerstrukturen auf Basis von Gelen erhält. Über die richtige Anordnung dieser Fasern kann aber gleichwohl 3D-Trägerstrukturen für viele verschiedene Gewebetypen aufgebaut werden, mit dem Vorteil einer verbesserten mechanischen Belastbarkeit [30-32]. Das Elektrospinnen ist dabei ein weitverbreitetes Verfahren, für die Erzeugung von Faserscaffolds mit einem Faser-Durchmesserbereich von 100 – 1000 nm [33, 34]. Bei diesem Prozess wird eine

kontinuierliche Faser aus einer Polymerlösung durch elektrische Hochspannung erzeugt und auf einer geerdeten Oberfläche abgelegt (Abbildung 1A). Dafür wird die Polymerlösung in einer Spritze durch eine metallische Kanüle gepumpt. An der Spitze der Kanüle bildet sich ein Tropfen der Polymerlösung (Abbildung 1B), welcher durch die Oberflächenspannung in Form gehalten wird. Durch das Anlegen einer positiven Hochspannung an die Kanüle wird die Oberfläche der Lösung positiv geladen und es bildet sich ein elektrisches Feld zum geerdeten Kollektor. Durch dieses elektrische Feld und der elektrostatischen Abstoßungskräfte an der Oberfläche der Lösung, bildet sich ein sogenannter Taylor-Konus.

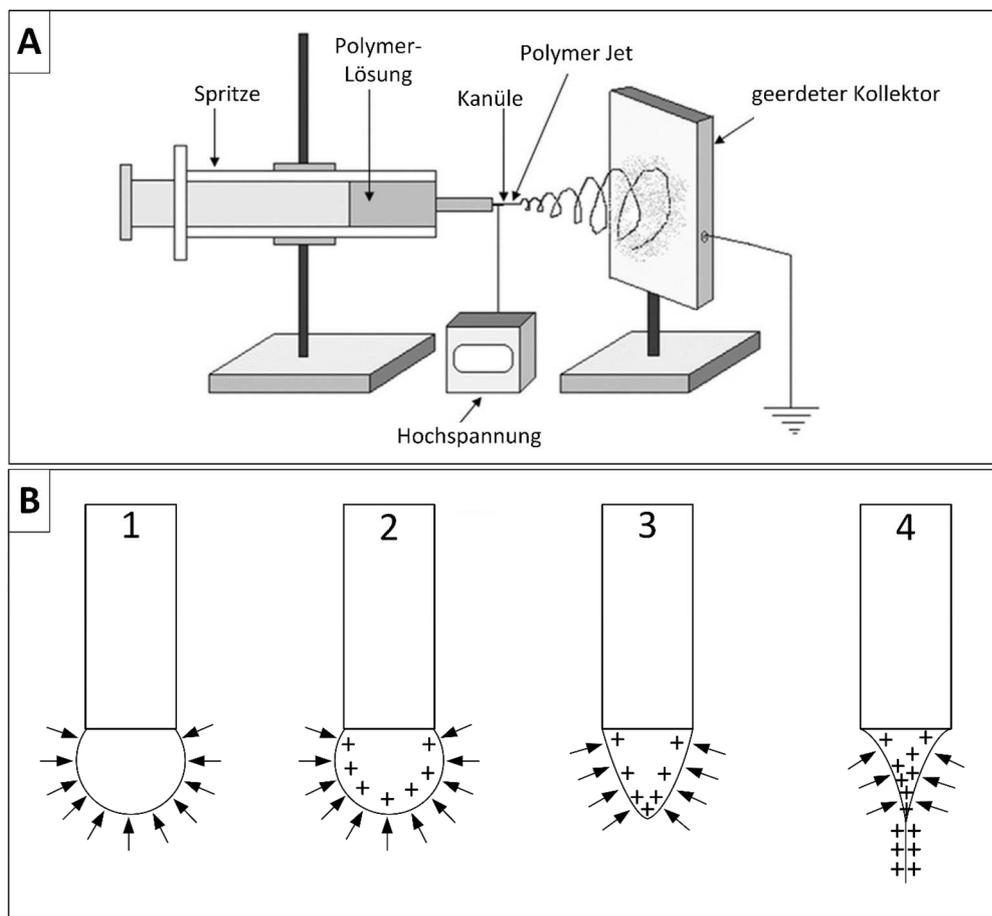


Abbildung 1: Aufbau und Prinzip des Elektrosplinnens. (A) Schematischer Aufbau eines Elektrosplinnens mit den einzelnen Komponenten. (B) Erzeugung eines Polymer Jets in vier Schritten zur Erzeugung von Nanofasern. 1. Tropfenbildung an der Kanüle; 2. Aufladen der Kanüle und Polymerlösung durch Hochspannung; 3. Deformierung des Tropfens und Bildung des Taylor-Konus durch die Kräfte der Oberflächenspannung und Elektrostatik der geladenen Lösung; 4. Erzeugung eines Polymer Jets durch die elektrischen Kräfte. Die Kräfte durch die Oberflächenspannung der Lösung ist mit Pfeilen dargestellt sowie die positiven Ladungen mit einem Plus. (A) Reprinted and translated by permission from DOVE Medical Press, Vasita R., Katti D. [35], copyright (2006).

1. Einleitung

Ab einer vom Polymer und Lösungsmittel abhängigen Spannung, überschreiten die elektrischen Kräfte die der Oberflächenspannung und es bildet sich ein Jet, welcher aus dem Tropfen heraus beschleunigt wird.

Auf dem Weg zu Kollektor verdampft das Lösungsmittel und die gebildete Faser wird auf dem Kollektor abgelegt. Die wichtigsten Einflussfaktoren zur Bildung der Fasern sind dabei die Oberflächenspannung der Lösung, die Konzentration des Polymers in der Lösung, die angelegte Spannung sowie die relative Luftfeuchtigkeit. Durch die Anwendung eines rotierenden Kollektors kann zusätzlich die Orientierung der Fasern im Scaffold beeinflusst werden, sowie eine gleichmäßigere Dicke des Scaffolds erreicht werden [36].

1.2.2. Kohlenstofffasern – Eigenschaften und Herstellung

Die herausragenden Eigenschaften von Kohlenstofffasern, z.B. deren Festigkeit, Flexibilität, elektrische Leitfähigkeit und chemische Beständigkeit [37, 38], führt zu vielen Anwendungsmöglichkeiten in verschiedenen Bereichen. Als Beispiele für diese Fasern, mit Durchmessern im unteren Mikrometerbereich, sind die Herstellung von ultraleichten Komposit-Materialien und die Verstärkung von Textilien, sowie die Nutzung als elektrischer Leiter [39-41]. Aufgrund ihrer hohen Oberfläche und thermischen sowie chemischen Beständigkeit, erfolgt der Einsatz von Kohlenstofffasern aber auch im Bereich von Elektroden. Da für diese Anwendung eine möglichst hohe Grenzfläche zum Kontaktmedium erforderlich ist, erfolgt eine Modifizierung der Fasern mit Poren oder eine Reduzierung des Faserdurchmessers in den nanoskaligen Bereich. Durch die strukturelle Ähnlichkeit von Nanofasern mit der EZM-Struktur, ergeben sich für Kohlenstoff-Nanofasern biomimetische Eigenschaften [42] und sind damit ebenfalls für die Interaktion mit Zellen im Vorteil. Zur Erstellung von leitfähigen Kohlenstoff-Nanofasern erfolgt die Strukturbildung bereits in der Vorstufe, dem nicht leitfähigen Polyacrylnitril (PAN). Die isolierenden Eigenschaften dieser Vorstufe erlaubt es, die Fasern über das Elektrospinnen zu generieren. Zur Erhaltung der Faserstruktur nach dem Spinnprozess, werden die Fasern, unter mechanischer Spannung, bei 250 °C oxidativer Umgebung (normale Luft) ausgesetzt. Dabei findet ein

Zyklisierungsschritt statt, wobei die Nitrilgruppen einen Sechsring mit dem angrenzenden Kohlenstoff-Atom der Nachbar-Nitrilgruppe bilden (Abbildung 2A) [43]. Unter der Spannung bildet sich bereits eine gerichtete Vorstruktur, welche wichtig für die spätere Ausrichtung der Graphit-ähnlichen Strukturen ist [44]. Zudem generieren sich sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen im molekularen Netzwerk. Im nächsten Schritt werden die stabilisierten Fasern unter Schutzgas bei 1000 °C karbonisiert. Bis ca. 600 °C findet dabei eine Pyrolyse der Fasern statt, was zu einer Eliminierung der meisten sauerstoffhaltigen Gruppen führt. Bei steigenden Temperaturen erfolgen die Aromatisierung und das Wachstum der Graphitstrukturen unter Abgabe von Blausäure (HCN) (Abbildung 2B). Bis ca. 1000 °C werden bis zu ca. 92 % aller Fremdatome, unter Bildung entsprechender flüchtiger Gase, abgegeben. Dabei bleibt Kohlenstoff weitestgehend zurück und bildet Graphitstrukturen aus, welche in der Faser in amorphen Kohlenstoff eingebettet sind [45]. Je größer und orientierter diese Graphitstrukturen sind, desto besser sind die Eigenschaften betreffend der Festigkeit, E-Modul und elektrische Leitfähigkeit [46-48]. Diese können bei der Graphitisierung zwischen 2500 und 3000 °C, durch das Wachstum der Graphitstrukturen, weiter verbessert werden. Da aber auch die restlichen Fremdatome von der Oberfläche verschwinden, kann dies auch die Hydrophobizität an der Oberfläche verändern.

1. Einleitung

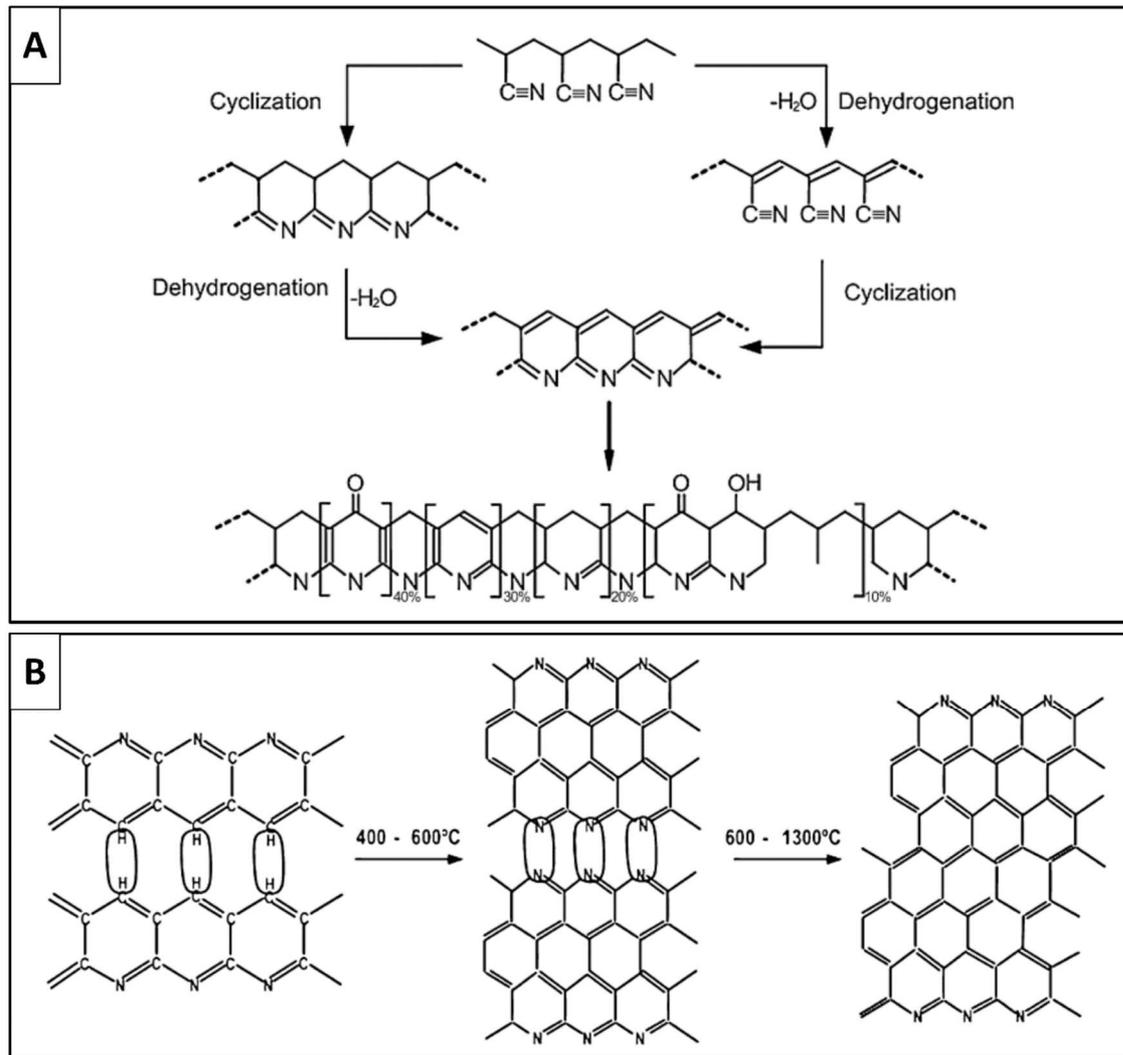


Abbildung 2: Chemische Prozesse während der Temperierung und Umwandlung von PAN-Fasern zu Kohlenstofffasern. (A) Stabilisierung des PAN bei 250 °C unter sauerstoffhaltiger Atmosphäre. Es erfolgt eine Zyklisierung des Polymers. (B) Pyrolyse und Karbonisierung des stabilisierten PANs mit der Aromatisierung und Kristallit-Wachstum. Reprinted by permission from Elsevier, Rahaman et al. [43], copyright (2007).

1.3. Charakterisierung von nanoskaligen Elektroden Scaffolds

1.3.1. Rasterelektronenmikroskopie

Die strukturelle Charakterisierung von elektrogesponnenen Nanofaser-Elektroden über gewöhnliche lichtmikroskopische Techniken ist unzureichend, durch die begrenzte Auflösung im Nanometer-Bereich. Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) eignet sich daher besser zur Darstellung von Nanostrukturen, durch die geringere Wellenlänge von beschleunigten Elektronen im Vergleich zu Licht. Daher wurde diese Methode ausgewählt, um die Struktur der Fasern wie Oberfläche, Durchmesser oder Anordnung zu charakterisieren. Anders als im Lichtmikroskop wird bei der REM ein Elektronenstrahl erzeugt, welcher über eine Hochspannung in den Strahlengang geleitet wird (Abbildung 3A). Über mehrere magnetische Kondensor- und Objektiv-Linsen kann dieser Elektronenstrahl im Strahlengang auf die Oberfläche der Probe fokussiert werden. Beim Eintreffen der Elektronen auf die Oberfläche der Probe treten diese in das Material ein. Die Eindringtiefe ist dabei hauptsächlich von der Energie der Elektronen abhängig. Unterhalb des Eindringpunktes wechselwirken die Elektronen mit dem Material in einem Bereich, was räumlich gesehen auf die Form einer Birne begrenzt ist (Abbildung 3B). Eine wichtige Wechselwirkung für die Bildgebung ist das Herausschlagen von sekundären Elektronen aus den Atomen des Materials. Je näher die Wechselwirkungsbirne an einer Kante lokalisiert ist, treten mehr Sekundärelektronen aus dem Material heraus. Über Detektoren erfolgt eine Intensitätsmessung der austretenden Sekundärelektronen mit einer anschließenden Umwandlung in einen Intensitätswert. Ein Abrastern der Oberfläche mit dem Elektronenstrahl über einer Scan-Spule erzeugt Intensitätswerte für jeden Pixel der Oberfläche und damit ein Graustufenbild über die gemessenen Sekundärelektronen. Ein weiterer Vorteil der REM gegenüber der Lichtmikroskopie ist die verbesserte Tiefenschärfe. Abbildung 3C zeigt, dass bei gleicher Punktauflösung die Tiefenschärfe 100-800-mal größer ist, als bei der Lichtmikroskopie. [49, 50]

1. Einleitung

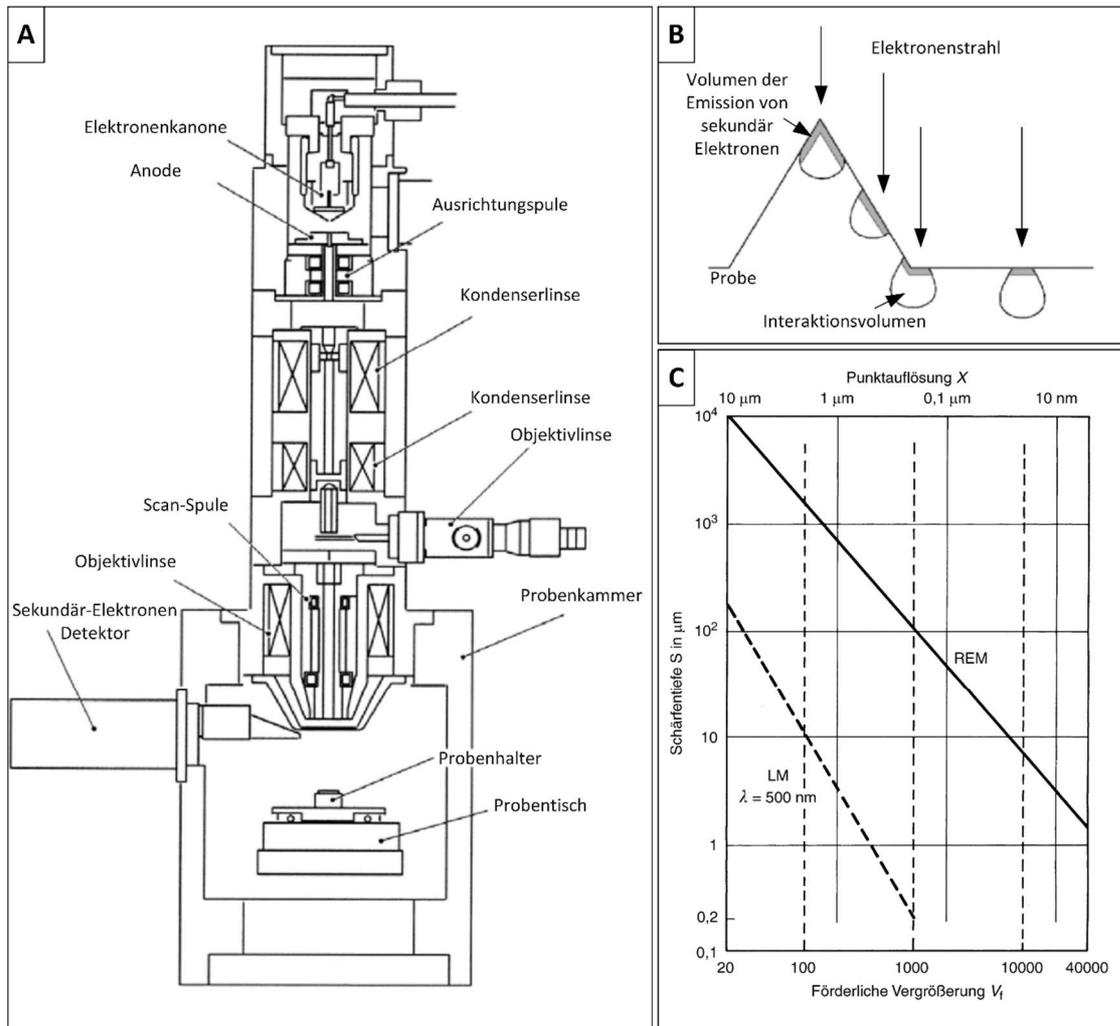


Abbildung 3: Aufbau und Prinzip der Bildgebung der Rasterelektronenmikroskopie. (A) schematischer Aufbau des Strahlengangs im Rasterelektronenmikroskop mit den wichtigsten Komponenten zur Elektronenstrahl-Erzeugung, -Steuerung und -Fokussierung sowie zur bildgebenden Detektion von Sekundärelektronen. (B) Wechselwirkungszone beim Auftreffen des Elektronenstrahls auf die Probe. Dabei werden Sekundärelektronen erzeugt, welche an Kanten einfacher aus dem Material austreten können und detektierbar werden. (C) Auftragung der Tiefenschärfe gegen die Vergrößerung, mit dem Vergleich zur herkömmlichen optischen Mikroskopie. (A)(B) Reprinted and translated by permission from Springer Nature, Zhou et al. [50], copyright (2006). (C) Reprinted by permission from Springer Nature, Macherauch E., Zoch E.M. [49], copyright (2014).

1.3.2. Raman Spektroskopie

Die Raman Spektroskopie ist eine verbreitete Methode zur strukturellen Aufklärung von Kohlenstoff-basierten Materialien und eignet sich daher, die Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds zu charakterisieren. Diese Methode basiert auf der Interaktion von elektromagnetischen Wellen im sichtbaren Spektrum, in Form eines Lasers, mit der Oberfläche des Materials. Dabei wird das Licht an der Oberfläche des Materials gestreut und es entstehen unelastische Wechselwirkungen mit dem Licht, durch die Erzeugung oder Auslöschung bestimmter geometrischer Schwingungen der Atome. Die Energie dieser Schwingungen ist hauptsächlich von den Rückstellkräften der Bindungen zwischen den Atomen abhängig und daher charakteristisch für die Zusammensetzung bestimmter Moleküle. Bei der Erzeugung einer Schwingung absorbiert diese einen Teil der Laserenergie und führt zu einer geringen Erhöhung der Wellenlänge im gestreuten Licht. Die Auslöschung einer Schwingung hat dagegen eine Erhöhung der gestreuten Lichtenergie zur Folge. Im Zuge der Messungen ergeben sich daher drei Banden unterschiedlicher Energie für eine charakteristische Bindung. Das gestreute Licht des Lasers, welches nicht mit dem Material in Wechselwirkung getreten ist, beschreibt die Bande mit der höchsten Intensität. Die beiden anderen Banden entsprechen der Anregung bzw. Auslöschung einer Schwingung und werden als Stokes bzw. Anti-Stokes-Banden bezeichnet. Deren energetische Verschiebung, auch Raman Shift genannt, ist dabei vom Betrag her identisch und befindet sich im Energiebereich von Infrarotstrahlung. Abschließend resultiert aus der Messung ein Spektrum der Streuintensität gegen die energetische Verschiebung. [51]

Dabei entstehen für Kohlenstoff-Materialien in der Regel zwei charakteristische Peaks zwischen 1000 und 1800 cm^{-1} . Über eine Peakanalyse können diese Peaks auf fünf überlagerte Bande aufgeteilt werden (Abbildung 4A). Die grafitische Bande (**G**-Bande) bei ca. 1580 cm^{-1} stellt dabei die Streckschwingung in E_{2g} -Symmetrie des idealen Grafittitters dar (Abbildung 4B) [52, 53]. Die anderen vier Banden (**D**-Banden) stehen im Spektrum für Schwingungen von ungeordneteren Strukturen (**D**isorder) im Material. Die ausgeprägteste Bande (D1) bei 1350 cm^{-1} entsteht dabei durch Ring-Atem-Schwingungen von ungeordneten grafitischen Gittern in

1. Einleitung

A_{1g} -Symmetrie [52, 53]. Ebenso entsteht die D2-Bande bei 1620 cm^{-1} durch Schwingungen von ungeordneten grafitischen Gittern in E_{2g} -Symmetrie [52]. Die D3-Bande bei 1500 cm^{-1} wird durch Schwingungen von amorphem Kohlenstoff hervorgerufen [54, 55]. Die D4-Bande bei 1200 cm^{-1} wird ähnlich wie die D1-Bande, durch Ring-Atem-Schwingungen von ungeordneten grafitischen Gittern [56], aber mit dem Einfluss von ionischen Verunreinigungen und polyenischen Strukturen [54, 55] erzeugt. Je nach Reinheit und Ordnung im Material können daher auch bestimmte Banden nur sehr gering oder gar nicht auftreten. Beispielsweise würde bei hochgeordnetem Grafit nur die G-Bande detektierbar sein. [53, 57]

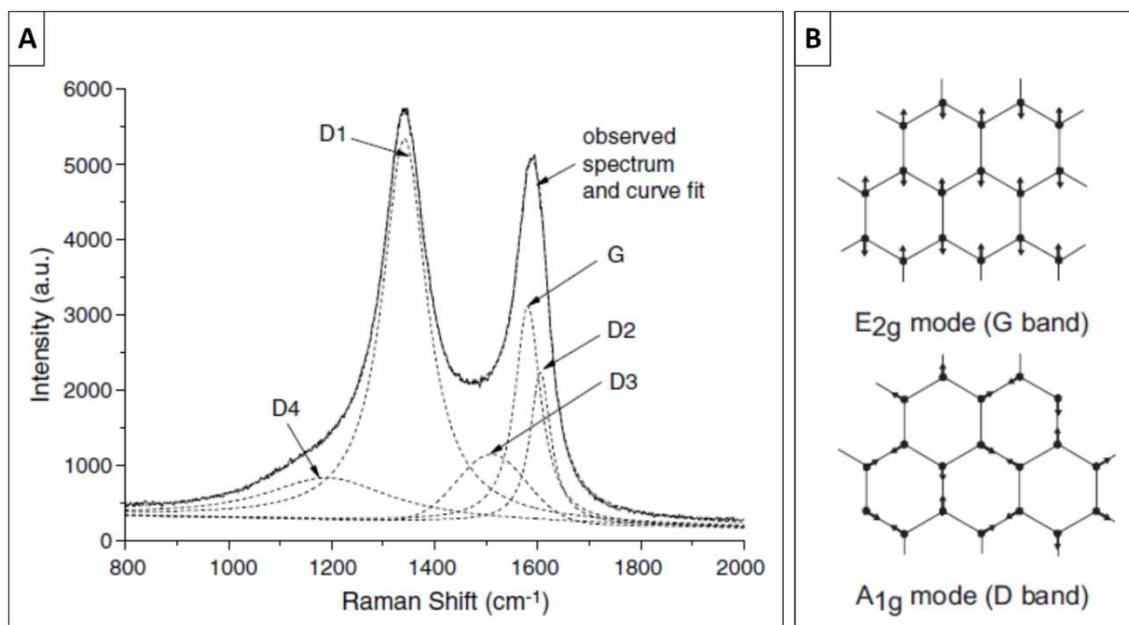


Abbildung 4: Raman-Eigenschaften von Kohlenstoff. (A) Charakteristisches Raman-Spektrum von Kohlenstoff mit fünf überlagerten Schwingungsbanden aus einer G-Bande und vier D-Banden. (B) Darstellung der Schwingungsmodi mit der Streckschwingung E_{2g} bzw. G-Bande und der Ring-Atem-Schwingung A_{1g} bzw. D-Bande. (A) Reprinted by permission from Elsevier, Sadezky et al. [58], copyright (2005). (B) Reprinted by permission from John Wiley and Sons, Irmer G., Dorner-Reisel A. [59], copyright (2005).

1.3.3. Spannungs-Dehnungs-Diagramm

Die mechanischen Eigenschaften beschreiben einen Teil der wichtigsten makroskopischen Kenngrößen eines Materials. Dabei ergeben sich Rückschlüsse auf die Qualität und Struktur des Materials, sowie Vergleiche mit anderen Materialien, wie z.B. biologisches Gewebe. Die klassische Methode dafür ist die Erstellung eines Spannungs-Dehnungs-Diagramms. In dieser Messung wird ein Prüfkörper in einer Zugmaschine mit einer definierten Zuggeschwindigkeit belastet. Ein Kraftaufnehmer misst dabei die resultierende Rückstellkraft der Probe. Über die Querschnittsfläche des Prüfkörpers ist eine Darstellung der Kraft in Spannung (σ) entscheidend, um die Vergleichbarkeit der Materialien zu gewährleisten. Beispiele für Spannungs-Dehnungs-Kurven sind in Abbildung 5 dargestellt. Die Kurve beginnt zunächst mit einem linearen Bereich, welcher sich durch die Elastizität des Materials auszeichnet. Daher bestimmt die Steigung dieser Geraden direkt das E-Modul. Dieser Bereich beschreibt eine rein elastische Verformung des Prüfkörpers und würde eine reversible Rückkehr zur ursprünglichen Form des Prüfkörpers bei einem Abbruch des Versuches bedeuten. Ab Erreichen der Streckgrenze erfolgt eine plastische und damit irreversible Verformung des Prüfkörpers. Diese Verformung tritt nur bei plastisch verformbaren Materialien auf (Abbildung 5A). Bei weiterer Dehnung wird ein Maximum in der Spannung des Materials gemessen. Dieser Punkt ist definiert, als die maximale Zugfestigkeit des Prüfkörpers. Nach Überschreiten dieser Spannung erfolgt zudem die Einschnürung des Materials, was bei weiterer Belastung zum Bruch führt. Dabei entspricht die Fläche unter der Kurve die aufgenommene Energie des Materials. Bei spröden Materialien, wie beispielsweise Kohlenstoffmaterialien, ist die plastische Verformung nur sehr schwach ausgebildet, wodurch es meist schon kurz nach dem Eintreten in den plastischen Bereich zum Sprödbbruch und dem totalen Versagen des Materials kommt (Abbildung 5B). [60, 61]

1. Einleitung

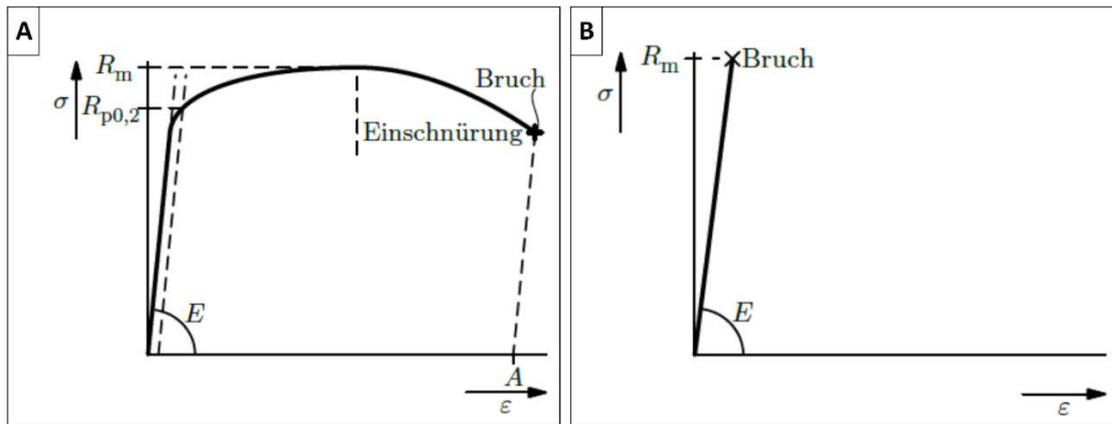


Abbildung 5: Spannungs-Dehnungs-Diagramme eines plastisch verformbaren und eines spröden Materials. (A) Spannungs-Dehnungs-Diagramm eines plastisch verformbaren Materials mit der Steigung E als E-Modul, R_m als Streckgrenze und x als Bruch, bzw. Versagen des Materials. (B) Spannungs-Dehnungs-Diagramm eines spröden Materials. Charakteristisch sind, das Ausbleiben der plastischen Verformung und der direkte Bruch der Probe. Reprinted by permission from Springer Nature, Rösler J., Harders H., Bäker M., [61], copyright (2016).

1.3.4. Impedanz Spektroskopie

Die Stimulations-Effizienz einer implantierten Elektrode steht im Zusammenhang der Verlustleistungen an der Grenzfläche der Elektrode zur biologischen Umgebung. Befindet sich eine Elektrode in einem flüssigen Elektrolyt, erfolgt ein Wechsel im Mechanismus der Stromübertragung. In der Elektrode selbst besteht der Stromfluss aus der Bewegung von Elektronen. Im flüssigen Elektrolyten bestimmen dagegen Bewegungen gelöster Ionen die Übertragung der elektrischen Energie. Redoxreaktionen an der Elektrodenoberfläche und damit verbundene Erzeugung von weiteren Ionen, sowie der Aufbau von elektrische Felder, führen zu einer Ionendiffusion im Elektrolyten und erzeugen den Fluss der elektrischen Energie ausgehend von der Elektrode. Diese kapazitiven und faradayschen Prozesse an der Material-Elektrolyt Grenzfläche sind von der Frequenz des elektrischen Signals abhängig und bestimmen die Effektivität des Energieübertrags. Die wichtigste Methode zur Charakterisierung der Energieübertragung ist die elektrochemische Impedanz Spektroskopie (EIS). Bei dieser Methode erzeugt das Impedanz Spektroskop eine Wechselspannung mit Frequenzen zwischen 0,1 und 100000 Hertz (Hz), sowie geringem Stromfluss am Übergang zwischen Elektrode

und Elektrolyt. Zeitgleich erfolgt die Bestimmung des frequenzabhängigen Wechselstromwiderstandes und der Phasenverschiebung zwischen Spannung und Strom. Daraus ergibt sich der Wechselstromwiderstand (\vec{Z}), oder auch Impedanz genannt. Dieser ist eine komplexe Größe und kann über das Ohm'sche Gesetz, durch den Quotienten des Spannungs- und Stromvektors gebildet werden. Die komplexe Darstellung erfolgt mit Hilfe einer komplexen Exponential (e) -Funktion, welche den Phasenunterschied (φ), zwischen Spannung (U) und Strom (I), enthält [62, 63]:

$$\begin{aligned}\vec{Z} &= \frac{\vec{U}}{\vec{I}} = \frac{\hat{U}}{\hat{I}} e^{j(\varphi_u - \varphi_i)} = |\vec{Z}| e^{j\varphi} = Z(\cos\varphi + j\sin\varphi) \\ &= \text{Re } \vec{Z} + j\text{Im } \vec{Z}\end{aligned}$$

Durch die eulersche Relation ist diese e-Funktion über eine Summe eines realen Kosinus-Terms und eines imaginären Sinus-Terms zusammengesetzt. Diese bilden damit Polarkoordinaten, deren Vektor in einem Polarkoordinatensystem dargestellt werden kann. Zur einfacheren Darstellung erfolgt die Transformation in kartesische Koordinaten mit der Aufteilung der Impedanz in einen Real- (Re) und Imaginärteil (Im).

Die Auftretende Impedanz an der Phasengrenze zwischen Elektrode und Elektrolyt setzt sich aus verschiedenen elektrischen Bauteilen zusammen und kann über ein geeignetes Ersatzschaltbild nachgebildet werden. Mit Hilfe dieses Ersatzschaltbildes erfolgt eine Kurvenanpassung bzw. Fit an die Messkurve und bestimmt dabei die charakteristischen Werte der einzelnen Elemente im Ersatzschaltbild. Die einfachsten Elemente sind dabei der Ohm'sche Widerstand, welcher nur einen realen Anteil an der Impedanz besitzt, sowie der kapazitive Widerstand (Kondensator) mit einem rein imaginären Anteil. Dabei beträgt die Phasenverschiebung zwischen Spannung und Strom bei einem idealen Kondensator genau -90° . Weniger relevant für die Charakterisierung des Phasenübergangs an einer Elektrode, ist der induktive Widerstand. Dieser ist ebenfalls rein imaginär, aber negativ im Vergleich zum Kondensator. Außerdem beträgt die Phasenverschiebung zwischen Spannung und Strom bei einer idealen Spule genau $+90^\circ$.

1. Einleitung

Ohm'scher Widerstand: $\vec{Z} = R$

Kapazitiver Widerstand: $\vec{Z} = \frac{1}{j\omega C}$

Induktiver Widerstand: $\vec{Z} = j\omega L$

Der Ohm'sche Widerstand zeigt sich im Nyquist-Plot (Abbildung 6A) als Punkt auf der Achse des Realteils und stellt beispielsweise den elektrischen Widerstand der Elektrode dar. Der Kondensator dagegen ist nur auf der imaginären Achse zu finden (Abbildung 6B). Eine Kombination beider Komponenten in einer Parallelschaltung, erzeugt einen Halbkreis im Nyquist-Plot (Abbildung 6C). Diese Parallelschaltung ist das einfachste Ersatzschaltbild zur Charakterisierung einer Elektrode, welches den Charge-Transfer-Widerstand und die Doppelschichtkapazität der Elektrode beschreibt. Die Anwendung dieses Schaltbildes für einen Fit erfordert aber eine ideale glatte Elektrode und ist damit für die Charakterisierung von strukturierten Elektroden ungeeignet. Deshalb wird oft der Kondensator mit einem konstantem Phasenelement (CPE) ersetzt und erleichtert damit die Bestimmung der charakteristischen Werte über einen Fit [64].

CPE: $\vec{Z} = \frac{1}{j\omega Q^{-n}}$

Dabei verschiebt sich das Zentrum des Halbkreises auf der realen Achse in den negativen Bereich des imaginären Teils mit einem Winkel von $(1-n) \cdot 90^\circ$. Für $n = 1$ ergibt sich damit ein Kondensator und mit $n = 0$ ein ohm'scher Widerstand.

Auf Grund von Rauigkeiten auf der Oberfläche der Elektrode ist aber eine Mischung aus beiden Anteilen realistischer wodurch sich n im Bereich zwischen 0 und 1 befindet [65, 66]. Befindet sich die CPE mit einem Widerstand in einer Parallelschaltung, ist die Berechnung der Oberflächenkapazität möglich, was die Vergleichbarkeit mit der Literatur vereinfacht. Die Berechnung der Kapazität erfolgt dabei über die Frequenz am Maximums des Halbkreises ω_{max} [67]:

Umrechnung CPE in Kapazität: $C = Q(\omega_{max})^{n-1}$

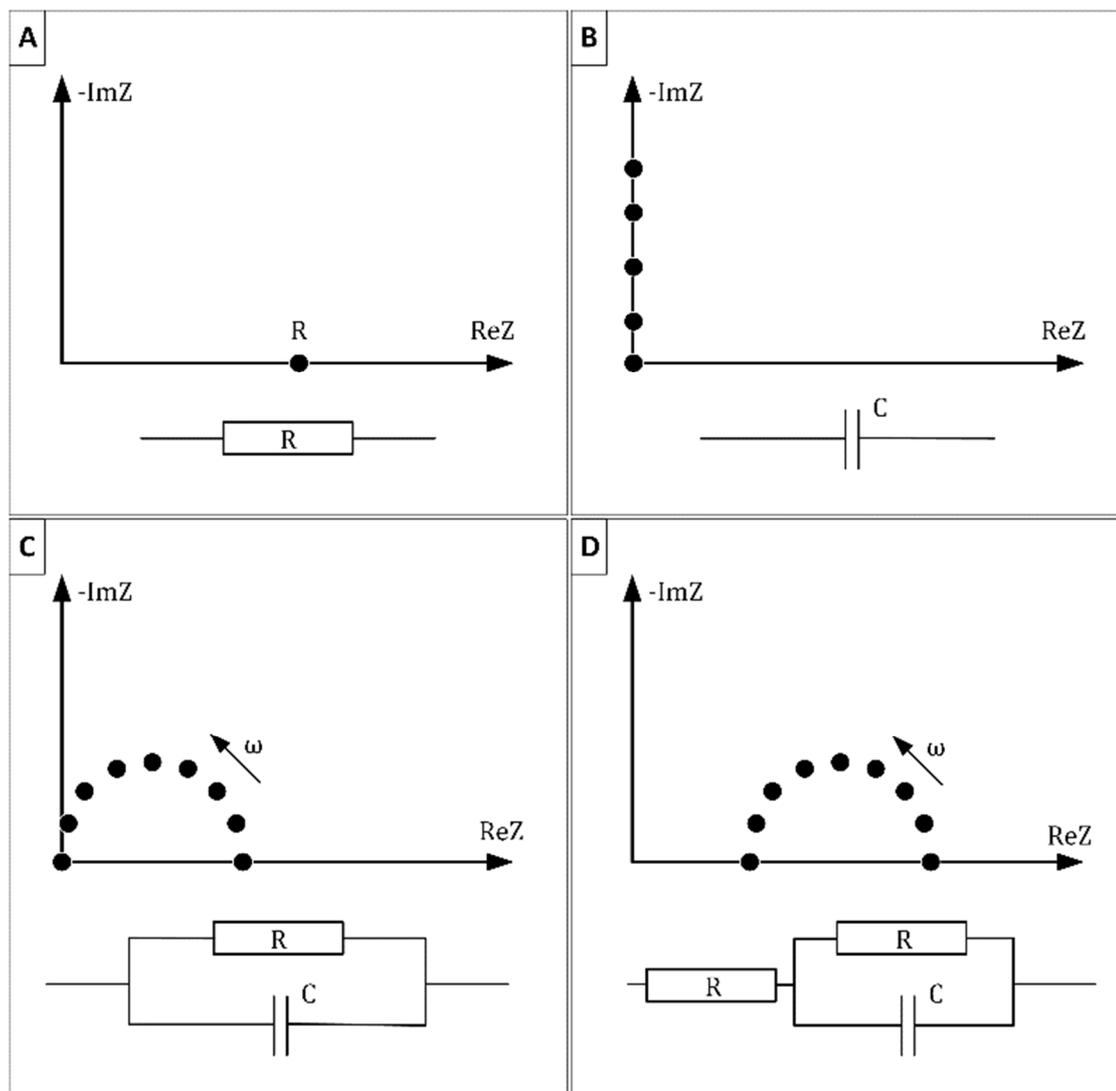


Abbildung 6: Beispiele für einfache Nyquist-Plots mit den zugehörigen Ersatzschaltbildern. Dabei zeigt A) einen Ohm'schen Widerstand, B) einen Kondensator, C) eine Parallelschaltung aus einem Widerstand und einem Kondensator und D) ebenfalls eine Parallelschaltung mit vorangehendem zusätzlichem Widerstand.

Bei der Messung in einem Elektrolyten tritt ein zusätzlicher Widerstand vor der Parallelschaltung auf. Dieser Verschiebt den Halbkreis auf der realen Achse um diesen Widerstandsbetrag (Abbildung 6D) und beschreibt den elektrischen Widerstand des Elektrolyten [64].

Mit sinkenden Frequenzen in der Impedanzmessung steigt der Einfluss der Ionendiffusion. Bereits 1899 beschrieb E. Warburg die Polarisation von Lösungen [68] woraus sich die Warburg-Impedanz entwickelte. Zum Vergleich mit der CPE

1. Einleitung

besitzt dabei die Warburg-Impedanz einen festen Phasenwinkel von 45° . Da die Warburg-Impedanz die semi-infinite Diffusion beschreibt, ist diese meist nur für glatte Elektroden mit ungehinderter Diffusion geeignet. Auf Grund der porösen Faserstrukturen wird in dieser Arbeit das T-Element verwendet, welches eine finite Diffusion durch eine dünne Schicht beschreibt.

T-Element:
$$\vec{Z} = \left(\frac{1}{Q\sqrt{j\omega}}\right)\coth(B\sqrt{j\omega})$$

Der erste Teil der Gleichung ist dabei ähnlich zur CPE mit einem Admittanzparameter (Q), während der zweite Teil eine Zeitkonstante (B) beschreibt. Dabei verhält sich diese Impedanz bei hohen Frequenzen ($>2/B^2$) wie eine Warburg-Impedanz, da hier die Diffusion durch die Schicht viel länger dauert als das zeitliche Intervall der Messfrequenz. Bei geringen Frequenzen wird die Diffusion immer dominanter, was zu einem stärkeren Anstieg des Imaginärteils und damit der Gesamtkapazität führt. [69]

1.3.5. Cyclovoltametrie

Die Cyclovoltametrie (CV) ist eine Methode zur potentiometrischen Bestimmung von elektrochemischen Vorgängen an der Elektrode. Diese Methode ermöglicht es den Elektrolyt über Redoxreaktionen zu untersuchen, oder um Reaktionen der Elektrode selbst zu messen. Die Messung erfolgt durch das Anlegen einer zeitlich steigenden und anschließend zeitlich fallenden Spannung $U(t)$ in Form einer Dreiecksspannung, zwischen der zu untersuchenden Elektrode und einer Gegenelektrode. Elektrochemische Prozesse an der Elektrode erzeugen einen Stromfluss $I(t)$ in Abhängigkeit der Spannung. Um störende Faktoren in der Messung zu reduzieren ist die Anwendung eines drei-Elektrodensystems üblich. Dabei wird die Spannung über eine nicht stromdurchflossene Bezugs elektrode angelegt, und der Strom über die Gegenelektrode gemessen. Daraus ergibt sich das elektrische Feld zwischen Arbeits- und Referenzelektrode aus:

$$E(t) = U(t) - E_{ref}$$

Die zeitliche Änderung der Spannung im Dreieckssignal, auch Vorschubgeschwindigkeit (v) genannt, ist für jede Messung ein fester Parameter im Bereich zwischen 1 – 1000 mV/s.

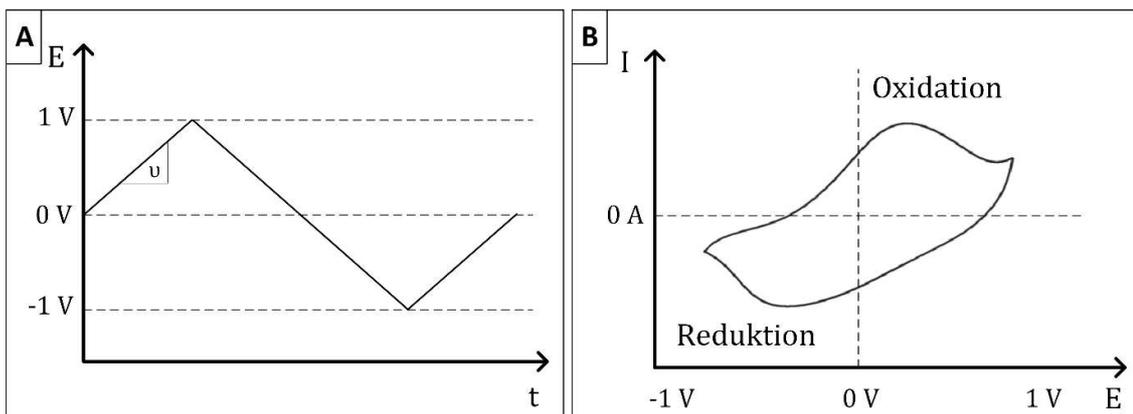


Abbildung 7: Beispiel einer cyclovoltametrischen Messung. (A) zeitliche Änderung der Spannung über die Zeit in der Messzelle. Die Steigung dieser Kurve stellt die Vorschubgeschwindigkeit der Messung dar. (B) Beispiel einer Stromflussmessung über die angelegte Dreiecksspannung. Peaks im positiven Stromflussbereich stellen oxidative, im negativen, reduktive Prozesse dar.

1. Einleitung

Bei der Darstellung im Diagramm befinden sich kathodische Ströme (Reduktionen) im negativen Bereich und anodische Ströme (Oxidationen) im positiven Bereich. Sind Peaks im Diagramm erkennbar, deutet dies auf bestimmte elektrochemische Vorgänge an der Elektrode. Dabei existieren zum einen reversible Vorgänge, welche durch symmetrische Peaks im Hinlauf bei den anodischen Strömen und im Rücklauf bei den kathodischen Strömen erkennbar sind. Beispiele sind dafür Redoxreaktionen oder Desorptions-/Adsorptionsprozesse an der Elektrode. Zum anderen gibt es irreversible Vorgänge, welche sich durch einen einseitigen Anstieg des Stromes auszeichnen. Ein Beispiel dafür die die Zersetzung des Elektrolyts. Die Höhe der Strompeaks hängt von dem Spannungsvorschub ab. Vor allem bei elektrochemischen Reaktionen steigt der Strom bei steigendem Vorschub immer höher an. Die Integration eines Strompeaks führt zur Bestimmung der voltametrischen Ladung (Q) einer Reaktion oder zur kathodischen bzw. anodischen Ladungskapazität der Elektrode. [70, 71]

$$Q = \frac{1}{v} \int I(E) dE$$

1.4. Strategien zur Reduzierung der Verkapselung von Implantaten

Implantate werden in den meisten Fällen von Körper als Fremdkörper erkannt. Die auftretende Fremdkörperreaktion führt zu einer Kapselbildung um das Implantat und kann dabei deren Funktion beeinträchtigen. Am Beispiel der Herzschrittmacherelektrode verursacht die fortschreitende Verkapselung einen steigenden Energieverbrauch zur Stimulation des Herzens. Die Fremdkörperreaktion an der Implantatoberfläche beginnt direkt mit der Implantation. Dabei entsteht der erste Kontakt mit Körperflüssigkeiten, wie Blut, Wund- und Lymphflüssigkeiten. Dies führt bereits in der ersten Minute zu unkontrollierten Adsorptionsprozessen von Ionen und Proteinen. In den ersten Stunden treten Zellen zur Wundheilung mit dem Fremdkörper in Kontakt [72]. Neutrophile dringen dabei bis zum Implantat vor und produzieren unter anderem Zytokine. In den kommenden Tagen führt dies zu einer Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen. Da die Makrophagen den Fremdkörper nicht aufnehmen können, reagieren diese auf den Fremdkörper mit einer frustrierten Phagozytose und produzieren ebenfalls Zytokine. Diese Signalmoleküle rekrutieren in den Tagen 5 – 15 Gewebezellen wie Fibroblasten, welche mit der Synthese von Kollagen beginnen. Zur gleichen Zeit erfolgt die Fusion der Makrophagen zu Fremdkörper-Riesenzellen. Dieser Prozess führt nach einigen Wochen zur kompletten Einkapselung des Fremdkörpers in fibröses Gewebe und wird dabei vom Körper isoliert. [72, 73]

In den meisten Fällen ist diese Fremdkörperreaktion eine unerwünschte Nebenwirkung, da sie die Funktion des Implantats und deren Integration in das umliegende Gewebe stören kann. Daher werden Strategien entwickelt um die Verkapselung zu verlangsamen oder bestenfalls zu verhindern [17]. In Herzschrittmacherelektroden wurden beispielsweise Wirkstoffe wie Cortisonderivate eingelagert, um die Reaktion der Makrophagen zu verlangsamen [15]. Die Interaktion der Makrophagen mit dem Fremdkörper kann aber nicht verhindert werden. Daher ist eine Strategie, die Makrophagen vom inflammatorischen Phenotyp M1 zum anti-inflammatorischen Phenotyp M2 zu polarisieren und damit die Verkapselung durch die Fibroblasten über die Zytokine

1. Einleitung

zu verhindern [72, 74]. Dies erfolgt z.B. über die Funktionalisierung der Implantatoberfläche durch Moleküle, Proteine oder Nanostrukturen [72]. Ein weiterer Ansatz ist die Anpassung des E-Moduls und der Flexibilität des Implantats an das umliegende Gewebe [11, 72]. Durch die Verwendung von Nanofaserstrukturen kann die Implantatoberfläche an die Umgebung angepasst werden und das Verhalten der Makrophagen beeinflussen [75-77]. Ein vielversprechender Ansatz ist die Anwendung von porösen Implantaten. Durch eine Porengröße von ca. 40 μm und einen verbundenen System aus Poren können die Zellen in das Implantat eindringen (Abbildung 8A,B). Dabei organisieren sich die Zellen im Implantat und bilden organisierte Gewebestrukturen und Gefäßsysteme aus (Abbildung 8C). Dies führt zu einer Integration des Implantats in das umliegende Gewebe und kann, je nach Implantationsort, die Fremdkörperreaktion sogar verhindern [17, 78, 79].

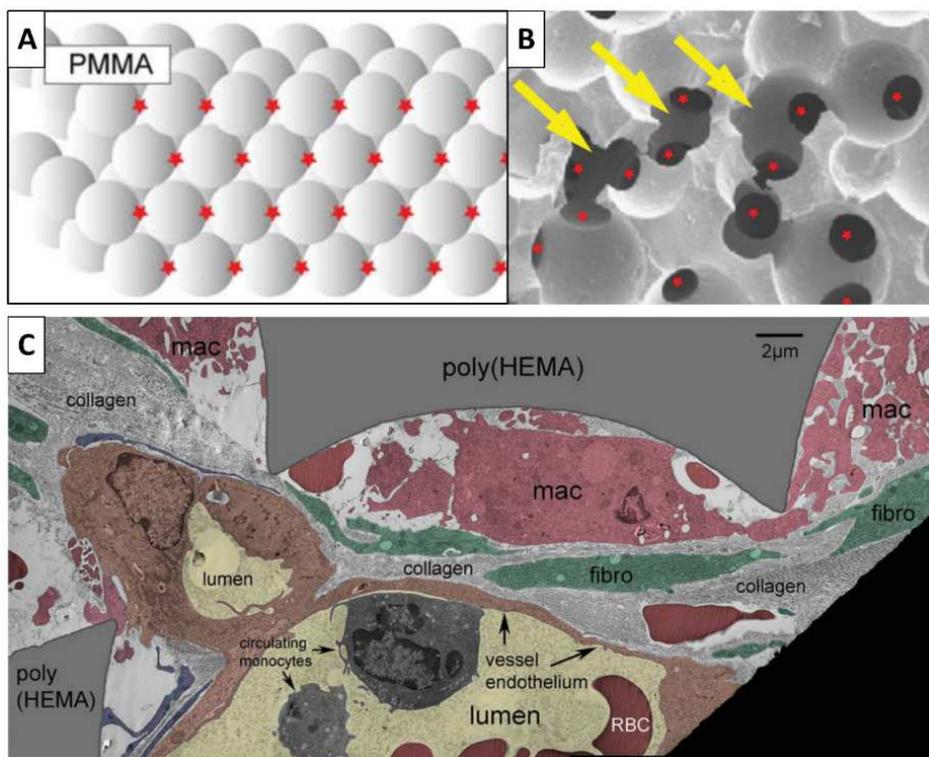


Abbildung 8: Poröses Scaffold für verbesserte Gewebeintegration. (A) Schematische Darstellung des porösen Scaffolds. Weiß zeigt das Scaffoldmaterial Polymethylmethacrylat, grau die Poren und die roten Sterne die Verbindungen zwischen den Poren. (B) REM-Aufnahme der Porenstruktur des Scaffolds. Die roten Sterne zeigen die Verbindungen zu den nächsten Poren. (C) TEM-Aufnahme in Falschfarbendarstellung zeigt die eingewanderten Zellen sowie das gebildete Gewebe und Gefäßstrukturen welches sich nach Implantation *in vivo* gebildet hat. Reprinted by permission from John Wiley and Sons, Fukano et al. [78], copyright (2010).

Eine neue Methode zur Integration von Elektroden besteht darin, die Oberfläche mit humanen Zellen und Gewebe vom Körper abzuschirmen. Dabei wird das Implantat mit verschiedenen Hydrogelen beschichtet und die betreffenden Zellen des Zielgewebes *in vitro* im Gel kultiviert. Dadurch erfolgt der elektrische Kontakt des Zielgewebes über eine zelluläre Zwischenschicht und kann dabei den Kontakt des Fremdkörpers mit Immunzellen verhindern [18].

1.5. Aufbau und Generierung von kardialem Gewebe

Im idealen Fall, steht eine Herzschrittmacherelektrode im direkten Kontakt mit dem Herzgewebe. Für die Entwicklung dieser Elektroden ist daher wichtig, die Kompatibilität mit dem Gewebe zu gewährleisten, sowie deren Interaktion zu untersuchen. Dafür kann die Kompatibilität über den Kontakt mit kardialen Zellen bestimmt werden. Komplexere Charakterisierungen, wie beispielsweise elektrische Stimulationen, erfordern dagegen gereiftes Herzgewebe. Dieses kann durch das Tissue Engineering generiert werden oder über Biopsate gewonnen werden. Der Aufbau von kardialem Gewebe hat einen hierarchischen Charakter. Vergrößert man einen Ausschnitt aus dem Myocardium, kann man die zelluläre Struktur des Muskelgewebes erkennen (Abbildung 9). Der größte Anteil des Gewebes wird dabei von den kardialen Muskelfasern gebildet. Diese sind parallel ausgerichtet und über Verzweigungen miteinander verbunden. Die Orientierung dieser Fasern bestimmt über die Kontraktions- und Signalausbreitungsrichtung und ist damit wichtig für die Pumpfunktion des Herzens. Die einzelnen Kardiomyozyten sind über Glanzstreifen miteinander verbunden. In diesen Streifen sind die Zellen, zum einen über Gap Junctions verbunden, welche das Aktionspotential weitergeben. Zum anderen sind diese Zellen in Faserorientierung über Desmosome verbunden, welche die Fasern mechanisch verankert. Viele Färbungen zeigen ein gestreiftes Muster innerhalb der Kardiomyozyten, welches die Myofibrillen darstellt. Diese Fibrillen werden mit einer wiederholenden Einheit, den Sarkomere, aufgebaut. Über eine weitere Vergrößerung eines dieser Streifen zeigen sich die Myofilamente, welche die kraftgenerierenden Elemente der Sarkomere darstellen. Diese sind über Titin mit Aktinfilamenten verankert, welches die einzelnen Myofilamente der Fibrille

1. Einleitung

untereinander als eine Art Feder verbindet. Zusätzlich sind am Aktinfilament weitere Proteine wie Troponine gebunden, welche unter anderem für die Bindung des Myosins während der Kontraktion verantwortlich sind. Wird der Ausschnitt wieder auf zelluläre Ebene verkleinert, zeigen sich weitere zelluläre Strukturen zwischen den kardialen Muskelfasern. Zum einen sind dies Gefäßsysteme, welche die kardialen Zellen mit Nährstoffen versorgen. Zum anderen findet man in regelmäßigen Abständen Gewebszellen wie Fibroblasten, welche für die Bereitstellung von extrazellulärer Matrix verantwortlich sind. [80-82]

Um spezifische, funktionelle und in der Struktur möglichst identische Gewebe *in vitro* nachzustellen, wird die Technik des Tissue Engineerings angewendet. Dafür wird ein kleiner Teil Gewebe der betreffenden Spezies und des betreffenden Organs entnommen und spezifische Zellen daraus isoliert. Anschließend expandiert man diese Zellen und differenziert diese in die gewünschte Richtung. Im folgenden Schritt wird das Gewebe aufgebaut. Dafür verwendet man eine geeignete Stützmatrix, welche die EZM nachahmt. Darauf werden die Zellen in Mono- oder Co-Kultur ausgesät. Über einige Wochen hinweg erfolgt die Reifung des Gewebes in statischer oder dynamischer Kultur. Abschließend kann das entstandene funktionelle Gewebe implantiert oder für weiterführende Experimente verwendet werden. [83, 84]

Zur spezifischen Erzeugung von Herzgewebe eignen sich verschiedene Zellquellen. Für tierbasierte Gewebe erfolgt die Isolation der Kardiomyozyten (CM) meist direkt aus dem nativen Herzgewebe. Da diese Zellen nicht proliferieren, werden diese ohne weitere Expansion auf das Scaffold gegeben und darauf kultiviert [85]. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit und Qualität, verwendet man für den Aufbau von humanem Gewebe selten direkt isolierte Kardiomyozyten, sondern differenziert diese aus Stammzellen. Dies hat zudem den Vorteil einer höheren Zellzahl durch deren Expansion. Als Quellen dienen dabei embryonale Stammzellen [86] und induziert pluripotente Stammzellen (iPSC) [87]. Neben den Kardiomyozyten kommen meist humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) und humane dermale Fibroblasten (hdF) zur Anwendung, in Kombination als Co-Kultur. Dies zeigte eine effizientere Reifung und verbesserte Struktur des Gewebes durch die Bereitstellung von EZM und Differenzierung zu herzähnlichen Zellen und wird daher auch in Zelltherapien

bei Herzinfarkten verwendet [82, 88-92]. Als Stützstruktur werden zum einen dezellularisierte Gewebe verwendet, welche bereits eine gewünschte EZM-Struktur oder -Zusammensetzung aufweisen und bestenfalls ein erhaltendes vaskuläres System bereitstellen [93-95]. Zum anderen generiert man diese Scaffolds synthetisch, wofür verschiedenste Materialien und Fabrikationstechniken zur Anwendung kommen um die bestmögliche Kombination herauszufinden [96-100]. Oft werden dabei fibröse Scaffolds über Elektrospinnen hergestellt, da diese über den Faserdurchmesser EZM-Strukturen nachahmen und über die Faserorientierung die Ausrichtung der Zellen beeinflussen [97, 101]. Durch die dichte Faserstruktur können die Zellen aber nur begrenzt in das Scaffold eindringen, weshalb sich das zu bildende kardiale Gewebe auf die Oberfläche des Scaffolds begrenzt. Für eine verbesserte Dreidimensionalität müssen daher die Scaffolds mit ausreichend großen Poren ausgestattet werden, damit sich das Gewebe auch innerhalb der Struktur bilden kann. Eine weitere Strategie zum kardialen Tissue Engineering verwendet 3D-Druckverfahren, welche die Kardiomyozyten direkt in einer Gelstruktur verarbeitet [96]. Als Scaffoldmaterialien dienen unter anderem EZM-Proteine [86, 102], resorbierbare Polymere [97] oder elektrisch leitfähige Materialien wie zum Beispiel Gold oder Kohlenstoff [85, 103].

1. Einleitung

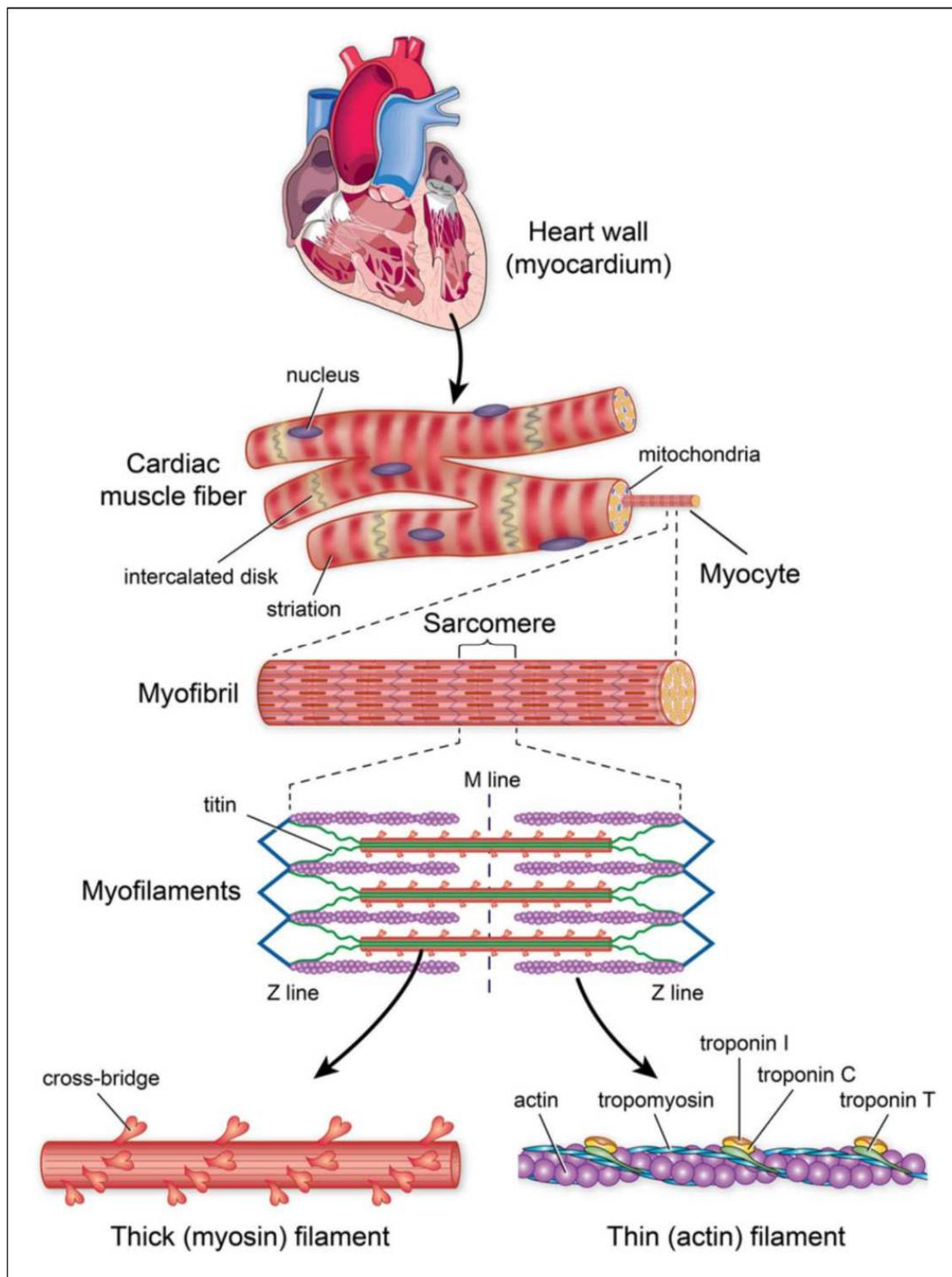


Abbildung 9: Hierarchischer Aufbau von humanem Herzgewebe mit Fokus auf die kardialen Muskelfasern. Reprinted by permission from Springer Nature, Golob et al. [80], copyright (2014).

2. Ziel der Arbeit

Die beschriebenen Nachteile konventioneller Herzschrittmacherelektroden beinhalten deren Verkapselung durch die Fremdkörperreaktion und die dadurch zeitliche Abnahme der Stimulationseffizienz. Als Ursache wurde eine mangelnde Integration in das Herzgewebe identifiziert, was hauptsächlich durch die mechanischen Eigenschaften des Materials und dessen Struktur hervorgerufen wird. Das Ziel dieser Doktorarbeit war es daher, über geeignete Materialien und Fabrikationsmethoden, die strukturellen Eigenschaften von Herzschrittmacherelektroden zu verbessern und eine Gewebeintegration zu begünstigen. Bewertet werden sollten dabei die Migrationsfähigkeit von Zellen, sowie der Aufbau von funktionellem biologischem Gewebe in der Elektrode. Neben dem Integrationspotential galt als weitere Voraussetzung der zu entwickelnden Elektrode, gleichbleibende oder verbesserte elektrische Eigenschaften gegenüber derzeitigen Herzschrittmacher-elektroden bzw. Elektrodenmaterialien zu gewährleisten. Zudem sollte der große Unterschied in den mechanischen Eigenschaften, wie beispielsweise Flexibilität und E-Modul, zwischen derzeitiger Elektrode und dem Zielgewebe verringert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

Tabelle 1: Geräte.

Gerät	Hersteller
Absaugeinrichtung BVC Control	Vacuubrand GmbH + Co. KG, Deutschland
Abzug	Köttermann, Deutschland
Accu-jet pro	Brand, Deutschland
Ag/AgCl Double Junction Referenzelektrode	Metrohm Autolab, Niederlande
Analytische Waage	Kern & Sohn, Deutschland
Autoklaven: DX-45 Bench-top Autoclave Steam sterilizer (Varioklav) Technoclav	Systec GmbH, Deutschland HP Medizintechnik, Deutschland Integra Biosciences AG, Schweiz
Blockstation EG1150 H	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland
CO2-Inkubator BBD 6220	Haraeus, Deutschland
Dampfgarer	Braun/De'Longhi Deutschland GmbH, Neu- Isenburg, Deutschland
Dremel Multifunktionswerkzeug	Dremel, Deutschland
DXR Raman Microscope	Thermo Scientific, USA
Einbett-Automat Microm STP 120	Microm International GmbH, Deutschland
Einbettkassetten-Drucker VCP-5001	Vogel Medizintechnik, Deutschland
Eismaschine AF-80	Scotsman Ice Systems, USA
Eppendorf Pipetten: 0,25 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl	Eppendorf, Deutschland
Flaschendruckminderer BASELINE ® Typ C106/2 7 bar	Linde, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr-International Deutschland GmbH, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C TS Series	Thermo Scientific
Hellfeld-Mikroskop Axio Lab.A1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland

3. Material und Methoden

Gerät	Hersteller
Hochspannungsquelle	Gamma High Voltage Research, USA
Injector für 48 ml Doppelkartuschen	Dreve Otoplastik, Deutschland
Konfokal-Mikroskop TCS SP8	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Deutschland
Kritisch-Punkt-Trocknung CPD 030	BAL-TEC
Kryoeinfriergerät „Mr. Frosty“	VWR, Darmstadt, Deutschland
Kühlraum, 4 °C	Genheimer, Deutschland
Luftfeuchtesensor, B+B Thermo-Technik Feuchte- und Temperatur-Sensor-Modul	Conrad Electronic
MEA-Chip 8 x 8	Owane Biosciences SA , Schweiz
Mikrotom SM 2010R	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland
Muffelofen, L08/14	Nabertherm, Deutschland
Multi Electrode Array (MEA)	Multi Channel Systems MCS GmbH, Deutschland
Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Multimeter MT-52	Voltcraft, Deutschland
Objekträger-Schnelltrockner TDO 66	Medite GmbH, Deutschland
Organbad mit Kraftsensor DMT Myograph PL3504 B16	AD Instruments, Deutschland
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 40 C	Zeiss, Deutschland
Pico Niederdruckplasmaanlage	Diener electronic GmbH + Co. KG, Deutschland
Potentiostat PGSTAT204	Metrohm Autolab, Niederlande
REM Supra 25	Zeiss, Deutschland
Rohrofen R50/250/12	Nabertherm, Deutschland
Sauerstoffkonzentrator Kröber O2	Kröber Medizintechnik GmbH, Deutschland
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Fisher Scientific AG, Schweiz
Simatic Controller	Siemens, Deutschland
Spritzenpumpe, Modell Nr. 5400060-B	World Precision Instruments, USA
Sputtercoater EM ACE600	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Deutschland
Gerät	Hersteller

Stickstofftank -180 °C MVE TEC 3000	MVE Biological Systems, USA
Stimulator HC FE155	AD Instruments, Deutschland
Trockenofen	Memmert, Deutschland
Ultraschallbad Branson 8510	Branson Ultraschall GmbH, Deutschland
Ultraschallzerstäuber Ultrastar	Honeywell, Detuschland
VCA 2000 video contact angle goniometer	AST products, USA
Vortexer Genie 2	Carl Roth, Deutschland
Waagen EG 2200-2NM ABJ 220-4M Cubis® Ultramicro Balance	KERN & SOHN GmbH, Deutschland KERN & SOHN GmbH, Deutschland Satorius AG, Deutschland
Wasserbad Alpha	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Deutschland
Wasserbad für Paraffinschnitte	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Deutschland
XEED 3D-Drucker	Leapfrog 3D Printers, Niederlande
Zwick Universalprüfmaschine	Zwick Roell, Ulm, Deutschland

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Händler
Aluminium-Folie PACLAN	CeDo GmbH, Deutschland
Autoklavierbeutel	A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Bohrer 0,5 mm und 1 mm	PROXXON, Trier, Deutschland
Deckgläschen für Objektträger (24 x 60 mm)	Menzel-Gläser , Deutschland
Edelstahlkanüle 1mm Innendurchmesser	A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Einbettkassetten	Klinipath, Niederlande
Fettstift	Dako, Deutschland
Filterpapier zum Einbetten	Labonord, Deutschland
Fusselfreie Tücher	A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Glas-Petrischale	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Verbrauchsmaterial	Hersteller/Händler

3. Material und Methoden

Graphitfolie	Goodfellow, Deutschland
Handschuhe, Peha-soft, nitrile	Paul Hartmann AG, Deutschland
Kryoröhrchen (1,8 ml), Nunc™	VWR, Deutschland
Kunststoffpetrischalen	Greiner Bio-One, Deutschland TPP Techno Plastik Products AG, Schweiz
Magnetfolie DIN A4 - weiß	magnets4you GmbH, Deutschland
Magnetring 13,0 mm x 9,0 mm x 1,0 mm	magnets4you GmbH, Deutschland
Mischkanülen, DM: 6,3 mm	Dreve Otoplastik, Deutschland
Objekträger Polysine™ (25 · 75 · 1 mm)	Langenbrinck, Deutschland
Parafilm® M	Carl Roth GmbH, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand, Deutschland
Pipettenspitzen: 0,1-10 µl, 10-100 µl, 100-1250 µl	Eppendorf, Deutschland
Proto-Pasta HAT-PLA High Performance Filament 1.75 mm, Iridescent Ice	filamentworld, Deutschland
Reaktionsgefäße: 1 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Deutschland
REM Klebepads	Plano GmbH, Deutschland
REM-Probenteller	Plano GmbH, Deutschland
Schlauchklemmen	Carl Roth GmbH, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Deutschland
Skalpellklingen	Bayha, Deutschland
Spritzen: 3 ml, 5 ml, 10 ml	BD Bioscience, Deutschland
Teflonband (12 m · 12 mm · 0,075 mm)	Hydrasun Ltd, GB
Wägeschalen	A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Zellkultur Multi-Wellplatten: 6-, 12-, 24-, 96-Well	TPP Techno Plastik Products AG, Schweiz
Zellkulturflaschen, T150, T75, T25	TPP Techno Plastik Products AG, Schweiz
Zellsieb 70 µm	Greiner Bio-One, Deutschland
Zentrifugen-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Deutschland

Tabelle 3: Labormaterial.

Labormaterial	Hersteller/Händler
Analysensieb 125 µm	Retsch, Deutschland
Bechergläser	Schott, Deutschland
DURAN® Gaswaschflasche	Schott AG, Deutschland
Exsikkator aus Glas	Hartenstein, Deutschland
Färberahmen aus Glas	Mercateo, Deutschland
Glaspipetten: 5 ml, 10 ml, 25 ml	Brand, Deutschland
Glassy-Carbon Stab (Gegenelektrode)	Metrohm Autolab, Niederlande
Kälteschutz-Handschuhe	VWR, Deutschland
Laborglasflaschen: 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml	Schott, Deutschland
Mörser	Hartenstein, Deutschland
Neubauerzählkammer	Marienfeld GmbH & Co. KG, Deutschland
Pinzette	Hartenstein, Deutschland
Skalpellhalter	Bayha, Deutschland
Spatel	Hartenstein, Deutschland
Sprühflaschen	Hartenstein, Deutschland
Trichter	Hartenstein, Deutschland
Zentrifugenröhrchen-Ständer	neoLab, Deutschland

Tabelle 4: Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller	Nummer
Aceton	Carl Roth GmbH, Deutschland	5025.5
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH, Deutschland	90604-29-8
Antikörper-Verdünnungspuffer	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG, Deutschland	ALI20R500
Argon 5.0; 50 L	Rießner-Gase GmbH, Lichtenfels, Deutschland	
Chemikalie	Hersteller	Nummer

3. Material und Methoden

L-Ascorbyl-2-Phosphat, Mg-Salz	Sigma-Aldrich, Deutschland	A8960-5G
B27	Gibco® Life TechnologiesTM, Deutschland	17504-044
CO ₂ [l], 50 L	Rießner-Gase GmbH, Lichtenfels, Deutschland	
DAPI-Fluoromount-G™	Southern-Biotech, USA	SBA-0100-20
Descosept® AF	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld, Deutschland	00-311-050
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deutschland	D2438-50ML
Dispase	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	17105-041
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco® Life TechnologiesTM, Deutschland	10564011
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS-)	Sigma-Aldrich, Deutschland	D8537
Eindeckmittel Entellan	Merck, Deutschland	1079600500
Eisen-II-sulfat-Heptahydrat (FeSO ₄ x 7 H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Deutschland	215422-250G
Eosin 1 % wässrige Lösung	Morphisto GmbH, Deutschland	861006-25G
Eserserum	Sigma-Aldrich, Deutschland	D9663-10ML
Ethanol, vergällt (99,8 %)	Carl Roth, Deutschland	T171.2
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA-Na ₂ x 2 H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Deutschland	E5134
FCS LOT: BS226503 LOT: BS210601.5	Bio & SELL GmbH, Feucht, Deutschland	FCS.ADD.0500
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Deutschland	7513-100ml
Hämatoxilin	Carl Roth, Deutschland	3861.1
Incidin® plus	Ecolab, Deutschland	3011520
Isopropanol	Carl Roth, Deutschland	2316.5
Kollagenase	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland	10103578001
Natrium-L-Lactat	Sigma-Aldrich, Deutschland	L7022-5G
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Deutschland	A4544-25G
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich, Deutschland	D4551-250ML
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Deutschland	S7653-1KG
Chemikalie	Hersteller	Nummer

Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich, Deutschland	D6750-500G
Paraffin	Carl Roth, Deutschland	6642.6
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe, Deutschland	P11-010
Polyacrylnitril	Sigma-Aldrich, Deutschland	181315-50G
Roti®-Histofix 4%	Carl Roth, Deutschland	P087.1
RPMI 1640	life technologies GmbH, Deutschland	11875093
Silikon Biopor AB	Dreve Otoplastik GmbH, Deutschland	28400M
Triton X-100	Carl Roth, Deutschland	3051.2
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deutschland	T8154-100ML
Tween-20	VWR, Deutschland	8.22184.0500
Trypsin/EDTA-Stammlösung, 0,5%	Invitrogen, Deutschland	15400-054
Xylol	Carl Roth, Deutschland	9713.3
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, Deutschland	W230618- 1KG-K
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deutschland	M31148

Tabelle 5: Antikörper.

Antikörper	Hersteller	Bestellnummer
Alpha Actinin	Sigma-Aldrich, Deutschland	A7811-100UL
CD90	abcam, Deutschland	2695-1
cardiac Troponin C	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Deutschland	sc-48347
cardiac Troponin T	Sigma-Aldrich, Deutschland	SAB1411359-100UG
Donkey anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 488	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	A-21202
Donkey anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 555	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	A-31570
Donkey anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 488	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	A-21206
Donkey anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 555	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	A-31572
Antikörper	Hersteller	Bestellnummer

3. Material und Methoden

Alexa Fluor® 555 Phalloidin	Cell Signalling Technology, Deutschland	8953S
Vimentin	abcam, Deutschland	92547

Tabelle 6: Präputium-Biopsate zur Isolation von hdF.

Biopsat-Nummer	Geschlecht	Alter
hdF 26	männlich	5 Jahre
hdF 30	männlich	15 Monate
hdF 16-018	männlich	Keine Angabe
hdF 16-020	männlich	Keine Angabe

Tabelle 7: Software.

Software	Beschreibung	Hersteller
BZ Analyzer	Bildbearbeitung am Keyence Mikroskop	KEYENCE Deutschland GmbH, Deutschland
ImageJ	Bildbearbeitung und Bildanalyse	Wayne Rasband, NIH, USA
LAS X Life Science	Bildbearbeitung am LSM	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Deutschland
Microsoft Excel 2013	Tabellenkalkulation	Microsoft®, USA
Microsoft Visio 2013	Zusammenstellung der Abbildungen	Microsoft®, USA
Microsoft Word 2013	Textverarbeitung	Microsoft®, USA
Nova 2.1	Mess- und Auswertungssoftware für Potentiostat	Metrohm Autolab, Niederlande
Origin Pro 8.6	Datenanalyse und graphische Darstellung	OriginLab Corporation, USA

3.2. Herstellung der Kohlenstofffaser-Scaffolds

3.2.1. Elektrospinnen von Polyacrylnitril-Fasern mit verschiedenen Durchmessern und deren Umwandlung zu Kohlenstofffasern

Zur Generierung von Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds ist der erste Schritt die Faserherstellung durch Elektropinnen einer PAN-Lösung. Als einflussreichster Faktor, ist es über die Konzentration dieser Spinnlösung möglich, den Durchmesser der resultierenden Nanofasern einzustellen. Da jedes Elektrospinn-System etwas anders agiert, wurden drei Konzentrationen zur Spinnverarbeitung angesetzt. Um eine Variation an verschiedenen Durchmessern zu testen, fiel die Wahl auf 8, 10 bzw. 12 Gewichtsprozent (%wt) PAN Lösungen. Dazu wurde das PAN-Pulver abgewogen und mit 10 ml N,N-Dimethylformamid (DMF) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt. Um eine homogene Spinnlösung zu erreichen, musste die Mischung aus Polymer und Lösungsmittel zunächst 48 h aufquellen. Bis zur vollständigen Homogenisierung der Lösung wurde das Zentrifugenröhrchen für mindestens 2 h bei 50 °C in ein Ultraschallbad gegeben. Eine Vlieskontrolle der Lösung bewertete die Homogenität der Lösung. Eine Verlängerung der Inkubation im Ultraschallbad war dabei notwendig, bei Auffinden eines ungleichmäßigen Fließverhaltens der Lösung. Der Spinnvorgang erfolgte in einer eigens gebauten Elektrospinn-Anlage mit zwei gegenüber ausgerichteten Spritzenpumpen und einer zentral eingebauten rotierenden Walze, mit einem Umfang von 33 cm (Abbildung 10). Die Erdung der Walze über die Hochspannungsquelle erfolgte über einen Gold-Schleifkontakt am hinteren Ende der rotierenden Welle. Die Drehzahl betrug unter Standardbedingungen 1600 U/min, was einer Oberflächengeschwindigkeit von 8,8 m/s entspricht. Für den Spinnvorgang wurde für jede Seite eine 5 ml Spritze mit ca. 2 ml Spinnlösung befüllt und mit einer Edelstahl-Kanüle mit 1 mm Durchmesser versehen. Nachdem die Spritzen in den Spritzenpumpen verankert wurden, erfolgte die Kontaktierung der Kanüle mit der Hochspannungsquelle über eine Klemme. Für gleiche Spinnprozessbedingungen betrug die relative Luftfeuchtigkeit während des Spinnprozesses zwischen 20 und 40 %. Die angelegte Spannung und der eingestellte Durchfluss an den Spritzenpumpen wurden individuell für jede Lösungskonzentration eingestellt:

3. Material und Methoden

- 8 %wt: Spannung 10 kV, Durchfluss 0,4 ml/h;
- 10 %wt: Spannung 10 kV, Durchfluss 0,4 ml/h;
- 12 %wt: Spannung 7 kV, Durchfluss 0,3 ml/h

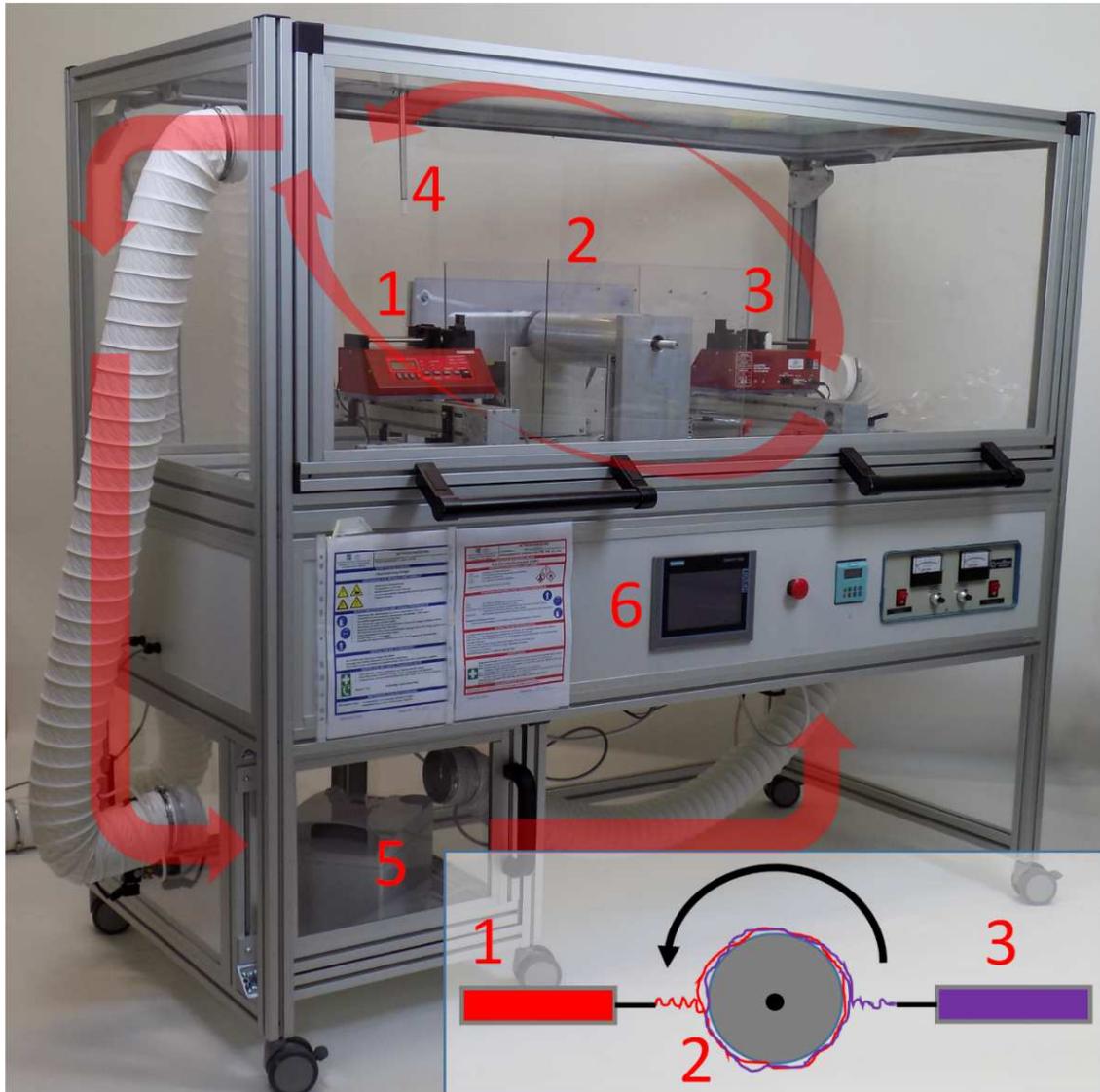


Abbildung 10: Aufbau und Komponenten des Elektrospinners. Bidirektionales Elektrosplennen in einem abgeschlossenen System mit Steuerung der Luftfeuchtigkeit. Die Pfeile zeigen die Führung des Luftstroms, der durch eine Apparatur zur Einstellung der Luftfeuchtigkeit geleitet wird. Das Insert verdeutlicht das Prinzip des bidirektionalen Elektrosplennens. 1 und 3 sind die Spritzenpumpen, welche die Spinnlösungen bereitstellen. 2 ist eine rotierende Walze, auf welche die Fasern gesponnen werden. 4 ist der Luftfeuchtesensor. 5 ist die Klimakammer, in welcher entweder trockene Luft eingeleitet wird, oder mittels Ultraschall-Zerstäuber Feuchtigkeit erzeugt wird. 6 ist die Benutzeroberfläche zur Einstellung der Prozessparameter, wie Luftfeuchtigkeit (über einen Simatic-Controller), Drehzahl der rotierenden Walze und die Spannung für den Spinnprozess. Abbildung wurde publiziert von Radakovic et al. [104].

Das abschließende Anfeuchten des Faservlieses auf der Walze mit Ethanol (EtOH) vereinfachte das Abnehmen des Vlieses von der Walze. Für den Stabilisierungsvorgang bei 250 °C in einem Muffelofen L08/14, wurden die Fasern mit Gewichten über einem Rahmen aufgehängt, um eine stetige Zugspannung in den Fasern während der Temperierung zu gewährleisten. Die Heizrate des Ofens betrug 2,5 Kelvin/Minute (K/min) bis 250 °C. Bei dieser Temperatur erreichte das Ofenprogramm ein Plateau, welches die Temperatur für 2 h konstant hielt. Abschließend kühlte der Ofen ohne aktive Kühlung über ca. 3 h auf Raumtemperatur ab. Die abschließende Lagerung der stabilisierten Fasern erfolgte in Kunststoffpetrischalen bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss.

Die Karbonisierung der Faserscaffolds bei 1000 °C erfolgte in einem Rohrofen R50/250/12, mit einem Quarzglasrohr von 4 cm Innendurchmesser. Laut Hersteller ist die Zone mit konstanter Temperatur in der Mitte des Ofens ca. 8 cm lang. Für diese Maße mussten die stabilisierten Faservliese zunächst angepasst werden. Die längere Ausdehnungsrichtung war dabei die Vorzugsorientierung der Nanofasern im Vlies. Zu Beginn des Temperierungsprozesses erfolgte der Austausch der Atmosphäre im Quarzglasrohr mit Inertgas, durch einen Argonfluss von 50 l/h für 15 min. Anschließend startete das Temperierungsprogramm mit einer Heizrate von 8 K/h auf 1100 °C. Da der Temperatursensor außerhalb des Quarzglasrohres lokalisiert ist, entspricht die maximale Temperatur innerhalb des Rohres laut Hersteller etwa 1000 °C. Zur vollständigen Karbonisierung der Fasern hielt der Ofen diese Temperatur für 1 h. Abschließend erfolgte eine passive Abkühlung des Ofens und abschließend die Probenentnahme ab etwa 200 °C im Rohr. Während der gesamten Temperierung betrug der Argonfluss etwa 20 l/h, um noch einen leichten Überdruck im Ofenrohr zu gewährleisten. Des Weiteren wurden die Abgase während des gesamten Prozesses durch eine Eisensulfat (FeSO₄)-Lösung geklärt, um giftige Blausäure zu binden. Die gebundene Blausäure zeigte sich am darauffolgenden Tag durch die Bildung von Berliner Blau.

3.2.2. Salz-Modifikation des Faser-Scaffolds

Die Modifikationen des Fasernetzwerkes mit Natriumchlorid sollten dazu dienen, das Fasernetzwerk zu verzerren und die Maschenweite zu erhöhen. Dabei ergaben sich zwei Möglichkeiten, das NaCl in die Vliese einzubringen.

1. In Form einer gesättigten NaCl-Lösung:

Diese Modifikation erfolgte nach der Stabilisierung und damit vor der Karbonisierung. Dafür wurde das Faservlies zwischen zwei Färberahmen aus Glas eingespannt und immobilisiert. Anschließend benetzten 2 ml einer gesättigten NaCl-Lösung (30 % in vollentsalztes Wasser (VE-Wasser)) das Faservlies. Beim Trocknungsprozess über Nacht bildeten sich nach und nach sichtbare Salzkristalle im Fasernetzwerk.

2. In Form von NaCl-Partikeln definierter Größe:

Die zweite Möglichkeit basierte auf der Technik des Salt Leaching Prozesses. Dafür erfolgte das Einbringen der NaCl-Partikel während des Spinnprozesses. Zunächst wurde die Partikelgröße des NaCl mit Hilfe eines Mörsers und drei verschiedenen Siebgrößen eingestellt. Somit entstanden drei Größenfraktionen hergestellt: $<70\ \mu\text{m}$, $70\text{-}125\ \mu\text{m}$ und $>125\ \mu\text{m}$. Die Einarbeitung der Salzpartikel fand während einer kurzen Unterbrechung des Spinnvorgangs alle 12 min statt. Das Anfeuchten der Walze, bzw. der bereits gesponnenen Fasern, mit Ethanol erzeugte einen Haftvermittler für die NaCl-Partikel. Ein Zentrifugen-Röhrchen mit eingeborten Löchern im Deckel (Lochgröße: 0,5 mm für NaCl-Partikel $<70\ \mu\text{m}$; 1 mm für die größeren Partikelfraktionen) diente als Salzstreuer, welcher die NaCl-Partikel möglichst homogen auf der Walze verteilte. Anschließend war es erforderlich, die Spinnkammer zu durchlüften, um die Bildung einer explosionsfähigen Atmosphäre unter Hochspannung zu vermeiden. Dieser Vorgang aus Spinnen, Feuchten und Streuen wiederholte sich 15-mal, um eine ausreichende Dicke des Scaffolds zu erreichen. Beim abschließenden Abnehmen des Faservlieses konnte meist nicht die komplette Dicke des Scaffolds von der Walze abgenommen werden, da die untersten Faserschichten, durch das angelöste Salz, stark hafteten.

Zur Bestimmung der Masse des eingesponnen Salzes wurde ein Teil des Scaffolds gewogen, mit VE-Wasser gespült, im Trockenschrank bei 60 °C getrocknet und abschließend die Differenz über erneutes wiegen berechnet. Die Stabilisierung der Faservliese mit NaCl-Partikel erfolgte mit den gleichen Einstellungen der vorigen PAN-Fasern.

Die Parameter der Karbonisierung wurden ebenfalls von den reinen PAN-Faservliesen übernommen. Lediglich die Zeit mit maximaler Temperatur (1000 °C) verlängerte sich auf 3 h, um das vollständige verdampfen des NaCl zu gewährleisten.

3.2.3. Oberflächenaktivierung durch Sauerstoff-Plasma

Zur Aktivierung der Faseroberfläche von Scaffold 12P wurde das Scaffold in die Vakuumkammer einer Pico Niederdruckplasmaanlage platziert und auf einen Druck 0,12 mbar evakuiert. Die Erzeugung der Sauerstoff-Atmosphäre erfolgte durch spülen der Kammer mit 50 Standard Kubikzentimeter (sccm) Sauerstoff über einen Zeitraum von 2 min, welcher ein Sauerstoffkonzentrator Kröber O2 aus der Umgebungsluft generierte. Die folgende Plasmabehandlung mit einer Leistung von 500 W und einer Frequenz von 100 kHz dauerte 30 s an. Zur abschließenden Probenentnahme durchspülte die Anlage die Kammer mit Umgebungsluft und belüftete diese auf Umgebungsdruck.

3. Material und Methoden

3.3. Material Charakterisierung

3.3.1. Raster-Elektronen-Mikroskopie

Aufnahmen mittels REM erfordern ein trockenes Material sowie eine leitfähige Oberfläche. Während das Elektroden-Scaffold diese Eigenschaften idealerweise besitzt, müssen biologischen Proben erst für die REM präpariert werden:

Fixierung und Entwässerung:

Um die Fixierung von löslichen Proteinen aus dem Zellkulturmedium zu vermeiden, wurden die Proben zunächst zwei Mal in PBS⁻ gewaschen. Eine anschließende Inkubation in 4 % Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (Histofix) für 15 min führte zu einer Fixierung des biologischen Anteils der REM-Probe. Zwei weitere Waschschriffe mit phosphatgepufferter Salzlösung ohne Calcium und Magnesium (PBS⁻) (5 min Inkubation) entfernten restliches PFA in der Probe. Die Entwässerung der Proben und Austausch mit Aceton erfolgte über eine aufsteigende Acetonreihe. Diese Reihe bestand aus 30 %, 50 %, 70 %, 90 % und 6 mal 100 % Aceton in VE-Wasser mit einer Inkubationszeit der Proben von jeweils 30 min. Unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit waren die Proben im letzten Aceton-Medium, bis zur Kritisch-Punkt-Trocknung einige Tage lagerfähig.

Kritisch-Punkt-Trocknung:

Zur Kritisch-Punkt-Trocknung diente eine CPD 030. Zur Vorbereitung des Prozesses wurden Proben zügig in die Druckkammer überführt und bis zum oberen Rand mit Aceton überschichtet. Nach einer sorgfältigen Verschießung der Kammer kühlte diese auf 8 °C ab bis die Einleitung von flüssigem Kohlenstoffdioxid (CO₂) startete. Der steigende Druck führte zu einer Reduzierung des Acetonvolumens, dessen Differenz das eingeleitete flüssige CO₂ langsam ausglich. Unter dauerhaftem Rühren für 5 min erfolgte die Vermischung des Acetons und des CO₂. Zur schrittweisen Erhöhung des CO₂-Anteils wurde ca. 50 % der Flüssigkeit aus der Kammer abgelassen und wieder mit flüssigem CO₂ nachgefüllt. Durch 10 Wiederholungen dieses Vorgangs gewährleistet der Hersteller den ausreichenden Austausch von Aceton mit flüssigem CO₂ für den Vorgang der Kritisch-Punkt-Trocknung. Die zur Hälfte gefüllte Druckkammer erwärmte sich dabei auf 40 °C mit dem

einhergehenden Übergang zum überkritischen Zustand des CO₂ bei etwa 31 °C und 74 bar. Um die trockenen Proben entnehmen zu können erfolgte eine langsame Reduzierung des Drucks über ein Nadelventil mit einem maximalen Gasfluss von 5 L/h.

Platin-Beschichtung und REM:

Zur Generierung einer leitfähigen Oberfläche zu Ableitung der Elektronen während der REM, wurden die Proben auf REM-Probenhalter mit leitfähigen Klebepads fixiert und mit 1 nm Platin in einer EM ACE600 besputtert

Die REM-Aufnahmen erfolgten mit einer Zeiss Supra 25. Als Parameter für die Bildgebung diente eine 2 kV Beschleunigungsspannung und die Verwendung des InLens SE1 Detektors.

Zur Generierung der Falschfarbenbilder aus den REM-Aufnahmen, wurde ein Hintergrundbild über ImageJ erzeugt, welches lediglich die zellulären Bestandteile enthält. Dafür erfolge zunächst die Erstellung eines generellen Hintergrundbildes, durch das ImageJ-Werkzeug "Subtract Background" mit einem Radius von 10 Pixel mit der anschließenden Subtraktion des Hintergrundbildes vom Originalbild. Daraus entstand ein Bild, welches hauptsächlich die hellen Faserstrukturen anzeigte. Die Subtraktion dieses Faserbildes vom generellen Hintergrundbild erzeugte ein Hintergrundbild, welches nur die zellulären Bestandteile enthält. Zur Erzeugung des Falschfarbenbildes wurde abschließend das Hintergrundbild mit den zellulären Bestandteilen, mit einem leichten Farbton, über das in Graustufen dargestellte Originalbild gelegt.

3.3.2. Vermessung der Maschen

Über ImageJ erfolgten die Vermessungen der Vliesmaschen hinsichtlich der Durchtrittsfläche und deren Zirkularität. 8-Bit REM-Bilder mit einer 5000-fachen Vergrößerung wurden in das Programm geladen. Die Programmfunktion „Analyze Particles“ diente zur Ausmessung der Maschen. Dafür musste das Bild zunächst in ein binäres Bild umgewandelt werden. Ein Helligkeitswert von 40 setzte man dabei

3. Material und Methoden

als Schwellenwert fest. Pixel unterhalb dieser Helligkeit wurden dadurch als schwarz, Pixel über diesem Schwellenwert als weiß dargestellt. Daraus ergab sich ein binäres Bild, welches die Maschen in schwarz über die Funktion „Analyze Particles“ ausmessen ließ. Um Rauscheffekte herauszufiltern erfolgte die Aufnahme der Maschengrößen ab einer minimalen Fläche von $0,1 \mu\text{m}^2$. Die Maschen von jeweils 10 Bilder jedes Scaffoldtyp wurden vermessen, was einer Fläche von etwa $0,02 \text{ mm}^2$ entspricht.

3.3.3. Raman Spektroskopie

Die Aufnahme der Raman Spektren erfolgte mit einem DXR Raman Microscope mit einer Laserwellenlänge von 780 nm. Die Messparameter entsprachen einer Laserenergie von 5 mW, einer Spaltöffnung von 50 μm , sowie ein 50x Objektiv zur Fokussierung des Messpunktes. Mit der Software Origin wurde anschließend das, für Kohlenstoff, charakteristische Spektrum zwischen $950 - 1800 \text{ cm}^{-1}$, über eine Peak-Analyse untersucht. Die Positionen mit den Wellenzahlen 1580 (G), 1350 (D1), 1620 (D2), 1500 (D3), 1200 cm^{-1} (D4), gaben dem Programm die Startpunkte der Peaks für den Fit vor. Als weitere Fit-Parameter diente die Auswahl der Verteilungskurven: eine Lorentz-Verteilung für die Banden G, D1, D2 und D4 sowie eine Gauß-Verteilung für die Bande D3 (nach Sadezky et al. [58]).

3.3.4. Mechanische Testung

Spannungs-Dehnungs-Kurve:

Zur Erstellung von Spannungs-Dehnungs-Kurven erfolgten Zugversuche der Kohlenstofffaser-Scaffolds in einer Zwick Universalprüfmaschine. Eine 100 N Kraftmessdose diente dabei als Kraftaufnehmer. Wegen des 3 cm Abstandes zwischen den Klemmen, wurden die Faservliese auf eine Länge von 5 cm und einer Breite von ca. 0,5 cm zugeschnitten. Die genaue Messung der Breite erfolgte über die Software ImageJ über Fotos der einzelnen Scaffolds. Die Prüfnorm ASTM D 882-02 diente als Grundlage zur Auswahl der Zuggeschwindigkeit, welche für die verwendete Probengröße und dem erwartetem Dehnungsverhalten eine

Separationsgeschwindigkeit der Klemmen von 1 mm/min vorschlägt. Zur Umrechnung der Kraft in die Spannung der Querschnittsfläche ist die Festkörperdicke des Scaffolds erforderlich, welche über folgender Gleichung bestimmt werden konnte:

$$\text{Festkörperdicke} = \frac{\text{Masse}}{\text{geometrische Oberfläche} * \text{Dichte}}$$

Die Dichte wurde aus Mittal et al. [105] als theoretischer Wert entnommen.

Biegeversuche zur Bestimmung der Flexibilität:

Die Bestimmung der Flexibilität erfolgte durch das Biegen der Scaffolds um Metallstäbe mit Durchmessern von 13 bis 1,5 mm. Beginnend mit dem größten Durchmesser, wurden die Kohlenstoff -Faservliese fortlaufend um den nächst kleineren Metallstab gebogen, bis das Scaffold mechanisch Versagte bzw. visuell Schäden aufwies. Diese Messung erforderte 10 Proben von jedem getesteten Scaffoldtyp, mit einer Breite von 7 mm und einer ausreichenden Länge.

3.3.5. Kontaktwinkelmessung

Die Kontaktwinkelmessung erfolge an einem VCA 2000 video contact angle goniometer auf quadratischen Faservliesen mit etwa 1 cm Kantenlänge. Über deine Fixierung des Scaffold, sollten die Positionsänderung durch elektrostatische Wechselwirkungen oder Luftzüge verhindert werden. Das einspannen über eine Klemmvorrichtung konnte aber nicht angewendet werden, da dies die Betrachtung und Messung von der Seite behindert. Durch die Platzierung des Vlieses auf einen Magnetring (Innendurchmesser 9 mm) und dessen Festsetzung mit vier kleinen Stücken Magnetfolie (1-3 mm³) an den Ecken, erzeugte zwei Messbare Ausdehnungsrichtungen auf dem Scaffold. Bei der Messung wurde ein 3 Mikroliter (µl) Tropfen VE-Wasser an einer Kanüle erzeugt, auf das Faservlies übertragen und nach 10 s der Kontaktwinkel gemessen.

3. Material und Methoden

3.4. Elektrische Charakterisierung

3.4.1. Leitfähigkeit

Zur elektrischen Leitfähigkeitsbestimmung der Kohlenstofffaser-Scaffolds ist es erforderlich, alle Fasern an beiden Enden des Scaffolds zu kontaktieren. Dafür wurde ein Aufbau entwickelt, welcher die Fasern an der Kontaktseite zusammenpresst und einen elektrischen Zugang zu zwei gegenüberliegende Seiten ermöglicht (Abbildung 11). Die Vorzugsorientierung der Fasern im Scaffold, war in jedem Messvorgang gleich der Messrichtung. Die Messung erfolgte über ein Multimeter MT-52 an den herausragenden Aluminium-Folie-Streifen (Abbildung 11D).

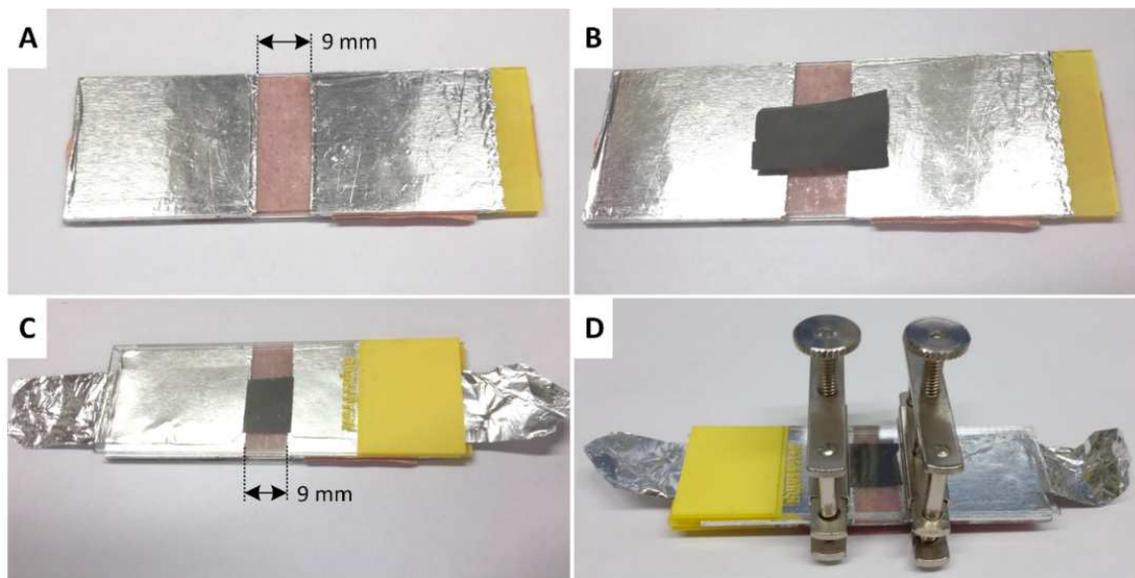


Abbildung 11: Aufbau zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit. (A) Zwei Objektträger wurden übereinander gelegt und mit Aluminium-Folie zwei Kontaktflächen erzeugt. Die spätere Messung erfolgt über den 9 mm breiten Spalt, welcher elektrisch isolierend ist. (B) Auf den Spalt wird das Faserscaffold gelegt. (C) Auf dieses Scaffold wurden auf beiden Seiten zwei Streifen Aluminium-Folie gelegt, um den elektrischen Kontakt von beiden Seiten zu gewährleisten. Diese Streifen ragen über die Länge des Objektträgers hinaus und dienen als Kontakt für die anschließende Messung. Auf diesen Aufbau werden zwei weitere Objektträger gelegt. (D) Zur Fixierung und Herstellung des optimalen elektrischen Kontaktes zu allen Fasern wurde der Aufbau mit zwei Schlauchklemmen zusammen gepresst.

Zur Bestimmung der spezifischen Leitfähigkeit dienten folgende Formeln:

$$\sigma = \frac{l}{R \cdot A_Q}; \quad A_Q = d_t \cdot b; \quad d_t = \frac{m}{A_g \cdot \rho}$$

Mit σ : spezifische Leitfähigkeit; l : Länge; R : elektrischer Widerstand; A_Q : Querschnittsfläche; d_t : theoretische Dicke; m : Masse; A_g : geometrische Oberfläche; ρ : Dichte; b : Breite

3.4.2. Impedanz Spektroskopie

Um die Kohlenstofffasern über eine definierte Fläche in einem Elektrolyt standardisiert vermessen zu können, wurde eine Einspannung entworfen, welche zusätzlich den Kontakt verschiedener leitfähiger Materialien unter Elektrolytbenetzung verhindert. Zur Herstellung dieser Einspannung (Abbildung 12) diente ein XEED 3D-Drucker mit PLA-Filament. Mit dieser Einspannung erfolgt der elektrische Kontakt zu den Fasern über ein Streifen Graphitfolie und kann damit Reaktionen zwischen verschiedenen leitfähigen Materialien verhindern. Des Weiteren wird der Kontakt über beide Seiten mit Druck auf das Scaffold hergestellt und sichert damit die komplette Kontaktierung über die Dicke des Scaffolds (Abbildung 12C). Die Maße der Proben für die Impedanzmessung betragen 7 mm in der Breite sowie 20 mm in der Länge. Die Vorzugsorientierung der Fasern entsprach der Längenrichtung. Eine 30 minütige Inkubation in VE-Wasser vor der Messung sollte die Benetzung der Faseroberfläche im Vorfeld gewährleisten. Anschließend wurde das Scaffold im nassen Zustand in die Einspannung eingebaut und nochmal 10 min im Messelektrolyt (PBS-) inkubiert. Die Messung erfolgte in einem Drei-Elektroden-Aufbau mit einem Potentiostat PGSTAT204. Als Gegenelektrode diente ein Glassy-Carbon Stab und als Referenz eine Silber/Silberchlorid (Ag/AgCl) Double Junction Elektrode. Der gemessene Frequenzbereich lag zwischen 0,1 und 100000 Hz mit einer Spannungsamplitude von 10 mV. Als Vergleichsmaterialien für die Impedanzmessung dienten eine 2 cm² große Platinfolie sowie TiN-Beschichtung auf einem Objektträger. Die Software Nova 2.1 fittete abschließend die Impedanzkurven anhand der Ersatzschaltbilder in Abbildung 24E, zur Bestimmung der Oberflächenkapazität und des Ladungstransfer-Widerstandes.

3. Material und Methoden

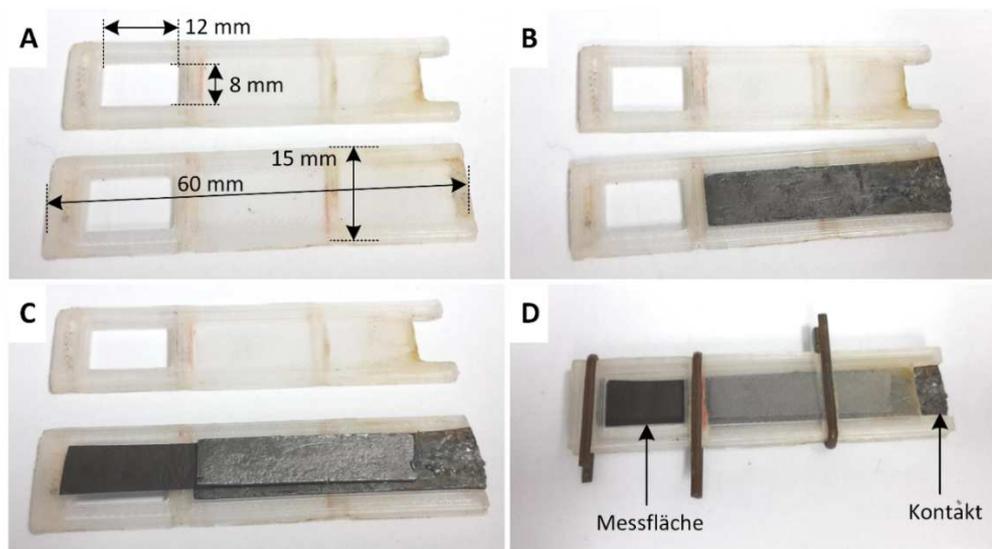


Abbildung 12: Aufbau zur Messung der Impedanz und des Cyclovoltagramms. (A) 3D-gedruckte Einspannung mit den Abmessungen 60 x 15 mm und einem Messfenster von 12 x 8 mm. (B) Um elektrochemische Reaktionen an der elektrischen Kontaktfläche zu vermeiden, wurde der Kontakt zu den Kohlenstoffasern über eine Graphitfolie hergestellt. Diese wurde in die Einspannung gelegt. In dieser Stelle befindet sich eine Vertiefung von 0,5 mm. (C) Anschließend wurde das Faserscaffold aufgelegt. Für einen beidseitigen elektrischen Kontakt wurde ein weiterer Streifen Graphitfolie aufgelegt. (D) Abschließend wurde der Deckel der Einspannung aufgelegt und mittels dreier abgesägter Haarklammern fixiert. Am oberen Ende befindet sich eine Aussparung für den elektrischen Kontakt zum Messgerät.

3.4.3. Cyclovoltametrie

Die Cyclovoltametrie erfolgte mit dem gleichen Aufbau und Messgerät, wie die Impedanzmessungen in 3.4.2.. Die Messung erfolgte im Spannungsbereich von -1 und 1 V (vs. Ag/AgCl) sowie mit Vorschubgeschwindigkeiten von 0,1; 0,05; 0,03; 0,01 und 0,005 V/s. Als Elektrolyt diente PBS⁻. Mit allen Vorschubgeschwindigkeiten wurden 3 Durchgänge aufgezeichnet und jeweils der dritte für Darstellung und Auswertung verwendet. Eine Normierung des gemessenen Stromflusses auf das jeweilige Probengewicht sollte die Vergleichbarkeit der Proben untereinander verbessern. Die Integration des Stromflusses im negativen bzw. positiven Bereich über die Spannung mit der Software Origin, ergab die kathodischen bzw. anodischen Ladungskapazitäten. Von jedem Material wurden jeweils drei Proben im CV gemessen und ausgewertet.

3.5. Zellkultur

3.5.1. Ethische Zulassung

Primäre humane Zellen wurden aus Biopsaten, wie beispielsweise Knochenmark oder Vorhaut, isoliert. Die Genehmigung zur Zellisolation erfolgte durch die Ethik-Kommission der Universität Würzburg (182/10). Eine schriftliche Zustimmung des Patienten oder der nächsten Angehörigen, Betreuer oder Erziehungsberechtigten wurde eingeholt, wenn der Patient minderjährig war.

3.5.2. Standard Zellkultur Bedingungen

Die Durchführung aller Zellkultur-Methoden erfolgte bei sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank. Alle verwendeten Labormaterialien für die Zellkultur waren steril. Die Sterilisierung erfolgte entweder durch den Hersteller oder durch Autoklavieren bzw. steril filtrieren von Lösungen. Die Standardkulturbedingungen im Inkubator betragen 37 °C, eine CO₂-Konzentration von 5 % und einer dampfgesättigten Atmosphäre.

3.5.3. Isolation von Fibroblasten und deren Vermehrung

Die Isolation von humanen dermalen Fibroblasten erfolgte dem dermalen Teil einer humanen Vorhaut nach dem Protokoll von Pudlas et al. [106]. Zu Beginn wurde aus dem Transportmedium des Biopsats 3 ml entnommen und in einer T25 – Zellkulturflasche über Nacht im Brutschrank inkubiert, um die Sterilität des Biopsats zu prüfen. Unter der Sicherheitswerkbank überführte man das Biopsat in eine Petrischale mit 3 anschließenden Waschschritten in PBS⁻. Die Entfernung des Fett und Bindegewebes an der Unterseite des Biopsats erfolgte mit einem Skalpell. Danach wurde das Biopsat in ca. 2 – 3 mm breite Streifen geschnitten und wieder 3-mal mit PBS⁻ gewaschen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Durch Überschichten mit Dispase-Lösung (2,0 U/ml) und anschließender Inkubation bei

3. Material und Methoden

4 °C für 16 – 18 h erfolgte die Spaltung von Fibronectin der Basallamina. Darauffolgend wurden die Streifen entnommen und in eine Petrischale mit 10 ml PBS gegeben. Mit einer feinen Pinzette erfolgte die Trennung und Verwerfung der Epidermis von der dermalen Schicht. Mit einem Skalpell zerkleinerte man die verbliebenen Dermis-Streifen in ca. 3 x 3 mm große Stückchen. Ein Kollagenase-Verdau hilft den Zellen aus dem Gewebe auszuwachsen. Dazu wurden die Dermis-Stückchen mit 100 Kollagenase-Lösung (500 U/ml) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und für 45 min im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Über einen anschließenden Zentrifugationsschritt (Multifuge X3R) entfernte man die Kollagenaselösung. Das Pellet wurde mit 10 ml PBS gewaschen und der Überstand nach einem weiteren Zentrifugationsschritt verworfen. Abschließend wurde das Pellet in 2 ml Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) + 10 % fötales Kälberserum (FCS) + 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) aufgenommen und in eine T75-Zellkulturflasche überführt und vorsichtig in einen Inkubator gestellt. Am Folgetag erweiterte man das Volumen durch Zugabe von 6 ml Kulturmedium. Der erste Medienwechsel erfolgte nach 5 Tagen mit 15 ml Kulturmedium. Ab einer Konfluenz von 80 – 90 % konnten die Zellen mit Hilfe von Ethyldiamintertraessigäure (EDTA) und Trypsin passagiert werden, wobei 100 % Konfluenz nicht erreicht werden sollte. Ab Passage 1 erfolgte ein Wechsel auf Antibiotika-freies Kulturmedium. Zur Lagerung der Zellen, wurden die Zellen in Passage 0, sowie Passage 1, eingefroren. Dazu erstellte man eine Dispersion aus 1×10^6 Zellen in 1 ml Kulturmedium mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in einem Cryoröhrchen. In einem Kryoeinfriergerät „Mr. Frosty“ erfolgte der Einfrierprozess mit einer Rate von 1 K auf - 80 °C. Am Folgetag konnten die Cryoröhrchen in einen - 180 °C Stickstofftank zur Kryokonservierung überführt werden.

3.5.4. Zellkultur von humanen Fibroblasten auf den Kohlenstofffaser-Scaffolds

Die Zellkultur der hdF erfolgte in DMEM mit 10 % FCS. Für die Experimente auf den Faserscaffolds dienten ausschließlich Fibroblasten in Passage 2. Die Faserscaffolds wurden dafür in Zellkronen [21] eingespannt. Die resultierende Oberfläche des

Scaffolds betrug dabei $1,1 \text{ cm}^2$. Die Sterilisation erfolgte über Autoklavieren der eingespannten Scaffolds. Zur Beschleunigung der Benetzung vor der Zell-Aussaat, inkubierte man die Scaffolds für 30 min in sterilem VE-Wasser und einem anschließenden Waschvorgang mit DMEM. Die Aussaat der Zellen erfolgte mit einer Zelldichte von $15000 \text{ Zellen/cm}^2$. Über eine Dauer von bis zu 12 Wochen, wurde das Medium drei Mal die Woche gewechselt.

Die Analyse der Vitalität erfolgte über eine Lebend-Tod-Färbung mit Fluoresceindiacetat (FDA) und Propidiumiodid (PI). Dafür wurden die Proben mit PBS- gewaschen und anschließend für etwa 10 s in $0,5 \text{ Mikrogramm/ml}$ ($\mu\text{g/ml}$) FDA und $5 \mu\text{g/ml}$ PI inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS- konnte die Probe im Mikroskop (Keyence) betrachtet werden, mit dem GFP-Kanal (Anregung 470 nm ; Emission 535 nm) für FDA und dem TRITC-Kanal (Anregung 543 nm , Emission 593 nm) für PI.

Die Anregung der Fibroblasten zur Matrixsynthese erfolgt über die Zugabe des Supplements Ascobinsäure-2-Phosphat in der 10 Woche, mit einer Konzentration von $0,5 \text{ mmol/L}$. Durch Herauslösen der Zellen, konnte nach der zweiten Stimulations-Woche die Matrix freigelegt werden. Dafür wurde das besiedelte Scaffold zwei Mal für 15 min in 80 mmol/L Natriumdesoxycholat inkubiert und anschließend 2 mal mit PBS- gewaschen.

3.5.5. Kardiomyozyten-Mono- und Co-Kultur

Für die Kultur diente ein kardiales Basal Medium Kadari et al. [107], bestehend aus RPMI 1640 (500 ml) mit 10 ml B27 Supplement (50x), 1 ml β -Mercaptoethanol (50 mM), L-Ascorbinsäure ($50 \mu\text{g/ml}$), Penicilin/Streptomycin, Natrium-L-Lactat (2 mM) und Glutamin (2 mM). Für die Monokultur kamen Zellkronen, mit einer resultierenden Fläche von $0,63 \text{ cm}^2$, in einer 12-Well-Platte zum Einsatz. Die Kultur erfolgte mit Kardiomyozyten, abgeleitet aus humanen induziert pluripotenten Stammzellen (hiPS-CM), mit einer Dichte von $250000 \text{ Zellen/cm}^2$. Die Differenzierung der hiPSC-CM wurde im Voraus aus der iPS Zelllinie IMR 90-4 über

3. Material und Methoden

das Differenzierungsprotokoll von Kadari et al. [107] durchgeführt. Die Dauer dieser Kultur betrug 7 Tage mit 3 Medienwechseln von 2 ml.

Die Co-Kultur zu Generierung von kardialen Gewebe, kombinierte hiPS-CM, hdF und hMSC. Die Isolation der hMSC erfolgte im Voraus, nach dem Protokoll von Kleinhans et al. [108] aus einem Knochenmark-Aspirat (Uniklinik Würzburg) durch eine Biocoll Zentrifugation. Für diese Co-Kultur verwendete man die porösen Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds in einer Zellkrone mit $1,1 \text{ cm}^2$ Wachstumsfläche, platziert in einer 6-Well Platte. Für die Aussaat wurden die Zellen im gleichen Verhältnis und mit einer Gesamtzelldichte von $500000 \text{ Zellen/cm}^2$ auf den Scaffolds ausgesät. Die Kultur erfolgte in einem Zeitraum bis zu sieben Wochen, mit drei Medienwechsel pro Woche mit jeweils 5 ml.

3.6. Herstellung und Charakterisierung einer hybriden kardialen Elektrode

3.6.1. Generierung einer hybriden Elektrode und deren elektrophysiologische Testung

Eine Herzschrittmacherelektrode benötigt einen elektrischen Anschluss, um die Signale der Batterie zu erhalten. Dementsprechend musste für die hybride Elektrode ein elektrischer Anschluss für spätere Stimulationen eingeplant werden. Dafür wurde das poröse Scaffold mit einem zusätzlichen länglichen Streifen (ca. 2 cm Länge und 0,5 cm Breite) ausgeschnitten (Abbildung 13A). Um diesen Streifen zu stabilisieren und das spätere Einwachsen von Zellen zu verhindern, erfolgte eine Einbettung des Anschlusses in Silikon Biopor AB. Die Scaffolds mit Anschluss wurden in einer Zellkrone mit $1,1 \text{ cm}^2$ Kulturfläche eingespannt. Dazu musste aber zunächst eine Aussparung für den Anschluss zu geschaffen, und daher die Zellkronen angepasst werden. Dafür stellte erst ein XEED 3D-Drucker mit biokompatiblen PLA-Filament diese Zellkronen her. Anschließend fräste man die Aussparung am äußeren Ring bis zu Zwischenboden aus, mit Hilfe eines Dremel Multifunktionswerkzeugs und einer Trennscheibe (Abbildung 13B). Diese Aussparung hatte die Breite des elektrischen Anschlusses des Scaffolds. Im zusammengebauten Zustand ist das Scaffold in der Zellkrone eingespannt und der Anschluss ragt durch die Öffnung nach außen (Abbildung 13C,D). Die Scaffolds in

den Zellkronen wurden anschließend autoklaviert und in einer 6-well Platte platziert. Für die Zellaussaat mischte man hiPS-CM, MSC und hdF mit einem Verhältnis von 1,5 : 1 : 0,5 in Suspension und gab diese Zellen mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/cm² auf die Scaffolds. Der Medienwechsel erfolgte drei Mal die Woche mit jeweils 5 ml, bis zu einer maximalen Kulturdauer von vier Wochen. Es kam das gleiche Medium aus 2.5.3. zu Einsatz.

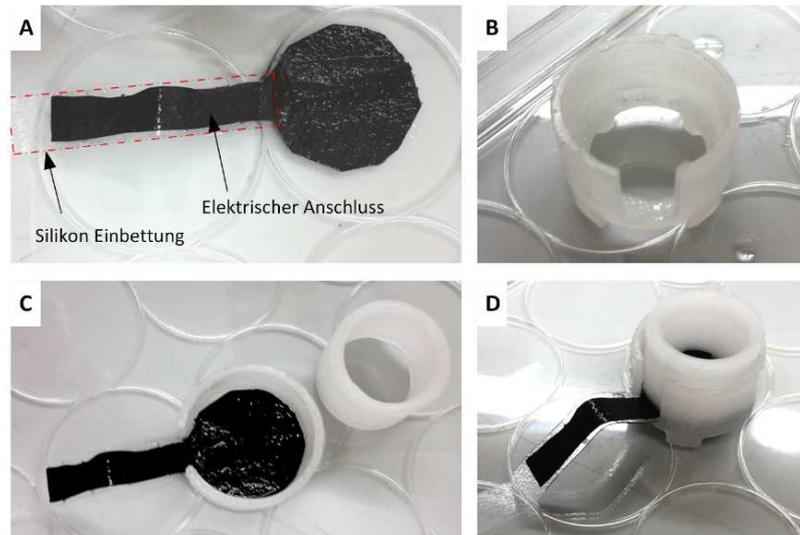


Abbildung 13: Aufbau der Elektrode und Zellkrone für die Zellkultur. (A) Ausschnitten der Elektrode mit einem zusätzlichen Streifen als elektrischen Anschluss. Zur Stabilisierung wurde dieser in Silikon (gestrichelte Linie) eingebettet. (B) Anpassung der Zellkrone mit einer Aussparung am äußeren Ring. (C) Durch die Aussparung kann der Anschluss der Elektrode aus der Zellkrone herausragen. (D) Fertiges Konstrukt aus Zellkrone und eingespanntem Scaffold.

Die elektrophysiologischen Messungen nach vier Wochen erfolgten mit einem Multi Electrode Array (MEA). Für die Messung wurden die besiedelten Scaffolds in Stücken von ca. 4 x 4 mm geschnitten und auf einem 8 x 8 MEA-Chip platziert. Die Elektroden des MEA-Chips bestanden aus Platin Spitzen mit 30 µm Durchmesser, 50-70 µm Höhe und waren 200 µm voneinander entfernt. Die Impedanz der Elektroden betrug 450-650 Kiloohm (kΩ).

3.6.2. Einwachsen der hybriden Elektrode in kardiales Gewebe

Im Kontrast zu herkömmlichen Herzschrittmacherelektroden, welche über eine Verletzung des Gewebes im Herzen verankert werden, sollte die hybride Elektrode

3. Material und Methoden

die Verbindung zum kardialen Testsystem nur durch den physischen Kontakt herstellen und zusammen wachsen. 4 Wochen zuvor erfolgte, parallel zu hybriden Elektrode, die Aussaat der gleichen Zellen auf einer dezellularisierten Dünndarm-Matrix, zur Generierung eines kardialen Testgewebes nach Schürlein et al. [94]. Nach der vierwöchigen Reifung der kardialen Gewebe, auf der Elektrode und der dezellularisierten Matrix, wurde die hybride Elektrode mit eingebettetem Anschluss aus der Zellkrone entnommen und auf 0,7 x 0,7 cm zugeschnitten, unter Erhalt des Anschlusses. Durch umdrehen der Elektrode, konnte diese mit der besiedelten Seite nach unten auf das kardiale Testsystem gelegt und damit der zelluläre Kontakt hergestellt werden. Der eingebettete elektrische Anschluss zeigte nun senkrecht an der inneren Wand der Zellkrone nach oben. Dieses zusammengelegte Konstrukt wurde anschließend für weitere 4 Wochen kultiviert. Der Medienwechsel erfolgte drei Mal die Woche mit jeweils 5 ml Medium.

3.6.3. Charakterisierung der Funktionalität des Elektroden-Gewebe Konstrukts

Die zusammengewachsenen Konstrukte wurden aus den Zellkronen entnommen und in Streifen mit 0,5 mm Breite geschnitten, welche ebenfalls in Reihe mit dem eingebetteten Anschluss verbunden waren. Zur Messung der Kontraktion durch eine elektrische Stimulation, erfolgte die Einspannung am angewachsenen kardialen Patch in ein Organbad mit Kraftsensor DMT Myograph PL3504 B16 und 5 ml Kulturmedium. Nach 30 min Ruhe, erweiterte man den Abstand der Klemmen bis die spontane Kontraktion des Konstrukts zu messen war. Um den kardialen Patch elektrisch zu stimulieren wurde ein Stimulator HC FE155 mit dem eingebetteten Anschluss der hybriden Elektrode verbunden. Dies erfolgte über eine Kanüle, welche den elektrischen Kontakt über das durchstechen des eingebetteten Anschluss herstellte. Für die Stimulation dienten monophasische Pulse mit einer Pulsweite von 0,1 ms, einer Amplitude von 50 mA angelegt und Frequenzen von 1 Hz, 1,5 Hz und 2 Hz.

Neben der elektrischen Stimulation, erfolgte eine Testung der mechanischen Stabilität der zellulären Verbindung beider Komponenten. Dafür wurde im

Organbad auf einer Seite das kardiale Testgewebe und gegenüber der eingebettete Anschluss eingespannt. Die manuelle kontinuierliche Erhöhung des Abstandes zwischen den Klemmen und die Messung der entstehenden Zugkraft, führten zur Bestimmung der Verbindungskräfte zwischen Patch und hybrider Elektrode. Die maximale gemessene Kraft wurde als Stabilitätswert für das Interface von Gewebe und Elektrode festgelegt.

3.7. Histologie

Paraffinschnitte:

Die Proben wurden in den Zellkronen zunächst mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend in 5 ml Histofix für 15 min fixiert. Zur Vorbereitung der Einbettung in Paraffin, platzierte man die fixierten Proben in einer Einbettkassette zwischen Filterpapier und entfernte das restliche Histofix aus der Probe durch eine zweistündige Inkubation in VE-Wasser. Anschließend erfolgte das Einbetten in Paraffin, über eine aufsteigende Alkoholreihe in einem Einbett-Automat Microm STP 120. Dabei waren die Schritte VE-Wasser, 50 %, 70 %, 80 %, 96 % EtOH, 2 x 100 % Isopropanol, 1:2: Mischung aus Isopropanol und Xylol, 2 x 100 % Xylol und abschließend 2 x 60 °C heißes Paraffin für jeweils ca. 1 h. Die Proben wurden anschließend an einer Blockstation EG 1150 H geblockt und über Nacht bei Raumtemperatur ausgehärtet. Die Paraffinschnitte erstellte man an einem Mikrotom SM 2010 R mit 5 µm Schnittdicke. Vor der Färbung wurden die Schnitte bei 36 °C über Nacht in einem Objektträger-Schnelltrockner getrocknet und anschließend das überschüssige Paraffin bei 60 °C für 2 h geschmolzen. Der Rest des Paraffins löste sich durch doppelte Inkubation in Xylol für jeweils 10 min. Abschließend folgte die Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe, durch eintauchen in folgende Konzentrationen: EtOH 96 % I, EtOH 96 % II, EtOH 70 %, EtOH 50 % und zuletzt VE-Wasser.

3. Material und Methoden

Hämatoxilin-Eosin (HE)-Färbung:

Nach der Rehydrierung erfolgte die HE-Färbung nach folgendem Protokoll (Tabelle 8). Abschließend wurden die Schnitte in Entellan[®] eingedeckt.

Tabelle 8: Protokoll zu HE-Färbung.

Schritt	Lösung	Inkubationszeit
Färbung der basophilen Strukturen	Hämatoxilin	6 min
Abwaschen des Hämalauns	VE-Wasser	bis keine Farbe mehr auswäscht
Bläuen	Leitungswasser	5 min
Färbung der azidophilen Strukturen	Eosin	6min
Abwaschen des Eosins	VE-Wasser	bis keine Farbe mehr auswäscht
Dehydration	Ethanol 70 %	eintauchen
	Ethanol 96 %	2 min
	Isopropanol I	5 min
	Isopropanol II	5 min
	Xylol I	5 min
	Xylol II	5 min

Phalloidin-Färbung:

Nach einem Waschschrift mit PBS⁻, fixierten die Proben in Histofix für 15 min. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembranen mit einer 0,2 % Triton X-100 Lösung (in PBS⁻) für 5 min mit einem darauffolgenden Waschschrift in PBS⁻/Tween-20. Zur Vermeidung unspezifischer Adsorption des Phalloidins, inkubierten die Proben zunächst für 10 min in einer 1 % bovines Serumalbumin (BSA) -Lösung (PBS⁻). Die Färbung des Aktinskeletts, bzw. die Bindung von Alexa Fluor 555 Phalloidin, erfolgte mit einer 1:40 Verdünnung (in PBS⁻) für 20 min auf einem Schüttler unter Lichtausschluss. Abschließend wurden die Proben zwei Mal für 5 min in PBS⁻/Tween-20 gewaschen und mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) -Fluoromount-GTM auf einem Objektträger eingedeckt.

Immunhistologie:

Zur Vorbereitung der rehydrierten Schnitte für immunhistologische Färbung erfolgte die Demaskierung der Epitope durch einen Kochprozess in 4,2 g/l Citrat-Puffer (pH 6) für 20 min bei 100 °C in einem Dampfgarer. Daraufhin folgte ein Waschschrift in PBS-/Tween-20 für 5 min und die Permeabilisierung der Zellmembranen durch eine 0,2 % Triton X-100 Lösung (in PBS-) für 5 min. Nach einem weiteren Waschschrift für 5 min in PBS-/Tween-20 erfolgte die Inkubation von 5 % Eselserum in Antikörper-Verdünnungspuffer für 20 min, um ein unspezifisches Binden des Sekundärantikörpers zu verhindern. Anschließend inkubierten die Schnitte in der Lösung des Primärantikörpers bei 4 °C über Nacht, mit folgenden Verdünnungen der Antikörper in Antikörper-Verdünnungslösung mit 5 % Eselserum: 1:1000 für Anti-cTnT (Hase), 1:100 für Anti-cTnC (Maus), 1:2000 für Anti-Vimentin (Maus), 1:100 für Anti-CD90 (Hase) und 1:100 für Anti-Alpha Actinin (Maus). Am nächsten Tag wurden die Proben zwei Mal für 5 min in PBS-/Tween-20 gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers für 1 h, welcher mit einer 1:100 Verdünnung (Antikörper-Verdünnungslösung mit 5 % Eselserum) vorlag. Als Sekundärantikörper dienten je nach Primärantikörperspezies und Farbe: Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488, Donkey anti-mouse Alexa Fluor 488, Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 555 und Donkey anti-mouse Alexa Fluor 555. Abschließend wurden die Proben zwei Mal für 5 min in PBS-/Tween-20 gewaschen und in DAPI-Fluoromount-G™ eingedeckt.

Erfolgte eine direkte Färbung der Proben zur Betrachtung der Oberfläche (ohne schneiden und Paraffineinbettung), galt die gleiche Vorbereitung der Proben wie zur Phalloidin-Färbung.

3. Material und Methoden

3.8. Konfokal-Mikroskopie

Die Konfokal-Mikroskopie erfolgte an einem LSM TCS SP8. Für die Aufnahmen dienten folgende Objektive: 10x; 40x; 63x

Parameter für die Aufnahme eines Z-Stacks:

- Bildabstand: 1 μm
- Aufnahmegeschwindigkeit: 200
- Bildgröße: 1024 x 1024 Pixel

Parameter der Kanäle:

- DAPI (in Blau dargestellt): Anregung : 405 nm; Emissionsfilter: 417-471 nm
- Alexa Fluor 488 (in grün dargestellt):
Anregung : 488 nm; Emissionsfilter: 496-538nm
- Alexa Fluor 555 (in rot dargestellt):
Anregung : 561 nm; Emissionsfilter: 567-617 nm
- Reflexion an den Fasern (in grau dargestellt):
Anregung : 476 nm; Emissionsfilter: 474-487 nm

3.9. Statistik

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung ausgedrückt. Die statistische Analyse wurde unter Verwendung eines ungepaarten Student-t-Tests und einer ANOVA-Varianzanalyse durchgeführt. Ein Wert von $p < 0,05$ war statistisch signifikant.

4. Ergebnisse

4.1. Herstellung von Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds mit verschiedenen strukturellen Eigenschaften

Als Material für den Aufbau von 3D-Elektroden-Scaffolds diente Kohlenstoff, welcher sich durch seine elektrische Leitfähigkeit und die Möglichkeit der Strukturierung in der Polymer-Vorstufe auszeichnet. Bei der Entwicklung der 3D-Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds konnte über Spinnparameter die Faserstruktur beeinflusst werden, um die Räume zwischen den Fasern für eine spätere Zellmigration zu vergrößern und damit die Dreidimensionalität zu erreichen. Der erste Schritt beschreibt die Generierung von drei Faser-Durchmessern, durch die Variation der PAN-Konzentration in der Spinnlösung (Abbildung 14A). Die Lösungen enthielten dabei 8, 10 bzw. 12 %wt PAN. Nach der Stabilisierung bei 250 °C in normaler Luft, konnte man erkennen, dass ein geringerer Faserdurchmesser zu einer helleren Braunfärbung führte. Während der Karbonisierung bei 1000 °C in Argon, verschwanden die Brauntöne und die Scaffolds färbten sich schwarz, ohne Unterschiede zwischen den verschiedenen Faserdurchmessern. Die resultierenden Faserdurchmesser wurden durch REM Analyse bestimmt. Für 8 %wt PAN-Lösung resultierte ein Kohlenstofffaserdurchmesser von 140 ± 34 nm (Abbildung 14A, E), für 10 %wt einen Durchmesser von 334 ± 64 nm (Abbildung 14C, F) und für die 12 %wt PAN-Lösung ein Durchmesser von 530 ± 56 nm (Abbildung 14D, G). Über geringere Vergrößerungen ist eine Vorzugsrichtung der Fasern erkennbar. Diese entsteht durch die Rotation des Kollektors beim Spinnen, dessen Oberflächengeschwindigkeit nahe an der Faserfluggeschwindigkeit ein aufwickeln und damit Ausrichten der Fasern bewirkt. Es ist bereits bekannt, dass die Zwischenfaserräume von elektrogesponnenen Faservliesen für eine ausgeprägte Zellmigration durch das Scaffold ungeeignet sind [109, 110]. Dies bewirkt, dass Zellen das Scaffold nur in zwei Dimensionen erkennen können, was den 3D-Aspekt der Elektrode verhindert. Daher wurden Porogene in das Fasernetzwerk eingearbeitet, um die Zwischenräume zu erweitern.

4. Ergebnisse

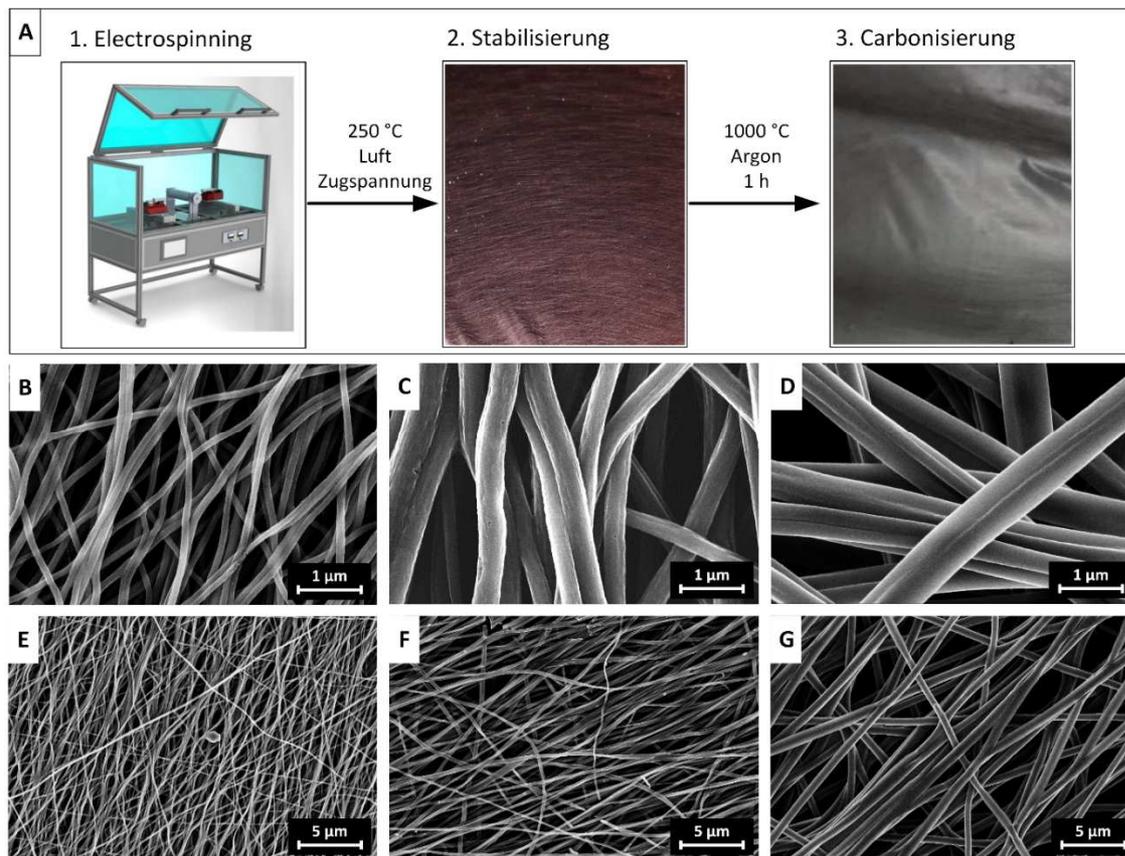


Abbildung 14: Generierung von Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds mit unterschiedlichen Faserdurchmessern. (A) Die Herstellung der Nanofaser-Struktur erfolgte durch das Electrospinnen von Polyacrylnitril-Lösungen. Die Stabilisierung bei 250 °C und Luftatmosphäre festigt die Faserstruktur. Im letzten Schritt wurden die Fasern bei 1000 °C unter Argon-Atmosphäre karbonisiert und erhielten dadurch ihre charakteristische schwarze Farbe und elektrische Leitfähigkeit. Die REM-Bilder zeigen die Kohlenstofffasern, welche über verschiedene PAN-Lösungen gesponnen wurden: (B, E) 8 %wt PAN, (C, F) 10 %wt PAN und (D, G) 12 %wt PAN.

Voraussetzungen für die Eignung als Porogen sind die Zytokompatibilität von möglichen Rückständen im Scaffold und die Wasserlöslichkeit, um das Porogen mit zytokompatiblen Lösungsmittel entfernen zu können. Des Weiteren sollte das Porogen eine Stabilität bei möglichst hohen Temperaturen besitzen, um die Form und chemische Zusammensetzung des Porogens in der Faserstruktur bei den Temperierprozessen erhalten zu können. Neben den funktionellen Eigenschaften des Porogens ist außerdem eine einfache Handhabung und Verfügbarkeit von Vorteil. Daher fiel die Wahl auf NaCl, welches bereits in Literatur in einigen Herstellungstechniken von porösen Scaffolds vertreten ist [111]. Um lokal die Porosität des Fasernetzwerkes zu erhöhen, wurden die Fasern aus der 12 %wt PAN-Lösung nach der Stabilisierung in NaCl-Kristalle eingebettet (Abbildung 15A). Über

eine konzentrierte NaCl-Lösung bilden sich nach dem Trocken Salzkrystalle im Faser-Scaffold, welche zum Teil mit dem Auge sichtbar waren. Diese Kristalle dienen in der folgenden Karbonisierung als Abstandhalter, um eine Schrumpfung des Scaffolds teilweise zu verhindern. Durch die Verzerrung der Faserstruktur zeigte das Kohlenstofffaser-Scaffold nach der Karbonisierung eine wellige Morphologie. Über REM konnte ebenfalls, im Vergleich zu den unbehandelten Kohlenstofffaser-Scaffolds (Abbildung 14G), eine Verzerrung der Fasernetzwerkes beobachtet werden (Abbildung 15B). Neben der Veränderung der Maschenstruktur bildeten sich graphenartige Ablagerungen im Fasernetzwerk (Abbildung 15C). Diese Strukturen wickelten sich wie Decken um einzelne Fasern oder Faserbündel (Abbildung 15D). Lokalisiert waren diese Strukturen hauptsächlich an den ursprünglichen Positionen der größeren Salzkrystalle, welche die Vertiefungen im Scaffold erzeugten. Des Weiteren traten diese vermehrt an der Unterseite des Scaffolds auf, welche durch die Vliespositionierung im Karbonisierungs-ofen bestimmt wurde.

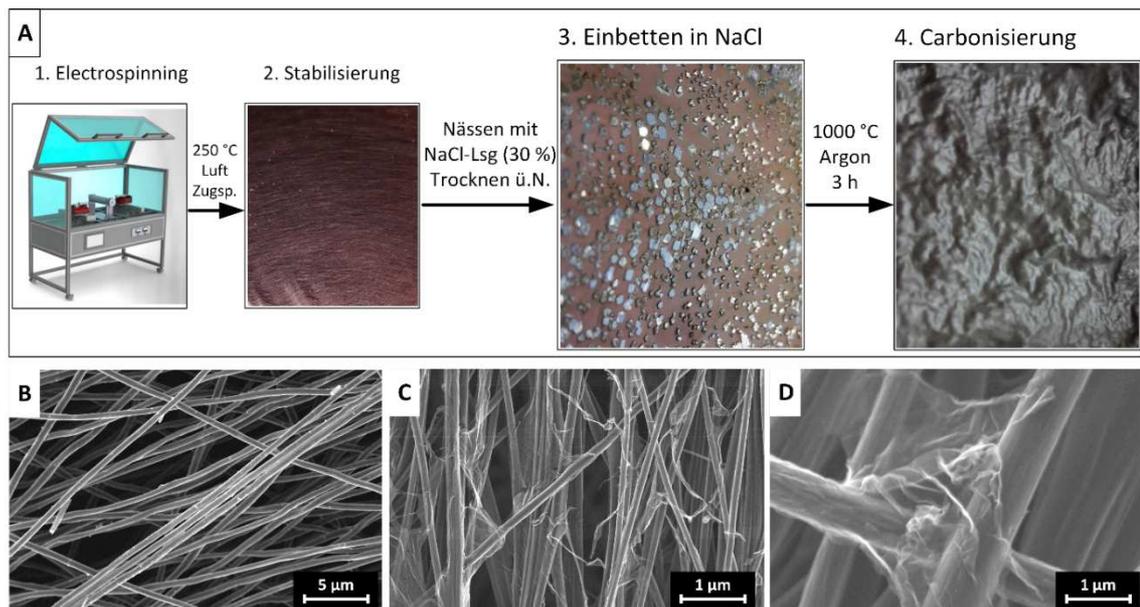


Abbildung 15: Modifikation der Scaffold Faser-Struktur durch Einbetten der Fasern in NaCl. (A) Der Spinnprozess und die Stabilisierung erfolgten nach den Standardbedingungen in Abbildung 14A. Die Verzerrung des Faser-Scaffolds resultierte durch das Einbetten der stabilisierten Fasern in NaCl. (B) REM-Aufnahme der verzerrten Maschenstruktur des behandelten Kohlenstofffaser-Scaffolds. (C,D) REM-Aufnahme der entstandenen graphenartigen Ablagerungen um die Fasern.

4. Ergebnisse

Eine Reduzierung der Karbonisierungszeit verhindert ein vollständiges verdampfen des NaCl. Dadurch konnte die Graphenstrukturen verringert werden, mit der Vermutung eines direkten Zusammenhangs mit dem Salz.

In den bisherigen Versuchen hatte sich gezeigt, dass die Verwendung von NaCl im Kohlenstofffaser-Scaffold Einfluss auf die Struktur der Fasern, sowie die Faservlies-Morphologie nahm. Jedoch war es nicht möglich, Poren im Faser-Netzwerk zu generieren. Dies konnte verbessert werden, durch die Immobilisierung von NaCl in Form von definierten Partikeln zwischen den Fasern. Dafür wurde während des Spinnens der Prozess angehalten und die Partikel mit einem Salzstreuer auf der Walze verteilt (Abbildung 16A). Für eine bessere Immobilisierung der Salzpartikel, diente ein Lösungsmittel als Haftvermittler. Aufgrund der hohen Polarität zeigte sich H₂O als ungeeignet. Mit H₂O war es nicht möglich, geringe Volumina gleichmäßig aufzutragen, um die Partikel anzubinden aber nicht zu lösen. Die geringe Löslichkeit von Salzen in Ethanol zeigt sich dagegen vielversprechend. Selbst das Auftragen eines durchgehenden Flüssigkeitsfilm, führte nur zu einem oberflächlichen Anlösen der NaCl Partikel. Die Partikel waren dadurch stark genug an der Oberfläche gebunden, um ein Ablösen des NaCl, durch die Fliehkräfte der rotierenden Walze zu verhindern. Da die ersten Faserschichten des Scaffolds zu fest an der Walze klebten, konnte das Scaffold nicht komplett abgenommen werden und es blieb etwa ein Drittel des Faservlieses auf der Walze zurück. Die anschließende Stabilisierung erfolgte mit den gleichen Parametern der Salz-freien Fasern. Verdampfungsprozesse während der Karbonisierung führten zur Reduzierung des NaCl-Anteils im Scaffold. Eine Verlängerung dieser Temperierung auf 3h sollte die komplette Entfernung des Salzes erreichen. Da der Einfluss der Partikelgröße auf die Poren- bzw. Maschenstruktur unbekannt war, diente als Streugut NaCl in drei definierten Größen-Bereichen. Zwei Siebe trennten dafür, durch Mahlprozesse, zerkleinertes Salz in drei Fraktionen: unter 70 µm, 70 – 125 µm und über 125 µm (Abbildung 16B). Die Herstellung der Scaffolds erfolgte mit der Intention einer möglichst hohen Porosität, und daher mit einer maximalen Beladung der Faservliese mit NaCl Partikel. Eine Reduzierung der Spinnzeiten zwischen der Bestreuung der Walze mit NaCl, um die Partikelbeladung zu erhöhen, war möglich bis zu einem Minimum von 12 min. Kürzere Spinnzeiten führten im Laufe des

Prozesses zum Reißen und Ablösen des PAN-Scaffolds von der Walze, auf Grund des zu hohen Massenanteils von NaCl. Die resultierende Masse der NaCl-Partikel in der PAN-Matrix war bei allen Partikelgrößen ähnlich und betrug $87,8 \pm 4,9 \%$. Die homogene Verteilung der Partikel wurde nach der Stabilisierung der Fasern durch REM kontrolliert. Fig. 3C zeigt die stabilisierten PAN-Fasern mit den eingesponnenen NaCl-Partikel aus der mittleren Größen-Fraktion.

Die Charakterisierung der karbonisierten porösen Scaffolds, hinsichtlich deren Struktur, erfolgte über REM. Auffällig ist die Bildung von graphenartigen Strukturen bei der Verwendung aller Partikelgrößen (Abbildung 17A, B, C). Dabei nahm die Menge der Ablagerungen mit steigender Größe der NaCl-Partikel ab. Im Gegensatz zu den in NaCl eingebetteten Scaffolds, waren die graphenartigen Strukturen im gesamten porösen Scaffold zu finden. Außerdem waren dabei die Fasern mit diesen Ablagerungen nicht eingewickelt, sondern zwischen den Fasern aufgespannt.

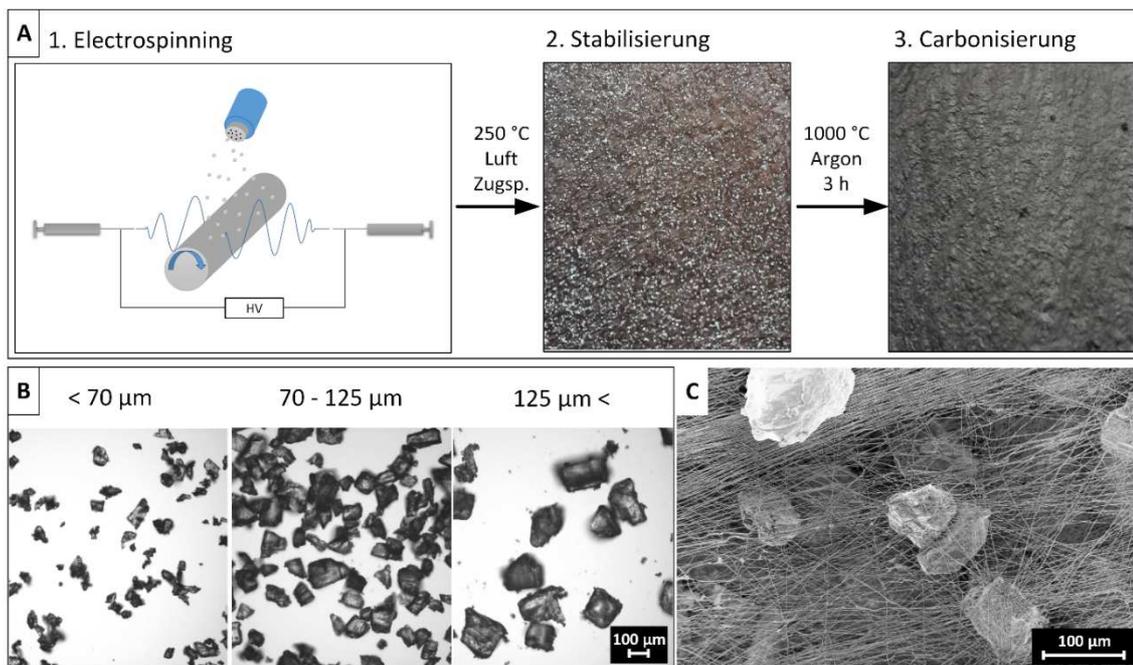


Abbildung 16: Herstellung von porösen Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds. (A) Generierung von Poren im Faserscaffold durch Streuen von NaCl-Partikeln während des Elektrosynn-Prozesses. Die Stabilisierung erfolgte analog zu den Fasern nach Standard-Synnprozess. Nach der Stabilisierung waren die farblosen NaCl-Partikel im braunen Scaffold erkennbar. Abschließend wurde das poröse Scaffold 3 h bei 1000 °C karbonisiert. Dabei schmolzen und verdampften die Partikel. (B) Lichtmikroskop-Aufnahmen der verwendeten NaCl-Partikel aus 3 Größenfraktionen. (C) REM-Aufnahme eines stabilisierten PAN-Scaffolds mit eingesponnenen NaCl-Partikel der mittleren Partikelgröße. Abbildung C wurde publiziert von Weigel et al. [112].

4. Ergebnisse

Bei Betrachtung der Faserstruktur eröffneten sich in allen Scaffolds geordnete und ungeordnete Bereiche der Fasern. Dabei ließ sich vermuten, dass sich die Fasern bevorzugt an den Partikeln vorbei ablegten und nur zu einem geringeren Teil über die Partikel selbst spannten (Abbildung 17D, E, F). Dies führte zu einer erhöhten Maschenweite über den ursprünglichen Positionen der Partikel (Abbildung 17G, H). Dieser Effekt konnte bei der Verwendung der mittleren NaCl-Partikelgröße am stärksten beobachtet werden. Größere Partikel führten zu einer geringeren Partikelanzahl im Scaffold und dadurch zu einer geringeren Ausprägung dieser Struktur. Außerdem konnten einige Fasern um die Partikel, den Spannkraften während der Karbonisierung, nicht standhalten und waren gerissen. Gegenteilig folgte bei kleineren Partikeln eine erhöhte Partikelzahl im Scaffold. Dies führte ebenfalls zu einer Reduzierung der geordneten Bereiche und Verringerung der Maschenweite, im Vergleich zu den mittleren NaCl-Partikel-Scaffolds. Grund dafür war eine schnellere Überspinnung der Partikel, was die Anzahl der Faserlagen über dem NaCl erhöht und damit die Maschenweite verringert. Zudem war ein Verschließen viele Zugänge zwischen den Fasern durch die exzessive Bildung von graphenartigen Strukturen erkennbar. Im Querschnitt zeigten alle Scaffolds eine ausgeprägte Porenstruktur (Abbildung 17I). Die Höhe dieser Poren ist ähnlich der Größe der Partikel.

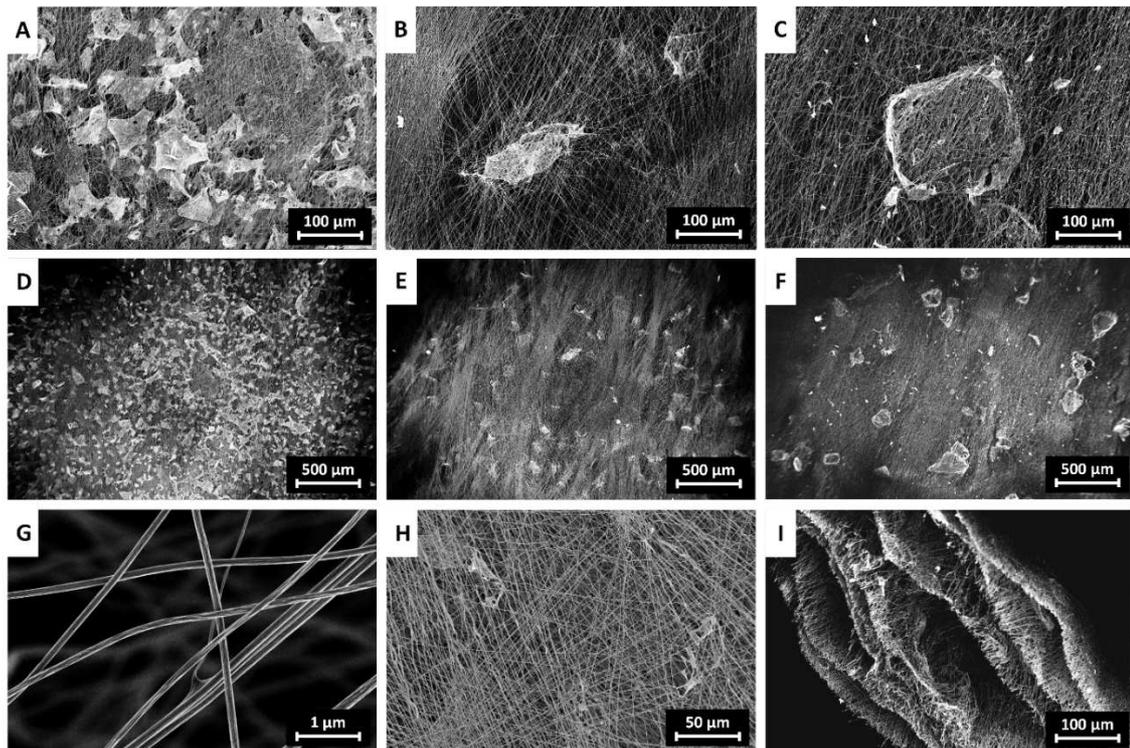


Abbildung 17: REM-Analyse der porösen Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds. (A, D) REM-Aufnahmen mit Aufsicht auf die porösen Scaffolds, generiert mit den kleinen NaCl-Partikeln, (B, E) mit der mittleren Partikel-Größe sowie (C, F) mit den großen Salzpartikeln. Die Aufnahmen (G, H, I) zeigten Scaffolds, hergestellt mit der mittleren Partikelgröße. (G,H) Nahaufnahmen der erhöhten Maschenweite über den Positionen ehemaliger NaCl Partikelpositionen. (I) Der Querschnitt des Scaffolds zeigte die generierten Poren.

In die anderen beiden Dimensionen waren die Poren über mehrere 100 µm länglich ausgedehnt, was vor allem der Rotation der Walze im Spinnprozess zuzuschreiben ist. Diese länglichen Poren führten zu einer lamellenartigen Struktur der Scaffolds.

In den folgenden Charakterisierungen wurden die generierten Faserscaffolds miteinander verglichen. Unterschiede zwischen Scaffolds aus 8 % PAN und 12 % PAN Lösung (Bezeichnung im Folgenden: 8 für 8 % PAN bzw. 12 für 12 % PAN) dienten zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Faserdurchmesser. Der nächsten Vergleich beinhaltet zusätzlich das Scaffold mit NaCl, welches sich aus einer Lösung im Fasernetzwerk kristallisierte (Bezeichnung im Folgenden: 12S), um den Einfluss von NaCl, auf die Eigenschaften des Scaffolds zu untersuchen. Die Charakterisierung der porösen Scaffolds beschränkte sich ausschließlich auf die Vliese mit der mittleren NaCl-Partikelgröße, da hier die Struktur am vielversprechendsten war (Bezeichnung im Folgenden: 12P).

4. Ergebnisse

Ein wichtiges Kriterium für ein 3D-Scaffold in der Zellkultur, ist die Möglichkeit der Zellen in das Scaffold einzuwandern. Dafür ist die Größe der Fasermaschen als Zwischenraum zwischen den Fasern ausschlaggebend. Diese wurden auf REM-Aufnahmen mit ImageJ gezählt und ausgemessen. Die Verteilungen der Fasermaschen der vier Scaffolds sind in Abbildung 18 dargestellt. Scaffold 8 zeigte dabei mit den dünnsten Fasern die meisten und kleinsten Maschen an der Oberfläche des Vlieses (Abbildung 18A). Bei Scaffold 12 war die Anzahl der Maschen stark reduziert und die Verteilung verschob sich etwas zu größeren Öffnungen (Abbildung 18B). Das Einbetten des Scaffolds in NaCl führte zu einer geringen Vergrößerung der Fasermaschen, während die Gesamtanzahl der Maschen ähnlich zu Scaffold 12 blieb (Abbildung 18C). Eine Verzerrung des Fasernetzwerkes durch das Salz ist ein möglicher Grund. Um dies zu untersuchen, wurde von allen vermessenen Maschen die Zirkularität bestimmt (Abbildung 19B). Der Vergleich der Maschen-Zirkularitäts-Verteilung zwischen Scaffold 12 und 12S zeigte die gleiche Anzahl an Maschen. Aber das Maximum der Verteilung von Scaffold 12S war zu kleineren Zirkularitäten verschoben, was für länglichere Maschen und damit für eine Verzerrung des Netzwerkes spricht.

Die größten Fasermaschen zeigte das poröse Scaffold 12P (Abbildung 18D). Für eine bessere Vergleichbarkeit mit den anderen Scaffolds ist die Grafik bis zu einer Maschengröße von $20 \mu\text{m}^2$ begrenzt. Die Gesamte Verteilung der Maschen des Scaffold 12P ist in Abbildung 19A dargestellt, mit Öffnungen nahe an $100 \mu\text{m}^2$.

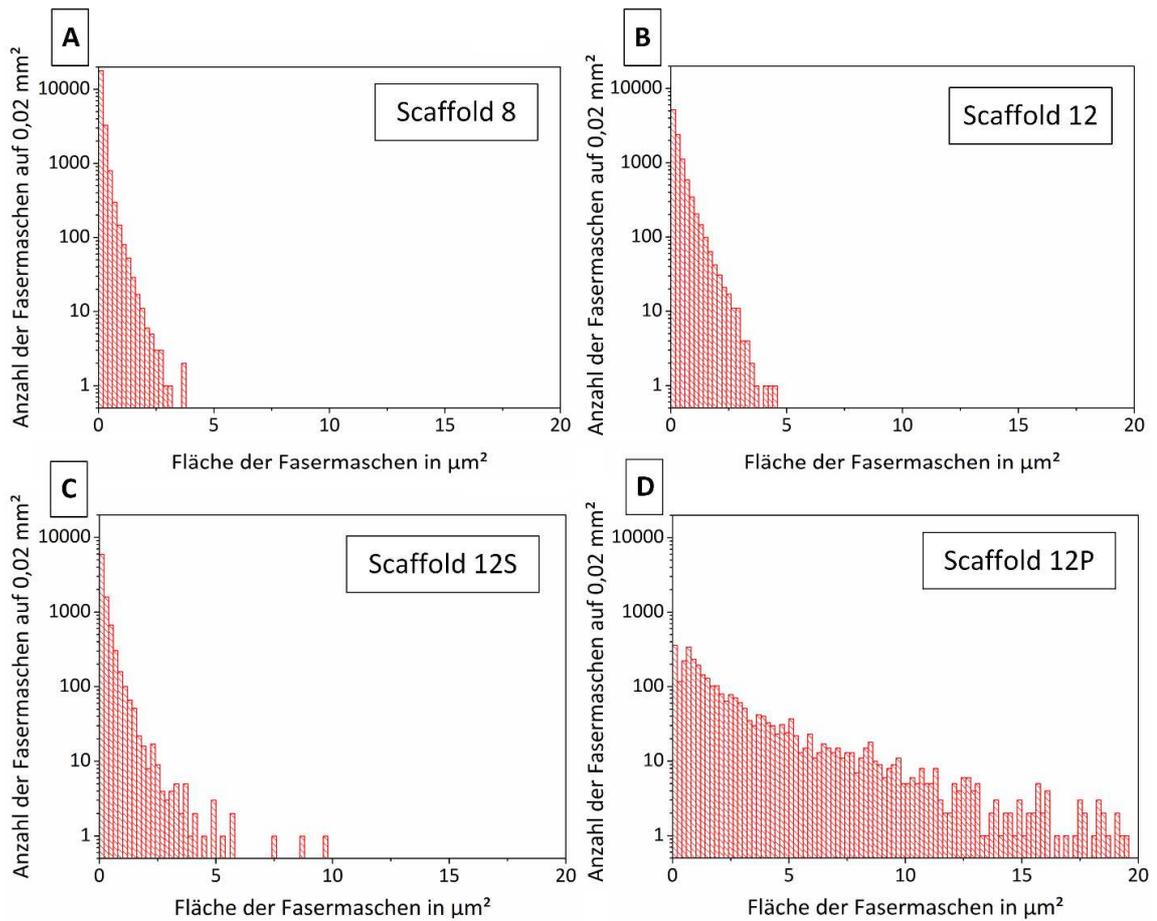


Abbildung 18: Größe der Maschenweiten der Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds. ImageJ Messung der Maschenanzahl und -größe von REM-Aufnahmen auf einer Gesamtbildfläche von $0,02 \text{ mm}^2$. (A) zeigt die Maschenverteilung für das Kohlenstofffaser-Scaffold aus 8 % PAN-Lösung (Scaffold 8), (B) für das Kohlenstofffaser-Scaffold aus 12 % PAN-Lösung (Scaffold 12), (C) für das Kohlenstofffaser-Scaffold aus 12 % PAN-Lösung mit NaCl-Lösung (Scaffold 12S) und (D) für das poröse Kohlenstofffaser-Scaffold (Scaffold 12P). Auf Grund der geordneten und ungeordneten Bereiche von Scaffold 12P, wurde die Vermessung der Maschen ausschließlich oberhalb der Poren durchgeführt. Zur Vergleichbarkeit wurde die Maschenverteilung von Scaffold 12P bei $20 \mu\text{m}^2$ abgeschnitten.

4. Ergebnisse

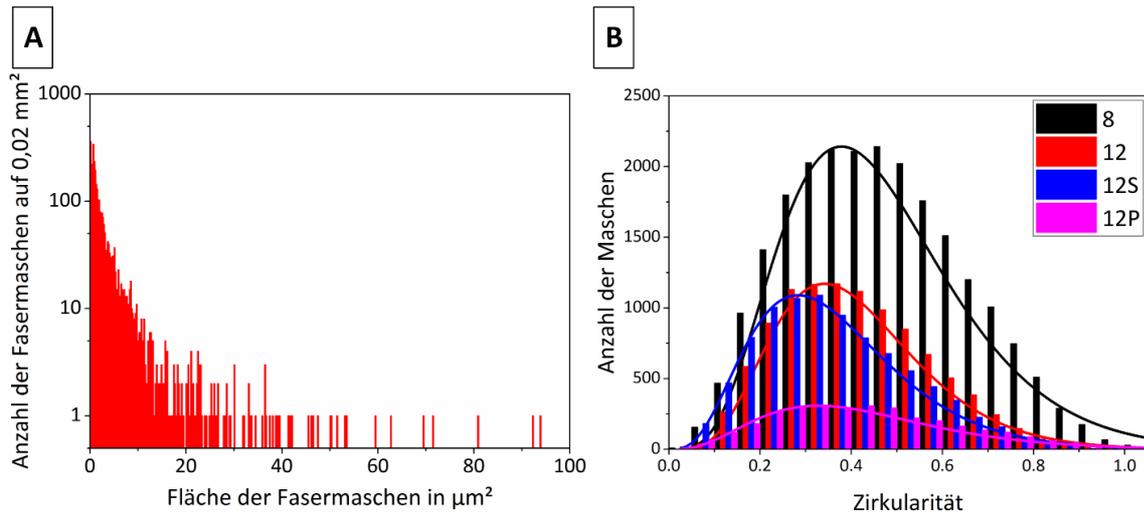


Abbildung 19: Größe und Morphologie der Maschen in den Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds. (A) Vollständige Maschen-Größen-Verteilung von Scaffold 12P. **(B)** Maschen-Zirkularitäts-Verteilung der Nanofaser Scaffolds von Zwischenfaserräume auf einer Gesamtbildfläche von 0,02 mm².

4.2. Material-Charakterisierung der Scaffolds

4.2.1. Charakterisierung der Kohlenstoffstruktur in den Nanofasern

Standardmethoden zur Bestimmung der Materialzusammensetzung und Struktur sind die Röntgendiffraktometrie (XRD) und die Schwingungsspektroskopie. Auf Grund der geringen Materialdichte, konnte mit XRD keine vergleichbaren Reflexe gemessen werden. Daher wurde die Raman Spektroskopie angewandt, welche ausschließlich an der Oberfläche des Scaffolds stattfindet. Abbildung 20A zeigt die Raman-Spektren der vier Scaffolds. Dabei sind die beiden Peaks bei 1330 cm^{-1} und 1590 cm^{-1} deutlich zu erkennen, welche charakteristisch für Kohlenstoff-Materialien sind [113, 114]. Dagegen sind in den Spektren kaum Unterschiede zwischen den vier Scaffolds erkennbar. Um eine bessere Vergleichbarkeit der inneren Struktur der Kohlenstoff-Nanofasern zu erreichen, erfolgte eine Peakanalyse der gemessenen Raman-Spektren. Über einen Fit konnte die Software Origin das Spektrum in fünf Banden aufteilen, welche durch Sadezky et al. beschrieben wurde [58]. Die G-Bande repräsentiert dabei die geordnete „graphitische“ Struktur in den Fasern, während die D-Banden den ungeordneten „defekten“ Strukturen zugeordnet werden. In Abbildung 20B ist die Peakanpassung vom Spektrum des Scaffolds 12 beispielhaft dargestellt.

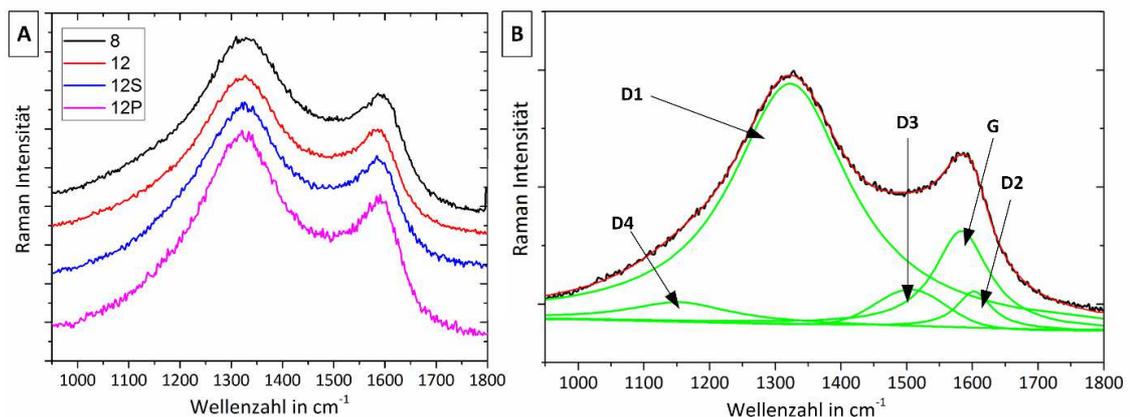


Abbildung 20: Charakterisierung der Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds durch Raman Spektroskopie. (A) Ausschnitt aus dem Ramanspektrum der vier Scaffolds mit den charakteristischen Banden für Kohlenstofffasern. (B) Raman-Spektrum von Scaffold 12 (schwarz) als Beispiel für das durchgeführte Fitting (rot). In grün sind die jeweiligen gefitteten graphitischen (G) und ungeordneten (disorderd, D) Banden dargestellt.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Peakanalyse sind in Tabelle 9 dargestellt. Dabei zeigten die Scaffolds mit Salz, 12S und 12P, mit 14,8 % einen höheren Flächenanteil an der G-Bande als die Standard-Scaffolds. Mit 5,8 % hatte das Scaffold 8 die geringste Peakfläche. Die Fläche der großen ungeordneten Bande D1 war bei den Salzfasern geringer, als bei den unbehandelten Scaffolds. Die Bande D2 hatte dagegen für Scaffold 8 und 12P einen verdoppelten Anteil als Scaffold 12 und 12S. Die ungeordnete Bande D3 zeigte bei allen Scaffolds einen ähnlichen Flächenanteil am Spektrum. In der letzten Bande, D4, konnte ein tendenziell höherer Flächenanteil mit den Salzfasern gemessen werden.

Tabelle 9: Flächenanteile der Peaks in Prozent aus durch die Peakanalyse aus den Ramanspektren mit den zugehörigen Peakpositionen. Für jedes Scaffold wurden drei Proben gemessen.

Peakfläche der Scaffolds in %	8	12	12S	12P
G (1580 cm ⁻¹)	5,8 ± 1,7	11,9 ± 1,5	14,8 ± 1,6	14,8 ± 4,0
D1 (1350 cm ⁻¹)	70,2 ± 0,9	72,2 ± 0,7	66,6 ± 1,2	61,3 ± 3,4
D2 (1620 cm ⁻¹)	10,1 ± 0,4	4,6 ± 0,5	4,1 ± 2,9	8,0 ± 0,2
D3 (1500 cm ⁻¹)	7,1 ± 1,0	6,2 ± 0,7	7,4 ± 0,7	5,9 ± 1,5
D4 (1200 cm ⁻¹)	6,8 ± 1,2	5,0 ± 0,4	7,1 ± 1,7	9,9 ± 0,6

Da der direkte Vergleich dieser Banden stark von der Messung abhängen kann, ist die Bildung von Verhältnissen zwischen den Banden eine genauere Methode. Das Intensitätsverhältnis aus D1- und G-Bande wird in der Literatur oft als Maßeinheit für den Anteil an der organisierten graphitischen Strukturen verwendet [52, 55, 58, 115, 116], wobei in den meisten Fällen die G-Bande nicht von den D2 und D3 Banden separiert wurde. Ebenso wird das Verhältnis zwischen den Banden D3 und G als Anteil von amorphen Kohlenstoff beschrieben [55, 116]. In Tabelle 10 sind die Verhältnisse dieser Banden aufgetragen. Scaffold 8 zeigt dabei den höchsten Wert im D1/G Verhältnis und besitzt damit die geringste geordnete Struktur. Scaffold 12 zeigt eine höhere Ordnung mit dem halben Wert von Scaffold 8. Die Salz-Scaffolds weisen die geringsten Werte und damit die größte Ordnung in der graphitischen

Struktur. Im Wert für den Anteil des amorphen Kohlenstoffs zeigt ebenfalls Scaffold 8 den höchsten Wert. Die anderen drei Scaffolds weisen einen weit geringeren amorphen Anteil auf.

Tabelle 10: Intensitätsverhältnisse zur Bestimmung der geordneten Strukturen in den Fasern, gebildet aus den Werten aus Tabelle 9.

Scaffold	8	12	12S	12P
I_{D1}/I_G	12,03	6,06	4,51	4,13
I_{D3}/I_G	1,73	0,39	0,28	0,54

4.2.2. Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds

Die Bestimmung der mechanischen Eigenschaften der Scaffolds erfolgte zunächst durch ein Zugversuch. Scaffolds der Gruppen 8 und 12 zeigten dabei ein ähnliches Spannungs-Dehnungs-Verhalten, wobei die maximale Spannung bei Scaffold 12 deutlich höher war (Abbildung 21A). Ähnlich zu spröden Materialien erfolgte ein steiler Spannungsanstieg mit dem katastrophalem Versagen nach einer geringen Dehnung. Das poröse Scaffold 12P konnte bis zum Bruch etwa 3-mal länger gedehnt werden, mit einer einhergehenden Reduzierung der maximalen Zugspannung. Mit der weitesten Dehnung bis zum Bruch zeigte das Scaffold 12S zudem kein schlagartiges Materialversagen, sondern brach mit mehreren kleinen zeitlich versetzten Brüchen.

Aus den Messungen des Spannungs-Dehnungs-Diagramms erfolgte die Bestimmung die charakteristischen Werte der Scaffold. Das E-Modul entspricht dabei der Steigung des elastischen Teils der Dehnungskurve [60]. Da die Scaffolds bei der Einwirkung der ersten Kräfte zunächst mit einer Faserorientierung reagieren, erkennt man in den Kurven zu Beginn der Messung eine geringere Steigung. Daher wurde für die Bestimmung der Steigung die Mitte des elastischen Teils der Kurve ausgewählt, um Faserausrichtungseffekte möglichst auszuschließen. Abbildung 22A stellt das E-Modul für die verschiedenen Faserscaffolds dar, mit etwa 10-Fach höheren Werten für die unmodifizierten Scaffolds 8 und 12. Die Werte der maximalen Dehnung (Abbildung 22B) zeigten ein reziprokes Verhalten im Vergleich zum E-Modul. Dabei waren die mit NaCl modifizierten Scaffolds 12S und 12P um den Faktor 3-5 dehnbarer als die Scaffolds 8 und 12. Die Zugfestigkeit (Abbildung 22C), bzw. die maximale Spannung in der Messkurve, beschrieb eine ähnliche Abhängigkeit wie das E-Modul. Da aber diese Messung empfindlicher von Fehlern im Material oder Scaffold abhängt, ist die Standardabweichung größer. Eine Integration über die Fläche der Spannungs-Dehnungs-Kurven führte zur Bestimmung der Bruchenergie (Abbildung 22D). Im direkten Vergleich konnten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Scaffolds erkannt werden.

Neben dem Dehnungsverhalten ist auch die Flexibilität der Scaffolds ein wichtiger Faktor. Für dessen Bestimmung wurden die jeweils 10 Scaffolds um Metallstäbchen mit kleiner werdenden Durchmessern von 13 bis 1,5 mm gebogen (Abbildung 21B). Die beste Flexibilität zeigte dabei das Scaffold 12P, welches die Biegungen der gesamten Proben, um alle Durchmesser, ohne Schaden überstand. Das Scaffold 12S zeigte ähnliche Eigenschaften, wobei ein Scaffold beim kleinsten Durchmesser brach. Scaffold 12 und 8 zeigten bei diesem Test eine geringere Flexibilität. Bei Scaffold 12 waren bis zu einem Durchmesser bis 4 mm alle Test Scaffold gebrochen. Scaffold 8 zeigte eine geringfügig bessere Flexibilität als Scaffold 12, war aber sehr anfällig auf Spaltung in Längsrichtung.

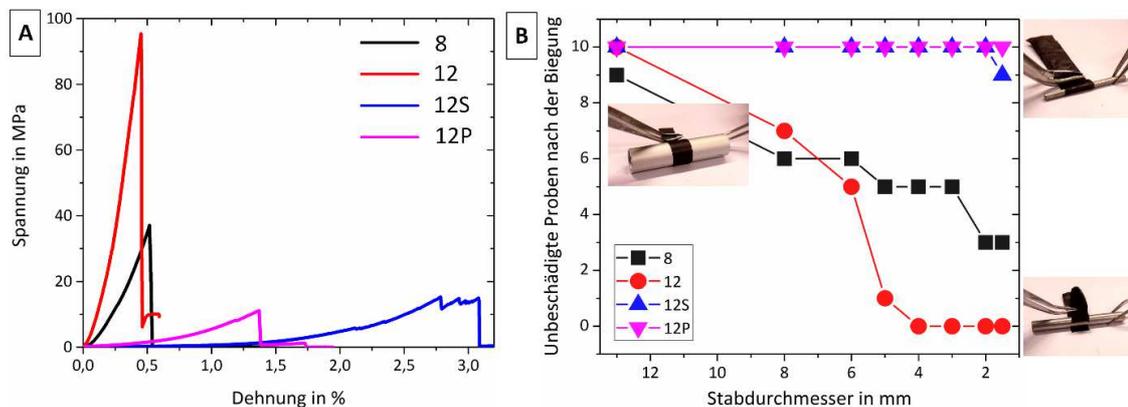


Abbildung 21: Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds. (A) Spannungs-Dehnungs-Diagramm der vier Scaffolds. (B) Bestimmung der Flexibilität der Scaffolds über einen Biege-Versuch. Dabei wurden die Faservliese um Metallstäbe mit Durchmessern von 13 – 1,5 mm gebogen.

4. Ergebnisse

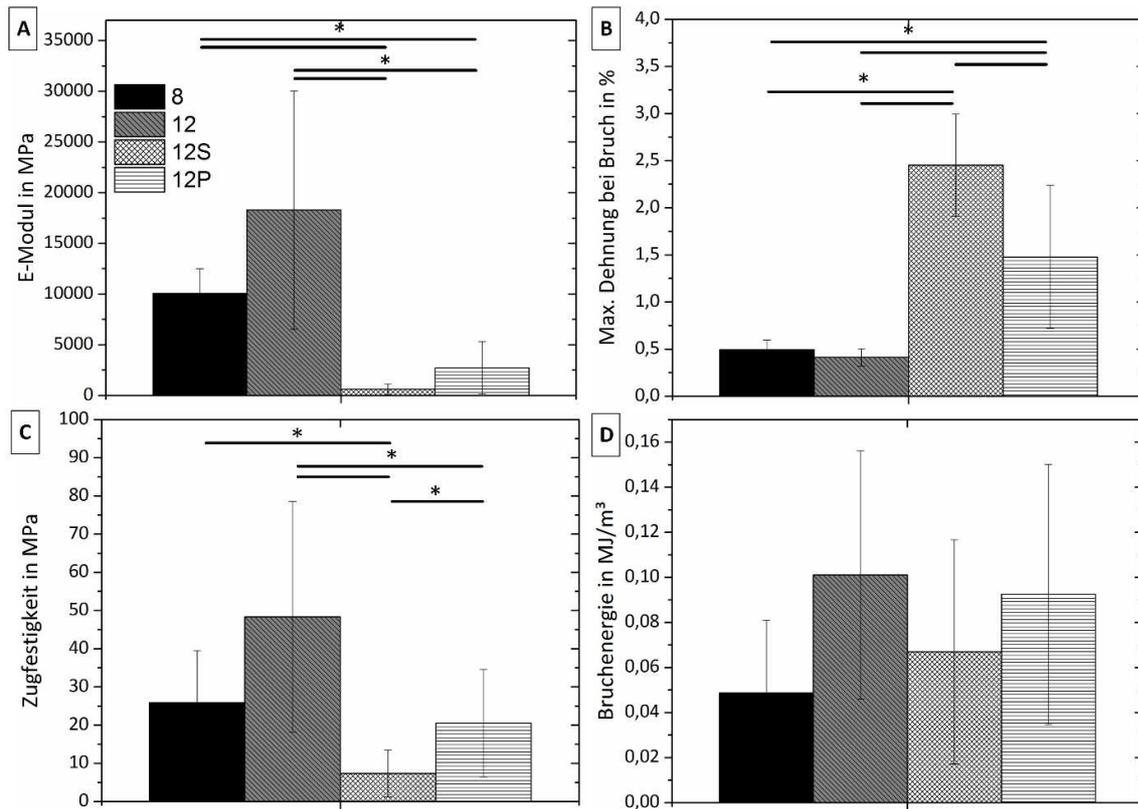


Abbildung 22: Mechanische Werte der Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds bestimmt aus den Spannungs-Dehnungs-Diagrammen. (A) E-Modul der Scaffolds, bestimmt aus der Steigung des linearen Abschnittes im Spannungs-Dehnungs-Diagramm. (B) Maximale Dehnung bis zum Versagen der Scaffolds. (C) Zugfestigkeit des Scaffolds, bestimmt aus der maximalen Spannung im Zugversuch. (D) Maximale Bruchenergie, bestimmt durch die Integration des Spannungs-Dehnungs-Diagramms. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant angenommen (*). Die Daten wurden aus 5 verschiedenen Spannungs-Dehnungs-Messungen der jeweiligen Faserscaffolds bestimmt.

4.2.3. Benetzungseigenschaften der Kohlenstoff-Nanofaser -Scaffolds

Die Messung des Kontaktwinkels auf den Scaffolds hilft bei der Einschätzung der Interaktion mit Flüssigkeiten. Durch die Benetzung der Oberfläche mit einem Tropfen, kann auf die Polarität der Oberfläche zurückgeschlossen werden. Dabei gilt, je größer der Kontaktwinkel, desto hydrophober die Oberfläche [117]. Dies ist aber nicht immer eindeutig, da Oberflächenstrukturierungen die Benetzung beeinflussen [118-120]. Scaffold 8 zeigte in der Kontaktwinkelmessung einen Winkel von $52,3 \pm 17,6^\circ$ (Abbildung 23A) und ist damit als hydrophil einzustufen. Auffällig dabei, war die hohe Abweichung des Kontaktwinkels. Grund dafür war eine Orientierung des Wassertropfens auf der Oberfläche, wodurch die Winkel je nach

Betrachtungsrichtung unterschiedlich waren (Abbildung 23B). Bei Scaffold 12 konnte keine Messung des Kontaktwinkels durchgeführt werden, da der Tropfen direkt in das Faservlies eingedrungen ist. Bei einer vergleichbaren Polarität der Oberfläche wie Scaffold 8, führte die größere Maschenweite bei Scaffold 12 zu einer sofortigen Benetzung. Im Gegenteil zu den unmodifizierten Fasern zeigten die NaCl-Scaffolds ein stark hydrophobes Verhalten in der Kontaktwinkelmessung. Durch die wellige Oberflächenstruktur von Scaffold 12S konnte aber keine genaue Messung durchgeführt werden. Bei Scaffold 12P wies der Kontaktwinkel $129,4 \pm 4,7^\circ$ auf und zeigt damit einen fast runden Tropfen auf der Oberfläche der Fasern (Abbildung 23C). An dieser Stelle war unklar, ob die Faseranordnung oder Änderungen der chemischen Oberflächengruppen für dieses hydrophobe Verhalten verantwortlich sind. Daher wurde das Scaffold 12P für 30 s mit Sauerstoffplasma behandelt. In der anschließenden Kontaktwinkelmessung drang der Wassertropfen sofort in das Faservlies ein und zeigte damit ein ähnliches Verhalten wie Scaffold 12. Daher wurde vermutet, dass die Temperierung mit Salz die polaren Oberflächengruppen reduzierte.



Abbildung 23: Bilder der Kontaktwinkelmessung auf Scaffold 8 und 12P. (A) zeigt den Wassertropfen von der Seite auf Scaffold 8. (B) Bei Betrachtung der Wassertropfen auf Scaffold 8 von oben erkennt man die Ausrichtung der Tropfenform. (C) Ein Wassertropfen auf dem porösen Scaffold mit einer annähernd runden Form.

4.3. Elektrische Charakterisierung

Die Anwendung einer Elektrode in einem elektrischen Schaltkreis erfordert eine ausreichende elektrische Leitfähigkeit, um Energieverluste durch abfallende Spannungen an elektrischen Widerständen möglichst gering zu halten. Da die Faserelektroden, im trockenen Zustand, zum Großteil aus Luft bestehen, wurde Leitfähigkeit nur über den leitfähigen Kohlenstoffanteil gemessen. Die spezifische Leitfähigkeit der Kohlenstofffaser-Scaffolds ist in Tabelle 11 dargestellt. Dabei zeigte das Scaffold mit den dünnsten Fasern die geringste Leitfähigkeit. Die Strukturierung mit Salz führte zu einer leichten Erhöhung der Leitfähigkeit bei Scaffold 12S. Wurde das Scaffold mit Salzpartikeln, anstatt mit einer Lösung, beladen, reduzierte sich die Leitfähigkeit um ca. 100 S/cm.

Tabelle 11: Spezifische Leitfähigkeit der verschiedenen Kohlenstofffaser-Scaffolds.

Scaffold 8	Scaffold 12	Scaffold 12S	Scaffold 12P
193,3 ± 34,6 S/cm	242,0 ± 51,5 S/cm	251,2 ± 28,7 S/cm	148,0 ± 17,5 S/cm

An der Grenzfläche der Elektroden zum flüssigen Medium, erfolgt eine Änderung im Mechanismus der elektrischen Leitung statt. Während der Strom in der Elektrode und den elektrischen Verbindungen über die Bewegung von Elektronen stattfindet, muss diese in der Flüssigkeit in Ionen-Bewegungen umgewandelt werden. Die erforderliche Energie an diesem Übergang ist dabei Abhängig von der Effizienz und dem Mechanismus dieser Übertragungsumwandlung. Bei der Charakterisierung von Elektroden für biologische Anwendungen steht daher die Energieübertragung an der Grenzfläche der Elektrode in das umliegende Medium im Vordergrund. Dieser kann über die Impedanz Spektroskopie gemessen und durch ein geeignetes Fitting charakterisiert werden. Dieses Vorgehen erlaubt es, spezifische elektrische Parameter abzuschätzen und daraus Schlüsse auf die Material-Elektrolyt-Interaktion, wie z.B. Doppelschicht Kapazität oder Ladungstransfer-widerstand, zu ziehen. In Abbildung 24A ist beispielhaft der Betrag der Impedanz und in Abbildung 24B die Phasenverschiebung, einer Messung in PBS⁻, dargestellt. Die Messungen

zeigten kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Scaffolds. Nur in der Phase war bei Scaffold 8 und 12S eine stärkere Verschiebung bei etwa 1 Hz zu sehen. In diesem Bereich war die Messung aber stark abhängig von der Oberfläche und Porosität des Scaffolds, welche sich auf die Diffusion der Ladungsträger im Elektrolyten auswirkten. Da es mit dem vorhandenem Elektrosponner nicht möglich war, die Dicke der Scaffolds zu kontrollieren, könnten die Unterschiede im Scaffold hauptsächlich durch Schwankungen in der Dicke, bzw. der dadurch variierenden Oberfläche zur Energieübertragung, hervorgerufen werden.

Als Kontrolle, wurden die Impedanzen der Kohlenstofffaser-Scaffolds zunächst mit Materialien verglichen, welche derzeit als Herzschrittmacher-Elektroden eingesetzt werden. Der Einsatz von Platin ist bereits seit 1959 [2] als Herzschrittmacher-Elektrode beschrieben. Im Spektrum zeigte dieses Material, im Vergleich zu den Kohlenstofffasern, bereits einen starken Anstieg in der Impedanz (Abbildung 24C) und eine hohe Phasenverschiebung (Abbildung 24D), ab einer Frequenz von 100 Hz. Als zweites Vergleichsmaterial wurde eine nanostrukturierte Titannitrid-Beschichtung (TiN) verwendet. Auf Grund der guten Impedanzeigenschaften hat dieses Material Platin bereits als Beschichtung auf einigen Herzschrittmacher-Elektroden abgelöst [5]. Der Vergleich des Impedanzspektrums von TiN mit dem unbehandelten Faserscaffold, zeigt ein ähnliches Verhalten mit einer etwa 8-Fach geringeren Impedanz bei 0,1 Hz als Platin (Abbildung 24C). Auch die Phasenverschiebung von TiN war ähnlich der Kohlenstofffaser, mit einer geringen Verschiebung zu kleineren Frequenzen (Abbildung 24D).

Eine genauere Interpretation der Kurvenverläufe erforderte das Fitten über ein simuliertes Ersatzschaltbild. Dafür wurden grundlegende elektrische Elemente, wie z.B. Widerstände oder Kondensatoren, mit einander verknüpft, um den elektrischen Übergang von der Elektrode in das flüssige Medium, zu beschreiben. In der Literatur findet man den „Randles Circuit“ oft als grundlegendes Ersatzschaltbild (Abbildung 24E) zur Interpretation von Impedanzspektren bei Elektroden in flüssigen Elektrolyten [64, 121, 122]. Dieses Ersatzschaltbild wird zusammengesetzt aus dem Widerstand des Elektrolyten (R_{sol}), dem Widerstand der Ladungstransfers (R_{CT}) und einer CPE-Einheit, welche unter anderem die Doppelschichtkapazität der Oberfläche beinhaltet.

4. Ergebnisse

Bei Messungen unter 1 Hz zeigte der Fit dieses Ersatzschaltbildes aber eine starke Abweichung (Abbildung 24F). Durch die Verwendung eines Diffusionselementes konnte diese Abweichung ausgeglichen werden. Zur Beschreibung der Ionendiffusion bei geringen Frequenzen ist die Anwendung eines Warbung-Elements eine gängige Lösung [64, 123, 124]. Da dieses aber nur bei glatten Oberflächen genaue Fits zulässt, wurde stattdessen ein T-Element gefittet, welches bereits bei der Beschreibung von porösen Elektroden Anwendungen gefunden hatte [69]. Bei kleinen Frequenzen wird dabei die Diffusion in der porösen Faserelektrode berücksichtigt (Abbildung 24E,F). Für TiN und Platin stand nur eine Probe zur Verfügung, weswegen die Werte aus den Fits keine Bestimmung der Standardabweichung erlaubte. Die Ergebnisse der Fits zeigen deutliche Unterschiede in den Werten der Kapazität der CPE (Abbildung 25A) und des R_{ct} (Abbildung 25B), welche beide die Übertragung der elektrischen Energie in das PBS beschreiben. Die elektrische Kapazität besteht zudem aus einer Überlagerung der Kapazität des Materials und dessen aktive Oberfläche. Im Vergleich zu den Kohlenstofffasern und TiN wies Platin nur eine sehr geringe Kapazität auf. Gegenüber den Kohlenstofffasern konnte für TiN ein Trend zu einer höheren Kapazität berechnet werden. Im Charge Transfer Widerstand beschrieb Platin mit Abstand den größten Wert. Die Kohlenstoff-Nanofasern weisen den geringsten R_{ct} auf, welcher etwa nur ein Drittel des TiN entspricht.

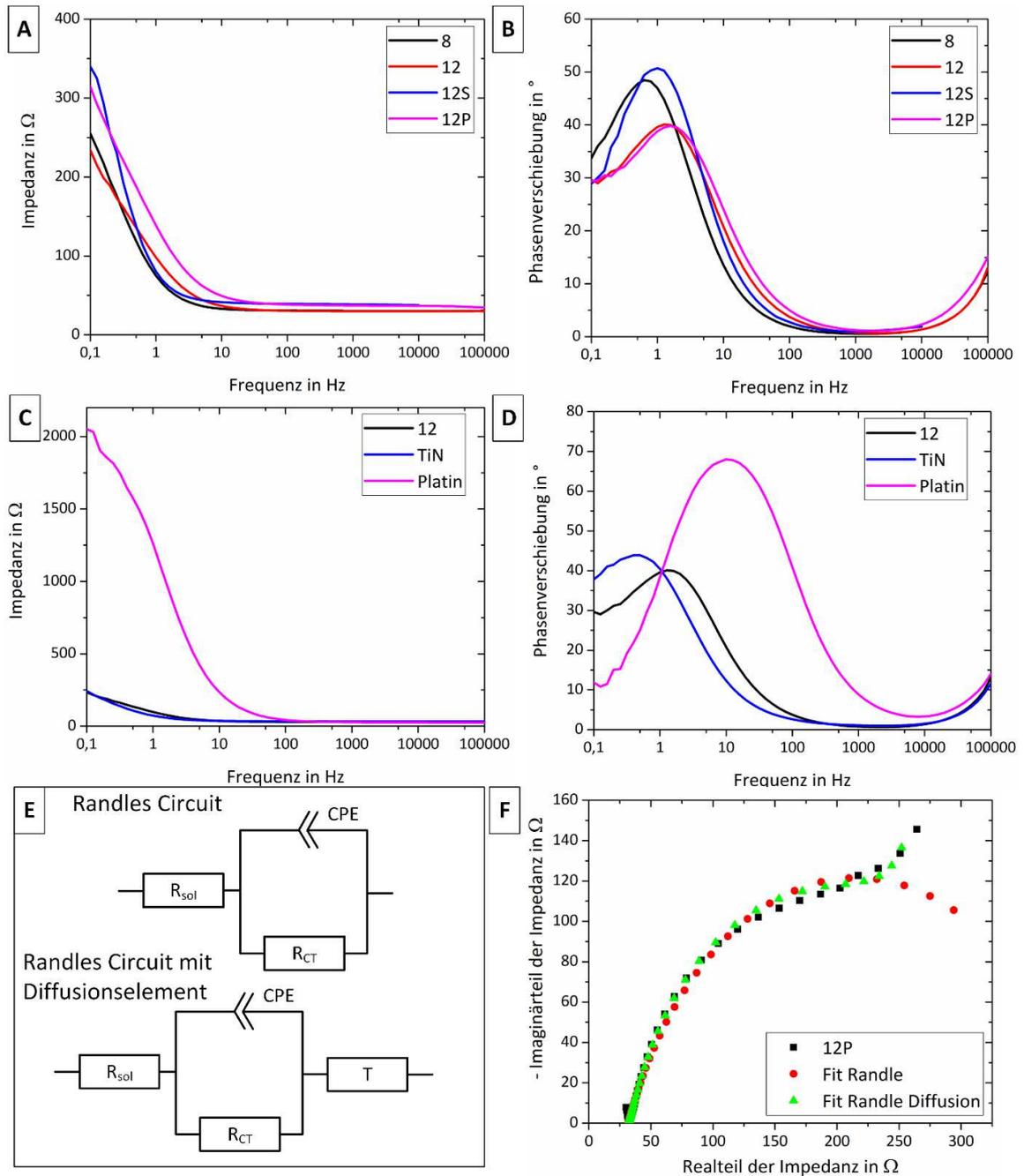


Abbildung 24: Impedanz-Messungen zur Charakterisierung der elektrischen Übergänge der Elektroden-Scaffolds in PBS. (A) Betrag der Impedanz und (B) die Phasenverschiebung zwischen Strom und Spannung einer Impedanzmessung der vier Scaffolds. Impedanz (C) und Phase (D) von Vergleichsmessungen der Elektrodenmaterialien Platin und Titanitrid (TiN). (E) Ersatzschaltbilder für das Fitting der Impedanzmessungen mit dem klassischen „Randles Circuit“ sowie eine Erweiterung zur Beschreibung der Ionendiffusion in poröse Elektroden (T-Element). (F) Beispiel für den Fit beider Schaltbilder nach einer Messung mit Scaffold 12P.

4. Ergebnisse

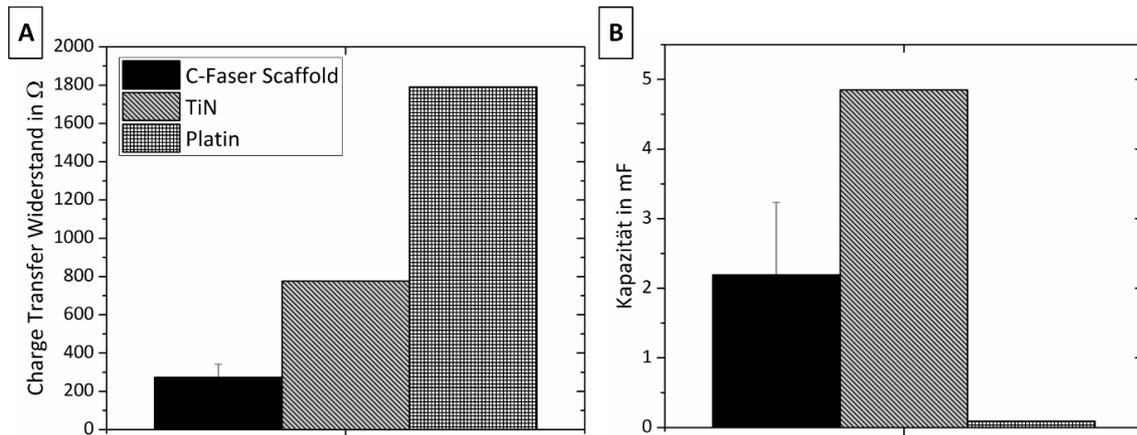


Abbildung 25: Fit-Ergebnisse der Kohlenstofffasern und der Vergleichsmaterialien TiN und Platin. (A) stellt den gefitteten Charge Transfer Widerstand dar (R_{ct}) sowie (B) die elektrische Kapazität, bestimmt aus dem Constant Phase Elements (CPE).

Die Messungen für das Cyclovoltogramm erfolgte mit Vorschubgeschwindigkeiten von 0,005 – 0,1 V/s mit anschließender Normierung des Stromflusses auf die Masse der Probe. Bei der Durchführung der Messungen konnte eine unvollständige Benetzung des Scaffolds mit PBS⁻, durch einen kleinen Peak bei ca. -0,4 V, identifiziert werden. Jedes Scaffold zeigte diesen Peak in der ersten Messung, welcher sich aber bis zum dritten Durchlauf zurückgebildet hatte. Scaffold 8 (Scaffold mit den dünnsten Fasern) und 12P (poröses Scaffold) (Abbildung 26A,D) wiesen diesen Peak aber dennoch in geringem Ausmaß auf, was für eine unvollständige Benetzung während der gesamten Messung spricht. Alle Scaffolds hatten im Bereich zwischen -1,0 und 1,0 V keine weiteren Peaks und damit keine elektrochemischen Reaktionen an der Oberfläche der Fasern sondern lediglich Adsorptions- und Desorptionsprozesse in der elektrochemischen Doppelschicht. Der Vergleich der Kurven (Abbildung 26E, F) beschreibt ein ähnliches Verhalten von Scaffold 8 und 12S (Scaffold, behandelt mit NaCl-Lsg.). Scaffold 12 (unbehandeltes Scaffold mit dickeren Fasern) und 12P wiesen dagegen einen höheren Stromfluss auf. Dabei ist dieser bei der geringsten Geschwindigkeit von 0,005 V/s fast identisch (Abbildung 26E). Beim Ansteigen der Geschwindigkeit bis auf 0,1 V/s steigt der Stromfluss von Scaffold 12 aber stärker an (Abbildung 26F). Die Integration der Kurven im kathodischen bzw. anodischen Bereich bei einer Geschwindigkeit von 0,03 V/s bestimmte die Ladungskapazität der Scaffolds bei diesem Vorschub (Tabelle 12). Die geringste Ladungskapazität hatte dabei Scaffold 8. Mit den Scaffold 12S, 12P und 12 steigt die Ladungskapazität bis auf das 3,5-Fache von Scaffold 8 an.

Tabelle 12: Kathodische und anodische Ladungskapazität durch Integration des CV bei einer Geschwindigkeit von 0,03 V/s.

Scaffold	8	12	12S	12P
Kathodische Ladungskapazität	84,9 ± 8,8 mC/mg	222,9 ± 31,2 mC/mg	117,1 ± 27,4 mC/mg	149,8 ± 51,9 mC/mg
Anodische Ladungskapazität	82,3 ± 10,4 mC/mg	280,2 ± 50,8 mC/mg	132,8 ± 43,1 mC/mg	153,3 ± 60,0 mC/mg

4. Ergebnisse

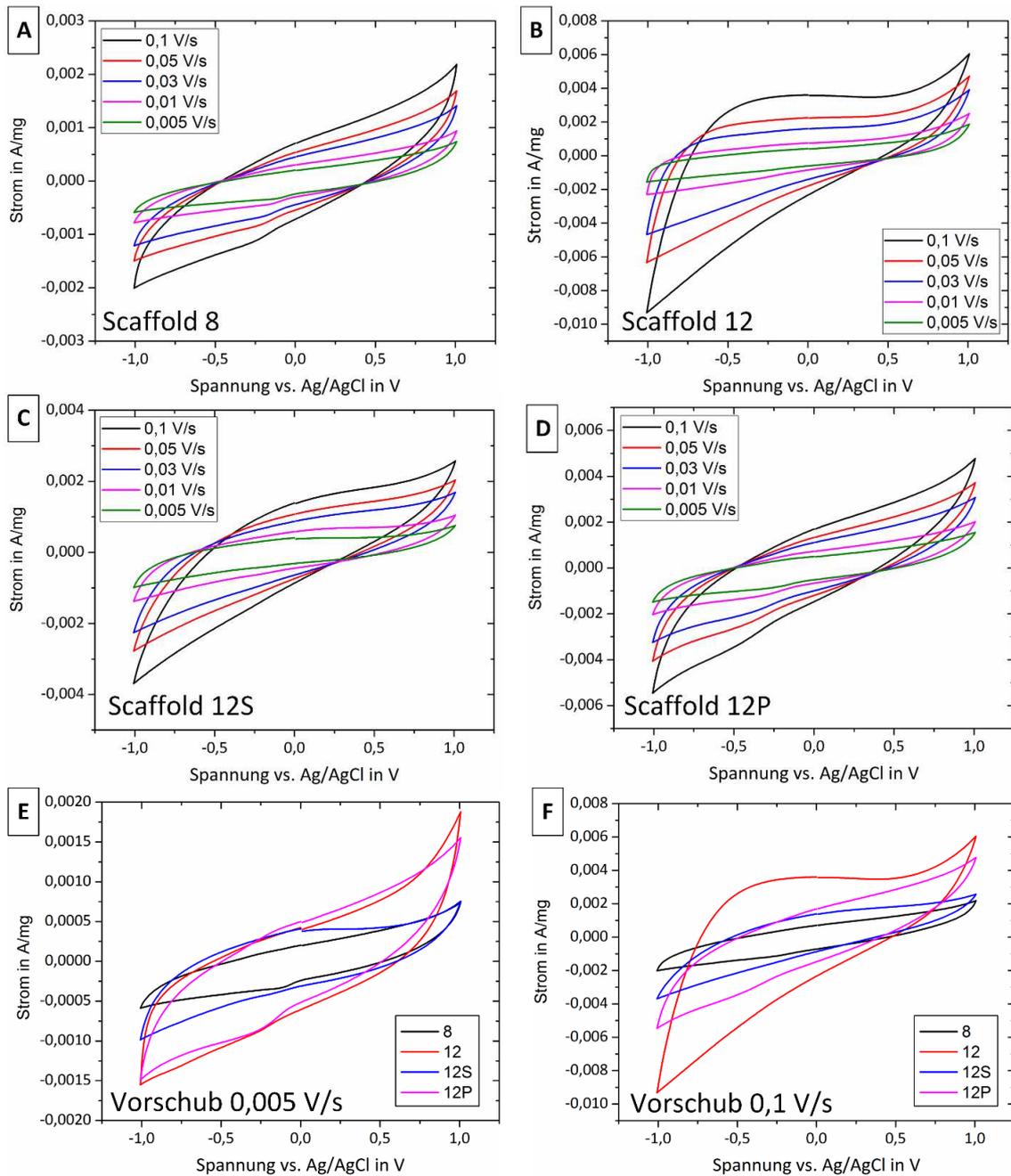


Abbildung 26: Cyclovoltogramme der Scaffolds mit Geschwindigkeiten von 0,005 bis 0,1 V/s in PBS. (A) zeigt das CV von Scaffold 8, (B) von Scaffold 12, (C) von Scaffold 12S und (D) von Scaffold 12P. Vergleich der CV aller Scaffolds bei 0,005 V/s (E) und 0,1 V/s (F).

4.4. Biokompatibilität und Migrationsverhalten der Scaffolds

Neben den strukturellen und elektrischen Eigenschaften einer Herzschrittmacherelektrode ist die Biokompatibilität ebenfalls eine Grundvoraussetzung. Neben Kompatibilität mit Gewebezellen, waren dabei deren Migrationsverhalten sowie die Interaktion mit kardialen Zellen und Gewebe wichtige Fragestellungen. Die generelle Zytokompatibilität von Kohlenstofffasern bzw. Nanofasern wurde bereits von einigen Forschergruppen gezeigt und publiziert [125-127]. Daher beschränkte sich der Kompatibilitätstest mit humanen dermalen Fibroblasten (hdF) auf die Standardfasern, um mögliche Komplikationen, wie geringe Unterschiede in der Faserherstellung oder Sterilisation auszuschließen. Die Bewertung erfolgte über die Bestimmung der Viabilität mittels einer Lebend-Tot-Färbung, sowie die Untersuchung der Morphologie durch eine Phalloidin-färbung. Nach 2 Tagen Kultur, zeigte die Viabilitätsfärbung mit FDA ausschließlich lebendige Zellen auf der Oberfläche der Scaffolds (Abbildung 27A, C). Lediglich in tieferen Ebenen befanden sich einige schwache rote Signale. Da Zellen in so kurzer Zeit kaum in die Scaffolds eindringen, könnte es sich dabei um unspezifischer Adsorption des Propidiumiodid an den Fasern bzw. an adsorbierten Proteinen, handeln. Die Betrachtung der Zellmorphologie (Abbildung 27B, D) über eine Färbung des Aktinskeletts durch Phalloidin, erkannte man eine spindelförmige Ausrichtung der Zellen, welche sich vermutlich an der Vorzugrichtung der Fasern orientierte. Diese Ausrichtung ist auf den dickeren Fasern des Scaffold 12 ausgeprägter als auf Scaffold 8, wo einige Zellen auch in andere Richtungen ausgebreitet sind. Zudem ist erkennbar, dass die hdF auf Scaffold 12 mit ihren Zellausläufern etwas unter die Fasern vordringen.

Das Ziel einer 3D-Elektrode ist die nahtlose Integration in das Zielgewebe. Dafür ist es notwendig, dass zunächst Gewebezellen in das 3D-Scaffold vordringen und eigene EZM synthetisieren können. Idealerweise sollte diese Migration über mehrere Wochen möglich sein und dabei das Scaffold im gesamten Volumen betreffen. Daher wurden hdF für 5 Tage bzw. für 6 Wochen auf den Scaffolds (8, 12, 12S und 12P) kultiviert. Anschließend erfolgte die Analyse der Migration über eine Phalloidin-färbung mit Konfokalmikroskopie sowie REM. Zum frühen Zeitpunkt zeigten die Fibroblasten auf Scaffold 8 keine Anzeichen auf eine Migration (Abbildung 28A).

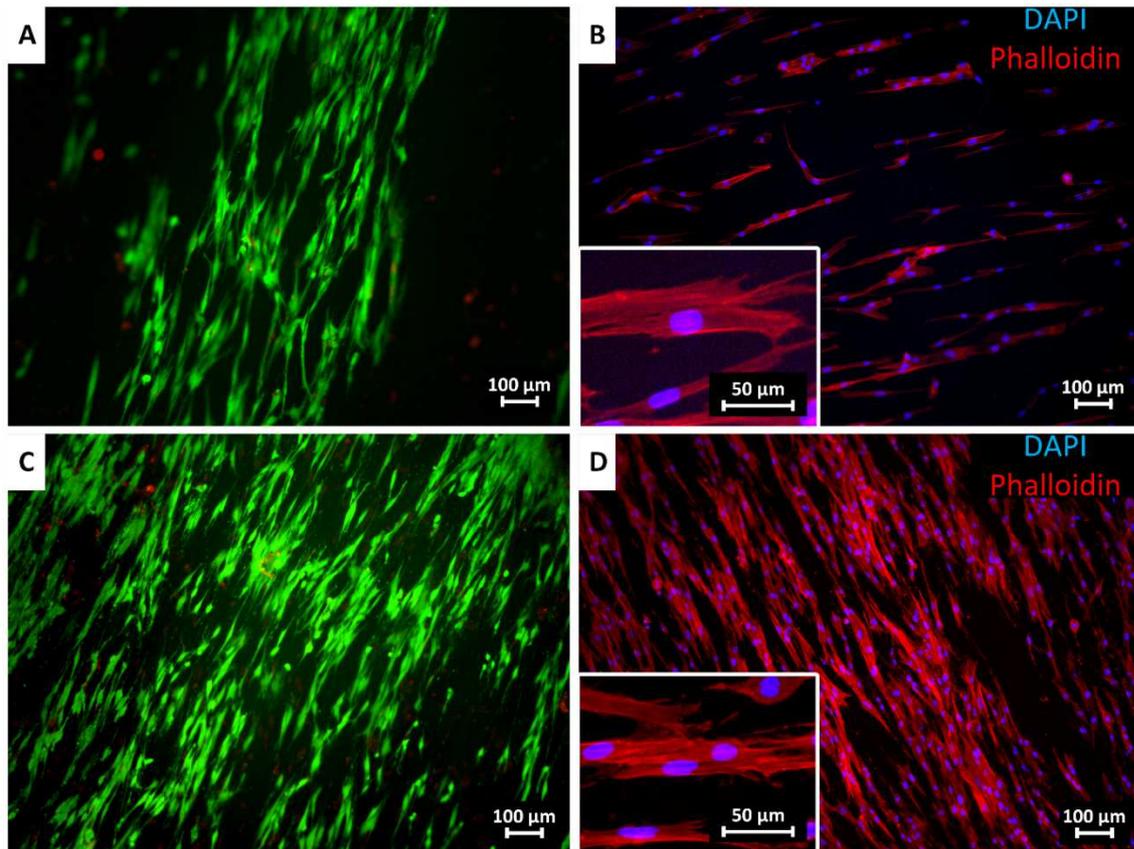


Abbildung 27: Kompatibilitätstest nach 2 Tagen mit humanen dermalen Fibroblasten. (A), (B) zeigt die hdF nach 2 Tagen auf Scaffold 8 und (C), (D) auf Scaffold 12. (A), (C) Darstellung der Viabilität über eine Lebend-Tod-Färbung. Dabei werden vitale Zellen mit FITC grün gefärbt und die DNA von toten Zellen mit Prodiimidid rot gefärbt. (B), (D) Zur Betrachtung der Morphologie, wurde das Zytoskelett mit Phalloidin (rot) und der Zellkern mit DAPI (blau) gefärbt. Die Insets stellen die Zellen auf den jeweiligen Scaffolds mit 40x Vergrößerung dar.

Dagegen konnten die Zellen beim Scaffold 12 (Abbildung 28B) zumindest unter einige Fasern migrieren. Scaffold 12S (Abbildung 12D) und das poröse Scaffold (Abbildung 12E) wiesen ein ähnliches Migrationsverhalten auf, wie Scaffold 12 in den Konfokalbildern. Das Einbetten nach der Färbung führte zu einer Komprimierung der Scaffolds, was die Maschenstruktur und damit die 3D-Darstellung der Scaffolds beeinflussen könnte. Daher wurden die besiedelten Scaffolds 12 und 12P zusätzlich im REM betrachtet, dessen Präparation kein Einbetten erfordert und damit die 3D-Struktur der Scaffold erhält. Dabei konnte man bei Scaffold 12 (Abbildung 28C) keine Unterschiede zur Konfokalmikroskopie erkennen. Auf dem porösen Scaffold 12P war dagegen ein verstärktes Migrationsverhalten der Fibroblasten erkennbar. Hier konnte Stellenweise ein

komplettes Eindringen der Zellen in das Scaffold beobachtet werden (Abbildung 28F). Zudem zeigten die Zellen weniger die typische 2D-Spindelförmige Morphologie sondern eher eine Form welche an 3D Gewebe erinnert [128]. Nach sechs Wochen hatte sich auf den dünnen Fasern des Scaffold 8 eine geschlossene Zellschicht gebildet (Abbildung 29A). Eine sichtbare Migration der Fibroblasten in das 3D Scaffold konnte nicht beobachtet werden. Auf Scaffold 12 hatte sich ebenfalls eine dichte Zellschicht gebildet (Abbildung 29B). Aber hier konnte man unter den sichtbaren Fasern, Teile vom Zytoskelett sowie DAPI-gefärbte Kerne finden. Bei Scaffold 12S zeigten sich einige Stellen, welche nach sechs Wochen noch nicht mit einem Zelllayer bedeckt waren (Abbildung 29C). Dies lag aber hauptsächlich daran, dass es sich dabei um Erhebungen handelte. Aufgrund der Schwerkraft sammeln sich die Zellen eher in den Senken des Scaffolds, weswegen Erhöhungen erst später besiedelt werden. Aber man konnte erkennen, dass die Zellen in der Lage waren, durch die Erhebungen etwas in das Scaffold einzudringen.

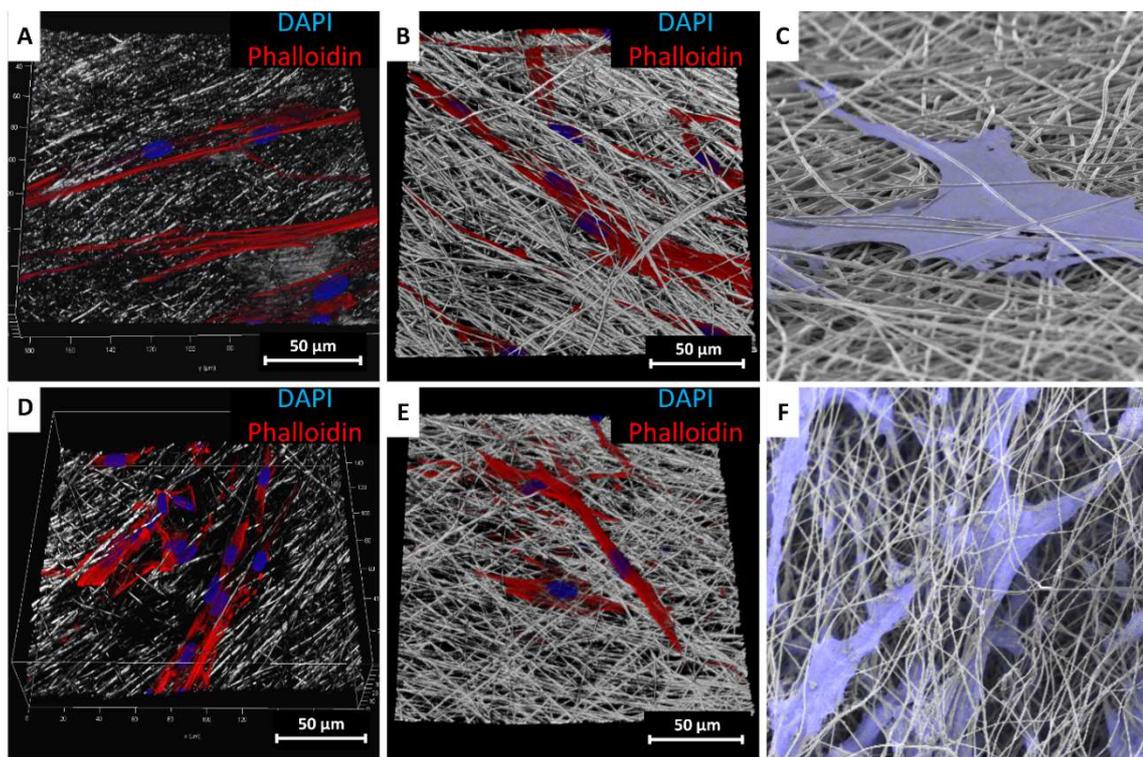


Abbildung 28: Migrationsverhalten von hGF auf den Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds nach 5 Tagen. Konfokal-mikroskopische Aufnahmen einer Phalloidin (rot) - DAPI (blau) - Färbung der Fibroblasten auf (A) Scaffold 8, (B) Scaffold 12, (D) Scaffold 12S und (E) Scaffold 12P. Das Reflexionssignal der Fasern ist in grau visualisiert. Falschfarben Darstellung von REM-Aufnahmen mit hGF auf (C) Scaffold 12 und (F) Scaffold 12P.

4. Ergebnisse

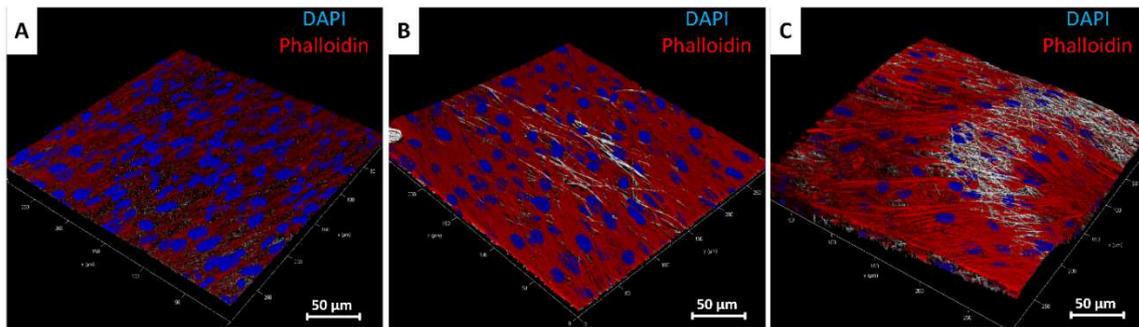


Abbildung 29: Migrationsverhalten von h2DF auf den Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds nach 6 Wochen. Konfokal-mikroskopische Aufnahmen einer Phalloidin (rot) - DAPI (blau) - Färbung der Fibroblasten auf (A) Scaffold 8, (B) Scaffold 12 und (C) Scaffold 12S. Über das Reflexionssignal sind die Fasern in grau dargestellt.

Im Vergleich zu den Scaffolds 8, 12 und 12S, zeigte das poröse Scaffold ein weit stärkeres Migrationspotential. Zur genaueren Untersuchung dieses Effektes folgte eine Verlängerung der Kulturdauer auf bis zu 12 Wochen sowie die Untersuchung über REM, um die Scaffoldstruktur während der Präparation besser zu erhalten und eine höhere Tiefenschärfe zu erzielen. Nach acht Wochen konnte man erkennen, dass die Migration der Fibroblasten in das Innere des Scaffolds die Bildung einer dichten Zellschicht bis zu diesem Zeitpunkt verhindert hatte (Abbildung 30A, B). Außerdem konnte man die eingedrungenen Zellen in der nächsten Ebene durch das Fasernetzwerk erkennen. Nach 10 Wochen konnte im Querschnitt (Abbildung 30C) die Migration durch das komplette Scaffold beobachtet werden. Die Proliferation an der Oberfläche des Scaffolds hat im Zeitraum zwischen 8 und 10 Wochen zu der Ausbildung einer dichten Zellschicht geführt. Eine Integration von Scaffolds in biologisches Gewebe erfordert die Synthese von EZM durch eingewanderte Zellen innerhalb des Scaffolds. Zur Untersuchung dieser Eigenschaft wurden die h2DF, nach 10 Wochen Kultur, mit Magnesium-Ascorbyl-Phosphat zu Kollagensynthese angeregt. Bereits nach zwei Wochen konnte man faserförmige Ablagerungen um die Zellen herum erkennen (Abbildung 30E). Die vollständige Darstellung des EZM-Netzwerks kann aber nur nach einer Entfernung der Zellen erreicht werden, da diese einen Großteil der Matrix verdecken. Eine Inkubation der besiedelten Scaffolds in einer Natriumdesoxycholat-Lösung, bewirkt das Herauslösen zellulärer Bestandteile aus einer Matrix aber auch eine weitgehende Erhaltung der EZM [129]. Dadurch konnte man ein Netzwerk aus sehr dünnen Fasern im kompletten Scaffold wieder finden.

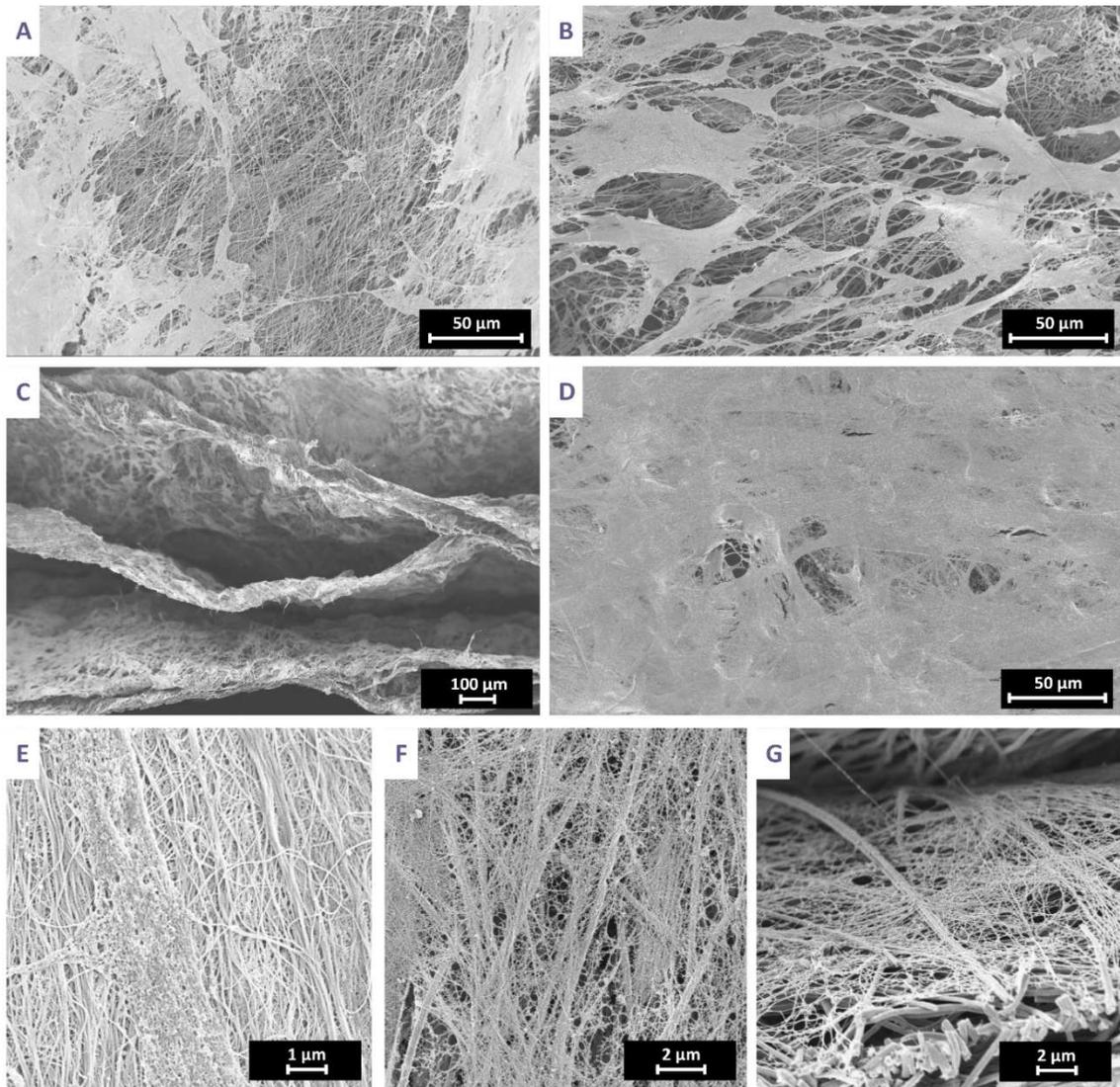


Abbildung 30: Migrationsverhalten von hdF auf den porösen Scaffolds 12P. (A)(B) REM-Aufnahme von hdF nach 8 Wochen. (C) Querschnitt des Scaffolds 12P zeigte die Migration der Fibroblasten durch das Scaffold nach 10 Wochen. (D) Die Bildung eines geschlossenen Zellschichtes wurde nach 10 Wochen Fibroblasten-Kultur erreicht. (E) Nahaufnahme der Fibroblasten auf dem Scaffold nach 12 Wochen, welche mit Magnesium-Ascorbyl-Phosphat zur Matrixexpression angeregt wurden. (F)(G) Nach dem Herauslösen der Zellen mit Natriumdesoxycholat bleibt das Faserscaffold mit exprimierter EZM zurück.

An Stellen, wo zuvor mehr Zellen waren wie zum Beispiel an der Oberfläche, konnte ein dickeres und dichteres Netzwerk aus dünnen Fasern gefunden werden. Das Verhalten von hdF bestätigte die generelle Biokompatibilität der Faserscaffolds. Neben der Proliferation konnten diese Gewebezellen die 3D-Struktur der porösen Kohlenstofffaser-Scaffolds nutzen und in das Scaffold vordringen. Diese Tests sollten anschließend auf spezifische Zellen der kardialen Richtung übertragen

4. Ergebnisse

werden, um die Reaktion von kardialen Gewebe bei der Anwendung als Herzschrittmacher-Elektrode einschätzen zu können.

Um die Migration dieser Zellen zu untersuchen, diente als Kulturoberfläche für das folgende Zell-Experiment nur das vielversprechende poröse Scaffold 12P und Scaffold 12 als unporöse Referenz. Kultiviert wurden dafür hiPS abgeleitete Kardiomyozyten für sieben Tage mit anschließender Betrachtung über REM und Konfokalmikroskopie. Bereits vor dem fixieren fand man kontrahierende Zellcluster über ein Durchlichtmikroskop. REM zeigte auf beiden Scaffolds ein ähnliches Verhalten der Kardiomyozyten. Sie schlossen sich zu Zellclustern zusammen, welche ausschließlich auf der Oberfläche des Scaffolds zu finden waren (Abbildung 31A, C). Anzeichen auf eine aktive Migration dieser Zellen konnten nicht entdeckt werden. Einige einzelne Zellen befanden sich zwar im porösen Scaffold in der nächst tieferen Schicht, welche aber wahrscheinlich nur beim aussähen durch das erweiterte Maschennetzwerk passiv bewegten. Zur Einschätzung der Viabilität und Kompatibilität konnte, neben der Kontraktion, auch die Expression des späten Differenzierungsmarker Troponin T [107] durch eine Antikörperfärbung nachgewiesen werden. Konfokalmikroskopische Aufnahmen zeigten dabei die gestreifte Anordnung der Sarkomere in allen Zellclustern (Abbildung 31B, C). Zwar waren diese kaum orientiert, aber die Kontraktion belegte deren Funktionalität und damit auch die Kompatibilität mit diesen Zellen.

Im nächsten Schritt wurde versucht die Bildung der Zellcluster zu vermeiden, um ein funktionelles und dichtes kardiales Gewebe im Scaffold zu generieren. Aus früheren Arbeiten [94] ist bekannt, dass die Anwendung einer Co-Kultur aus den hiPS-CM, hdF und hMSC die Clusterbildung vermeidet und sich funktionelles Gewebe bilden kann. Dies wurde bisher auf einem dezellularisierten Scaffold, basierend auf porcinen Dünndarm, generiert. Unklar war nun, ob die Bildung eines solchen Gewebes auf einer komplett synthetischen Matrix aus Kohlenstoff-Nanofasern ohne jegliche bereitgestellte biologische extrazelluläre Matrix möglich ist. Dafür erfolgte die Kultivierung dieser Zell-Kombination auf den porösen Scaffolds (Abbildung 32) mit einer regelmäßigen Betrachtung über eine cTnT bzw. cTnC Färbung.

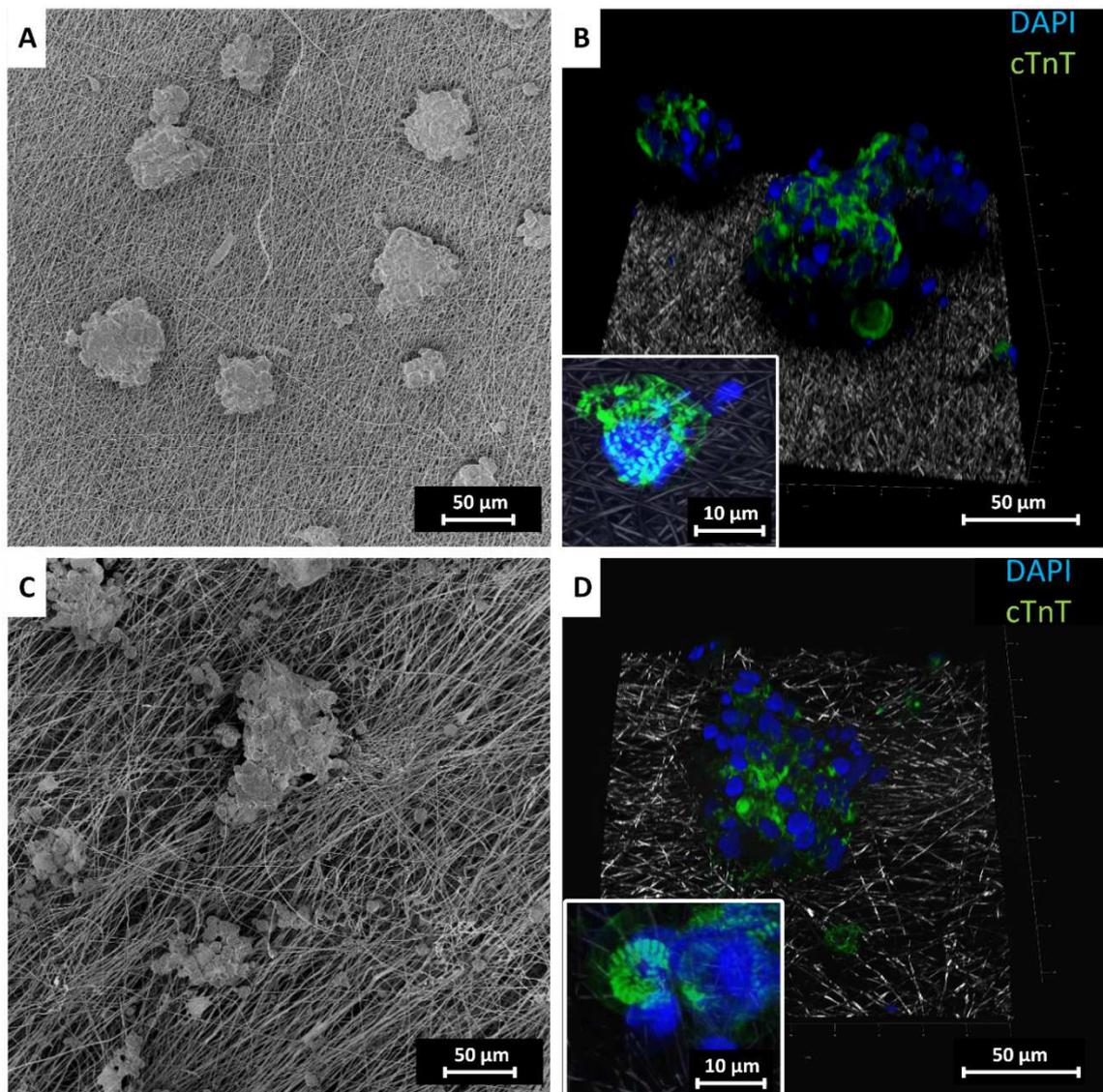


Abbildung 31: Kompatibilitätstest der Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds mit Kardiomyozyten, differenziert aus humanen induziert pluripotenten Stammzellen. REM-Aufnahmen der hiPS-CM nach 7 Tagen auf (A) Scaffold 12 und (C) Scaffold 12P. Konfokalmikroskop-Aufnahme der hiPS-CM nach 7 Tagen auf (B) Scaffold 12 und (D) Scaffold 12P. Gefärbt wurde gegen kardiales Troponin T in grün, die Zellkerne mit DAPI in blau und über die Reflexion die Fasern in grau. Abbildung wurde publiziert von Weigel et al. [112].

4. Ergebnisse

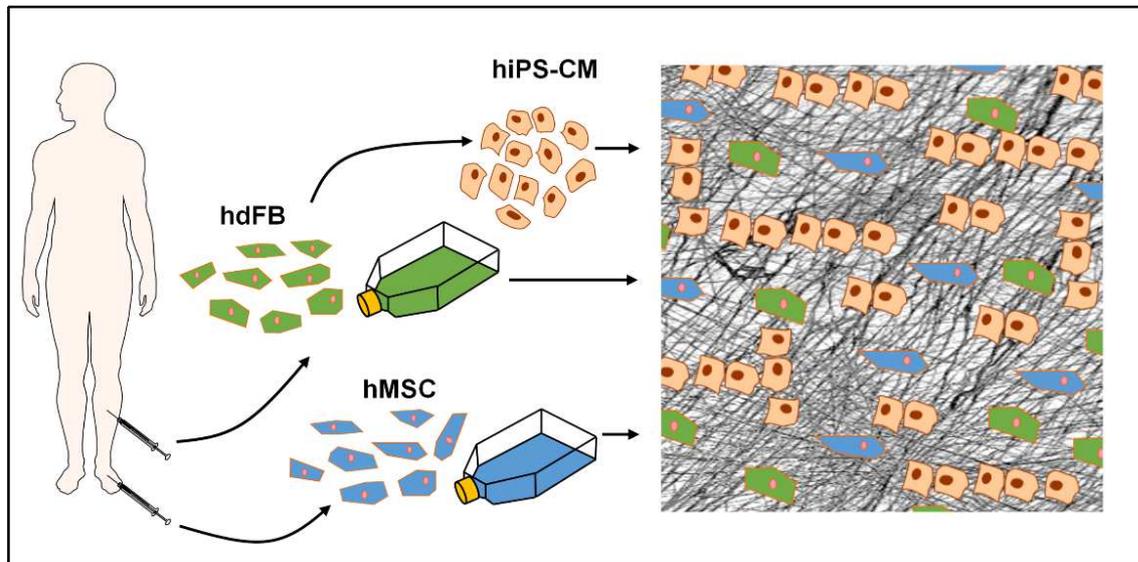


Abbildung 32: Erweiterung der Zellkultur zur Generierung von kardialen Gewebe. Anwendung einer Co-Kultur aus hiPS-CM, hdF und hMSC auf den porösen Scaffolds zur Erzeugung von dichtem kardialen Gewebe. Abbildung wurde publiziert von Weigel et al. [112].

Die Gesamtzellzahl in diesem Experiment betrug 5×10^5 Zellen/cm² im gleichen Verhältnis der drei Zelltypen, was einer ähnlichen Anzahl an Kardiomyozyten wie in der Monokultur entspricht. Nach zwei Wochen zeigte eine Phalloidin-Färbung, sowie eine Färbung gegen cTnI als früher Differenzierungsmarker [107], die Verteilung von Gewebs- und kardialen Zellen. Dabei konnte man kein geschlossenes Zellnetzwerk in dem Scaffold erkennen (Abbildung 33A). Die Gewebezellen, hdF und hMSC, konnte man durch die Phalloidin-Färbung auf dem Scaffold lokalisieren, sowie deren Migration in das Scaffold. Die Kardiomyozyten waren dagegen mit größeren Abständen auf dem Scaffold verteilt, und daher nicht in der Lage in dieser Zeit sich zu verbinden. Nach sechs Wochen konnte über eine Antikörperfärbung gegen cTnT die ersten Verbindungen von Kardiomyozyten beobachtet werden (Abbildung 33B). Des Weiteren zeigte die DAPI-Färbung eine höhere Zelldichte auf dem Scaffold, im Vergleich zu Zeitpunkt von zwei Wochen. Nach sieben Wochen Kultur, konnte auch diese erhöhte Zelldichte über REM-Aufnahmen bestätigt werden (Abbildung 33C). Die Zellen hatten einen fortgeschrittenen Zellrasen auf und in dem Scaffold gebildet. Die Färbung gegen cTnT lies zu diesem Zeitpunkt auch den Zusammenschluss mehrerer Kardiomyozyten erkennen (Abbildung 33D). Dies führte zu einer erhöhten Expression an cTnT, welches in der typischen gestreiften Anordnung der Sarkomere zu finden war. Im Vergleich zur Monokultur (Abbildung 31D) konnte

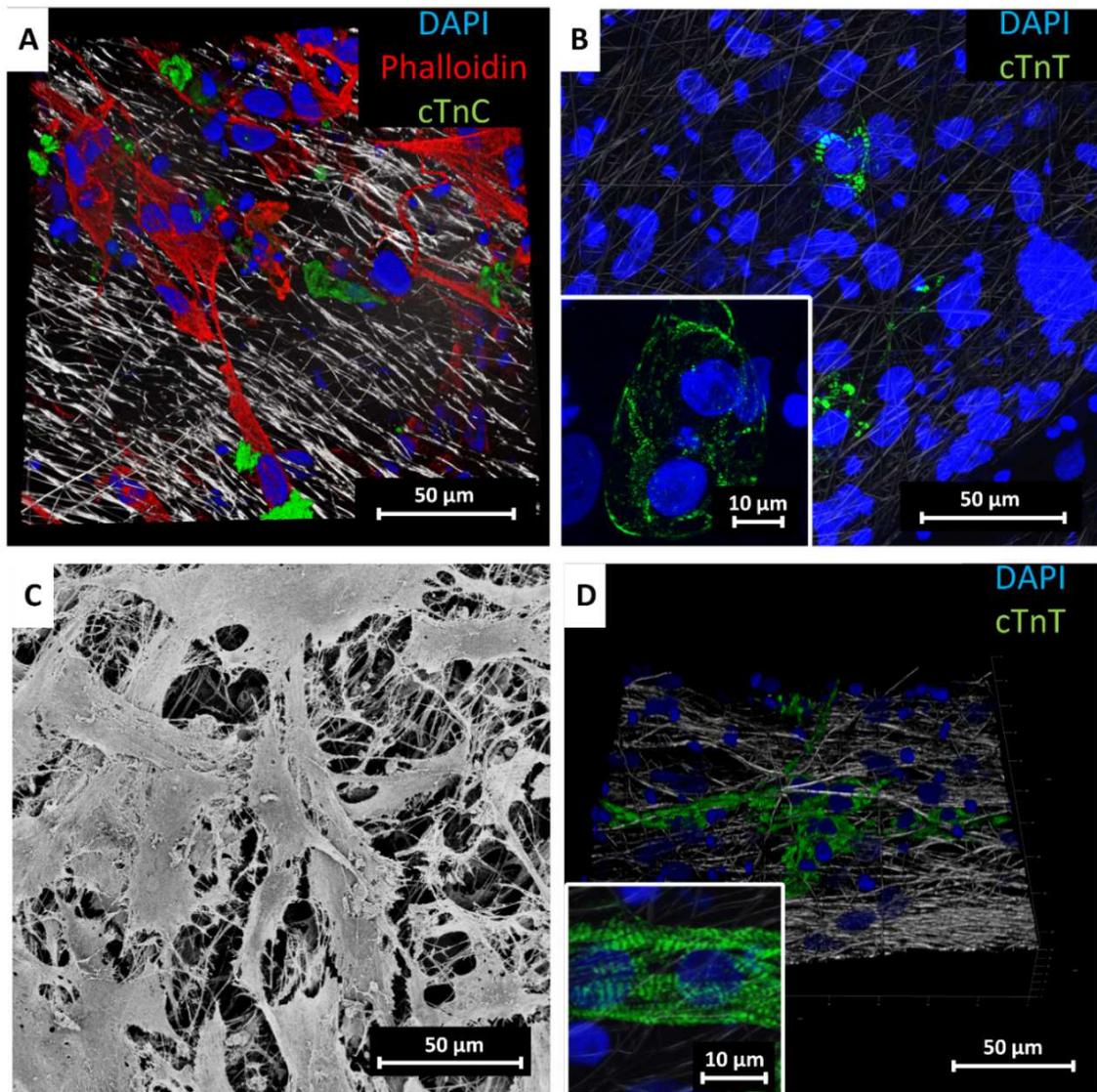


Abbildung 33: Langzeitkultur aus hiPS-CM, hdF und hMSC zur Beobachtung der Organisation von Kardiomyozyten und Bildung von kardialem Gewebe. (A) Konfokalmikroskopaufnahme zeigt die Co-Kultur nach zwei Wochen. Dabei sind die Kardiomyozyten gegen den frühen Differenzierungsmarker Troponin C in grün gefärbt. Die Gewebezellen hdF und hMSC sind über eine Phalloidinfärbung in rot dargestellt. (B) Aufnahme der Co-Kultur nach 6 Wochen mit den ersten Verbindungen zwischen wenigen Kardiomyozyten, dargestellt mit der Expression von cTnT in grün. Das vergrößerte Inset zeigt eine Nahaufnahme zweier Kardiomyozyten welche sich verbinden und das Sarkomernetzwerk aufbauen. (C)(D) Co-Kultur nach 7 Wochen. (C) REM-Aufnahme der Oberfläche zeigt eine nicht geschlossene zelluläre Scaffoldoberfläche. (D) Konfokalmikroskopische Aufnahme mit einer fortgeschrittenen, organisierten Anordnung mehrerer Zellen und der Ausbildung eines gerichteten Sarkomer-Netzwerkes gefärbt gegen cTnT (grün). Abbildung C und D wurde publiziert von Weigel et al. [112].

4. Ergebnisse

man in der Anordnung der Sarkomere eine Orientierung feststellen. Die Bildung der ersten kardialen Strukturen nach sieben Wochen deutete darauf hin, dass die Zellzahl der Kardiomyozyten zu gering war. Da auch diese Zellen nicht in der Lage sind zu Proliferieren, muss für die Erzeugung eines großflächigen kardialen Gewebes im Scaffold die Zellzahl der Kardiomyozyten bei der Aussaat um ein vielfaches erhöht werden.

4.5. Generierung einer hybriden Gewebe Elektrode und deren Integration in funktionelles kardiales Gewebe

Im nächsten Schritt sollte durch eine Erhöhung der Zellzahl ein kardiales Gewebe entstehen, welches die Faserelektrode umschließt und damit eine hybride Gewebe Elektrode erzeugt. Um eine spätere elektrische Stimulation durch die Elektrode zu ermöglichen, wurde an einer Seite des porösen Faserscaffolds beim Zuschneiden ein direkt verbundener Faserstreifen mit ausgeschnitten. Eine Einbettung dieses elektrischen Kontaktes in Silikon, sollte diesen vor mechanischen Schäden und vor dem einwandern von Zellen schützen (Abbildung 34). Dieser eingebettete Kontakt kann später als Zuleitung für die Elektrode dienen. Parallel erfolgte die Generierung eines kardialen Patches, welches zu Untersuchung der Integration der Elektrode in kardiales Testgewebe dienen sollte.

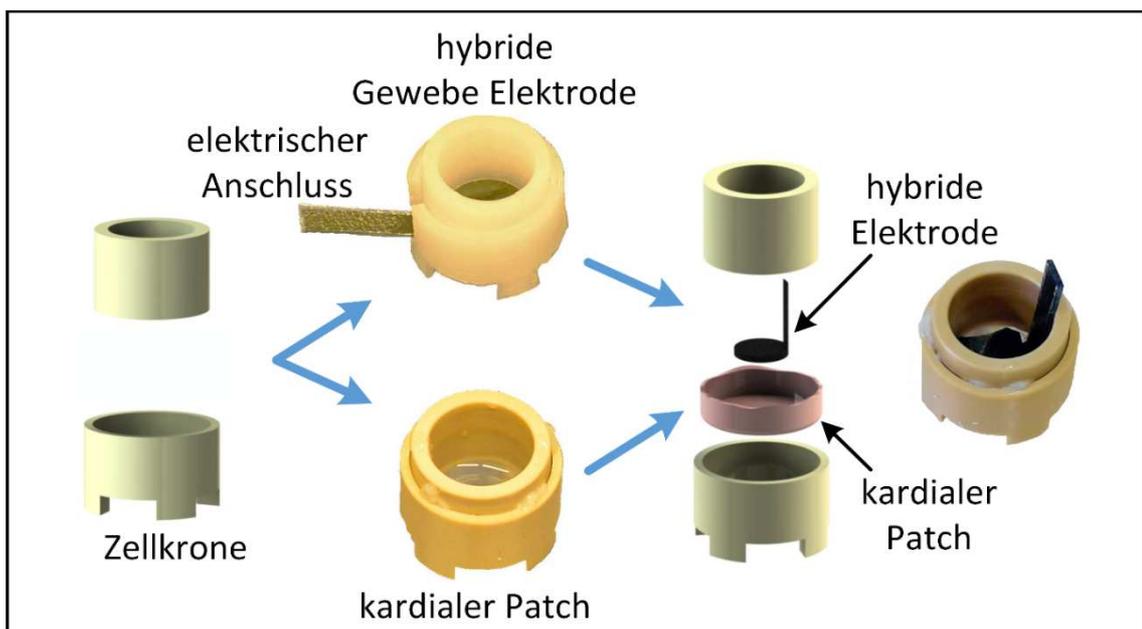


Abbildung 34: Konzeptzeichnung für die Erstellung einer hybriden kardialen Elektrode mit anschließender Integration in einen parallel generierten kardialen Patch. Die Kultivierung beider Komponenten erfolgte in Zellkronen. Für die Elektrode wurde das poröse Scaffold 12P und für den kardialen Patch eine dezellularisierte porcine Dünndarm-Matrix als Grundgerüst verwendet. Nach 4 Wochen Kultur wurde die entstandene hybride Gewebe Elektrode aus der Zellkrone genommen, zugeschnitten und mit den Zellen nach unten auf den kardialen Patch gelegt. Das Konstrukt wurde weiter 4 Wochen kultiviert.

4. Ergebnisse

Als Basis für diesen Patch verwendete man eine dezellularisierte Matrix aus porcinem Dünndarm [94] als Trägerstruktur. Für diesen Patch, als auch für die Besiedlung der Elektrode, wurden die gleichen Zellen verwendet. Eine vierfach höhere Zelldichte (2×10^6 Zellen/cm) sollte dabei helfen, das poröse Faserscaffold stärker mit kardialen Gewebe zu umschließen als in den vorigen Versuchen. Änderungen im Zellverhältnis sollten außerdem ein Überwachsen stark proliferierender Fibroblasten verhindern, sowie der geringen bzw. nicht vorhandenen Proliferation der Kardiomyozyten entgegen kommen. Daher wurde im Zellverhältnis der Anteil der Fibroblasten halbiert und die der Kardiomyozyten um 50 % erhöht. Das resultierende Zellzahlverhältnis zwischen hiPS-CM : hMSC : hdF bei der Aussaat betrug daher 1,5 : 1 : 0,5. Schon einige Tagen nach Aussaat konnten große kontrahierende Zellanhäufungen makroskopisch beobachtet werden. In den ersten beiden Wochen verteilten sich diese Anhäufungen immer weiter über das Scaffold. Nach zwei Wochen erfolgte die erste Analyse über eine cTnT-Färbung des besiedelten Scaffolds im Konfokalmikroskop. Die DAPI-Färbung zeigte, dass die Zellen auf dem gesamten Scaffold verteilt waren, während die cTnT-Färbung große Gebiete mit positiver Expression und ausgeprägter Sarkomer-Anordnung aufwies (Abbildung 35A). Diese könnten Reste der kontrahierenden Zellanhäufungen nach der Aussaat darstellen. Von diesen Anhäufungen war eine Ausbreitung der cTnT-positiven Bereiche in umliegende cTnT-negative Bereiche (Abbildung 35B) wahrscheinlich, welche sich mit anderen umliegenden positiven Bereichen verbindet. Genau dies zeigte sich nach weiteren zwei Wochen Kultur: Abbildung 35C zeigt in geringerer Auflösung, dass die cTnT-positiven Bereiche sich miteinander verbunden und ein Netzwerk aus funktionellem kardialen Gewebe über das gesamte Scaffold gebildet hatten. Des Weiteren war in den kontrahierenden Zellanhäufungen, durch die DAPI-Färbung eine erhöhte Zellkerndichte erkennbar. Nur einige cTnT-negative Bereiche waren zu diesem Zeitpunkt noch zu sehen. Zum einen zeigt die Zellkernfärbung mittels DAPI, dass sich Zellen darin befanden. Zum anderen konnte man in der 3D-Ansicht erkennen, dass es bei diesen Bereichen um Erhöhungen mit großer Maschenweite handelt. Demnach könnte es sich bei diesen Bereichen um Stellen handeln, an denen die Zellen hauptsächlich in das Scaffold migrieren. Eine Färbung nach insgesamt sechs Wochen Kultur unterstützt diese Theorie. Diese zeigte die Anordnung von Kardiomyozyten in organisierten cTnT-

Strukturen (violett, Abbildung 35D) innerhalb der ursprünglich negativen Bereichen in einer weit tieferen Ebene (40 μm unter der obersten Zellschicht). Zum Zeitpunkt nach vier Wochen Kultur konnte bereits eine großflächige Kontraktion des gesamten Scaffolds, durch ein Mikroskop oder auch mit dem bloßen Auge, beobachtet werden.

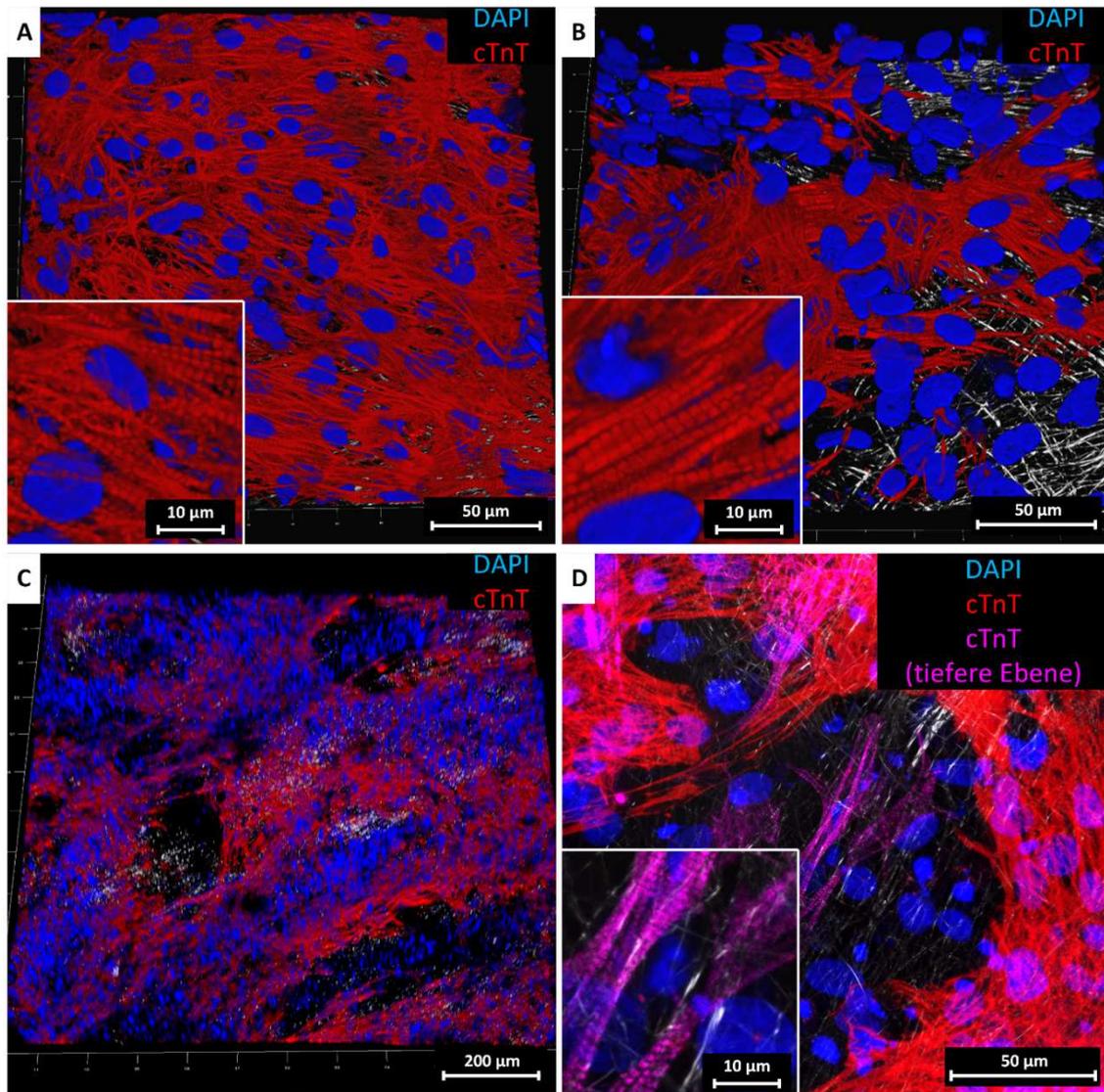


Abbildung 35: Entwicklung der hybriden kardialen Gewebe Elektrode. Konfokalmikroskopische Aufnahmen mit einer Färbung gegen cTnT (rot), den Zellkernen gefärbt mit DAPI (blau) und dem Reflexionssignal der Fasern (grau). (A)(B) Die Gewebe Elektrode nach zwei Wochen Kultur weist größere sich ausbreitenden Cluster an cTnT-positiven Zellen auf. (C) Nach vier Wochen haben sich die cTnT positiven Bereiche verbunden und bilden ein durchgehendes funktionelles kardiales Gewebe auf bzw. im Faserscaffold, mit der Ausnahme kleinerer cTnT-negativer Bereiche. (D) Nach sechs Wochen konnte die Bildung von cTnT-positiven Strukturen in tieferen Schichten (violett) beobachtet werden. Die Insets zeigen einen vergrößerten Ausschnitt aus dem jeweiligen Bild.

4. Ergebnisse

Eine weitere Messung der Funktionalität der hybriden Elektrode erfolgte durch die Messung der elektrischen Signale des Gewebes über ein MEA. Die gemessenen Signale hatten eine Amplitude von etwa $100 \mu\text{V}$ und eine Frequenz von ca. $0,5 \text{ Hz}$. Legte man die gemessenen Signale der äußersten Messelektroden des MEA-Chips übereinander (Abbildung 36), fiel auf, dass die zeitliche Verschiebung der Signale sehr gering war. Aus dem zeitlichen Unterschied der Signale und deren Distanz, resultierte eine Signalausbreitungsgeschwindigkeit von $0,9 \pm 1,1 \text{ m/s}$. Da diese, im Vergleich zu früheren Arbeiten [94], um ein vielfaches erhöht war, besteht die Annahme, dass das Signal nicht nur durch das kardiale Gewebe, sondern auch über die Fasern weiter geleitet wurde. Zur Analyse der Integration der Zellen in dem Scaffold erfolgte zunächst eine HE-Färbung eines Querschnitts (Abbildung 37A). Dabei konnte dichtes Gewebe bis in die zweite Schicht des Scaffolds gefunden werden, sowie einzelne langgestreckte Zellen in tieferen Schichten. REM-Aufnahmen zeigten in der Aufsicht auf die Elektrodooberfläche hauptsächlich dichtes Gewebe mit einigen noch nicht ganz geschlossenen Bereichen (Abbildung 37B). In diesen offenen Bereichen konnte man aber sehen, dass die Zellen in das Fasernetzwerk eindringen konnten.

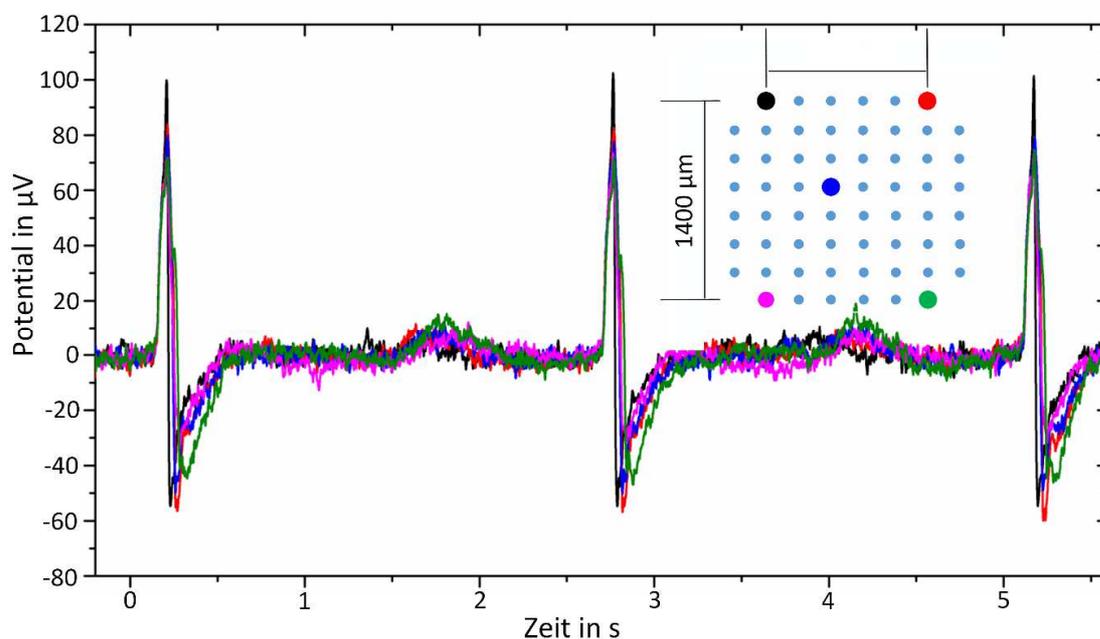


Abbildung 36: Messung der elektrischen Signale der hybriden Gewebe Elektrode auf einem Multi-Elektroden-Array Chip. Das Diagramm zeigt 2,5 Perioden der gemessenen Spannungssignale der hybriden Elektrode. Dargestellt sind ausschließlich die Messungen der Elektroden mit dem größten Abstand zueinander.

Eine Färbung mit spezifischen Antikörpern sollte die Aufteilung der verschiedenen Zelltypen im Scaffold aufzuklären. Abbildung 37C zeigt die Färbung gegen Alpha Actinin, welches vorallem in kardialen Zellen zur Expression kommt [130]. Da es aber auch an den fokalen Adhäsionskomplexen von Bindegewebszellen vorhanden ist, konnte es im gesamten Gewebe detektiert werden. Mit CD90 wurde ein Marker gefärbt, welcher für den Stammzellcharakter der hMSC steht (Abbildung 37D). Die Expression dieses Markers konnte aber nur sehr schwach in der untersten Schicht des dichten zellulären Gewebes ausgemacht werden, was für eine Differenzierung der MSCs spricht.

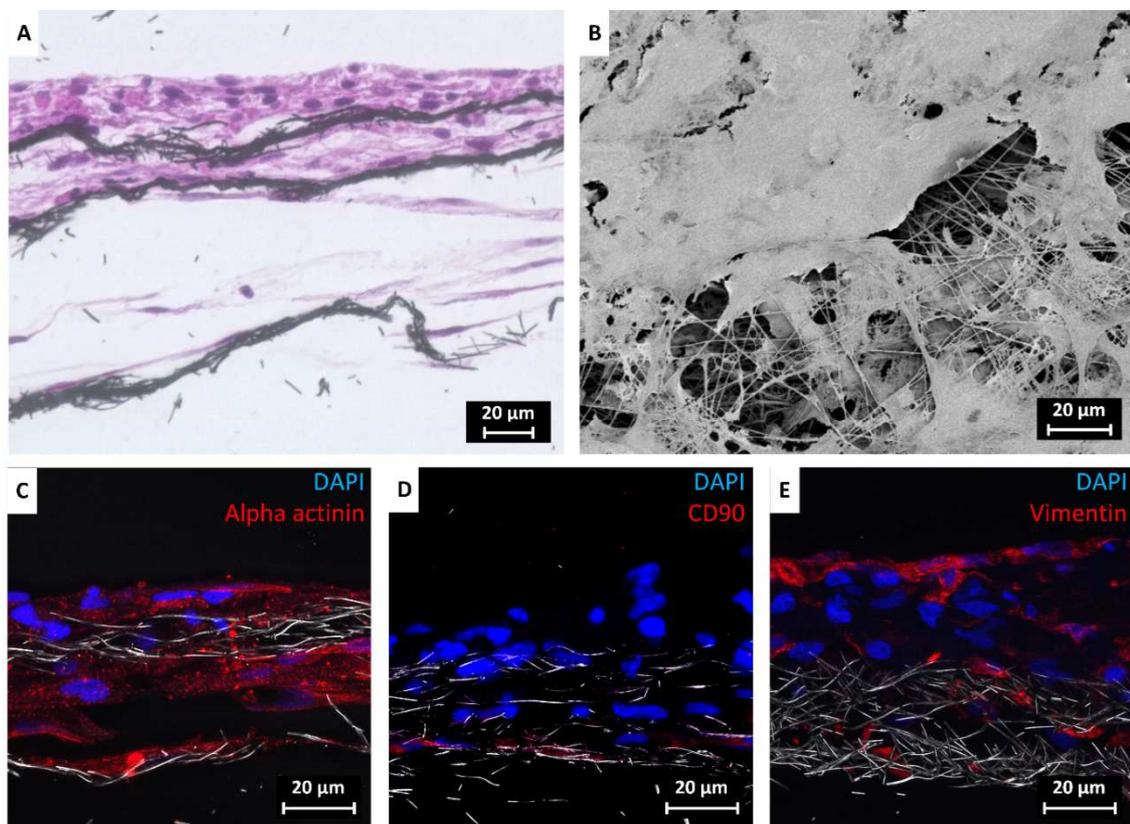


Abbildung 37: Migration und Bildung von kardialem Gewebe im porösen Elektronen Scaffold 12P nach vier Wochen. (A) HE-Färbung eines Parafinschnittes der hybriden Elektrode zeigt die obersten beiden in Gewebe integrierten Faserlagen. (B) REM-Aufnahme der Konstruktoberfläche mit dem dichten zellulären Gewebe und einem Bereich mit vermehrter Migration. (C) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Parafinschnitten mit Antikörperfärbungen gegen Alpha Actinin, (D) CD90 und (E) Vimentin, jeweils in rot. Zellkerne sind in blau und die Fasern in grau dargestellt.

4. Ergebnisse

Als dritte Färbung wurde Vimentin ausgewählt, welches vor allem in Fibroblasten expremiert wird. Die Mikroskopaufnahmen zeigen dieses vor allem an der Oberfläche des Gewebes und in einzelnen Zellen in tiefenen Schichten des Scaffolds.

Nach einer vierwöchigen Reifung der hybriden Elektrode, erfolgte eine *in vitro* Implantation der Elektrode in kardiales Gewebe, welches dafür mit den gleichen Zellen aufgebaut wurde (Abbildung 34). Dafür wurde die hybride Elektrode aus der Zellkrone genommen und umgedreht, so dass sich die Zellen auf der Unterseite befanden, und auf einen kardialen Patch gelegt. Weitere Maßnahmen zur mechanischen Verankerung wurden nicht vorgenommen. Die darauffolgende Kulturdauer betrug weitere 4 Wochen. Über den Querschnitt des Konstrukts wurde zunächst die Verbindung der beiden Komponenten untersucht. Die Falschfarbendarstellung einer REM-Aufnahme (Abbildung 38A) zeigt das biologische Gewebe in rot und die Nanofasern des Scaffolds in grau. Dabei erkennt man zum einen, dass sich beide Komponenten nahtlos verbunden haben. Zum anderen erkennt man auch, dass die biologischen Komponenten bis mindestens in die zweite Faserschicht eingedrungen sind. Ähnliches erkennt man auch in der HE-Färbung in Abbildung 38B. Hier ist vor allem der nahtlose Übergang zwischen den Zellschichten deutlicher dargestellt. Vereinzelt kann man noch einige Poren im Zellgewebe erkennen, was für verbleibende Luftblasen an der früheren Grenzfläche hindeutet. Über Antikörperfärbungen wurde dieses Konstrukt ebenfalls untersucht, zeigten aber ähnliche Eigenschaften wie in der hybriden Elektrode nach vier Wochen. Alpha Actinin befand sich überall in der zellulären Schicht, CD90 dagegen nur sehr schwach an den Übergängen zu den Scaffolds. Ebenfalls war Vimentin nur in den Randgebieten zu den Scaffolds bzw. in den Scaffolds lokalisiert.

Die mechanische Stabilität dieser zellulären Verbindung, zwischen den fusionierten Komponenten, erfolgte durch mechanische Belastung durch Zug in einem Organbad mit Kraftaufnehmer. Dafür wurde auf einer Seite der kardiale Patch und auf der anderen Seite die hybride Elektrode am elektrischen Anschluss eingespannt (Abbildung 39A). Über eine Millimeterschraube vergrößerte sich langsam der Abstand der beiden Klemmen manuell, bis die Verbindung zwischen der hybriden Elektrode und dem kardialen Patch brach. In Einzelfällen löste sich dabei die Zellschicht an beiden Komponenten was in Abbildung 39A gezeigt ist. Ansonsten

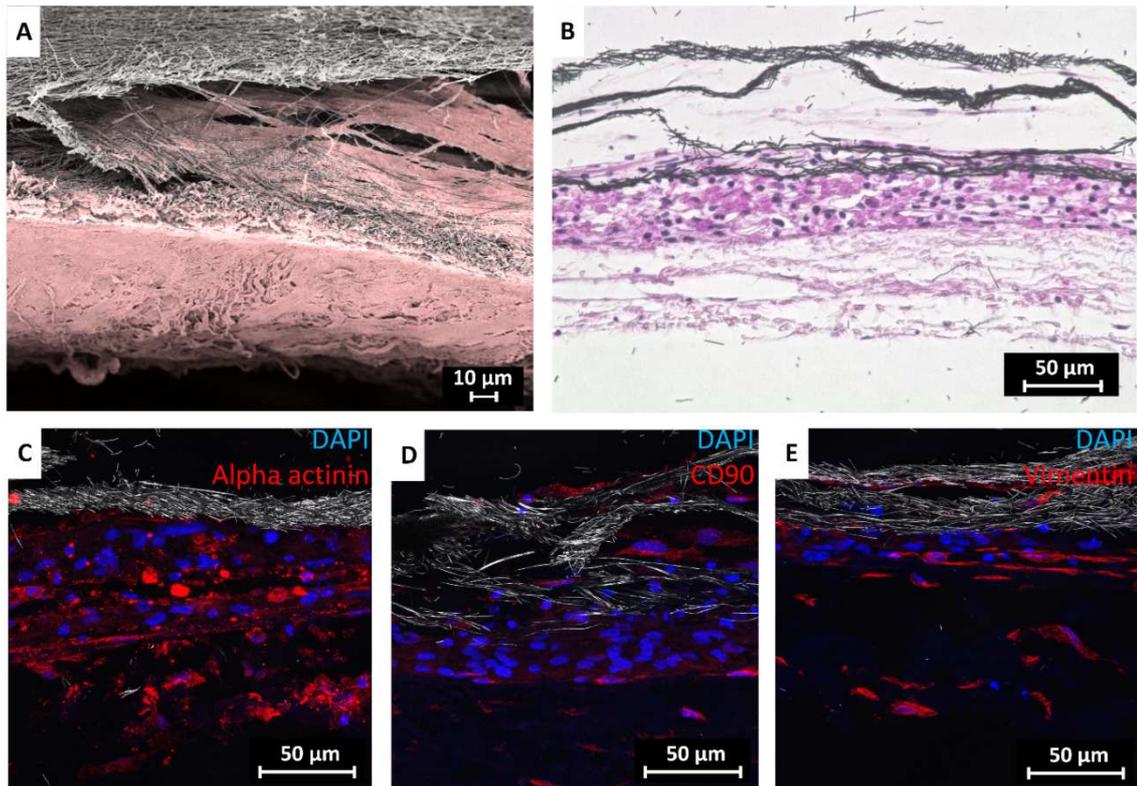


Abbildung 38: Integration der hybriden Gewebe Elektrode in einen kardialen Patch. (A) REM-Aufnahme mit Falschfarbendarstellung eines Querschnittes der beiden zusammengewachsenen Komponenten. Die Fasern sind in grau und biologisches Gewebe in rot dargestellt. (B) HE-Färbung eines Paraffinschnittes der eingewachsenen Elektrode. (C) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Paraffinschnitten mit Antikörperfärbungen gegen Alpha Actinin, (D) CD90 und (E) Vimentin, jeweils in rot. Die Fasern sind in grau und die Zellkerne in blau dargestellt. Diese Aufnahmen erfolgten nach 4 Wochen Kultur in Kontakt der beiden Komponenten.

erfolgte die Trennung eher schlagartig und es konnte eine maximale Zugkraft gemessen werden (Abbildung 39B). Die maximale Zugkraft der eingewachsenen Elektrode betrug dabei $35,0 \pm 13$ mN mit 4 gemessenen Proben. Abschließend erfolgte die Testung die Funktionalität des fusionierten Konstrukts bezüglich der spontanen und stimulierten Kontraktion. Für die Stimulation wurden elektrische Pulse, über den in Silikon eingebetteten Anschluss, in das kardiale Gewebe eingeleitet. Die spontane Kontraktion hatte eine maximale Kraft von 0,2 mN und eine Frequenz von ca. 1,4 Hz (Abbildung 40A, B). Mit elektrischen Rechteckpulsen von 50 mA und 0,1 ms, zeigten sich erste Reaktionen des Gewebes durch gemessene Kontraktionen. Bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz konnte das Gewebe seine eigene Kontraktionsfrequenz beibehalten und führte daher mehr zu einer unregelmäßigen Kontraktion durch die Überlagerung beider Frequenzen. Dies ist an

4. Ergebnisse

der hohen Verteilung der Frequenzwerte in Abbildung 40B zu erkennen. Eine Stimulationsfrequenz von 2 Hz übersteigt die eigene Kontraktionsfrequenz des Gewebes, welche dadurch unterdrückt wird. Daraus folgt eine Kontraktion welche nur noch auf die elektrischen Pulse reagiert (Abbildung 40A, B). Als Folge der erhöhten Kontraktionsfrequenz sinkt die maximale Kontraktionskraft dabei auf etwa 0,12 mN.

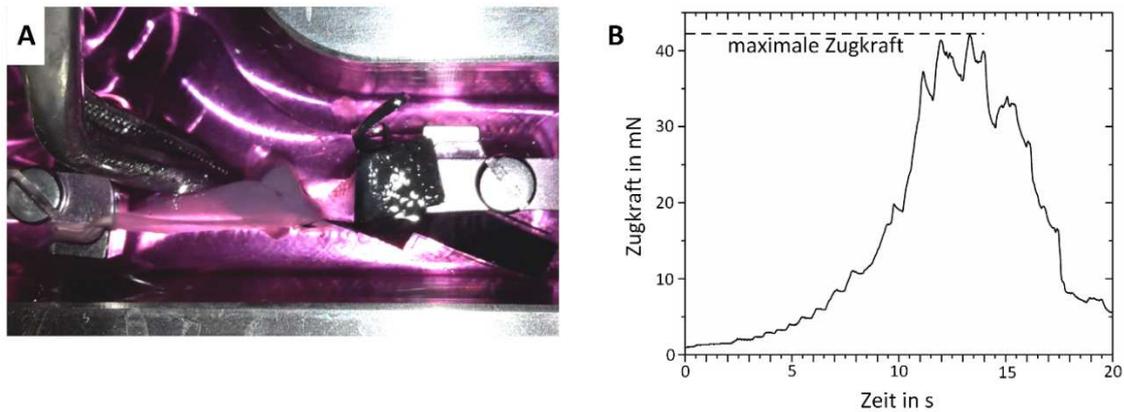


Abbildung 39: Mechanische Testung der zellulären Verbindung des zusammengewachsenen Konstrukts. (A) Zugexperiment in einem Organbad, bei welchem links der kardiale Patch und rechts des Kohlenstofffaser-Scaffold eingespannt wurde. Anschließend wurde per Hand die Distanz zwischen den Klemmen erhöht. Kurz vor dem Zerreißen des Konstrukts ist die zelluläre Verbindung zwischen den beiden Teilen sichtbar. (B) Gemessener Kraftverlauf eines Zugexperiments bis zur Trennung der Elektrode vom kardialen Patch.

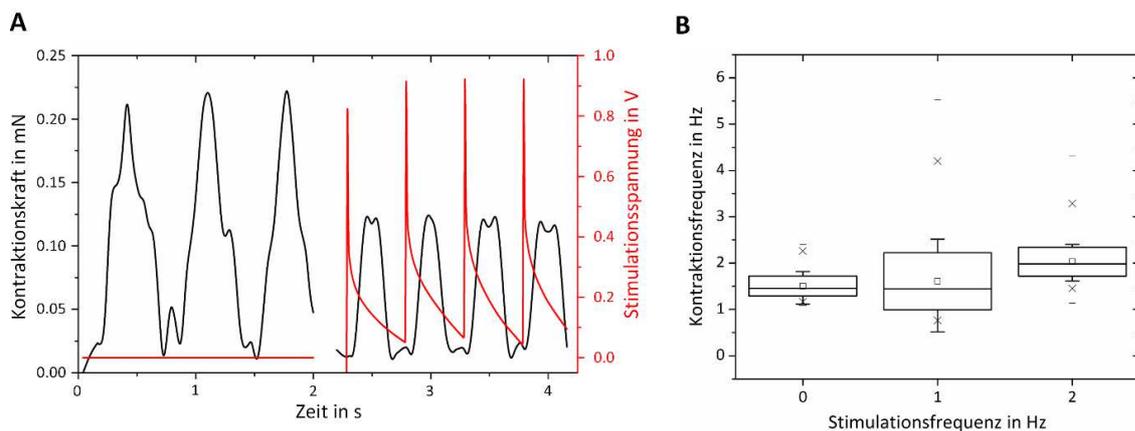


Abbildung 40: Kontraktions- und Stimulationsmessung des fusionierten Konstrukts. (A) Die linke Seite zeigt die Kraftkurve der spontanen Kontraktion des kardialen Gewebes mit eingewachsener Elektrode. Die rechte Seite zeigt die Kontraktionskraft durch eine Stimulation von 50 mA Pulsen mit 2 Hz. (B) Auftragung der Kontraktionsfrequenzen ohne, mit 1 Hz und mit 2 Hz elektrischer Stimulation. Anzahl der gemessenen Gewebe $n = 3$.

5. Diskussion

5.1. Eigenschaften der Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds

Die Generierung von Nanofasern mit Durchmessern zwischen 100 und 1000 μm über die Variation der Konzentration im Elektrospinn-Prozess ist allgemein bekannt [131] und erlaubt es, die Fasereigenschaften an spezifische Anforderungen, hinsichtlich strukturellen, mechanischen und elektrischen Eigenschaften, anzupassen. Das in dieser Arbeit entwickelte System ermöglicht eine Durchmesservariation von Kohlenstoff-Nanofasern zwischen 100 und 600 nm (Abbildung 14). Im Gegensatz zur direkten Verwendung von elektrogesponnenen Polymerfasern ohne weitere Nachbehandlung, schrumpft der Durchmesser von Kohlenstofffasern bei den Temperierprozessen um etwa 30 %, weswegen dementsprechend größere Durchmesser für die PAN-Rohfasern gesponnen wurden. Neben dem Faserdurchmesser ist die Maschenweite der gesponnenen Scaffolds ein wichtiges Kriterium für biologische Anwendungen, da diese Eigenschaft die Zellmigration in das Scaffold unterstützt oder verhindert. [75, 132]. Dabei führt ein kleinerer Faserdurchmesser zu einer dichteren Anlagerung der Fasern während des Spinnens, was in kleineren Maschenweiten resultiert [76]. Neben dem Faserdurchmesser kann ebenfalls das Einbringen von Abstandshaltern die Maschenweite beeinflussen und zusätzlich auch Poren im Netzwerk generieren [111]. Daher wurden in dieser Arbeit Methoden entwickelt, NaCl in das Faservlies zu integrieren und damit das Fasernetzwerk, nach bzw. während des Spinnprozesses, zu größeren Maschen auszudehnen.

Zunächst wurde der Einfluss des Faserdurchmessers auf die Faserstruktur im Scaffold und deren mechanischen Eigenschaften untersucht, über den Vergleich zwischen 140 und 530 nm dicken Fasern. Das Ausmessen der Maschenweiten bestätigte, dass dickere Fasern zu größeren Öffnungen im Netzwerk führen (Abbildung 18). Neben der Maschenweite beeinflusst die Dicke der Fasern auch deren Orientierung im Spinnprozess, was sich wiederum auf die mechanischen Eigenschaften des gesamten Scaffolds auswirkt. Grund hierfür ist, dass ein größerer Faserdurchmesser eine höhere Masse der Fasern im Spinnprozess bedingt. Eine steigende Trägheit führt zu einer geringeren Fluggeschwindigkeiten der Fasern zum

rotierenden Kollektor, was zu einer erhöhten Orientierung führt [133]. Die Testung der mechanischen Belastbarkeit im Zugversuch zeigte daher eine steigende Beständigkeit für größere Faserdurchmesser. Ein Vergleich der Faserorientierung zwischen den Faserscaffolds kann über die Form der Maschen getroffen werden, wobei eine steigende Faserorientierung zu länglichen Maschen und eine sinkende Orientierung zu runden Maschen im Scaffold führt. Kleinere Durchmesser wiesen dabei eine höhere Zirkularität auf (Abbildung 19B), was für eine geringere Faserorientierung spricht. Ein weiterer Grund für die geringere mechanische Belastbarkeit der dünneren Fasern ist die Anfälligkeit auf Fehler im Scaffold. Dies zeigte sich durch Faserbrüche und andere Schäden im Scaffold mit dünneren Fasern. Bei der Testung der Flexibilität zeigten die dünneren Fasern dagegen bessere Biegeeigenschaften (Abbildung 21B). In der Mechanik tritt dieser Effekt vor allem bei dünneren Bauteilen auf, da sich die Kräfte auf der Oberfläche mit dem Durchmesser verringern [134]. Das verstärkte Versagen, des Scaffolds mit dünneren Fasern, senkrecht zur Biegung ist durch die Fehler in der Faserstruktur erklärbar.

Um neben dem Faserdurchmesser auch Einfluss auf die Faserstruktur zu nehmen, wurde das Scaffold mit einem Kohlenstofffaser-Durchmesser von 530 nm bereits vor der Karbonisierung mit gesättigter NaCl-Lösung durchnässt und getrocknet. Dies führte zu Salzkristallbildung in den Maschen zwischen den Fasern (Abbildung 15A) und resultierte in einer welligen makroskopischen Struktur des Scaffolds nach der Karbonisierung. Da der Schmelzpunkt von NaCl etwa bei 800 °C [135] liegt, kann das Salz bis zu dieser Temperatur seine Form bewahren und dem Schrumpfprozess der Fasern entgegen wirken. Bei Erreichen dieser Temperatur im Ofen nach etwa 100 min, ist die Pyrolyse der stabilisierten Fasern weitestgehend abgeschlossen [43]. Während der Pyrolyse entweicht der größte Teil an Zersetzungsgasen und begründet damit auch einen Teil des Schrumpfungsprozesses der Fasern. Während dieses Prozesses können die NaCl-Kristalle dem Schrumpfprozess standhalten und damit das Fasernetzwerk verzerren. Dies führt zur Ausbildung der makroskopisch sichtbaren welligen Struktur. Da sich in jeder Masche Salzkristalle befanden, bewirkt dieser Prozess auch einen Einfluss auf die mikroskopische Struktur. Dies zeigte sich beispielsweise in einer geringen Vergrößerung der Maschen des

modifizierten Scaffolds mit NaCl-Lösung (Scaffold 12S) (Abbildung 18), im Vergleich zum Standard-scaffolds mit 530 nm Faserdicke (Scaffold 12). Neben der Maschengröße konnte die Verzerrung des Fasernetzwerkes noch deutlicher über eine Elongation der Maschen und damit einer Verringerung der Zirkularität bewiesen werden (Abbildung 19B). Diese Strukturänderungen hatten großen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften. In den Zugversuchen erkannte man dies, durch eine 5-fach höhere Dehnbarkeit des Scaffolds. Dies ist dadurch begründbar, dass sich die Wellen im Scaffold bei Zugbelastung zunächst glätten, bis die gesamte Spannung direkt auf die Fasern einwirkt. Dieser Effekt zeigt sich ebenfalls am Bruch des Materials. Die Gitterverzerrung führt zu einer ungleichmäßigeren mechanischen Belastung der Fasern. Dabei brechen erst die höher belasteten Bereiche des Scaffolds, während der Rest noch das Scaffold in Form hält und etwas später bricht. Dies ist im Spannungs-Dehnungs-Diagramm (Abbildung 21A) durch mehrere Maxima und damit Faserbrüche erkennbar. Die erhöhte Dehnbarkeit des mit NaCl erweiterten Scaffolds, führte im Spannungs-Dehnungs-Diagramm zu einer geringeren Steigung und damit zu einem 100-fach geringeren E-Modul im Vergleich zum Scaffold ohne Salz (Abbildung 22A). Die stark reduzierte Zugfestigkeit des Scaffolds mit NaCl führte zur Vermutung, dass die NaCl-Kristalle im Scaffold möglicherweise die Fasern während der Temperierung beschädigt haben. Daher wurde die gesamte Energieaufnahme während des Zugversuchs, durch Integration der Spannungs-Dehnungs-Kurve, berechnet. Dabei ergab sich eine vergleichbare Energieaufnahme des Standard-scaffolds und des Scaffolds mit NaCl-Modifikation (Abbildung 22D), was eine Schädigung der Fasern ausschließt. Die erhöhte Dehnbarkeit zeigte sich ebenfalls in einer verbesserten Flexibilität bei den Beigeversuchen. Dabei konnten 9 von 10 Proben den Test bis zum geringsten Biegedurchmesser von 1,5 mm bestehen, während das vergleichbare Scaffold ohne Salz nur mit einer Probe einem minimalen Durchmesser von 4 mm erreichen konnte. Verbesserungen der limitierten Flexibilität von Kohlenstoff-Nanofaser-Vliesen erfolgte bisher über Additive wie z.B. Titan, konnte aber das spröde Brechen des Vlieses beim Biegen trotzdem nicht vollständig verhindern [136]. Daher sind Änderungen in der Faserstruktur eine vielversprechende Alternative, flexible Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds zu entwickeln.

Neben der Verzerrung des Fasergitters konnten im REM weitere Nanostrukturen auf den Kohlenstofffasern mit NaCl Erweiterung beobachtet werden. Dabei handelte es sich um graphenartige Strukturen, welche sich um die Fasern wickelten oder mehrere Fasern eindeckten (Abbildung 15C, D). Aus der Literatur ist bekannt, dass sich Salzschnmelzen bei hohen Temperaturen als Lösungsmittel für Metalle, neutrale Verbindungen und Gase eignen [137]. Bei kohlenstoffhaltigen Verbindungen können diese in der Schmelze gelöst und dabei pyrolysiert werden. Je nach eingesetzter Salz-Kombination und organischem Molekül präzipitieren hochporöse Kohlenstoffstrukturen wie zum Beispiel Aerogele, Nanosheets, verzweigte Strukturen oder auch großflächige Graphen-Sheets [138-141]. In der Literatur werden hauptsächlich Salz-Mischungen verwendet um die Reaktionen zu steuern oder den Schmelzpunkt über ein Eutektikum zu verringern, daher wurde NaCl bisher noch nicht allein verwendet. Auf Grund der ähnlichen Strukturen ist es naheliegend, dass das NaCl für die graphenartigen Strukturen verantwortlich ist. Bei der Pyrolyse und Karbonisierung werden etwa 8 verschiedene gasförmige Substanzen aus den stabilisierten PAN-Fasern abgegeben [43], deren prozentualer Anteil in Abbildung 41 über der Temperatur aufgetragen sind. Dabei ist erkennbar, dass ab dem Schmelzpunkt von NaCl bei 800 °C nur noch HCN aus den Fasern entweicht und dieses Reaktionen in der Salzschnmelze auslösen könnte. Ein weiterer Grund für die Reaktionen von HCN in der NaCl-Schnmelze ist, dass dieses toxische Gas nicht mehr in den Abgasen des Ofens detektiert werden konnte. Aus Sicherheitsgründen erfolgt eine Klärung der Ofenabgase durch eine FeSO₄-Lösung, welche in Interaktion mit HCN zur Bildung von Berliner Blau führt. Bei der Anwesenheit von NaCl im Ofen, konnte dieser Farbumschlag nicht mehr beobachtet werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass das geschmolzene NaCl in den Fasern die Blausäure löst, diese dabei zersetzt und anschließend graphenartige Strukturen bildet. In der Literatur wird als Lösungsmechanismus von CO₂ die Bildung eines ionischen Quadrupol beschrieben, bei dem die Alkalimetallionen mit den Sauerstoff-Gruppen und die Halogen-Ionen mit dem Kohlenstoff interagieren [142]. Daher ist es möglich, dass ebenfalls die Chlorid-Ionen mit dem Kohlenstoff des HCN sowie die Natriumionen mit dem Wasserstoff interagieren. Außerdem sind Wechselwirkungen mit sauerstoffhaltigen Gruppen auf der Oberfläche der Fasern möglich, was zu einer Reduzierung dieser Gruppen führen kann. Ein weiterer

Hinweis auf die Reaktionen mit flüssigem Salz ist, dass die Strukturen hauptsächlich an der unteren Seite des Scaffolds auftreten. Dabei ist es wahrscheinlich, dass die Salzschnmelze mit gelöstem Kohlenstoff über die Schwerkraft nach unten geflossen war, im Laufe der Temperierung verdampfte und die beobachteten graphenartigen Strukturen zurückblieben. Auf Grund dieser sehr dünnen Schichten und den darunter liegenden Kohlenstofffasern konnte keine genaue Zusammensetzung herausgefunden werden, da sich die Signale der Fasern mit den der Strukturen in vielen Methoden überdecken. Denkbar ist, dass aus dem HCN Gase wie H_2 , N_2 oder NH_3 wieder abgegeben werden. Es ist aber nicht auszuschließen, dass zumindest ein Teil des Stickstoffs in den graphenartigen Strukturen zurückbleibt und im Gitter eingebaut wird [137].

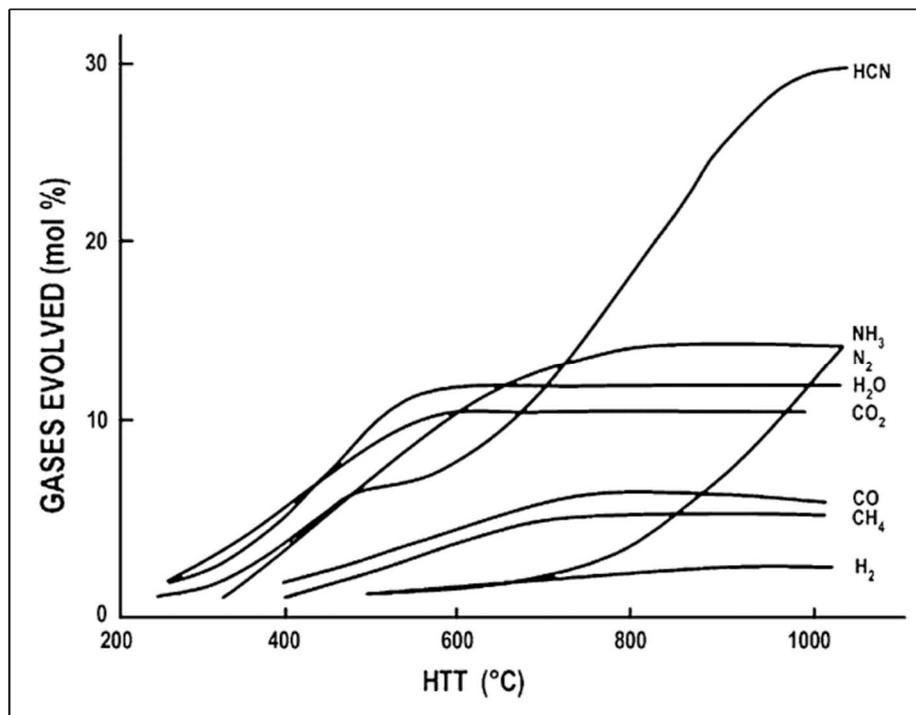


Abbildung 41: Qualitative und Quantitative Auftragung der Abgase während der Pyrolyse und Karbonisierung von PAN-Fasern. Reprinted by permission from Elsevier, Rahaman et al. [43], copyright (2007).

Die Erzeugung von Salzkristallen in der Fasermatrix durch eine gesättigte NaCl-Lösung, konnte eine Gitterverzerrung im Fasernetzwerk während der Karbonisierung erreichen. Bei diesem Prozess ist aber eine weitere Vergrößerung oder Verzerrung des Fasernetzwerkes nicht möglich, da höhere Spannungen in den Fasern zum Bruch dieser führen kann. Eine weitere Auflockerung des Faservlieses musste daher direkt während des Spinnprozesses stattfinden, da in diesem

Prozessschritt die Anordnung der Fasern direkt beeinflusst werden kann. Dafür wurden im nächsten Schritt NaCl-Partikel mit definierter Größe während des Spinnprozesses in das Faservlies eingebracht. Nach der Karbonisierung konnten zurückgebliebenen Poren im Querschnitt des Scaffolds gefunden werden. Diese zeigten etwa die Höhe der eingesetzten Partikel, hatten aber eine weit größere Länge (Abbildung 17I). Durch die Rotation der Walze wurden die Fasern mit einer gewissen Spannung über den Fasern abgelegt wodurch die Pore länger wird. Als weiteren Effekt wurde beobachtet, dass die Maschenweite über den Partikeln stark erweitert wurde. Die Salzpartikel könnten im Spinnprozess die geladenen Fasern elektrostatisch abstoßen und damit die Positionierung der Fasern um die Partikel begünstigen. Dadurch bildeten sich zwischen den Partikeln Bereiche mit einer hohen Faserordnung (Abbildung 17E). Legten sich Fasern über die Partikel, diente der oberste Teil des NaCl-Partikels als Knotenpunkt für die Fasern (Abbildung 17B). Ein andauernder Spinnprozess, führt zu einem fortschreitenden Ablegen von Fasern auf den Partikeln und damit zum Verkleinern der Maschen. Da aber ein möglichst kurzes Spinnintervall gewählt wurde, ermöglichte die folgende Partikelbeladung eine bleibende, im Vergleich zum Standardprozess, große Maschenweite. Dieser Effekt konnte am besten mit Partikeln der Größe 70-125 μm erzielt werden. Größere Partikel führten zu einer geringeren Partikelladung im Scaffold und zu großen Spannungen in den Fasern während der Karbonisierung. Kleinere Partikel führten zu einer geringeren Maschenweite, da mehr Fasern über die Partikel gesponnen werden konnten bis zum nächsten Salzstreu-Vorgang. Bisherige Publikationen im Bereich Elektrosponnen mit Porogenpartikeln, konnten keine Erhöhung der Maschenweite erzielen, da die Partikelbeladung des Scaffolds zu gering war [111]. In diesen Arbeiten dienten die Partikel zudem ausschließlich zur Generierung von Poren im Faserscaffold.

Die Maschen der Scaffolds, welche mit der mittleren Partikelgröße (Scaffold 12P) generiert wurden, ergaben eine Durchtrittsfläche von bis zu 100 μm^2 , was die Maschengrößen aller bisherigen Scaffolds bis zu einem Faktor von 20 übertrifft. Die mechanischen Eigenschaften des porösen Scaffolds waren ähnlich zum Scaffold, generiert über eine NaCl-Lösung, mit einer erhöhten Dehnbarkeit im Spannungs-Dehnungs-Diagramm. Dies ist damit zu begründen, dass beim Anlegen einer

Zugspannung zunächst die Poren in die Länge gezogen werden, bis die Zugbelastung rein auf die Fasern wirkt. Auch die geringere Steigung führte zu einem niedrigeren E-Modul als bei den unbehandelten Scaffold, aber die aufgenommene Energie bis zum Bruch war vergleichbar bei allen Scaffoldtypen. Im Biegeversuch zeigte das poröse Scaffold die höchste Flexibilität aller getesteten Proben. Im durchgeführten Biegetest konnten alle Proben bis zum kleinsten Durchmesser von 1,5 mm die Biegung ohne Schaden überstehen (Abbildung 21B). Selbst durch Knicken des Scaffolds konnte keine Schädigung erkannt werden. Eine Begründung ist, dass sich durch die lamellenartige Porenstrukturen die einzelnen Ebenen des Scaffolds untereinander besser bewegen können und weniger Spannungen an den Oberflächen des Scaffolds aufbauen.

Vergleichbar mit dem Scaffold mit NaCl-Kristallen aus einer Lösung, konnten auch mit den NaCl-Partikeln graphenartige Strukturen im Fasernetzwerk gefunden werden. Wobei die Menge mit abnehmender Partikelgröße stark zunahm (Abbildung 17A). Zudem befanden sich diese Strukturen an den Positionen der ursprünglichen Partikel. Dies lässt darauf schließen, dass das geschmolzene NaCl nicht über die Schwerkraft nach unten geflossen ist, sondern direkt an der ursprünglichen Position verblieb. Des Weiteren führte die erhöhte Oberfläche der kleineren NaCl-Partikel, bzw. Tropfen, zu einer verbesserten HCN Aufnahme aus den Fasern.

Bereits in früheren Publikationen wurde die Erzeugung von Poren durch Salzpartikel in elektrogesponnene Faservliese publiziert [111, 143]. Neben der Anwendung als Elektrode durch leitfähige Fasern, zeigt das entwickelte poröse Scaffold noch weitere Verbesserungen. Im Vergleich zu bereits publizierten porösen Nanofaser-Scaffolds, wurden die Partikel kontinuierlich, während des Spinnprozesses, über das Scaffold gestreut und eingearbeitet. Auf Grund der Rotation der Walze und der geringen Haftung der Partikel entstand dabei aber nur ein geringer NaCl-Gehalt im Fasernetzwerk, ohne weitere Maßnahmen zur Beladung des Vlieses. Das Anfeuchten der Walze mit Ethanol erhöhte die Haftung erheblich in dieser Arbeit und maximiert den NaCl-Gehalt auf etwa 90 %. Dadurch konnte die Anzahl der Poren gesteigert, die zwischenliegenden Faserlagen auf wenige Faserlagen reduziert werden und die Maschenweite um eine

Größenordnung gesteigert werden. Im Gegensatz zu diesen erwähnten Publikationen, konnte die Anwendung von PAN als Spinnpolymer und die darauffolgenden Temperierungen, neben der erweiterten Maschen und erzeugten Poren, ein elektrisch leitfähiges Scaffold ermöglichen.

Zur chemischen Charakterisierung des Materials wurde die Raman Spektroskopie angewandt. Ein Ausschnitt des Spektrums der vier Faser-Scaffolds ist in Abbildung 20A dargestellt und zeigt deutlich die für Kohlenstoff bzw. Kohlenstofffasern charakteristischen Peaks [144, 145]. Durch die Peakanalyse konnten die einzelnen Banden aufgetrennt und ihre Intensitätsanteile in Tabelle 9 bestimmt werden. Es ist erkennbar, dass das Spektrum stark von der D1-Bande dominiert wird. Die starke Ausprägung dieser Bande wird, neben den strukturellen Eigenschaften der Fasern, vor allem durch die Wellenlänge des Lasers der Raman-Messung verursacht. In der Literatur wird beschrieben, dass eine größere Wellenlänge die Intensität der D1-Bande stark erhöht und ebenso die Position etwas verschoben wird [113, 114]. Daher wird von vielen Gruppen eine möglichst kleine Wellenlänge bevorzugt um die Bande für ungeordnete Strukturen zu minimieren. Das in dieser Arbeit angewendete Raman-System verwendet, mit 780 nm, eine vergleichsweise große Laserwellenlänge. Daher sind direkte Vergleiche mit der Literatur ungeeignet. Dennoch lässt sich durch den Vergleich der Messungen untereinander Rückschlüsse auf strukturelle Unterschiede zwischen den Scaffolds treffen. Aus dem Intensitätsverhältnis aus D1- und G-Bande konnte das Verhältnis von ungeordneten und geordneten Strukturen bestimmt werden und untereinander verglichen werden. Die Fasern mit Durchmessern von 140 nm zeigten dabei die ungeordnetste Struktur der vier Scaffolds (Tabelle 10). Auf Grund der geringen Größe dieser Fasern fließt ein weit höherer Oberflächenanteil in die Messung mit ein, als mit dickeren Fasern von etwa 500 nm. Oberflächliche funktionelle Gruppen, welche die Ordnung graphitischer Strukturen stören, können für diesen hohen Wert verantwortlich sein. Beide NaCl-Scaffolds zeigten den niedrigsten Wert und damit die höchste Ordnung auf. Gründe dafür sind zum einen die graphenartigen Ablagerungen an den Fasern. Zum anderen wurden diese Fasern drei Mal länger karbonisiert, was ebenfalls die Ordnung in den Fasern verbessert und den Anteil an nicht-kohlenstoff Atomen verringert. Die Betrachtung der amorphen

Kohlenstoffanteile (Tabelle 10) zeigt ein ähnliches Verhalten, mit dem größten Anteil für die Fasern mit geringstem Durchmesser. Über die Intensität der D4 Bande (Tabelle 9) kann ein Maß für ionische Bestandteile und große Defekte getroffen werden [58, 146]. Bei den unbehandelten Scaffolds zeigen die dünneren Fasern einen höheren Wert was ebenfalls durch Gruppen an der Oberfläche begründet werden kann. Auch in den NaCl-Scaffolds ist dieser Wert höher und lässt darauf schließen, dass noch Reste von NaCl in bzw. auf den Fasern vorhanden sind.

Bei Betrachtung des Kontaktwinkels konnte eine anisotrope Benetzung auf dem Scaffold mit geringstem Faserdurchmesser erkannt werden (Abbildung 23A, B). Dabei wird durch die Ausrichtung der Fasern eine leicht erhöhte Benetzung in Faserorientierung erzielt. Dieser Effekt wurde bereits durch Tanaka et al. beschrieben, welcher eine anisotrope Benetzung auf Grabenstrukturen im μm -Bereich beobachtet hatte [147]. Eine Vergrößerung der Maschen durch dickere Fasern führt zu einer sofortigen Benetzung der Oberfläche. Die Temperierung mit NaCl führt bei den Scaffolds zu einer starken Verschiebung zu hydrophoben Kontaktwinkeln (Abbildung 23C). Über die Erzeugung von Sauerstoffgruppen an der Faseroberfläche konnte eine vergleichbare Benetzungsgeschwindigkeit zum unbehandelten Scaffold mit dickeren Fasern erzielt werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Temperierung mit NaCl die Karbonisierung an der Oberfläche der Faser verstärkt und damit die polaren Gruppen reduziert. In Korrelation mit den Raman-Messungen konnte bei den NaCl-Fasern auch eine höhere Ordnung der graphitischen Strukturen gemessen werden, was ebenfalls für eine Reduzierung der Oberflächengruppen sprechen kann.

Vergleicht man die Struktur- und Materialeigenschaften der vier Scaffoldtypen, konnte das poröse Scaffold die meisten Voraussetzungen für kardiale 3D-Elektroden erfüllen. Neben der erhöhten Maschenweite und generierten Poren, ist die erzielte Flexibilität ein erheblicher Vorteil im dauerhaften Bewegungsumfeld des Herzens. Als Nachteil zeigte sich bei diesem Scaffold die Reduzierung der Oberflächenpolarität durch die Karbonisierung in Anwesenheit von NaCl. Die nachträgliche Behandlung mit Sauerstoff oder Ammoniak-Plasma, zur Erzeugung von polaren Gruppen an der Faseroberfläche, wäre eine vielversprechende Methode, diesen Nachteil wieder auszugleichen.

5.2. Elektrische Eigenschaften der Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds

Bei der Verwendung von Elektroden als Implantat, müssen diese einige spezifische elektrische Eigenschaften erfüllen. Diese richten sich auf das Material an sich und dessen Interaktionen an der Grenzfläche. Neben der elektrischen Leitfähigkeit als grundlegende Eigenschaft, ist eine geringe Impedanz in einem möglichst breiten Frequenzspektrum wichtig, um Stimulationssignale möglichst widerstandsarm in das umliegende Medium zu übertragen. Zusätzlich sollte die Elektrode im zersetzungsfreien Spannungsbereich von Wasser (-1 – 1 V) keine Reaktionen mit dem Medium eingehen, bzw. nicht degradieren. Nach diesen Kriterien erfolgte die Charakterisierung der Kohlenstofffaser-Scaffolds in diesem Kapitel.

Zur Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften wurde zunächst die spezifische Leitfähigkeit der Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds bestimmt. Bei dieser Messung musste der Strom eine Distanz von 9 mm durch das Faservlies überwinden, wodurch die gemessene Leitfähigkeit stark von der Faserorientierung abhängig ist. Um nahe an der Anwendung zu bleiben, erfolgten alle elektrischen Messungen über eine Kontaktierung in der Vorzugsorientierung der Fasern im Scaffold. Bei einer optimalen Orientierung der Fasern in Messrichtung wird der Strom direkt, in den einzelnen Fasern, über die Distanz weitergeleitet. Man erhält vorwiegend die spezifische Leitfähigkeit des Materials, welche von der inneren Struktur, bzw. Kristallitgröße und dessen Ausrichtung, abhängt [148]. Ist die Ausrichtung der Fasern um 90° gedreht, muss der Strom von Faser zu Faser geleitet werden, was an jeder Grenzfläche einen Widerstand erzeugt und damit zu einer Verringerung der Leitfähigkeit führt [47]. Das vorige Kapitel behandelte bereits die Struktur der verschiedenen Kohlenstofffaser-Scaffolds und wies dabei Unterschiede in der Faserorientierung auf. Diese Unterschiede konnten sich in der elektrischen Leitfähigkeit widerspiegeln. Durch die Ausrichtung dickerer Fasern zeigte ebenfalls eine höhere spezifische Leitfähigkeit als mit dünneren, unorientierteren Fasern. Die Einbettung des Scaffolds in NaCl führte zu einer Verzerrung und einer leichten Verstärkung der Orientierung. Außerdem führten Kohlenstoffablagerungen an und zwischen den Fasern, zu möglichen elektrischen Brücken zwischen den Fasern. Dadurch erhöhte sich die Leitfähigkeit, im Vergleich zu den unbehandelten Fasern.

Das Einbringen von Salzpartikeln im Spinnprozess reduziert zum einen die Faserorientierung und zum anderen die elektrischen Kontaktflächen zwischen den Fasern und Faserschichten. Dies führte zu einer Verringerung der elektrischen Leitfähigkeit um 40 %, gegenüber des unbehandelten Kohlenstofffaser-Scaffolds. Der Vergleich mit der Literatur zeigt, dass für die Scaffolds in dieser Arbeit eine ca. 100-Fach höhere elektrische Leitfähigkeit bestimmt wurde, als durch andere Gruppen beschrieben. Dies liegt daran, dass meist die Luft in der offenen Faserstruktur nicht aus der Berechnung ausgeschlossen wurde [47, 149]. Für die Charakterisierung des Fasermaterials ist der Ausschluss der Luft aber ein Vorteil, da der Einfluss vom stark schwankenden Luftanteil im Scaffold ausgeschlossen wird und eine verbesserte Vergleichbarkeit mit sich bringt. In dieser Arbeit wurde dies über das Gewicht der Probe und der theoretischen Dichte der Kohlenstofffasern realisiert (siehe 3.4.1).

Über die Impedanz Spektroskopie wurde nach der Bestimmung der Leitfähigkeit, der Übergang der elektrischen Energie in den umgebenden Elektrolyten untersucht. Aufgrund der biologischen Anwendung wurde für den Elektrolyten PBS⁻ als physiologische Salzlösung gewählt. Der Verlauf der Impedanz und der Phasenverschiebung zeigte bei allen Scaffolds ein ähnliches Verhalten (Abbildung 24A, B). Erst unter einer Frequenz von 10 Hz steigt die Impedanz deutlich an, was eine typische Eigenschaft von porösen Kohlenstoff-Elektroden ist [150-153]. Im Nyquist-Plot ist ein Anstieg der Kurve unter 1 Hz erkennbar. Da bei geringeren Frequenzen der Diffusionsweg der Ionen ansteigt, nimmt die Diffusion der Ionen durch die Elektrode einen im größeren Einfluss auf die Messung. Dies zeigt sich beispielsweise durch eine erhöhte Kapazität und damit mit einer Erhöhung des Imaginärteils der Impedanz. Durch Fitten des Spektrums über ein Ersatzschaltbild kann diese Diffusion mit einem T-Element beschrieben werden, welches meist bei der Charakterisierung von porösen Elektroden verwendet wird [154, 155]. Zwischen den dargestellten Impedanzmessungen der vier Scaffolds sind geringe Unterschiede erkennbar. Da aber die Dicke der Scaffolds variiert, konnten keine weiteren Interpretationen zwischen den Scaffolds durchgeführt werden. Um die Fasern mit aktuell verwendeten Herzschrittmacherelektrodenmaterialien zu vergleichen wurde das Impedanz-Spektrum von TiN und Pt gemessen und über das

Ersatzschaltbild (Abbildung 24E) gefittet. Dabei zeigt sich ein starker Anstieg der Impedanz von Pt bei mittleren Frequenzen, während dies bei TiN und dem Kohlenstofffaser-Scaffold erst bei geringen Frequenzen geschieht. Aufgrund der faradayschen Ladungsübertragung von Platin wird die Energie unter anderem über Reaktionen an der Elektrodenoberfläche übertragen [5]. Die Folge ist ein hoher Ladungs-Transfer-Widerstand, welcher über den Fit in Abbildung 25B dargestellt ist. TiN und Kohlenstoff übertragen die Ladungen in den Elektrolyten fast ausschließlich über kapazitive Prozesse [5]. Dies führt zu einem geringem Ladungs-Transfer-Widerstand und einem Anstieg in der Kapazität (Abbildung 25A). In der Impedanzkurve zeigt sich kaum ein Unterschied zwischen TiN und den Kohlenstofffasern. In der Phase ist dagegen das Maximum von TiN zu kleineren Frequenzen verschoben (Abbildung 24D). Dies spricht für eine höhere Kapazität des TiN, welches trotz geringerer Oberfläche das Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffold übertrifft. Dieser Kapazitätsunterschied ist ebenfalls im Fit erkennbar (Abbildung 25A). Da aber die Kohlenstofffasern einen geringeren Ladungs-Transfer-Widerstand besitzen (Abbildung 25B), gleichen sich die Kurven im Impedanz-Spektrum an.

Die Erzeugung von Potentialen an Elektrodenoberflächen können chemische Reaktionen im Kontakt mit dem Elektrolyten hervorrufen. Folgen sind dadurch Korrosionserscheinungen an der Elektrode, die Zersetzung des wässrigen Elektrolyts oder unkontrollierte Reaktionen mit Bestandteilen aus der umliegenden Flüssigkeit oder dem Gewebe. Neben der Korrosion der Elektrode, können diese Reaktionen an der Herzschrittmacherelektrode das kardiale Gewebe schädigen. Daher ist es nötig die Stabilität der Elektrode bzw. des wässrigen Elektrolyten über cyclovoltametrische Messungen zu testen. Für viele Elektrodenmaterialien sind die Potentialbereiche für die Stabilität eines wässrigen Elektrolyten bekannt. Das sichere Stabilitätsfenster von Platin gegenüber wässrigen Elektrolyten ist zwischen -0,6 und 0,8 V positioniert, während TiN im Bereich von -0,9 – 0,9 V als reaktionsfrei gilt [5]. Ein Vorteil von kohlenstoffbasierten Elektroden ist ein reaktionsfreies Fenster von mindestens -1 – 1 V, kann aber durch die Kristallstruktur oder funktionelle Gruppen an der Oberfläche leicht variieren [156-158].

Die cyclovoltametrischen Messungen an den Kohlenstofffaser-Elektroden zeigten keine ausgeprägten Peaks im Spannungsbereich zwischen -1 und 1 V. Dies spricht dafür, dass an der Oberfläche der Elektrode keine Reaktionen durch das Potential hervorgerufen werden und lediglich Polarisierungseffekte an der Oberfläche stattfinden. Die Messung des porösen Scaffolds, sowie des Scaffolds mit dem dünnsten Faserdurchmesser, veranschaulicht eine Welle unterhalb von -0,25 V. Diese Welle war im ersten Durchlauf der Messung bei jedem Scaffolds zu sehen, jedoch bei den beiden anderen Scaffoldtypen bis zum dritten Messdurchgang verschwunden. Daher besteht die Vermutung, dass diese Welle auf unzureichende Benetzung der Scaffolds mit dem Elektrolyten hinweist. Farjami et al. zeigte einen Peak an einer ähnlichen Position, welcher durch die Sauerstoffreduktion eines sauerstoffgesättigten NaOH-Elektrolyten hervorgerufen wurde [159]. Demnach könnte eine unvollständige Benetzung des Scaffolds ebenfalls eine Sauerstoffreaktion durch eingeschlossene Gase ermöglichen. Der Vergleich der CV-Kurve des Scaffolds mit dem größeren Faserdurchmesser mit der Literatur, weist starke Ähnlichkeiten mit CV-Messungen von Aktivkohle- oder anderen porösen und pyrolysierten Kohlenstoff-Elektroden auf [160, 161]. Aufgrund der polaren Oberflächengruppen zeigte sich dabei eine hohe Kapazität an der Kontaktfläche zum Elektrolyten. Da auf den Fasern noch restliche funktionelle Gruppen vorhanden sind [162], ist ein ähnlicher Effekt denkbar. Im direkten Vergleich der CV-Kurven zeigten die unbehandelten dickeren Fasern, mit Abstand die höchste Ladungskapazität (Abbildung 26E, F, Tabelle 12). Da die Karbonisierung der Salzfasern verlängert wurde, ist eine Abnahme der funktionellen Gruppen wahrscheinlich. Zudem kann die Einwirkung des Salzes bei hohen Temperaturen den Abbau von Restgruppen verstärken, was eine geringere Ladungskapazität in der CV-Messung zur Folge hat. Die dünnen Fasern zeigten in der CV-Messung die geringste Ladungskapazität. Gründe dafür sind, zum einen eine unvollständige Benetzung, welche durch die sehr kleinen Maschen im Scaffold gebremst wird und in der Messung durch die Welle bei -0,25 V sichtbar ist. Zum anderen weist das Scaffold die geringste Stabilität auf, wodurch Faserbrüche beim Einspannen zu Messung denkbar sind und damit ebenfalls die Ladungskapazität der Elektrode senkt. Die Reduzierung der Ladungskapazität einer Elektrode wirkt sich aber nicht unbedingt negativ auf die

Anwendung als Schrittmacherelektrode aus, da eine zu hohe Ladungskapazität die Signalgeschwindigkeit der Elektrode reduziert und Fehlsignale ausgeben könnte.

Vergleicht man die elektrischen Eigenschaften der Kohlenstoff-Nanofasern mit alternativen Elektrodenmaterialien, zeigt sich eine etwa 10 – 100fach geringere Leitfähigkeit als metallische Materialien [163]. Da aber die Generierung einer vergleichbaren porösen 3D-Struktur aus Metall bisher nicht erreicht werden konnte, eignen sich diese Materialien weniger als 3D-Gewebeelektrode. Als Alternative zur Herstellung von leitfähigen Nanofasern, kommen elektrisch leitfähige Polymere, wie beispielsweise Poly(3,4-Ethylendioxythiophen):Polystyrolsulfonat (PEDOT:PSS), zur Anwendung. Mit einer vergleichbaren Leitfähigkeit zu den Kohlenstofffasern, zeigten diese aber nachteilige Eigenschaften in der Übertragung der elektrischen Energie in das umliegende Medium [5]. Die besten Ladungstransfer-Eigenschaften heutiger Elektroden zeigt TiN, welches aber nur als Beschichtung angewendet werden kann. Da Impedanzmessungen ein ähnliches Verhalten, in der Übertragung elektrischer Signale am Elektroden-Interface, zwischen TiN und den Kohlenstoff-Nanofasern darstellten, ist die Anwendung von 3D-Kohlenstofffaser-Scaffolds eine vielversprechende Alternative zu derzeitigen metallischen implantierbaren Elektroden.

5.3. Zellkompatibilität und -Migration der Kohlenstoff-Nanofaser-Scaffolds

Die Entwicklung von neuen Implantat-Materialien erfordert schon im frühen Entwicklungsstadium den Nachweis der Biokompatibilität. Laut Definition, soll dabei das Material mit biologischen Systemen verträglich sein und keine negativen Effekte aufweisen [164]. Die erforderlichen Testungen für den Nachweis der Biokompatibilität, sind in der Normreihe ISO 10993 festgelegt. Diese beinhalten die Bestimmung der Zytotoxizität, der Hämokompatibilität sowie Analysen in der Histopathologie. Für die Zytotoxizität erfolgt die Untersuchung der Zellverträglichkeit im direkten oder indirekten Kontakt mit Zellen. In den nächsten Schritten testet man zunächst die Kompatibilität im Kontakt mit Blut, bis hin zur Bestimmung der Fremdkörperreaktion durch Tiermodelle. Die Zytokompatibilität von Kohlenstofffasern konnte bereits durch einige Gruppen nachgewiesen werden [125-127]. Für den Vergleich zwischen den Faserscaffoldstrukturen dieser Arbeit ist daher der Einfluss auf die Fremdkörperreaktion und der Bildung einer Fibrösen Kapsel eine interessante Fragestellung. Ein wichtiger Aspekt zur Reduzierung der Fremdkörperreaktion ist dabei das Potential zur Gewebeintegration des Scaffolds [17]. Unter Vernachlässigung von Immunzellen, erfolgte die *in vitro* Untersuchung des Integrationspotentials der Scaffolds über fünf Schritte. Beginnend mit Fibroblasten als Standardgewebezelle und Kapselbildner, wurde zunächst die Kompatibilität dieser Zellen mit den Kohlenstofffasern untersucht. Im nächsten Schritt folgte die Beurteilung der Migration in das Scaffold, bzw. die Akkumulation dieser Gewebezellen auf der Vliesoberfläche. Die darauffolgenden Schritte bezogen sich auf die spezifische Anwendung als Herzschrittmacherelektrode. Dafür erfolgte die Beurteilung der Kompatibilität mit kardialen Zellen sowie Generierung von funktionellem kardialem Gewebe in den Kohlenstofffaser-Scaffolds. Im finalen Schritt behandelte diese Arbeit die großflächige Integration von funktionellem kardialem Gewebe in das Faserscaffold und deren Eigenschaften als Herzschrittmacherelektrode.

Zur Bestätigung der Kompatibilität mit humanen dermalen Fibroblasten, wurde deren Viabilität auf den beiden unbehandelten Kohlenstofffaser-Scaffolds

untersucht. Dies erfolgte über eine Lebend-Tod-Färbung der Zellen nach 48 h Kultur auf der Scaffoldoberfläche. Die Umsetzung von Fluorescein-Diacetat zu Fluorescein in den Mitochondrien zeigte dabei ausschließlich lebendige Zellen, durch eine grüne Fluoreszenz. Es konnte nur in tieferen Ebenen eine Rot-Färbung gefunden werden. Da aber die Zellen in der kurzen Zeit kaum Eindringen können, wurde dies als unspezifische Adsorption des Propidiumiodid an den Fasern oder Proteinen interpretiert. Über eine Phalloidin-Färbung zeigte sich eine kollektive Ausrichtung der Zellen in eine Dimensionsrichtung. Da sich Fibroblasten typischerweise an länglichen Oberflächenstrukturen ausrichten [165], wird diese auf den Scaffolds vermutlich durch die Vorzugsorientierung der Fasern hervorgerufen.

In den folgenden Versuchen wurde das Migrationspotential von Fibroblasten in die verschiedenen Scaffolds untersucht. Sowohl nach fünf Tagen als auch nach sechs Wochen konnte keine Migration der Zellen in das Scaffold mit 140 nm Fasern beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Maschenweite zu gering für Zellmigration ist (Abbildung 28A, Abbildung 29A) und sich Vergleichbar mit einer strukturierten 2D Oberfläche verhält. Dieses Verhalten von dünnen elektrogewebten Fasern konnte in der Literatur bereits gezeigt werden [166] und findet beispielsweise in der Entwicklung von Nerveguides Anwendung [167]. Die größere Maschenweite des Scaffolds mit 500 nm Faserdurchmesser konnte nach fünf Tagen das Unterwandern einzelner Fasern durch die Zellen ermöglichen (Abbildung 28B). Da das Fasernetzwerk bei dieser Faserdicke aber dennoch zu kleine Maschenweiten besitzt, blieb ein weiteres Vordringen in das Scaffold verwehrt unter der Bildung eines geschlossenen Zelllayers nach sechs Wochen (Abbildung 29B). Durch eine Verzerrung des Fasernetzwerkes mit Salzkristallen, konnten die Fibroblasten beim modifizierten Scaffold mit NaCl-Lösung stellenweise das Scaffold weiter durchdringen. Dies zeigte sich vor allem an den Rändern der wellenartigen Strukturen (Abbildung 29C), da an diesen Stellen die Gitterverzerrung am ausgeprägtesten war und damit Zellen durch die Wände in das Scaffold einwuchsen.

Durch die extreme Vergrößerung der Maschen im porösen Scaffold, veränderte sich die Morphologie und Migration der Fibroblasten erheblich. In den Bereichen mit den größten Maschen konnten die Zellen direkt nach der Besiedelung in das Scaffold

eindringen (Abbildung 28F). Dadurch zeigten diese Zellen, im Vergleich zu den anderen Scaffolds, eine geringere Faserrichtungs-gesteuerte Orientierung. Dagegen erfolgte die Adhäsion der Fibroblasten zwischen den Fasern, mit einer vergleichbaren Morphologie zu Zellen in 3D-Geweben [128]. Die verbesserte Migration der Zellen in das Scaffold, verhinderte einen geschlossener Zellrasen auf der Oberseite nach sechs Wochen Kultur. Zudem konnte im Querschnitt die Migration durch das gesamte Scaffold nach 10 Wochen gezeigt werden. Da 10 Wochen vergleichsweise lange für einen Migrationsweg von etwa 200-500 μm ist [168], ist es möglich, dass die großen Poren des Scaffolds die direkte Bewegung störten. Die Zellen konnten diese Poren nicht senkrecht überwinden und mussten deshalb am Rand der Poren zur nächsten Ebene einen erheblich weiteren Weg zurücklegen. Neben der Migration, ist die Synthese von EZM eine typische Eigenschaft von Bindegewebszellen, wie Fibroblasten [169]. Diese Matrix besteht zum Großteil aus Kollagen I mit geringen Anteilen weiterer Kollagene (beispielsweise Kollagen III und XIV), sowie Elastin und Proteoglykane [169]. Da für die Synthese von Kollagen die Hydroxylierung von Prolin, über Ascorbinsäure als Co-Faktor, erforderlich ist, kann die Bildung von EZM über Ascorbinsäure-Derivate simuliert werden [170]. Mit dem Medien-Supplement Magnesium-Ascorbyl-Phosphat konnte daher die EZM Synthese im Kohlenstofffaser-Scaffold durch die Fibroblasten angeregt werden (Abbildung 30E). Dies wies damit die biologische Funktionalität der Fibroblasten, betreffend der Bereitstellung von EZM, im Scaffold nach. Durch das Herauslösen der Zellen mit Natriumdesoxycholat blieb die expremierte Matrix zurück, welche die Kohlenstofffasern mit einem Netzwerk aus dünneren Fasern umschloss (Abbildung 30F, G) und damit ein hybrides Scaffold aus synthetischer und biologischer Matrix bildeten. Diese Methode kann in zukünftigen Arbeiten angewendet werden, synthetische Scaffolds mit humaner EZM zu funktionalisieren und damit den Einsatz *in vitro* und *in vivo* kompatibler zu gestalten.

Im nächsten Schritt wurde die Kompatibilität des porösen Scaffolds, sowie einem unbehandelten Scaffold, mit Kardiomyozyten untersucht. In der Monokultur bildeten sich auf beiden Scaffolds kontrahierende Zellaggregate (Abbildung 31). Da diese Zellen kaum in das Scaffold migrieren, hatte die erhöhte Maschenweite des

porösen Scaffolds keinen Einfluss, außer dass sich einige Zellen bei der Aussaat in der nächste Ebene festgesetzt haben. In den Zellagregaten konnte die Expression von cTnT in gestreifter Anordnung der Sarkomere nachgewiesen werden. Durch die fehlende Orientierung der Zellen zeigten die Sarkomere ebenfalls keine Orientierung. Die Bildung von Aggregaten ist für die Monokultur von Kardiomyozyten typisch [87]. In einigen Publikationen musste aber das Material beispielsweise mit Matrigel beschichtet werden, damit CMs adhäreren und überleben konnten [87, 171]. Die Kompatibilität der Kohlenstofffasern ohne jegliche Beschichtung ist möglicherweise auf die elektrische Leitfähigkeit des Scaffolds zurückzuführen, welche sich positiv auf die Differenzierung und Reifung von kardialem Gewebe auswirkt [85, 103]. Für die Generierung von funktionellem Herzgewebe in den Scaffolds musste anschließend die Migration in das Scaffold verbessert, die Aggregatbildung verhindert und ein gerichtetes Verbinden der Kardiomyozyten erreicht werden. Früheren Arbeiten zeigten, dass eine Co-Kultur die Bildung von Zellaggregaten reduziert und funktionelles kardiales Gewebe auf einer dezellularisierten Dünndarm-Matrix erzeugt [94]. Die Anwendung dieser Co-Kultur, aus CMs, MSCs und hdFs, auf den dem porösen Scaffold, konnte ebenfalls die Aggregatbildung verhindern (Abbildung 33A). Zudem erfolgte die Migration von Zellen in das Scaffold, was aber eher die Gewebszellen MSC und hdFs betraf. Aufgrund der großen Abstände der einzelnen CM zwischen den verschiedenen Zellen dauerte es bis zu sechs Wochen bis sich die ersten Zellen verbinden konnten und eine Expression von cTnT visuell beobachtet werden konnte (Abbildung 33B). Aber bereits eine Woche später bildeten sich organisierte Strukturen aus CM mit orientierten Sarkomeren (Abbildung 33D). Außerdem zeigten REM-Aufnahmen, dass die zellulären Strukturen in das Fasernetzwerk integriert werden konnten (Abbildung 33C). Das Überleben der Kardiomyozyten und deren Anordnung zu orientierten Zellclustern zeigt die Kompatibilität der porösen Scaffolds mit kardialem Gewebe.

Bisher konnte kardiales Gewebe auf elektrisch leitfähigen Fasern [85] oder auf Kohlenstoffstrukturen beschichteten Oberflächen [103] erzeugt werden. Als nicht leitfähige Materialien dienten dezellularisierte Matrices [94], Nanofasern aus Karbonsäureester-Polymeren [172] und Hydrogele, wie z.B. Kollagen [173, 174]. Bis

auf die Hydrogele konnten diese Scaffold-Materialien aber nur im geringen Maße eine Migration in des Scaffold erreichen. Die porösen Kohlenstofffaser-Scaffolds stellen, neben der Leitfähigkeit, zusätzlich die Möglichkeit der Zellmigration in das Scaffold zu Verfügung. Der Vorteil dieser Migration kann nun die bisherige 2D- bzw. 2,5D-Kultur von kardialen Gewebe in die dritte Dimension erweitern, und ein 3D Gewebe-Elektronik Schnittstelle ermöglichen. Für das Tissue Engineering von kardialen Gewebe besteht ebenfalls der Bedarf an elektrisch leitfähigen Scaffolds, trotz der entgegen gesetzten Anforderung auf biologische Abbaubarkeit [97]. Neben der Generierung von Kohlenstofffaser-Scaffolds ist es möglich, die entwickelte Technik zur Generierung von porösen Scaffolds, auf nichtleitende und abbaubare Polymere zu übertragen. Für die Anwendung als Herzschrittmacherelektrode sind aber nicht-abbaubare und leitfähige Scaffolds nötig, da diese in den meisten Fällen ein Leben lang im Herzen erforderlich sind.

5.4. Gewebeintegration von 3D Kohlenstoff-Nanofaser Elektroden

Aufgrund der Kompatibilität der porösen Kohlenstofffaser-Scaffolds gegenüber Bindegewebe- sowie kardialen Zellen, konnte die Grundvoraussetzung eines kardialen Implantats nachgewiesen werden. Zur Verbesserung von Herzschrittmacherelektroden ist die Kompatibilität mit kardialem Gewebe aber nicht ausreichend. Da die Oberfläche der Elektroden nach der Implantation mit Makrophagen und Fibroblasten bevölkert wird, folgt über die Fremdkörperreaktion die Bildung einer fibrösen Kapsel [175] und damit zu einem abnehmenden elektrischen Kontakt zum kardialen Gewebe. Um eine grundlegende Verbesserung gegenüber derzeitigen Elektroden zu erreichen, ist daher eine Integration in kardiales Gewebe ein wesentlicher Fortschritt. Dies bringt den Vorteil mit sich, dass ein dauerhafter direkter elektrischer Kontakt mit dem kardialen Gewebe ermöglicht wird und damit den Energieaufwand zur Stimulation minimiert. Das Ziel ist dabei, eine lückenlose Integration der Elektrode in das Gewebe zu erreichen, um eine neuartige 3D Gewebe-Elektronik Schnittstelle zu generieren. Durch eine Besiedelung mit kardialen Zellen im inneren der Elektrode, könnten Leckströme auf ein Minimum reduziert werden und effektiv zu Stimulation genutzt werden. Eine Implantation der Elektrode bewirkt aber die Bevölkering der Oberfläche mit Immunzellen [73], bevor eine Integration in ein Gewebe stattfinden kann. Eine 3D Elektrodenarchitektur könnte, durch die Zellmigration in die Elektrode, die Fremdkörperreaktion auf ein Minimum beschränken [17]. Der Bildung von funktionellem Herzgewebe in einer Elektrode nach der Implantation, steht deren geringes regeneratives Potential entgegen [176]. Die Folgen davon sind, eine unzureichende elektrische und mechanische Verbindung zum Gewebe, sowie die Aufhebung des 3D Vorteils der Elektrode. Über die Generierung eines funktionellen Gewebes in der Elektrode *in vitro*, könnte der elektrische Kontakt im Vorfeld hergestellt werden, und das spätere Einwachsen in das Zielgewebe vereinfachen. Zudem besteht die Möglichkeit, über die Dekoration der Elektrode mit autologen Zellen gegenüber dem Immunsystem abzuschirmen und damit eine Fremdkörpererkennung dauerhaft zu verhindern. Die Verwendung von autologen Zellen mit Trägerstrukturen sowie Zelltherapien, konnte bereits eine nachteilige

Immunererkennung abwenden [177-179]. Dafür ist die Generierung einer hybriden Elektrode erforderlich, welche funktionelles kardiales Gewebe mit einem synthetischen und elektrisch leitfähigen 3D-Elektrodenscaffold kombiniert.

Bisherige Versuche zeigten, dass die eingesetzte Zellzahl bei weitem zu gering war, um ein flächendeckendes und in das Scaffold vordringendes kardiales Gewebe zu erreichen. Daher wurde die Zellzahl der vorigen Co-Kultur vervierfacht und der Anteil der CM um 50 % erhöht. Bereits nach zwei Wochen konnte eine Kontraktion des gebildeten kardialen Gewebes und des Faserscaffolds beobachtet, sowie eine großflächige Expression von cTnT in gestreifter und orientierter Form auf der Elektrode gefunden werden (Abbildung 35A, B). Auf Grund der hohen Zellzahl lagerten sich die Kardiomyozyten zunächst in größeren Anhäufungen an, verteilten sich aber im Laufe der nächsten Wochen über das gesamte Scaffold. Nach vier Wochen war das gesamte Scaffold, bis auf wenige Bereiche, mit cTnT positiven Zellen besiedelt (Abbildung 35C). Mikroskopische Untersuchungen mit hoher Vergrößerung zeigten, dass diese Fehlstellen keineswegs zellfrei waren, sondern mit cTnT negativen Zellen besiedelt waren. Die Anordnung dieser cTnT negativen Bereiche zeigt Ähnlichkeiten mit der Anordnung der Poren und damit der Bereiche mit maximaler Maschenweite. Dies lässt darauf schließen, dass der Abstand an der Fasern an diesen Stellen zu groß ist für die Ausbildung von kardialem Gewebe. Andererseits können an diesen Stellen die Zellen vereinfacht in das Scaffold eindringen. Daher konnte nach sechs Wochen die Bildung von kardialem Gewebe unterhalb dieser Migrationspunkte beobachtet werden (Abbildung 35D). Über Paraffin-Schnitte wurde die Eindringtiefe der Zellen analysiert. Die HE-Färbung zeigt ein dichtes zelluläres Gewebe bis zur zweiten Faserlage und vereinzelt Zellen in tieferen Schichten (Abbildung 37A). Die langgezogene Morphologie der tieferen Zellen lässt vermuten, dass es sich dabei hauptsächlich um Fibroblasten handelt [180]. Um die Zellverteilung im oberen Teil zu bestimmen, wurden die Schnitte über Antikörper gefärbt, beginnend mit α -Actinin. Dieses ist in muskulären Zellen an den Z-Scheiben lokalisiert und sollte daher in gestreifter Form oder zumindest in regelmäßigen Abständen im kardialen Gewebe vorkommen [130]. Abweichende Färbungsmuster stellen die Bindung des Antiköpers an das Aktinskelett aller Zellen dar [130]. Bis auf die untersten Zelllagen, konnten überall gestreifte Muster oder

Färbungen in regelmäßigen Abständen gefunden werden (Abbildung 37C). Dies zeigt damit, dass die CM im dichten Zellgewebe bis zur zweiten Faserlage vordrangen. Die Färbung gegen CD90 sollte die Positionen der MSCs darstellen. Da nur in der untersten Zellschicht eine schwache Färbung gefunden wurde, lässt es darauf schließen, dass die Zellen ihren Stammzellcharakter verloren haben (Abbildung 37D) [181]. Möglich ist dabei eine Differenzierung zu herz- oder fibroblasten-ähnlichen Zellen [88-92], welche durch die Interaktion mit den iPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten und dem kardial konditioniertem Medium ausgelöst wurde. Die Färbung gegen Vimentin konnte in fast allen Zellen gefunden werden, war aber verstärkt an der oberen Grenzfläche und in tieferen Faserschichten zu finden (Abbildung 37E). Vimentin ist ein verbreiteter Marker zur Identifizierung von Fibroblasten in kardialem Gewebe [82], kann aber auch in geringem Maße in Kardiomyozyten exprimiert werden [182]. Eine stärkere Expression in Fibroblasten, deutet auf eine Akkumulation dieser Zellen an der Grenzfläche und im tieferen Fasergewebe. Ähnliche Verteilungen dieser Färbungen konnten in früheren Arbeiten in *in vitro* generiertem kardialem Gewebe auf dezellularisierter Matrix gefunden werden [94]. Zur funktionalen Testung des Gewebes wurde über ein MEA-Chip das Aktionspotential der hybriden Elektrode gemessen (Abbildung 36). Auffällig war, dass kaum eine zeitliche Verschiebung des R-Peaks zwischen den äußersten Elektroden stattfand. Die daraus berechnete Ausbreitungsgeschwindigkeit von $0,9 \pm 1,1$ m/s ist damit höher, als die von orientiertem humanem nativem Herzgewebe [183]. Dies lässt darauf schließen, dass sich die Signale nicht nur über das biologische Gewebe sondern auch über die leitfähigen Kohlenstofffasern in das gesamte Scaffold ausbreiten und damit die Zellen synchronisiert. Die beobachtete Abweichung der Ausbreitungsgeschwindigkeit lässt schließen, dass das Signal in verschiedenen Richtungen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit weitergeleitet wird. Da die Orientierung der Fasern im Scaffold eine Vorzugsrichtung aufweist und sich die Zellen ebenfalls an den Fasern ausrichten, kann das Signal in diese Richtung weit schneller weitergeleitet werden als senkrecht dazu. Senkrecht zur Faserorientierung kann das Signal nur über Fasern mit direktem Kontakt weitergeleitet werden, da der Eintritt in das flüssige Medium einen weit höheren elektrischen Widerstand aufweist als die Fasern selbst (Tabelle 11, Abbildung 25).

Daher ergibt sich eine größere Weglänge und damit eine längere Übertragungszeit für ein Signal in abweichender Richtung der Faserorientierung.

Die Analysen zeigen die erfolgreiche Generierung einer hybriden kardialen Gewebeelektrode. Da Kardiomyozyten nicht proliferieren, konnte eine komplette Besiedelung des gesamten Scaffolds mit kardialem Gewebe in dieser Arbeit nicht erreicht werden. Um eine Besiedelung des Scaffold über die dritte Faserlage hinweg erreichen zu können muss die Zellzahl für zukünftige Versuche noch weiter erhöht werden. Da aber der obere Teil des Scaffolds komplett mit funktionellem Gewebe umschlossen war, konnte die Integrierung dieser hybriden Elektrode in kardiales Gewebe getestet werden. Dafür wurde die hybride Elektrode, mit der Zellseite nach unten, auf einen kardialen Patch gelegt und ohne Fixierung vier Wochen kultiviert (Abbildung 34). Über den Querschnitt konnte im REM und mit einer HE-Färbung eine nahtlose Einheit der beiden Komponenten gefunden werden. Die Antikörper-Färbungen von α -Actinin, CD90 und Vimentin zeigten eine ähnliche Verteilung der verschiedenen Zellen, wie in der hybriden Elektrode allein (Abbildung 38C, D, E).

Ein wichtiges Kriterium von bereits implantierten Herzschrittmacherelektroden ist deren Verankerung im Gewebe. Sollte sich diese Verbindung lösen, könnte die Elektrode ihre Position ändern, bis hin zum Verlust des elektrischen Kontaktes mit dem Herzen. Dies würde ein Versagen der Implantatsfunktion bedeuten und einen weiteren Eingriff für den Patienten mit sich führen [184]. Daher wurde die zelluläre Verbindung der *in vitro* eingewachsenen Elektrode auf ihre mechanische Belastbarkeit getestet. Die mechanische Verbindung der zusammengewachsenen Komponenten erfolgte durch Zug, bis zum Reißen der zellulären Schicht (Abbildung 39). Mit einer maximalen Zugkraft von etwa 40 mN, konnte die mechanische Belastbarkeit der eingewachsenen Elektrode im kardialen Gewebe nachgewiesen werden. Aufgrund des neuen Elektrodenkonzepts ist diese Kraft nicht mit der Verankerung von konventionellen Herzschrittmacherelektroden vergleichbar. Um die Verbindung der Komponenten auf Funktionalität zu testen, wurde die Kontraktion des Gewebes in einem Organbad mit Kraftaufnehmer gemessen. Die Messung ergab eine spontane Kontraktion des Gewebes mit 1,4 Hz (Abbildung 40). Zur Stimulation, ähnlich wie bei einer Herzschrittmacherelektrode, erfolgte die Einleitung eines elektrischen Signals durch den Silikon-ummantelten Anschluss. Ab

einer Ladung von 3 μC konnte das Gewebe auf die elektrischen Stimuli mit einer Kontraktion reagieren. Die eingespeiste Energie zur Erregung der Kontraktion, ist damit vergleichbar mit einer, derzeitig angewendeten, frisch implantierten Herzschrittmacherelektrode [185]. Bei der Anwendung einer geringeren Stimulationsfrequenz als die spontane Kontraktionsfrequenz (Bsp. 1 Hz), erfolgte eine Überlagerung beider Kontraktionen. Dies ist in Abbildung 40B durch die erhöhte Abweichung in der Kontraktionsfrequenz sichtbar. Wurde die Frequenz erhöht, folgte die Kontraktion ausschließlich der elektrischen Stimulation, da der nächste Impuls früher stattfand als die eigene spontane Kontraktion. Zudem wurde dabei die Kraft der Kontraktionen um die Hälfte verringert. Dies lässt darauf schließen, dass bis zur nächsten Stimulation nicht alle Zellen vollständig für die nächste Kontraktion im elektrophysiologischen Zyklus regeneriert waren. Natives kardiales Gewebe zeigt bei der elektrischen Stimulation über der spontanen Kontraktionsfrequenz ein gegenteiliges Verhalten und führt zu einer Erhöhung der Kontraktionskraft bei Steigerung der Stimulationsfrequenz [186]. Der höhere Reifungszustand der Kardiomyozyten in nativem Gewebe zeigt sich in einer verbesserten Diffusion und Anreicherung von Calcium-Ionen in den Zellen. Dies wird unter anderem durch eine erhöhte Anzahl an spannungsgesteuerten L-Typ Calcium-Kanälen hervorgerufen wird. Zudem ist die Anordnung von Organellen wie Mitochondrien optimiert, um die ATP Diffusion zu den Sarkomeren und damit die Energieversorgung maximiert [187-189]. Für iPS-CM ist dieser Reifungszustand nur mit speziellen Protokollen erreichbar, was beispielsweise eine mechanische und elektrische Stimulation während der gesamten Kulturdauer beinhaltet [186]. Für die Generierung einer hybriden Elektrode ist dieser Zustand aber nicht zwingend notwendig, da eine Einspeisung des elektrischen Signals und deren Weiterleitung in das umliegende Herzgewebe auch mit dem niedrigeren Reifungszustand gezeigt werden konnte.

Durch die optimale Kontaktierung des Herzgewebes über die hybride Elektrode wurde allerdings ein geringerer Energieaufwand zur Stimulation der Kontraktion erwartet. Da der elektrische Kontakt über eine Kanüle in den Elektrodenanschluss erfolgte, wurden möglicherweise nur ein Bruchteil der Fasern und damit auch nur ein Bruchteil der Gewebeschnittstelle durch elektrisch stimuliert. Des Weiteren ist

auch ein Großteil des Elektrodenscaffolds auf der Oberseite unbesiedelt, wodurch ein Teil der Ladungen in das Medium abgegeben wurde anstatt in das Gewebe. Eine Besiedelung des Scaffolds von beiden Seiten könnte den Energieaufwand in zukünftigen Arbeiten senken und dadurch einen geringeren Energieaufwand als kommerzielle Herzschrittmacherelektroden erreichen.

Für die Umsetzung in die klinische Anwendung, sind Testungen in Tiermodellen unersetzlich. Durch den Aufbau einer humanen hybriden 3D Elektrode in dieser Arbeit, würde das Immunsystem eines Tieres durch den Unterscheid der Spezies, die besiedelte Elektrode dennoch als Fremdkörper erkennen. Daher ist es erforderlich eine tierbasierte Elektrode zu entwickeln, um die Interaktion einer hybriden Elektrode mit dem Immunsystem und dem kardialen Gewebe zu untersuchen. Des Weiteren gibt es zu prüfen, ob die Anwendung von MSCs bzw. hdFs ausreicht die Fremdkörperreaktion zu unterdrücken und das einwachsen zu fördern, was den Aufwand und Kosten der Generierung von hybriden Elektroden minimiert.

6. Fazit und Ausblick

Zusammengefasst wurden in dieser Arbeit Kohlenstoff-Nanofaser-basierte Elektroden generiert. Neben der Erhöhung des Faserdurchmessers, führte die Einbettung der Fasern in NaCl zu einer Vergrößerung der Maschen im Netzwerk. Über die Verwendung von NaCl-Partikeln als Porogen war es anschließend möglich, die Maschenweite des Faservlieses zu maximieren und Poren zu erzeugen. Im Vergleich zu heutigen 2D Herzschrittmacher-Elektrodenmaterialien, wiesen alle Faser-Scaffolds über-durchschnittliche elektrische Eigenschaften auf. Diese sind auf die Materialeigenschaften und 3D-Struktur der Elektroden zurückzuführen. Bei der Interaktion mit Zellen ist die Anforderung an 3D-Elektroden, die Bereitstellung von migrationsfähigen Zugängen in ausreichender Größe. Die Migration von Fibroblasten durch das gesamte poröse Kohlenstofffaser-Scaffold über eine Dicke von mehreren 100 μm , verdeutlichte die Dreidimensionalität der Elektrode auf zellulärer Ebene und damit die Eignung als 3D-Gewebeelektrode. Diese 3D-Struktur ermöglichte zudem ein neuartiges Konzept für Herzschrittmacherelektroden. Dieses umfasst die Kombination aus synthetischer Elektrode mit kardialem Gewebe *in vitro* zur Generierung einer hybriden Elektrode. Durch diese Eigenschaften konnte funktionelles kardiales Gewebe in der Elektrode generiert werden, welches die Fasern des Scaffolds integrierte. Das Einwachsen dieser Elektrode in humanes kardiales Gewebe, zeigte eine mechanische und funktionelle Verbindung und damit eine Eignung als mögliche Herzschrittmacherelektrode.

In zukünftigen Arbeiten können noch einige Eigenschaften der porösen Faserelektrode verbessert werden. Ein großer Nachteil der Struktur sind die langgezogenen Poren, welche das Scaffold parallel zur Vliesfläche destabilisieren. Des Weiteren wurde die Zellmigration durch die großen Ausdehnungen der Poren gebremst. Eine Lösung dafür wäre die Verwendung von kleineren Salzpartikeln, was die Poren in allen Richtungen verkleinern würde. Da sich aber dadurch die Maschen verkleinern, muss das Fasernetzwerk zusätzlich erweitert werden. Eine Möglichkeit wäre das Einspinnen eines weiteren Polymers, welches Opferfasern im Netzwerk erzeugt und ebenfalls in den Temperierungsschritten entfernt werden kann.

Mit *in vitro* Experimenten konnten in dieser Arbeit die hervorragenden Migrationseigenschaften des Scaffolds gegenüber einigen Zelltypen gezeigt werden. Unklar ist aber, inwiefern dieses Struktur *in vivo* angenommen wird. Dabei gilt es herauszufinden, ob die poröse Struktur einen positiven Einfluss auf die Fremdkörperreaktion nehmen kann. Außerdem ist es unklar ob die poröse Struktur, durch äußere Drücke und Bewegungen, im implantierten Zustand erhalten bleiben kann. Da eine totale Unterbindung der Fremdkörperreaktion, über Jahrzehnte hinweg, durch Materialkombinationen und Strukturierungen fragwürdig ist, könnte die Anwendung hybrider Elektroden eine Lösung darstellen. Durch die Erzeugung eines autologen Implantat-Gewebe-Interfaces *in vitro*, kann dadurch das Material vor dem Immunsystem zunächst abgeschirmt werden. Hierzu werden aber noch *in vivo* Tests benötigt, um die Effektivität und Langzeitstabilität dieser Abschirmung sowie deren Gewebeintegration und Elektrodenfunktionalität zu beurteilen.

7. Literatur

1. Buch, E., N.G. Boyle, and P.H. Belott, *Pacemaker and defibrillator lead extraction*. *Circulation*, 2011. **123**(11): p. e378-80.
2. Aquilina, O., *A brief history of cardiac pacing*. *Images Paediatr Cardiol*, 2006. **8**(2): p. 17-81.
3. "Operationen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern: 5-377 Implantation eines Herzschrittmachers und Defibrillators", R.K.I., Primärquelle: Statistisches Bundesamt (in www.gbe-bund.de - Startseite > Gesundheitsversorgung > Medizinische Verfahren, Medizinische Untersuchungen und Behandlungen > Operationen und Prozeduren in Krankenhäusern > Tabelle (gestaltbar): Operationen und Prozeduren in Krankenhäusern), 2016.
4. "Operationen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern: 5-378 Entfernung", W.u.K.e.H.u.D., Robert Koch Institut, Primärquelle: Statistisches Bundesamt (in www.gbe-bund.de-Startseite>Gesundheitsversorgung>Medizinische Verfahren, Medizinische Untersuchungen und Behandlungen>Operationen und Prozeduren in Krankenhäusern>Tabelle (gestaltbar): Operationen und Prozeduren in Krankenhäusern), 2016.
5. Cogan, S.F., *Neural stimulation and recording electrodes*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2008. **10**: p. 275-309.
6. Hirshorn, M.S., et al., *Characteristics of advanced porous and textured surface pacemaker electrodes*. *Pacing Clin Electrophysiol*, 1983. **6**(3 Pt 1): p. 525-36.
7. Parsonnet, V., et al., *Corrosion of pacemaker electrodes*. *Pacing Clin Electrophysiol*, 1981. **4**(3): p. 289-96.
8. Jonzon, A., et al., *Long-term implantation of platinum electrodes: effects on electrode material and nerve tissue*. *Med Biol Eng Comput*, 1988. **26**(6): p. 624-7.
9. Etsadashvili, K., et al., *Long-term results of high vs. normal impedance ventricular leads on actual (Real-Life) pacemaker generator longevity*. *Europace*, 2009. **11**(2): p. 200-5.
10. Ellenbogen, K.A., et al., *Steroid eluting high impedance pacing leads decrease short and long-term current drain: results from a multicenter clinical trial. CapSure Z investigators*. *Pacing Clin Electrophysiol*, 1999. **22**(1 Pt 1): p. 39-48.
11. Sohal, H.S., et al., *Mechanical Flexibility Reduces the Foreign Body Response to Long-Term Implanted Microelectrodes in Rabbit Cortex*. *PLoS One*, 2016. **11**(10): p. e0165606.

7. Literatur

12. Lopez-Garcia, M.D.C., D.J. Beebe, and W.C. Crone, *Young's modulus of collagen at slow displacement rates*. Bio-Medical Materials and Engineering, 2010. **20**(6): p. 361-369.
13. Wenger, M.P.E., et al., *Mechanical properties of collagen fibrils*. Biophysical Journal, 2007. **93**(4): p. 1255-1263.
14. Kenny, T., *The Nuts and Bolts of Cardiac Pacing*. Vol. 2. 2008: Wiley-Blackwell.
15. Feiner, R., et al., *Engineered hybrid cardiac patches with multifunctional electronics for online monitoring and regulation of tissue function*. Nat Mater, 2016. **15**(6): p. 679-85.
16. Viventi, J., et al., *A conformal, bio-interfaced class of silicon electronics for mapping cardiac electrophysiology*. Sci Transl Med, 2010. **2**(24): p. 24ra22.
17. Ratner, B.D., *A pore way to heal and regenerate: 21st century thinking on biocompatibility*. Regen Biomater, 2016. **3**(2): p. 107-10.
18. Goding, J., et al., *A living electrode construct for incorporation of cells into bionic devices*. Mrs Communications, 2017. **7**(3): p. 487-495.
19. Sultana, N., *Biodegradable Polymer-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering*. 2013: Springer-Verlag.
20. Deng, Y. and J. Kuiper, *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds - Materials, Technologies and Applications*. 2017: Woodhead Pub.
21. Moll, C., et al., *Tissue engineering of a human 3D in vitro tumor test system*. J Vis Exp, 2013(78).
22. Moroni, F. and T. Mirabella, *Decellularized matrices for cardiovascular tissue engineering*. Am J Stem Cells, 2014. **3**(1): p. 1-20.
23. Papadimitropoulos, A., et al., *Engineered decellularized matrices to instruct bone regeneration processes*. Bone, 2015. **70**: p. 66-72.
24. Sitarski, A., et al., *3D Tissue Engineered in Vitro Models of Cancer in Bone*. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2017.
25. Murphy, A.R., et al., *Scaffolds for 3D in vitro culture of neural lineage cells*. Acta Biomater, 2017. **54**: p. 1-20.
26. Ratheesh, G., et al., *3D Fabrication of Polymeric Scaffolds for Regenerative Therapy*. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2017. **3**(7): p. 1175-1194.
27. Lee, J.W., *3D Nanoprinting Technologies for Tissue Engineering Applications*. Journal of Nanomaterials, 2015.

-
28. Hinderer, S., S.L. Layland, and K. Schenke-Layland, *ECM and ECM-like materials - Biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016. **97**: p. 260-9.
 29. Moroni, L., et al., *Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology*. *Trends Biotechnol*, 2017.
 30. Kishan, A.P. and E.M. Cosgriff-Hernandez, *Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review*. *J Biomed Mater Res A*, 2017. **105**(10): p. 2892-2905.
 31. Castilho, M., et al., *Melt Electrospinning Writing of Poly-Hydroxymethylglycolide-co-epsilon-Caprolactone-Based Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering*. *Adv Healthc Mater*, 2017. **6**(18).
 32. Agarwal, S., J.H. Wendorff, and A. Greiner, *Use of electrospinning technique for biomedical applications*. *Polymer*, 2008. **49**(26): p. 5603-5621.
 33. Frenot, A. and I.S. Chronakis, *Polymer nanofibers assembled by electrospinning*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2003. **8**(1): p. 64-75.
 34. Reneker, D.H. and I. Chun, *Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning*. *Nanotechnology*, 1996. **7**(3): p. 216-223.
 35. Vasita, R. and D.S. Katti, *Nanofibers and their applications in tissue engineering*. *Int J Nanomedicine*, 2006. **1**(1): p. 15-30.
 36. Zander, N.E., *Hierarchically Structured Electrospun Fibers*. *Polymers*, 2013. **5**(1): p. 19-44.
 37. Radishevskii, M.B., et al., *Improvement of manufacturing technology for ultrastrong and high-modulus carbon fibres*. *Fibre Chemistry*, 2005. **37**(5): p. 327-331.
 38. Zhang, L.F., et al., *A review: carbon nanofibers from electrospun polyacrylonitrile and their applications*. *Journal of Materials Science*, 2014. **49**(2): p. 463-480.
 39. Kent, J., *Kent and Riegel's handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*, ed. J. Kent. Vol. 1. 2007, New York: Spinger.
 40. Cardarelli, F., *Materials Handbook*. 2008, London: Springer.
 41. Mao, X.W., T.A. Hatton, and G.C. Rutledge, *A Review of Electrospun Carbon Fibers as Electrode Materials for Energy Storage*. *Current Organic Chemistry*, 2013. **17**(13): p. 1390-1401.
 42. Wang, X., B. Ding, and B. Li, *Biomimetic electrospun nanofibrous structures for tissue engineering*. *Mater Today (Kidlington)*, 2013. **16**(6): p. 229-241.
-

7. Literatur

43. Rahaman, M.S.A., A.F. Ismail, and A. Mustafa, *A review of heat treatment on polyacrylonitrile fiber*. *Polymer Degradation and Stability*, 2007. **92**(8): p. 1421-1432.
44. Wu, G.P., et al., *Influence of tension on the oxidative stabilization process of polyacrylonitrile fibers*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2005. **96**(4): p. 1029-1034.
45. Kim, Y.A., et al., *Carbon Nanofibers*, in *Springer Handbook of Nanomaterials*, R. Vajtai, Editor. 2013, Springer-Verlag Berlin: Heidelberg.
46. Che, A.F., et al., *Fabrication of free-standing electrospun carbon nanofibers as efficient electrode materials for bioelectrocatalysis*. *New Journal of Chemistry*, 2011. **35**(12): p. 2848-2853.
47. Ra, E.J., et al., *Anisotropic electrical conductivity of MWCNT/PAN nanofiber paper*. *Chemical Physics Letters*, 2005. **413**(1-3): p. 188-193.
48. Park, S.-J. and G.-Y. Heo, *Precursors and Manufacturing of Carbo Fibers*, in *Carbon Fibers*. 2015, Springer Netherlands.
49. Macherauch, E. and H.-W. Zoch, *V47 Rasterelektronenmikroskopie*, in *Praktikum in Werkstoffkunde*. 2014, Springer Fachmedien: Wiesbaden.
50. Zhou, W. and Z.L. Wang, *Scanning Microscopy for Nanotechnology - Techniques and Applications*. 2006, New York: Springer.
51. Yadav, L.D.S., *Raman Spectroscopy*, in *Organic Spectroscopy*. 2005, Springer Netherlands.
52. Wang, Y., D.C. Alsmeyer, and R.L. McCreery, *Raman-Spectroscopy of Carbon Materials - Structural Basis of Observed Spectra*. *Chemistry of Materials*, 1990. **2**(5): p. 557-563.
53. Reich, S. and C. Thomsen, *Raman spectroscopy of graphite*. *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 2004. **362**(1824): p. 2271-2288.
54. Dippel, B., H. Jander, and J. Heintzenberg, *NIR FT Raman spectroscopic study of flame soot*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 1999. **1**(20): p. 4707-4712.
55. Cuesta, A., et al., *Raman Microprobe Studies on Carbon Materials*. *Carbon*, 1994. **32**(8): p. 1523-1532.
56. Aljishi, R. and G. Dresselhaus, *Lattice-Dynamical Model for Graphite*. *Physical Review B*, 1982. **26**(8): p. 4514-4522.
57. Ferrari, A.C., *Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron-phonon coupling, doping and nonadiabatic effects*. *Solid State Communications*, 2007. **143**(1-2): p. 47-57.

-
58. Sadezky, A., et al., *Raman micro spectroscopy of soot and related carbonaceous materials: Spectral analysis and structural information*. Carbon, 2005. **43**(8): p. 1731-1742.
 59. Irmer, G. and A. Dorner-Reisel, *Micro-Raman studies on DLC coatings*. Advanced Engineering Materials, 2005. **7**(8): p. 694-705.
 60. Ruge, J. and H. Wohlfahrt, *Eigenschaften der Werkstoffe*, in *Technologie der Werkstoffe*. 2013, Springer Fachmedien: Wiesbaden.
 61. Rösler, J., H. Harders, and M. Bäker, *Plastizität und Versagen*, in *Mechanisches Verhalten der Werkstoffe*. 2016, Springer Fachmedien: Wiesbaden.
 62. Macdonald, D.D., *Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy*. Electrochimica Acta, 2006. **51**(8-9): p. 1376-1388.
 63. Lvovich, V.F., *Impedance Spectroscopy - Applications to Electrochemical and Dielectric Phenomena*. 2012, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. .
 64. Moisel, M., M.A.F.L. de Mele, and W.D. Muller, *Biomaterial Interface Investigated by Electrochemical Impedance Spectroscopy*. Advanced Engineering Materials, 2008. **10**(10): p. B33-B46.
 65. Hirschorn, B., et al., *Constant-Phase-Element Behavior Caused by Resistivity Distributions in Films II. Applications*. Journal of the Electrochemical Society, 2010. **157**(12): p. C458-C463.
 66. Cordoba-Torres, P., T.J. Mesquita, and R.P. Nogueira, *Relationship between the Origin of Constant-Phase Element Behavior in Electrochemical Impedance Spectroscopy and Electrode Surface Structure*. Journal of Physical Chemistry C, 2015. **119**(8): p. 4136-4147.
 67. Hsu, C.H. and F. Mansfeld, *Technical note: Concerning the conversion of the constant phase element parameter Y_0 into a capacitance*. Corrosion, 2001. **57**(9): p. 747-748.
 68. Warburg, E., *Ueber das Verhalten sogenannter unpolarisierbarer Elektroden gegen Wechselstrom*. Annalen der Physik und Chemie, 1899. **303**(3): p. 493-499.
 69. Jacobsen, T. and K. West, *Diffusion Impedance in Planar, Cylindrical and Spherical-Symmetry*. Electrochimica Acta, 1995. **40**(2): p. 255-262.
 70. Bard, A.J. and L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods - Fundamentals and Applications*. 2001: John Wiley & Sons, Inc.
 71. Speiser, B., *Electroanalytical Methods .2. Cyclic Voltametry*. Chemie in Unserer Zeit, 1981. **15**(2): p. 62-67.
-

7. Literatur

72. Sridharan, R., et al., *Biomaterial based modulation of macrophage polarization: a review and suggested design principles*. *Materials Today*, 2015. **18**(6): p. 313-325.
73. Grainger, D.W., *All charged up about implanted biomaterials*. *Nature Biotechnology*, 2013. **31**(6): p. 507-509.
74. Brown, B.N., et al., *Macrophage polarization: an opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine*. *Biomaterials*, 2012. **33**(15): p. 3792-802.
75. Cao, H., et al., *The topographical effect of electrospun nanofibrous scaffolds on the in vivo and in vitro foreign body reaction*. *J Biomed Mater Res A*, 2010. **93**(3): p. 1151-9.
76. Saino, E., et al., *Effect of electrospun fiber diameter and alignment on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines*. *Biomacromolecules*, 2011. **12**(5): p. 1900-11.
77. Wang, Z., et al., *The effect of thick fibers and large pores of electrospun poly(epsilon-caprolactone) vascular grafts on macrophage polarization and arterial regeneration*. *Biomaterials*, 2014. **35**(22): p. 5700-10.
78. Fukano, Y., et al., *Epidermal and dermal integration into sphere-templated porous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) implants in mice*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010. **94a**(4): p. 1172-1186.
79. Bryers, J.D., C.M. Giachelli, and B.D. Ratner, *Engineering biomaterials to integrate and heal: the biocompatibility paradigm shifts*. *Biotechnol Bioeng*, 2012. **109**(8): p. 1898-911.
80. Golob, M., R.L. Moss, and N.C. Chesler, *Cardiac tissue structure, properties, and performance: a materials science perspective*. *Ann Biomed Eng*, 2014. **42**(10): p. 2003-13.
81. Betts, J.G., et al., *Anatomy & Physiology*. 2013, <https://openstax.org/details/books/anatomy-and-physiology>: OpenStax College.
82. Baum, J. and H.S. Duffy, *Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about?* *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011. **57**(4): p. 376-9.
83. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. *Science*, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
84. Schanz, J., et al., *Vascularised human tissue models: a new approach for the refinement of biomedical research*. *J Biotechnol*, 2010. **148**(1): p. 56-63.
85. Shevach, M., et al., *Nanoengineering gold particle composite fibers for cardiac tissue engineering*. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013. **1**(39): p. 5210-5217.

-
86. Zhang, W., et al., *Maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes (hESC-CMs) in 3D collagen matrix: Effects of niche cell supplementation and mechanical stimulation*. Acta Biomater, 2017. **49**: p. 204-217.
 87. Gershlak, J.R., et al., *Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds*. Biomaterials, 2017. **125**: p. 13-22.
 88. Nartprayut, K., et al., *Cardiomyocyte differentiation of perinatally-derived mesenchymal stem cells*. Molecular Medicine Reports, 2013. **7**(5): p. 1465-1469.
 89. Shen, X., et al., *Differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes is regulated by miRNA-1-2 via WNT signaling pathway*. Journal of Biomedical Science, 2017. **24**(29).
 90. Xie, X.J., et al., *Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells induced by myocardial medium under hypoxic conditions*. Acta Pharmacol Sin, 2006. **27**(9): p. 1153-8.
 91. Fujita, J., et al., *Myocardial cell sheet therapy and cardiac function*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **303**(10): p. H1169-82.
 92. Souders, C.A., S.L. Bowers, and T.A. Baudino, *Cardiac fibroblast: the renaissance cell*. Circ Res, 2009. **105**(12): p. 1164-76.
 93. Shevach, M., et al., *Gold Nanoparticle-Decellularized Matrix Hybrids for Cardiac Tissue Engineering*. Nano Letters, 2014. **14**(10): p. 5792-5796.
 94. Schürlein, S., et al., *Generation of a Human Cardiac Patch Based on a Reendothelialized Biological Scaffold (BioVaSc)*. Advanced Biosystems, 2017. **1**(3).
 95. Guyette, J.P., et al., *Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix*. Circ Res, 2016. **118**(1): p. 56-72.
 96. Zhang, Y.S., et al., *Bioprinting 3D microfibrinous scaffolds for engineering endothelialized myocardium and heart-on-a-chip*. Biomaterials, 2016. **110**: p. 45-59.
 97. Kitsara, M., et al., *Fibers for hearts: A critical review on electrospinning for cardiac tissue engineering*. Acta Biomater, 2017. **48**: p. 20-40.
 98. Madden, L.R., et al., *Proangiogenic scaffolds as functional templates for cardiac tissue engineering*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(34): p. 15211-6.
 99. Fleischer, S., R. Feiner, and T. Dvir, *Cutting-edge platforms in cardiac tissue engineering*. Curr Opin Biotechnol, 2017. **47**: p. 23-29.
-

7. Literatur

100. Fleischer, S., et al., *Modular assembly of thick multifunctional cardiac patches*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(8): p. 1898-1903.
101. Wang, L., et al., *Electrospun conductive nanofibrous scaffolds for engineering cardiac tissue and 3D bioactuators*. Acta Biomater, 2017. **59**: p. 68-81.
102. Zhang, J., et al., *Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: the matrix sandwich method*. Circ Res, 2012. **111**(9): p. 1125-36.
103. Wang, J.X., et al., *Graphene Sheet-Induced Global Maturation of Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells*. Acs Applied Materials & Interfaces, 2017. **9**(31): p. 25929-25940.
104. Radakovic, D., et al., *A multilayered electrospun graft as vascular access for hemodialysis*. PLoS One, 2017. **12**(10): p. e0185916.
105. Mittal, J., O.P. Bahl, and R.B. Mathur, *Single step carbonization and graphitization of highly stabilized PAN fibers*. Carbon, 1997. **35**(8): p. 1196-1197.
106. Pudlas, M., et al., *Raman spectroscopy: a noninvasive analysis tool for the discrimination of human skin cells*. Tissue Eng Part C Methods, 2011. **17**(10): p. 1027-40.
107. Kadari, A., et al., *Robust Generation of Cardiomyocytes from Human iPS Cells Requires Precise Modulation of BMP and WNT Signaling*. Stem Cell Rev, 2015. **11**(4): p. 560-9.
108. Kleinhans, C., et al., *A perfusion bioreactor system efficiently generates cell-loaded bone substitute materials for addressing critical size bone defects*. Biotechnology Journal, 2015. **10**(11): p. 1727-1738.
109. Sharma, S., et al., *Surface-modified electrospun poly(epsilon-caprolactone) scaffold with improved optical transparency and bioactivity for damaged ocular surface reconstruction*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. **55**(2): p. 899-907.
110. Fu, W., et al., *Electrospun gelatin/PCL and collagen/PLCL scaffolds for vascular tissue engineering*. International Journal of Nanomedicine, 2014. **9**: p. 2335-2344.
111. Nam, J., et al., *Improved cellular infiltration in electrospun fiber via engineered porosity*. Tissue Eng, 2007. **13**(9): p. 2249-57.
112. Weigel, T., et al., *Flexible tissue-like electrode as a seamless tissue-electronic interface*. BioNanoMaterials, 2017. **18**(3-4).
113. Heise, H.M., et al., *Characterisation of carbonaceous materials using Raman spectroscopy: a comparison of carbon nanotube filters, single- and multi-*

-
- walled nanotubes, graphitised porous carbon and graphite. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2009. **40**(3): p. 344-353.
114. Heise, H.M., et al., *Characterization of carbon nanotube filters and other carbonaceous materials by Raman spectroscopy - II: study on dispersion and disorder parameters*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2011. **42**(3): p. 294-302.
115. Gruber, T., T.W. Zerda, and M. Gerspacher, *Raman Studies of Heat-Treated Carbon-Blacks*. *Carbon*, 1994. **32**(7): p. 1377-1382.
116. Jawhari, T., A. Roig, and J. Casado, *Raman-Spectroscopic Characterization of Some Commercially Available Carbon-Black Materials*. *Carbon*, 1995. **33**(11): p. 1561-1565.
117. Ruffert, C., *Obeflächenfunktionalisierung*, in *Mikrofluidische Separationsverfahren und -systeme*. 2018, Springer Vieweg.
118. Lima, A.C. and J.F. Mano, *Micro/nano-structured superhydrophobic surfaces in the biomedical field: part I: basic concepts and biomimetic approaches*. *Nanomedicine*, 2015. **10**(1): p. 103-119.
119. Wang, I.F. and Z.D. Dai, *Effects of the natural microstructures on the wettability of leaf surfaces*. *Biosurface and Biotribology*, 2016. **2**(2): p. 70-74.
120. Long, J., et al., *Thermodynamic modeling of contact angles on rough, heterogeneous surfaces*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2005. **118**(1-3): p. 173-190.
121. Bundy, K.J., J. Dillard, and R. Luedemann, *Use of Ac Impedance Methods to Study the Corrosion Behavior of Implant Alloys*. *Biomaterials*, 1993. **14**(7): p. 529-536.
122. Franks, W., et al., *Impedance characterization and modeling of electrodes for biomedical applications*. *Ieee Transactions on Biomedical Engineering*, 2005. **52**(7): p. 1295-1302.
123. MacDonald, M.A. and H.A. Andreas, *Method for equivalent circuit determination for electrochemical impedance spectroscopy data of protein adsorption on solid surfaces*. *Electrochimica Acta*, 2014. **129**: p. 290-299.
124. K'Owino, I.O. and O.A. Sadik, *Impedance spectroscopy: A powerful tool for rapid biomolecular screening and cell culture monitoring*. *Electroanalysis*, 2005. **17**(23): p. 2101-2113.
125. Rajzer, I., et al., *In vitro and in vivo studies on biocompatibility of carbon fibres*. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 2010. **21**(9): p. 2611-2622.
-

126. Petersen, R., *Carbon Fiber Biocompatibility for Implants*. Fibers (Basel), 2016. **4**(1).
127. Zhang, H.Z., et al., *Carbon-Nanofibers-Based Micro-/Nanodevices for Neural-Electrical and Neural-Chemical Interfaces*. Journal of Nanomaterials, 2012.
128. Reyhani, V., et al., *Fibrin binds to collagen and provides a bridge for α V β 3 integrin-dependent contraction of collagen gels*. Biochem J, 2014. **462**(1): p. 113-23.
129. Pu, L., et al., *Determining the optimal protocol for preparing an acellular scaffold of tissue engineered small-diameter blood vessels*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2018. **106**(2): p. 619-631.
130. Sjoblom, B., A. Salmazo, and K. Djinovic-Carugo, *Alpha-actinin structure and regulation*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(17): p. 2688-701.
131. Inagaki, M., Y. Yang, and F.Y. Kang, *Carbon Nanofibers Prepared via Electrospinning*. Advanced Materials, 2012. **24**(19): p. 2547-2566.
132. Greiner, A.M., et al., *Multifunctional polymer scaffolds with adjustable pore size and chemoattractant gradients for studying cell matrix invasion*. Biomaterials, 2014. **35**(2): p. 611-9.
133. Almodovar, J., *Electrospun Biomaterials and Related Technologies*. 2017, Cham: Springer International Publishing AG.
134. Gummert, P. and K.-A. Reckling, *Mechanik*. 1994, Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag.
135. Kolafa, J., *Solubility of NaCl in water and its melting point by molecular dynamics in the slab geometry and a new BK3-compatible force field*. Journal of Chemical Physics, 2016. **145**(20).
136. Zhou, G.Y., et al., *Flexible titanium carbide-carbon nanofibers with high modulus and high conductivity by electrospinning*. Materials Letters, 2016. **165**: p. 91-94.
137. Liu, X.F., N. Fechler, and M. Antonietti, *Salt melt synthesis of ceramics, semiconductors and carbon nanostructures*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(21): p. 8237-8265.
138. Li, N., et al., *Free-Standing and Transparent Graphene Membrane of Polyhedron Box-Shaped Basic Building Units Directly Grown Using a NaCl Template for Flexible Transparent and Stretchable Solid-State Supercapacitors*. Nano Letters, 2015. **15**(5): p. 3195-3203.
139. Fechler, N., et al., *Salt and sugar: direct synthesis of high surface area carbon materials at low temperatures via hydrothermal carbonization of glucose under hypersaline conditions*. Journal of Materials Chemistry A, 2013. **1**(33): p. 9418-9421.

-
140. Chang, Y.Q., M. Antonietti, and T.P. Feller, *Synthesis of Nanostructured Carbon through Ionothermal Carbonization of Common Organic Solvents and Solutions*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2015. **54**(18): p. 5507-5512.
 141. Li, N., et al., *Controllable Synthesis of Tunable Microstructures of Self-Supporting Graphene Films from Opened Bubble to Cube via in Situ Template-Modulating*. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2017. **9**(48): p. 42093-42101.
 142. Novoselova, I.A., et al., *Electrochemical synthesis, morphological and structural characteristics of carbon nanomaterials produced in molten salts*. *Electrochimica Acta*, 2016. **211**: p. 343-355.
 143. Wulkersdorfer, B., et al., *Bimodal Porous Scaffolds by Sequential Electrospinning of Poly(glycolic acid) with Sucrose Particles*. *International Journal of Polymer Science*, 2010.
 144. Ji, L.W., et al., *Porous carbon nanofibers from electrospun polyacrylonitrile/SiO₂ composites as an energy storage material*. *Carbon*, 2009. **47**(14): p. 3346-3354.
 145. Ko, T.H., *Raman spectrum of modified PAN-based carbon fibers during graphitization*. *Journal of Applied Polymer Science*, 1996. **59**(4): p. 577-580.
 146. Bokobza, L., J.L. Bruneel, and M. Couzi, *Raman Spectra of Carbon-Based Materials (from Graphite to Carbon Black) and of Some Silicone Composites*. *Journal of Carbon Research*, 2015. **1**(1): p. 77-94.
 147. Tanaka, D., et al., *Unidirectional Control of Anisotropic Wetting through Surface Modification of PDMS Microstructures*. *Langmuir*, 2013. **29**(40): p. 12331-12336.
 148. Aprojanz, J., et al., *Highly anisotropic electric conductivity in PAN-based carbon nanofibers*. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 2017. **29**(49).
 149. Engel, A.B., et al., *Enhanced performance of electrospun carbon fibers modified with carbon nanotubes: promising electrodes for enzymatic biofuel cells*. *Nanotechnology*, 2013. **24**(24).
 150. Bonanni, A. and M. Pumera, *High-resolution impedance spectroscopy for graphene characterization*. *Electrochemistry Communications*, 2013. **26**: p. 52-54.
 151. Biswal, M., et al., *From dead leaves to high energy density supercapacitors*. *Energy & Environmental Science*, 2013. **6**(4): p. 1249-1259.
 152. Pyun, S.I., et al., *Effect of pore size distribution of activated carbon electrodes on electric double-layer capacitor performance*. *Journal of New Materials for Electrochemical Systems*, 2002. **5**(4): p. 289-295.
-

153. Magdic, K., K. Kvastek, and V. Horvat-Radosevic, *Concept of spatial surface heterogeneity in impedance modelling of electrochemically activated glass-like carbon electrode*. *Electrochimica Acta*, 2014. **117**: p. 310-321.
154. Kanoun, O., *Progress Reports on Impedance Spectroscopy: Measurements, Modeling and Application*. 2016, Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH.
155. Bisquert, J., et al., *Impedance of constant phase element (CPE)-blocked diffusion in film electrodes*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1998. **452**(2): p. 229-234.
156. Vomero, M., et al., *Highly Stable Glassy Carbon Interfaces for Long-Term Neural Stimulation and Low-Noise Recording of Brain Activity*. *Scientific Reports*, 2017. **7**.
157. Piret, G., et al., *3D-nanostructured boron-doped diamond for microelectrode array neural interfacing*. *Biomaterials*, 2015. **53**: p. 173-183.
158. Wang, K., et al., *Neural stimulation with a carbon nanotube microelectrode array*. *Nano Letters*, 2006. **6**(9): p. 2043-2048.
159. Farjami, E., M.A. Rottmayer, and L.J. Deiner, *Evidence for oxygen reduction reaction activity of a Ni(OH)₂/graphene oxide catalyst*. *Journal of Materials Chemistry A*, 2013. **1**(48): p. 15501-15508.
160. Kurzweil, P. and O.K. Dietlmeier, *Elektrochemische Speicher*. 2015, Wiesbaden: Springer Vieweg.
161. Hsia, B., et al., *Cycling characteristics of high energy density, electrochemically activated porous-carbon supercapacitor electrodes in aqueous electrolytes*. *Journal of Materials Chemistry A*, 2013. **1**(35): p. 10518-10523.
162. Figueiredo, J.L. and M.F.R. Pereira, *The role of surface chemistry in catalysis with carbons*. *Catalysis Today*, 2010. **150**(1-2): p. 2-7.
163. Lide, D.R., *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 2009: Taylor & Francis Ltd.
164. Wintermantel, E., et al., *Biokompatibilität, in Medizintechnik*. 2008, Springer-Verlag.
165. Huang, C.Y., K.H. Hu, and Z.H. Wei, *Comparison of cell behavior on pva/pva-gelatin electrospun nanofibers with random and aligned configuration*. *Scientific Reports*, 2016. **6**.
166. Kennedy, K.M., A. Bhaw-Luximon, and D. Jhurry, *Cell-matrix mechanical interaction in electrospun polymeric scaffolds for tissue engineering: Implications for scaffold design and performance*. *Acta Biomater*, 2017. **50**: p. 41-55.

-
167. Wang, H.B., et al., *Creation of highly aligned electrospun poly-L-lactic acid fibers for nerve regeneration applications*. J Neural Eng, 2009. **6**(1): p. 016001.
 168. Harley, B.A., et al., *Microarchitecture of three-dimensional scaffolds influences cell migration behavior via junction interactions*. Biophys J, 2008. **95**(8): p. 4013-24.
 169. Tracy, L.E., R.A. Minasian, and E.J. Caterson, *Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound*. Advances in Wound Care, 2016. **5**(3): p. 119-136.
 170. Phillips, C.L., S.B. Combs, and S.R. Pinnell, *Effects of Ascorbic-Acid on Proliferation and Collagen-Synthesis in Relation to the Donor Age of Human Dermal Fibroblasts*. Journal of Investigative Dermatology, 1994. **103**(2): p. 228-232.
 171. Feaster, T.K., et al., *Matrigel Mattress: A Method for the Generation of Single Contracting Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes*. Circ Res, 2015. **117**(12): p. 995-1000.
 172. Liu, Q., et al., *Porous nanofibrous poly(L-lactic acid) scaffolds supporting cardiovascular progenitor cells for cardiac tissue engineering*. Acta Biomater, 2015. **26**: p. 105-14.
 173. Zimmermann, W.H., et al., *Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct*. Circ Res, 2002. **90**(2): p. 223-30.
 174. Vunjak-Novakovic, G., et al., *Challenges in cardiac tissue engineering*. Tissue Eng Part B Rev, 2010. **16**(2): p. 169-87.
 175. Kypta, A., et al., *Complete encapsulation of a leadless cardiac pacemaker*. Clinical Research in Cardiology, 2016. **105**(1): p. 94-94.
 176. Kikuchi, K. and K.D. Poss, *Cardiac regenerative capacity and mechanisms*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2012. **28**: p. 719-41.
 177. Wang, K., et al., *Fibrin glue with autogenic bone marrow mesenchymal stem cells for urethral injury repair in rabbit model*. Tissue Eng Part A, 2012. **18**(23-24): p. 2507-17.
 178. Revell, C.M. and K.A. Athanasiou, *Success rates and immunologic responses of autogenic, allogenic, and xenogenic treatments to repair articular cartilage defects*. Tissue Eng Part B Rev, 2009. **15**(1): p. 1-15.
 179. Cambria, E., et al., *Translational cardiac stem cell therapy: advancing from first-generation to next-generation cell types*. NPJ Regen Med, 2017. **2**: p. 17.
 180. Ravikanth, M., et al., *Heterogeneity of fibroblasts*. J Oral Maxillofac Pathol, 2011. **15**(2): p. 247-50.
-

7. Literatur

181. Maleki, M., et al., *Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells*. Int J Stem Cells, 2014. **7**(2): p. 118-26.
182. Behr, T.M., et al., *Adult human cardiomyocytes coexpress vimentin and Ki67 in heart transplant rejection and in dilated cardiomyopathy*. J Heart Lung Transplant, 1998. **17**(8): p. 795-800.
183. Spach, M.S. and P.C. Dolber, *Relating Extracellular Potentials and Their Derivatives to Anisotropic Propagation at a Microscopic Level in Human Cardiac-Muscle - Evidence for Electrical Uncoupling of Side-to-Side Fiber-Connections with Increasing Age*. Circulation Research, 1986. **58**(3): p. 356-371.
184. Gialafos, J., A. Theophilis, and G. Siamas, *Spontaneous displacement of a pacemaker electrode and its subsequent successful reimplantation*. Br Heart J, 1989. **62**(5): p. 403-5.
185. Ben Amar, A., A.B. Kouki, and H. Cao, *Power Approaches for Implantable Medical Devices*. Sensors (Basel), 2015. **15**(11): p. 28889-914.
186. Ronaldson-Bouchard, K., et al., *Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells*. Nature, 2018. **556**(7700): p. 239-243.
187. Ruan, J.L., et al., *Mechanical Stress Conditioning and Electrical Stimulation Promote Contractility and Force Maturation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiac Tissue*. Circulation, 2016. **134**(20): p. 1557-1567.
188. Robertson, C., D.D. Tran, and S.C. George, *Concise review: maturation phases of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes*. Stem Cells, 2013. **31**(5): p. 829-37.
189. Blazeski, A., et al., *Cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells as models for normal and diseased cardiac electrophysiology and contractility*. Prog Biophys Mol Biol, 2012. **110**(2-3): p. 166-77.

8. Anhang

8.1. Lebenslauf

8.2. Publikationen und Konferenzbeiträge

Artikel

Radakovic, D., Reboredo, J., Helm, M., Weigel, T., Schürlein, S., Kupczyk, E., Leyh, R. G., Walles, H., Hansmann, J., **A multilayered electrospun graft as vascular access for hemodialysis.** PLOS ONE, Oktober 2017

Weigel, T., Pfister, T., Schmitz, T., Jannasch, M., Schürlein, S., Al Hijailan, R., Walles, H., Hansmann, J., **Flexible tissue-like electrode as a seamless tissue-electronic interface.** BioNanoMaterials, Juni 2017

Jannasch, M., Gätzner, S., Weigel, T., Walles, H., Schmitz, T., Hansmann, J., **A comparative multi-parametric in vitro model identifies the power of test conditions to predict the fibrotic tendency of a biomaterial.** Scientific Reports, Mai 2017

Schürlein, S., Al Hijailan, R., Weigel, T., Kadari, A., Rucker, C., Edenhofer, F., Walles, H., Hansmann, J., **Generation of a Human Cardiac Patch Based on a Reendothelialized Biological Scaffold (BioVaSc).** Advanced Biosystems, Februar 2017

Jannasch, M., Weigel, T., Engelhardt, L., Wiezoreck, J., Gätzner, S., Walles, H., Schmitz, T., Hansmann, J., **In vitro chemotaxis and tissue remodeling assays quantitatively characterize foreign body reaction.** ALTEX: Alternativen zu Tierexperimenten, Oktober 2016

Reboredo, J., Weigel, T., Steinert, A., Rackwitz, L., Rudert, M., Walles, H., **Investigation of Migration and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells on Five-Layered Collagenous Electrospun Scaffold Mimicking Native Cartilage Structure.** Advanced Healthcare Materials, Mai 2016

Belka, J., Weigel, T., Berninger, A.K., Kurth, D., Nickel, J.,

Growth and Differentiation of Myoblastic Precursor Cells on Thin Films of Metallo-Supramolecular Coordination Polyelectrolyte (MEPE). Advanced Materials Interfaces, September 2016

Vorträge

Weigel, T., Schmitz, T., Jannasch, M., Schürlein, S., Al Hijailan, R., Walles, H., Hansmann, J.,

3D-electrode scaffolds enabling cell infiltration and seamless tissue integration. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM), 2017, Würzburg.

Weigel, T., Schmitz, T., Jannasch, M., Gätzner, S., Hansmann, J.,

Kohlenstoff-Nanofasern als 3-dimensionale Elektroden-Scaffolds. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM), 2016, Aachen. Award for „Outstanding Oral Presentation“

Weigel, T., Schmitz, T., Jannasch, M., Gätzner, S., Walles, H., Hansmann, J.,

Nanostructured electronic tissue interface. World conference on regenerative medicine, 2015, Leipzig.

Poster

Weigel, T., Pfister, T., Schmitz, T., Jannasch, M., Schürlein, S., Al Hijailan, R., Walles, H., Hansmann, J.,

Seamless electrode-tissue interface. Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB), Athen, Griechenland, 2017

Weigel, T., Pfister, T., Schmitz, T., Jannasch, M., Walles, H., Hansmann, J.,
Modifications of 3D nano fiber scaffolds. Annual Conference of the European
Society for Biomaterials (ESB), Athen, Griechenland, 2017

Weigel, T., Choi, J., Schmitz, T., Jannasch, M., Gätzner, S., Hansmann, J.,
Development of nano electrodes for cell/tissue stimulation. World Biomaterials
Congress (WBC), Montreal, Kanada, 2016.

Weigel, T., Choi, J., Schmitz, T., Jannasch, M., Gätzner, S., Hansmann, J.,
**Development of nano electrodes for cell stimulation and reduced foreign
body reaction.** Würzburg Initiative Tissue Engineering (WITE), Würzburg, 2015.

8.3. Danksagung

Mein Dank geht an Prof. Dr. Heike Walles, für die Möglichkeit die Promotion am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin des Uniklinikums Würzburg durchzuführen. Ich möchte mich für das entgegengebrachte Vertrauen, die Unterstützung und Motivation sowie die vielen Möglichkeiten bedanken

Prof. Dr. Jürgen Groll danke ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit als Zweitgutachter, sowie die fachlichen Gespräche und seine Unterstützung durch die Möglichkeit der Mitnutzung der Geräte seines Lehrstuhls.

Darüber hinaus danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bei Prof. Dr. Seibel.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jan Hansmann für die sehr gute Betreuung meiner Arbeit. Deine fachliche Kompetenz, uneingeschränkte Unterstützung, wertvollen Anregungen und Erfahrung haben maßgeblich zum Gelingen beigetragen.

Bedanken möchte ich mich bei unserer Nachwuchsgruppe ETFace, bestehend aus Dr. Jan Hansmann, Dr. Tobias Schmitz, Maren Jannasch und Sabine Gätzner, für die spannende Zusammenarbeit und fachlichen Diskussionen.

Ich danke dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die Förderung der Nachwuchsgruppe zur Entwicklung nahtloser Gewebe-Technik-Schnittstellen (ETFace), Förderkennzeichen 13N12971.

Ebenso möchte ich mich beim Team der Werkstatt, u.a. Thomas Schwarz und Marc Möllmann, für die Bereitstellung des Elektrospinners, Hilfestellungen beim „basteln“ von Hilfsmitteln in der Werkstatt und die Generierung der Kleinteile über den 3D-Drucker bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich beim Herz-Team, Dr. Sebastian Schürlein und Reem Al-Hijailan, für die Bereitstellung der kardialen Zellen, sowie der Hilfestellung in den betreffenden Experimenten bedanken.

Darüber hinaus danke ich Bastian Christ für den täglichen Start in den Arbeitstag mit Morgenkaffee und interessanten Gesprächen.

8. Anhang

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie für die Unterstützung während dieser Arbeit; insbesondere danke ich meinen Eltern, dass sie mir auch dieses Studium ermöglicht haben.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei meiner Freundin für die Unterstützung im Labor und bei der Erstellung der Doktorarbeit bedanken.

Bei allen weiteren Kollegen und Studenten des Lehrstuhls möchte ich mich für die tolle Arbeitsatmosphäre, die Unterstützung und die interessanten sowie lustigen Gespräche und Abendgestaltungen bedanken.

8.4. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Entwicklung von 3D-Herzschrittmacher-Elektroden auf Basis von Kohlenstoffnanofasern“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

.....

Ort, Datum

.....

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Development of 3D pacemaker electrodes based on carbon nano fibers” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

.....

Place, Date

.....

Signature