

Gezielte dreidimensionale Zellkultivierung auf strukturierten lyophilisierten Kollagenträgern

Von der Fakultät für Maschinenwesen
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Ingenieurwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Melanie Kuberka

aus Herne

Berichter: Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Günter Rau
Univ.-Prof. Dr.-Ing. Michael Modigell

Tag der mündlichen Prüfung: 25. September 2006

D 82 (Diss. RWTH Aachen)

Melanie Kuberka

**Gezielte dreidimensionale Zellkultivierung auf
strukturierten lyophilisierten Kollagenträgern**



Helmholtz-Institut

für Biomedizinische Technik
an der RWTH Aachen

Shaker Verlag

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Aachen, Techn. Hochsch., Diss., 2006

Copyright Shaker Verlag 2007

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-5979-2

ISSN 1430-7316

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407/95 96 - 0 • Telefax: 02407/95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

„Denn es ist doch zuletzt nur der Geist, der jede Technik lebendig macht.“

Johann Wolfgang von Goethe

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Helmholtz-Institut für Biomedizinische Technik der RWTH Aachen. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Rau, der mir als Institutsdirektor die Möglichkeit eröffnet hat, diese Arbeit durchzuführen, und der mich dabei jederzeit konstruktiv unterstützt und gefördert hat. Bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Modigell bedanke ich mich für die Mitbetreuung und Begutachtung meiner Arbeit sowie die Übernahme des Korreferats.

Das Gelingen dieser Arbeit basiert auf der konstruktiven und menschlichen Arbeitsatmosphäre innerhalb des Arbeitsbereichs Kryobiologie, zu der alle Kolleginnen und Kollegen beigetragen haben. Besonders danke ich dabei Dr.-Ing. Ingo Heschel, der auch über seine Zeit als Gruppenleiter hinaus die Arbeit maßgeblich durch seine Ideen und seine fundierten wissenschaftlichen und praktischen Kenntnisse begleitet hat. Sehr wichtig für mich waren unsere intensiven fachlichen Diskussionen, die von konstruktiver Kritik und visionärem Denken gleichermaßen geprägt waren. Der Gruppenleiterin Dr.-Ing. Birgit Glasmacher, MSc. danke ich für die Ermöglichung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Sigrid Lüneberger für ihren unermüdlichen Einsatz im Labor und ihre vielen motivierenden Anregungen und wertvollen Hinweise zur praktischen Durchführung der Versuche. Bärbel Elbers danke ich für ihre stets zuverlässige und hochmotivierte Unterstützung bei vielen Laborarbeiten. Außerdem danke ich Herrn Dipl.-Ing. Peter Schwindke für seine Hilfe bei elektrotechnischen und messtechnischen Fragestellungen sowie für seinen unermüdlichen Einsatz, mit dem er das Mikroprozessorsystem zur Messwerterfassung für die Bioreaktorversuche entwickelt hat. Die engagierten Studierenden Inga Bernemann, Stefan Eick, Marc Goodger, Erika Suortti, Ulrich Noltén, Ugur Erdogan und Dorothea Brüggemann haben entscheidende Bausteine zu meiner Arbeit beigetragen. Den Mitarbeitern der Mechanischen Werkstatt danke ich für die Fertigung der Versuchsaufbauten.

Mein Lebenspartner Burkhard Halfmann hat mich während der gesamten Zeit nicht nur mit viel Verständnis und unendlicher Geduld, sondern auch durch zahlreiche fachliche Diskussionen sowie konstruktive Anregungen unterstützt.

Dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung „BiOMAT“ (BMBF-Projektnr. 01 KS 9503/9) danke ich für die Teilfinanzierung des Forschungsvorhabens.

Essen, im Dezember 2006

Melanie Kuberka

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Kollagen	7
2.1	Vorkommen von Kollagen	7
2.2	Aufbau von Kollagenmolekülen	8
2.3	Anwendungsgebiete für Kollagen	11
2.3.1	Allgemeine Anwendungsgebiete	11
2.3.2	Lyophilisiertes Kollagen als Trägermatrix	12
2.3.3	Poröse 3D-Kollagenträger für das Tissue Engineering	13
3	Gezielte Strukturierung von Kollagenträgern	17
3.1	Gerichtete Erstarrung von Kollagensuspensionen	17
3.1.1	Nicht-planare Erstarrungsfront	19
3.1.2	Gradientenfriertisch nach dem Bridgman-Verfahren	22
3.1.3	Gerichtete Erstarrung mit dem Power-Down-Verfahren	25
3.2	Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Variation der Kristallstruktur	27
3.2.1	Variation der Frierparameter	27
3.2.2	Ergebnisse der Mikroskopstudie	28
3.3	Herstellung von 3-dimensionalen Kollagenträgern unter Variation der Porengröße	30
3.3.1	Gefriertrocknung von Kollagenträgern	30
3.3.2	Untersuchung der Trägerstruktur	31
3.4	Untersuchung spezieller Materialeigenschaften	39
3.4.1	Porosität	39
3.4.2	Mechanische Festigkeit	41
3.4.3	Denaturierungstemperatur	44
3.4.4	Degradationsverhalten	48
3.4.5	Sterilisierbarkeit	52
3.5	Diskussion	54
4	Statische Zellkultivierung auf Kollagenträgern	61
4.1	Kultivierungstechniken	61
4.1.1	Statische Systeme	62
4.1.2	Dynamische Systeme	62

4.1.3	Zellkultur von Fibroblasten	63
4.2	Besiedlung und Kultivierung von Kollagenträgern	63
4.3	Proliferationsbewertung	66
4.3.1	MTT-Test	66
4.3.2	Histologie	72
4.3.3	Immunhistochemie	74
4.4	Diskussion	77
5	Bioreaktorentwicklung zur 3D-Zellkultivierung	79
5.1	Anwendung von verschiedenen dynamischen Kultivierungssystemen	79
5.2	Auslegung und Konstruktion des Bioreaktors	81
5.2.1	Einlaufgeometrie	83
5.2.2	Fixierung des Schwammes	84
5.3	Konzeptionierung des Kreislaufs	85
5.3.1	Der Kreislauf	85
5.3.2	Dimensionierung des Schlauchsystems	87
5.3.3	Datenerfassung	90
5.4	Sterilisation und Biokompatibilität der Systemkomponenten	92
5.4.1	In vitro Materialuntersuchung mit Zellen	92
5.4.2	Ergebnisse der in vitro Untersuchungen	93
5.5	Druckverlusttheorie des Bioreaktors	94
5.5.1	Fließverhaltens des Zellkulturmediums	94
5.5.2	Flüssigkeitsströmungen in porösen Materialien	96
5.5.3	Theoretische Abschätzung des Druckverlusts über den Bioreaktor	99
5.5.4	Modellierung des Druckverlusts mit steigendem Zellwachstum	104
5.5.5	Untersuchungen zur Bestimmung des realen Druckverlusts	107
5.6	Diskussion	110
6	Studien zur dynamischen Kultivierung im Bioreaktorkreislauf	113
6.1	Besiedlung und Kultivierung	113
6.2	Messwerterfassung während der Kultivierungsversuche	115
6.2.1	Sauerstoffpartialdruck	115
6.2.2	Kohlendioxidpartialdruck	116
6.2.3	PH-Wert	117
6.2.4	Temperatur	117
6.2.5	Ergebnisse der Messwerterfassung	118
6.3	Proliferationsbewertung	120
6.3.1	MTT-Test	121
6.3.2	Histologie und Immunhistochemie	122
6.3.3	Vergleich der statischen und dynamischen Kultivierung	125
6.4	Diskussion	125
7	Zusammenfassung und Ausblick	131

8	Literaturverzeichnis	137
A	Verwendete Materialien, Chemikalien und Lösungen	149
B	Porosimetrieverfahren	151
B.1	Direkte Porosimetrieverfahren – Mikroskopische Untersuchungen . . .	151
B.2	Indirekte Porosimetrieverfahren – Dichtebestimmung	151
B.2.1	Schwebeverfahren	152
B.2.2	Dichtesäule	152
B.2.3	Gas-Pyknometrie	152
B.3	Indirekte Porosimetrieverfahren – Porosimetrie mittels Fluidintrusion bzw. -extrusion	153
B.3.1	Quecksilber-Porosimetrie	153
B.3.2	Extrusionsporosimetrie	155
B.3.3	Porositätsbestimmung durch Permeabilitätsmessungen	155
B.3.4	Gasadsorption	155
C	Methoden der Zellkultur	157
C.1	Ansetzen der Zellkulturmedien	157
C.2	Zellkultur von Fibroblasten	157
C.2.1	Isolation von Fibroblasten	157
C.2.2	Passagieren von adhärenen Zellen	158
C.2.3	Bestimmung der Zellzahl mit Trypan-Blau	158
C.3	MTT-Test	159
C.4	Histologie	159
C.5	Immunhistochemie	160
C.5.1	Monoklonale Antikörper	160
C.5.2	APAAP-Methode	160
C.5.3	Verwendete Antikörper	161
C.5.4	Kryofixierung	162
D	Konstruktionszeichnungen	163
E	Übersicht über verschiedene Bioreaktorsysteme	171
F	Zusätze zu den Modellen	175
F.1	Nomogramme zur Ermittlung der dimensionslosen Konzentration . .	175
F.2	Berechnungen zur Modellierung des Druckverlusts mit steigendem Zell- wachstum	177

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schema der Kollagenbildung durch Fibroblasten [Kol91].	8
2.2	Aufbau von Kollagenmolekülen [Kol91].	9
2.3	Histologischer Schnitt eines mit Präadipozyten besiedelten Kollagenschwamms [vHe01a].	16
3.1	Schema der Gefriertrocknung von Kollagensuspensionen.	18
3.2	Erklärung des Auftretens einer konstitutionell unterkühlten Zone vor einer fortschreitenden planaren Eisfront [Kur89, Nun93].	20
3.3	Kristallographische Achsen im Eiskristall.	22
3.4	Prinzipskizze des Bridgman-Kryomikroskops (nach [Nun93]).	23
3.5	Prinzipskizze der Power-Down-Anlage (nach [Hes96]).	26
3.6	Zelluläre Eiskristallmorphologie nach der gerichteten Erstarrung einer Kollagensuspension.	27
3.7	Einfluss der Eisfrontgeschwindigkeit v auf die Eiskristallgröße ($n=100$).	29
3.8	Einfluss des Temperaturgradient G auf die Eiskristallgröße ($n=100$).	29
3.9	Einfluss der Kollagenkonzentration auf die Eiskristallgröße ($n=100$).	29
3.10	Gefriergetrockneter Kollagenschwamm mit den Abmaßen $80 \times 80 \times 10 \text{ mm}^3$	32
3.11	Kollagenschwammstruktur im Durchlichtmikroskop (100x).	32
3.12	Abhängigkeit der Porengröße von der Position im Kollagenscaffold und den Frierparametern Kühlrate B sowie Temperaturgradient G	33
3.13	Abhängigkeit der Porengröße von der Position im Kollagenscaffold bei Nicht-Erfüllung des Gradientenkriteriums.	34
3.14	Vertikaler Schnitt durch einen Kollagenschwamm, der von beiden Seiten erstarrt wurde ($G = 20 \text{ K/cm}$, $B = 3,6 \text{ K/min}$) (links). Verschiebung der Kollagenfasern in Richtung der c-Achse während der gerichteten Erstarrung (rechts).	35
3.15	Vertikale Schnitte durch Kollagenschwämme. Links: gesamte Höhe (16x); rechts: Detailaufnahme (100x).	36
3.16	Horizontaler Schnitt durch einen Kollagenschwamm ($S = 51 \mu\text{m}$).	37
3.17	REM-Aufnahme der Struktur eines Kollagenschwammes ($S = 98 \mu\text{m}$), der über Eck geschnitten wurde.	38
3.18	Abmaße einer Schulterprobe [AST79] (links). Kollagenschwammproben (rechts): vor und nach einem Zugversuch.	42

3.19	Spannungs-Dehnungs-Diagramm eines Zugversuchs mit einer Kollagenschwammprobe (links oben). Reißdehnung (rechts oben), Zugfestigkeit (links unten) und E-Modul (rechts unten) in Abhängigkeit von der Porengröße.	43
3.20	Links: Prinzipskizze der DSC. Rechts: Kollagenschwammproben vor und nach einem DSC-Experiment	45
3.21	DSC-Thermogramm zur Bestimmung der Denaturierungstemperatur von Kollagenschwämmen.	47
3.22	Dauer bis zur kompletten Degradation von Kollagenschwammproben durch bakterielle Kollagenase.	50
3.23	Verbleibendes Gewicht nach 1, 3 und 5-stündiger Kollagenasebehandlung.	51
3.24	Einfluss des Sterilisationsverfahrens auf die Porengröße in gefriergetrockneten Kollagenschwämmen.	53
3.25	Strukturveränderungen von zuvor rechteckigen Kollagenschwämmen nach der Plasmasterilisation.	54
4.1	Besiedlungskammer zur Besiedlung von Kollagenscaffolds mit Zellen (links: offen; rechts: geschlossen).	64
4.2	Zunahme der Oberflächenfärbung durch MTT-Reduktion von Fibroblasten der besiedelten Kollagenschwämme von d1 nach d7.	68
4.3	Einfluss verschiedener Besiedlungsmethoden auf das Wachstum von Fibroblasten in Kollagenschwämmen über einen Zeitraum von 21 Tagen.	70
4.4	HE-gefärbte Histologieschnitte von mit unterschiedlichen Methoden besiedelten Kollagenschwämmen an d7.	73
4.5	Vimentin-Nachweis an mit der Besiedlungskammer (d7) und der Spritze besiedelten Kollagenschwämmen (d21) (100-fach Vergrößerung).	76
4.6	Chondroitinsulfat-Nachweis an einem mit der Besiedlungskammer besiedelten Kollagenschwamm an d14 (100-fach Vergrößerung).	76
5.1	Auslegungsschema des Bioreaktors.	82
5.2	Allmähliche Rohrerweiterung (Übergangsdiffusor) [Tuc80]. a: Schema; b: Strömungsaufnahme mit abgelöster Strömung bei Überschreitung von $2\vartheta_D^*$	84
5.3	Schema zur Fixierung des Schwammes.	84
5.4	Schematische Darstellung des BR-Kreislaufs.	86
5.5	Blasenfalle, die an einen BR über Silikonschläuche angeschlossen ist.	86
5.6	Benutzeroberfläche des LabVIEW®-Programms zur Messwerterfassung bei den Versuchen zur dynamischen Kultivierung von zellbesiedelten Kollagenschwämmen im BR-System.	90
5.7	Färbungen auf den PMMA-Scheiben nach Plasma- und EtO-Sterilisation an d3 (links) und unterhalb der PP- und PTFE-Siebe an d7 (rechts).	93
5.8	Vergleich des Zellwachstums auf verschiedenen Materialien mittels MTT-Test (n=3, 4-fach Bestimmung).	93

5.9	Vergleich der dynamischen Viskosität für DMEM und destilliertes Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur.	95
5.10	Kapillarrohrmodell (links) und Rechteckkapillarmodell (rechts) zur näherungsweisen Beschreibung der Kollagenschwammstruktur.	96
5.11	Ersatz der realen Poren im Kollagenträger durch ein Kapillarmodell.	97
5.12	Schematische Darstellung des Biorektors.	100
5.13	Abhängigkeit des Druckverlusts von der Porengröße.	104
5.14	Modellierte Abhängigkeit des Druckverlusts von der Porengröße.	107
5.15	Schema einer Messanordnung zur Bestimmung des Druckverlusts mittels Wassersäule.	109
5.16	Vergleich der gemessenen Massenströme zur Bestimmung der Permeabilität von Kollagenschwämmen (n=4, 3-fach Bestimmung).	110
6.1	Vergleich der gemessenen Sauerstoffpartialdrücke im BR und den statischen Kontrollgruppen über einen 14-tägigen Kultivierungszeitraum (n=3).	118
6.2	Vergleich der gemessenen Kohlendioxidpartialdrücke im BR und den statischen Kontrollgruppen über einen 14-tägigen Kultivierungszeitraum (n=3).	119
6.3	Vergleich der gemessenen pH-Werte im BR und den statischen Kontrollgruppen über einen 14-tägigen Kultivierungszeitraum (n=3).	120
6.4	Vergleich der Oberflächenfärbungen nach 7-tägiger Kultivierung im BR und den statischen Kontrollgruppen im Brut- (BS-S) und Wärmeschrank (WS-S) (n=3, 4-fach Bestimmung).	121
6.5	Vergleich der Zellzahlen nach 7-tägiger Kultivierung im BR und den statischen Kontrollgruppen im Brut- (BS-S) und Wärmeschrank (WS-S).	122
6.6	Vimentin- (links) und HE-Färbung (rechts) von Fibroblasten in Kollagenschwämmen nach 1 Tag statischer Kultur im Brutschrank.	124
6.7	HE-Färbung von Fibroblasten in Kollagenschwämmen nach 7 Tagen statischer Kultur im Wärmeschrank (links) und dynamischer Kultivierung im Bioreaktor (rechts).	124
6.8	Ki-67-Färbung von einzelnen Fibroblasten in Kollagenschwämmen (ca. 0,4 mm Tiefe) nach 7 Tagen dynamischer Kultivierung im Bioreaktor.	124
B.1	Schematische Darstellung der Gas-Pyknometrie [Web01].	153
B.2	Schematische Darstellung der Quecksilberporosimetrie (nach [IBP01]).	154
B.3	Schematische Darstellung der Gasadsorption [Kel02].	156
D.1	Besiedlungskammer – Fixierungsring.	163
D.2	Besiedlungskammer – Grundkörper und Deckel.	164
D.3	Bioreaktor – Grundkörper.	165
D.4	Bioreaktor – Deckel.	166
D.5	Bioreaktor – Aufsatz.	167
D.6	Bioreaktor – Standfuß.	167

D.7	Blasenfalle – Grundkörper.	168
D.8	Blasenfalle – Deckel.	169
D.9	Blasenfalle – Standblech.	170
F.1	Dimensionslose Konzentration $\xi_L = 0 - 1$ als Funktion der dimensionslosen Länge $L^* = 0 - 10$ für verschiedene Widerstandsraten $\phi = 0 - 20$ [Kje93].	175
F.2	Dimensionslose Konzentration $\xi_L = 0 - 1$ als Funktion der dimensionslosen Länge $L^* = 0 - 100$ für verschiedene Widerstandsraten $\phi = 0 - 200$ [Kje93].	176
F.3	Modellierte Abhängigkeit der Porosität von der Anzahl der Zellen im Kollagenschwamm.	179
F.4	Modellierte Abhängigkeit der Porengröße von der Anzahl der Zellen im Kollagenschwamm.	179

Tabellenverzeichnis

3.1	Frierparameter Temperaturgradient G und Eisfrontgeschwindigkeit v .	28
3.2	Frierparameter Kühlrate B und Temperaturgradient G .	31
3.3	Porengrößen, die in verschiedenen Frierversuchen erzielt wurden.	34
3.4	Denaturierungstemperaturen gefriergetrockneter Kollagenmatrices.	46
3.5	Untersuchung der Denaturierungstemperaturen von gerichtet erstarrt und gefriergetrockneten Kollagenschwämmen mit unterschiedlichen Porengrößen.	47
3.6	Abbauverhalten unvernetzter Kollagenproben mit bakterieller Kollagenase.	49
3.7	Prozentual verbleibendes Gewicht von Kollagenproben nach der Degradation mit bakterieller Kollagenase gemessen am ursprünglichen Gewicht.	51
4.1	Methoden zur Besiedlung von Kollagenträgern mit Zellen.	65
4.2	Aus gemessenen Extinktionen errechnete Zellzahlen über einen Zeitraum von 21 Tagen.	70
5.1	Reynolds-Zahlen für Rohrteile im Bioreaktorsystem.	82
5.2	Bestimmung der Schlauchlängen und O_2 -Sättigungen in Abhängigkeit vom Volumenstrom.	89
5.3	Abschätzung des Druckverlusts über den BR und Kollagenschwamm mit der Porengröße $S = 51 \mu m$.	103
5.4	Gemessene Druckverluste in Abhängigkeit vom Volumenstrom und Vergleich mit den berechneten Daten (Kapillarrohrmodell (KRM) und Rechteckkapillarmodell (REKM)).	109
6.1	Besiedelte Kollagenschwammproben für die dynamischen Kultivierungsversuche.	114
E.1	Tabellarische Übersicht über verschiedene in der Literatur beschriebene Bioreaktoren (I).	172
E.2	Tabellarische Übersicht über verschiedene in der Literatur beschriebene Bioreaktoren (II).	173
E.3	Tabellarische Übersicht über verschiedene in der Literatur beschriebene Bioreaktoren (III).	174
F.1	Abmaße von Schwamm, Pore, Zelle, 6- und 24-Wellplatte.	177

Tabellenverzeichnis

F.2 Berechnungen zur Bestimmung des Reibungsverlusts in Abhängigkeit von der Zellzahl.	178
---	-----

Nomenklatur

Formelzeichen

Lateinische Variablen

A	- Fläche	$[m^2]$
A_0	- Anfangsquerschnitt	$[m^2]$
A_6	- Querschnittsfläche der 6-Wellplatte	$[m^2]$
A_{24}	- Querschnittsfläche der 24-Wellplatte	$[m^2]$
$A_{i,P}$	- innere Fläche einer Pore	$[m^2]$
$A_{i,S}$	- innere Schwamtoberfläche	$[m^2]$
$A_{Quer,P}$	- Querschnittsfläche einer Pore	$[m^2]$
$A_{Quer,S}$	- Querschnittsfläche des besiedelbaren Schwammes	$[m^2]$
A_{Rohr}	- Rohrquerschnittsfläche	$[m^2]$
A_Z	- Fläche, mit der sich eine Zelle anlagert	$[m^2]$
B	- Kühlrate	$[K/s]$
B^*	- dimensionsbehaftete Kennzahl für die Kühlrate (Parameter des Power-Down-Verfahrens)	$[K/(m\ s)]$
b	- Breite des Rechteckspaltes	$[m]$
c	- Konzentration eines gelösten Stoffes/Gases in der Lösung	$[mol/l]$
c_0	- Ausgangskonzentration eines gelösten Stoffes/Gases in der Lösung	$[mol/l]$
c_l	- Konzentration eines gelösten Stoffes in der Lösung	$[mol/l]$
c_l^*	- Lösungskonzentration an der planaren Eisfront bzw. an den Eiskristallspitzen	$[mol/l]$
c_L	- Konzentration eines gelösten Gases in der Flüssigphase (bei der Schlauchlänge L)	$[mol/l]$
c_m	- Konzentration eines gelösten Gases im Gleichgewicht mit dem Gaspartialdruck	$[mol/l]$
d	- Probenschichtdicke/Rohrdurchmesser	$[m]$
D	- Zellgröße (Größe bzw. Durchmesser ausgebildeter, zellulärer Eiskristalle parallel zur c-Achse)	$[m]$
d_6	- Durchmesser der 6-Wellplatte	$[m]$
d_{24}	- Durchmesser der 24-Wellplatte	$[m]$
d_i	- Innendurchmesser	$[m]$
d_S	- Schwammdurchmesser	$[m]$

Nomenklatur

D^*	- Diffusionskoeffizient	$[m^2/s]$
D_l^*	- Diffusionskoeffizient in Wasser	$[m^2/s]$
D_W^*	- Diffusionskoeffizient für das Wandmaterial	$[m^2/s]$
dc/dx	- Konzentrationsgradient	$[mol/m^4]$
d_W	- Wanddicke	$[m]$
d_Z	- Durchmesser einer Zelle	$[m]$
F	- Kraft	$[N]$
F_{max}	- Höchstkraft	$[N]$
F_R	- Kraft beim Reißen der Probe	$[N]$
g	- Erdbeschleunigung (9,81)	$[m/s^2]$
G	- Temperaturgradient	$[K/m]$
G^*	- dimensionsbehaftete Kennzahl für den Temperaturgradienten (Parameter des Power-Down-Verfahrens)	$[K]$
G_L	- Gradient der Liquidustemperatur an der Eisfront	$[K/m]$
h	- Höhe des Rechteckspaltes	$[m]$
h_{aus}	- Reibungsverlustrhöhe beim Ausströmen aus dem Kollagen- material	$[m]$
h_c	- Reibungsverlustrhöhe in einer Düse	$[m]$
H_D	- Enthalpie	$[J/g]$
h_{ein}	- Reibungsverlustrhöhe beim Einströmen in das Kollagen- material	$[m]$
h_e	- Reibungsverlustrhöhe im Diffusor	$[m]$
h_f	- Reibungsverlustrhöhe in Rohrteilen und im porösen Material	$[m]$
J	- Gasmengenstrom durch das Material pro Flächeneinheit und Zeit	$[mol/(m^2s)]$
k	- Verteilungskoeffizient	$[-]$
k_{KF}	- Konsistenzfaktor	$[kg/(ms)]$
K_c	- Kontraktionskoeffizient in einer Düse	$[-]$
k_{Darcy}	- Darcy Permeabilitätswert	$[m^2]$
K_e	- Erweiterungskoeffizient im Diffusor	$[-]$
K_H	- Henrykoeffizient	$[s^2/m^2]$
$k_{Perm.}$	- Fluidpermeabilität	$[1/m^2]$
L	- Länge	$[m]$
L_0	- Anfangslänge	$[m]$
L_e	- Kapillarrohrlänge	$[m]$
L_R	- Messlänge	$[m]$
L^*	- dimensionslose Länge	$[-]$
m_{tr}	- Trockenmasse eines Materials	$[kg]$
n	- Anzahl der Moleküle im idealen Gasgesetz	$[mol]$
$n_{6,max}$	- maximale Anzahl Zellen in der 6-Wellplatte	$[-]$
$n_{24,max}$	- maximale Anzahl Zellen in der 24-Wellplatte	$[-]$
n_F	- Fließindex	$[-]$
$n_{P/S}$	- Anzahl der Poren pro Schwamm	$[-]$

n_Z	- Anzahl der Zellen	$[-]$
$n_{Z/P}$	- maximale Anzahl der Zellen pro Pore	$[-]$
$n_{Z,max}$	- maximale Anzahl der Zellen im Schwamm	$[-]$
$O_{2-Stg.}$	- O_2 -Sättigung	$[\%]$
p	- Druck	$[Pa]$
p_i	- Gaspartialdruck	$[Pa]$
R	- ideale Gaskonstante (8,3143)	$[Pa\,m^3/(mol\,K)]$
R_a	- äußerer Schlauchradius	$[m]$
R_H	- hydraulischer Widerstand	$[kg/(m^4\,s)]$
R_i	- innerer Schlauchradius	$[m]$
r_{Pore}	- Porenradius	$[m]$
Re	- Reynoldszahl	$[-]$
s	- Länge der unterkühlten Zone/Stegdicke im Kollagenschwamm	$[m]$
S	- Porengröße	$[m]$
$S_{Abn.}$	- Abnahme des mittleren Porendurchmessers pro Zelle	$[m]$
S_{min}	- Porengröße bei maximaler Zellbesiedlung	$[m]$
T	- Temperatur	$[K]$
T_D	- Denaturierungstemperatur	$[^{\circ}C]$
T_l	- Liquidustemperatur	$[K]$
T_P	- Peaktemperatur bei DSC-Versuchen	$[^{\circ}C]$
u	- Strömungsgeschwindigkeit	$[m/s]$
u_0	- Leerrohrgeschwindigkeit	$[m/s]$
v	- Eisfrontgeschwindigkeit	$[m/s]$
V	- Volumen	$[m^3]$
$V_{Feststoff}$	- Feststoffvolumen eines Materials	$[m^3]$
V_{ges}	- Gesamtvolumen eines Materials	$[m^3]$
V_K	- Volumen des Kollagenmaterials im Schwamm	$[m^3]$
V_{K+Z}	- Volumen des Kollagenmaterials + Zellen	$[m^3]$
V_{Poren}	- Porenvolumen eines Materials	$[m^3]$
V_S	- Besiedelbares Rohvolumen des Schwammes	$[m^3]$
V_Z	- Volumen einer Zelle	$[m^3]$
$\dot{v}$	- flächenspezifischer Durchfluss	$[m^3/(m^2\,s)]$
$\dot{V}$	- Volumenstrom	$[m^3/s]$
x	- Ortskoordinate	$[-]$
z	- Höhenverlust	$[m]$

Griechische Variablen

β'	- Verhältnis zwischen Eingangs- und Ausgangsfläche	$[-]$
$\dot{\gamma}$	- Schergefälle	$[1/s]$
Γ	- Gibbs-Thomson-Koeffizient	$[K\ m]$
δ	- Kapillarrohrdurchmesser	$[m]$
Δp	- Druckverlust über das poröse Material	$[Pa]$
ϵ	- Dehnung	$[\%]$
ϵ_R	- Reißdehnung	$[\%]$
ε	- Porosität	$[\%]$
$\varepsilon_{Abn.}$	- Abnahme der Porosität pro Zelle	$[\%]$
ε_{nZ}	- Porosität in Abhängigkeit von der Zellzahl	$[\%]$
ζ	- Verlustbeiwert	$[-]$
η	- dynamische Viskosität	$[Pa\ s]$
ϑ_c	- Verengungswinkel	$[^\circ]$
ϑ_D	- Diffusorwinkel	$[^\circ]$
ϑ_D^*	- kritischer Diffusorwinkel	$[^\circ]$
λ_1	- primärer Dendriten- bzw. Zellabstand	$[m]$
μ	- Tortuosität	$[-]$
ν	- kinematische Viskosität	$[m^2/s]$
ξ_L	- dimensionslose Konzentration	$[-]$
ρ	- Dichte	$[kg/m^3]$
ρ_R	- Rohdichte	$[kg/m^3]$
σ	- Spannung	$[N/m^2]$
σ_{max}	- Zugfestigkeit	$[N/m^2]$
σ_R	- Reißfestigkeit	$[N/m^2]$
τ	- Schubspannung	$[N/m^2]$
τ_o	- Fließgrenze	$[N/m^2]$
ϕ	- Widerstandsrate („resistance ratio“)	$[-]$

Abkürzungen für Stoffe & Chemische Strukturformeln

Abkürzungen für Stoffe

APAAP	- Komplex aus alkalischer Phosphatase und Anti-Alkalischer Phosphatase
DMEM	- Dulbecco's Modified Eagle Medium (Zellkulturmedium)
EDC	- 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid-Hydrochlorid (Vernetzungsreagenz für Kollagenschwämme)
EDTA	- Ethylen-Dinitrilo-Tetra-Acetat
EPPS	- 4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Propan-Sulfonsäure (Puffer)

EtO	- Ethylenoxid
FCS	- Fötale Kälberserum
GA	- Glutaraldehyd (Vernetzungsreagenz)
Gly	- Aminosäure Glycin
HE	- Hämalun-Eosin (histologische Farbstoffe)
HEPES	- 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-Ethansulfonsäure (Puffer)
HMDIC	- Hexamethyldiisocyanat (Vernetzungsreagenz)
MOPS	- 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (Puffer)
MTT	- 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid
NHS	- N-Hydroxysuccinimid (Vernetzungsreagenz)
PBS	- Phosphatpuffer-Lösung (Phosphate Buffer System)
Pen.	- Penicillin (Antibiotikum)
PGA	- Polyglykolid (Poly(glycolic acid))
PLLA	- Polylactid (Poly(L-lactic acid))
PMMA	- Polymethylmetacrylat (Plexiglas®)
PP	- Polypropylen
Pro	- Aminosäure Prolin
PS	- Polystyrol
PTFE	- Polytetrafluorethylen (Teflon®)
Strep.	- Streptomycin (Antibiotikum)
TBS	- Trispuffer-Lösung (Tris-Buffer System)

Chemische Strukturformeln

$CaCl_2$	- Calciumchlorid
$C_{10}H_{16}N_2O_8$	- EDTA (Titriplex III), Ethylen-Dinitrilo-Tetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat
CO_2	- Kohlendioxid
HCl	- Salzsäure
HCO_3^-	- Carbonation
H_2CO_3	- Kohlensäure
H_2O	- Wasser
H_3O^+	- Hydroniumion
H_2O_2	- Wasserstoffperoxid
K	- Kalium
Na	- Natrium
$NaHCO_3$	- Natrium-Bicarbonat (CO_2 -abhängiger Puffer)
$NaOH$	- Natronlauge
$NH_2C(CH_2 - OH)_3$	- Tris-HCl (Tizma-HCl), Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
O_2	- Sauerstoff

Abkürzungen für Begriffe

3D	- dreidimensional
Abk.	- Abkürzung
Abn.	- Abnahme
BR	- Bioreaktor
BS	- Besiedlungsmethode, Pipettieren der Zellsuspension auf unbehandelte Schwämme
BS-	- Brutschrank
BSBK	- Besiedlungsmethode mit Hilfe einer Besiedlungskammer
BSC	- Besiedlungsmethode, Pipettieren der Zellsuspension auf gecoatete Schwämme
BSS	- Besiedlungsmethode mit Hilfe einer Spritze
d	- Tag (day)
HIA	- Helmholtz-Institut Aachen
K	- Kontrollgruppe ohne Schwamm
Konz.	- Konzentration
KRM	- Kapillarrohrmodell
Lit.	- Literaturstelle
max	- maximal
min	- minimal
REKM	- Rechteckkapillarmodell
REM	- Rasterelektronenmikroskop/Rasterelektronenmikroskopie
RZ	- Restzellen, Zellen am Gefäßboden unterhalb der Kollagenschwämme
S	- Kontrollgruppe mit Schwamm
Sätt.	- Sättigung
Steri.	- Sterilisation
Sus.	- Suspension
TE	- Tissue Engineering
UKA	- Universitätsklinikum Aachen
Verd.	- Verdünnung
WS-	- Wärmeschrank