

Aneliya Petrova¹, Günter Westphal¹, Rafael Valbuena¹, Tilo Dehne², Jochen Ringe²

Gewinnung von löslichen Kollagenen aus Schweineschwarten und deren Verwendung in der regenerativen Medizin

In einer kürzlich erschienenen Publikation (Petrova et al., 2011) hatten wir über gewebespezifische Vernetzungen von Kollagenstrukturelementen berichtet. Die Art und Bindungsstabilität der Kollagene ist nicht nur für deren physikochemische Eigenschaften wie Solvataion bzw. Löslichkeit sowie das Komplexierungsverhalten bedeutungsvoll, sondern auch für die Gewinnung der Kollagene bzw. deren Wechselwirkung mit den umgebenden Medien, darunter auch biologische Gewebe. In unseren Untersuchungen stehen die nutzbaren Wechselwirkungen mit anderen Biopolymeren wie Polysacchariden im Vordergrund. Die skizzierten Wechselwirkungen sind in Verbindung mit deren Nutzung analytisch zu begleiten, hier besonders in der regenerativen Medizin. Dabei kommen notwendigerweise neben den klassischen Methoden wie Aminosäureanalyse oder Elektrophorese aktuellere Methoden, wie sie von den Kooperationspartnern (CellServe GmbH, Kompetenzzentrum Tissue Engineering-KTE in Lübeck, Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung-IAP, Beuth Hochschule für Technik Berlin, Institut für Werkstoffwissenschaften und Technologien der Technischen Universität Berlin) entwickelt und angewendet werden, zum Einsatz. Im vorliegenden Beitrag wird vor allem über Versuchsanstellungen, Ergebnisse der Versuche des IASP und deren Bewertung berichtet.

1. Einleitung

Für unsere experimentellen Arbeiten wählten wir die Schwarten von Schweinen, die bei der Schlachtung in erheblicher Menge anfallen, aus. Im Laufe der Extraktionsversuche mit den genannten Rohstoffen fanden wir die Erfahrung anderer Arbeitskreise bestätigt, dass das ansteigende Lebensalter der Schlachttiere die Art und den Umfang der gewebetypischen Quervernetzungen maßgeblich beeinflusst (Bailey, 1998). In Abhängigkeit von der Zeit werden die zunächst biochemisch synthetisierten tripelhelikalen Tropokollagene in der Wechselwirkung mit deren konkreter Umgebung in vivo zu stabilen Kollagenfibrillen bzw. -fasern vernetzt. Der juvenile Kollagenanteil kann löslich sein in Lösungen von Neutralsalzen bzw. in Säuren (Davidson und Cooper, 1968; Fessler, 1960; Bailey, 1998). Bei einer ausgewählten Rohstoffcharge von Schweineschwarten ist das Extraktionsregime für die Ausbeute und die Struktur, also auch für die Eigenschaften der gewonnenen löslichen Kollagene – hier der Typen I und III – von erheblicher Bedeutung. Nach der Abtrennung der löslichen Kollagenanteile verbleiben unter den gewählten Extraktionsbedingun-

1 Institut für Agrar- und Stadtökologische Projekte an der Humboldt-Universität zu Berlin (IASP)

2 Tissue Engineering Lab & Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies, Dept. of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité-Universitätsmedizin Berlin

gen stabilere unlösliche Kollagene, die sich für Verwendungen in mehreren Industriezweigen, u.a. in der Lebensmittelindustrie, eignen.

2. Materialien und Methoden

Die Schritte für das angewendete Grundverfahren zur Gewinnung von löslichem Kollagen aus der Schweinehaut sind aus der Abbildung 1 zu entnehmen. Da die geplante maschinelle Entfettung der Haut unzureichend war, wurde zusätzlich eine Fettextraktion mittels Aceton vorgenommen. Zur Kollagenextraktion wurden drei verschiedene Extraktionsmethoden (saure Lösungen, Harnstoff und Pepsin) miteinander verglichen. Die Aufreinigung und Aufkonzentrierung der gewonnenen Kollagenextrakte richtete sich nach dem Extraktionsverfahren:

- nach der Extraktion mit sauren Lösungen (z.B. mit Essigsäure) wurden die erhaltenen Extrakte durch Cross-Flow-Filtration (Mikro- und Ultrafiltration) gereinigt, aufkonzentriert und weitgehend entkeimt,
- nach der Extraktion in Gegenwart von Harnstoff wurde der gewonnene Extrakt durch Dialyse aufgereinigt. Eine weitere Aufkonzentrierung der Lösungen war hier nicht nötig, da diese die gewünschte Konzentration bereits aufwiesen,
- nach der Extraktion mit Pepsin wurde der Extrakt mittels Fällung, Zentrifugation und Dialyse gereinigt. Die Aufkonzentrierung erfolgte über Ultrafiltration.

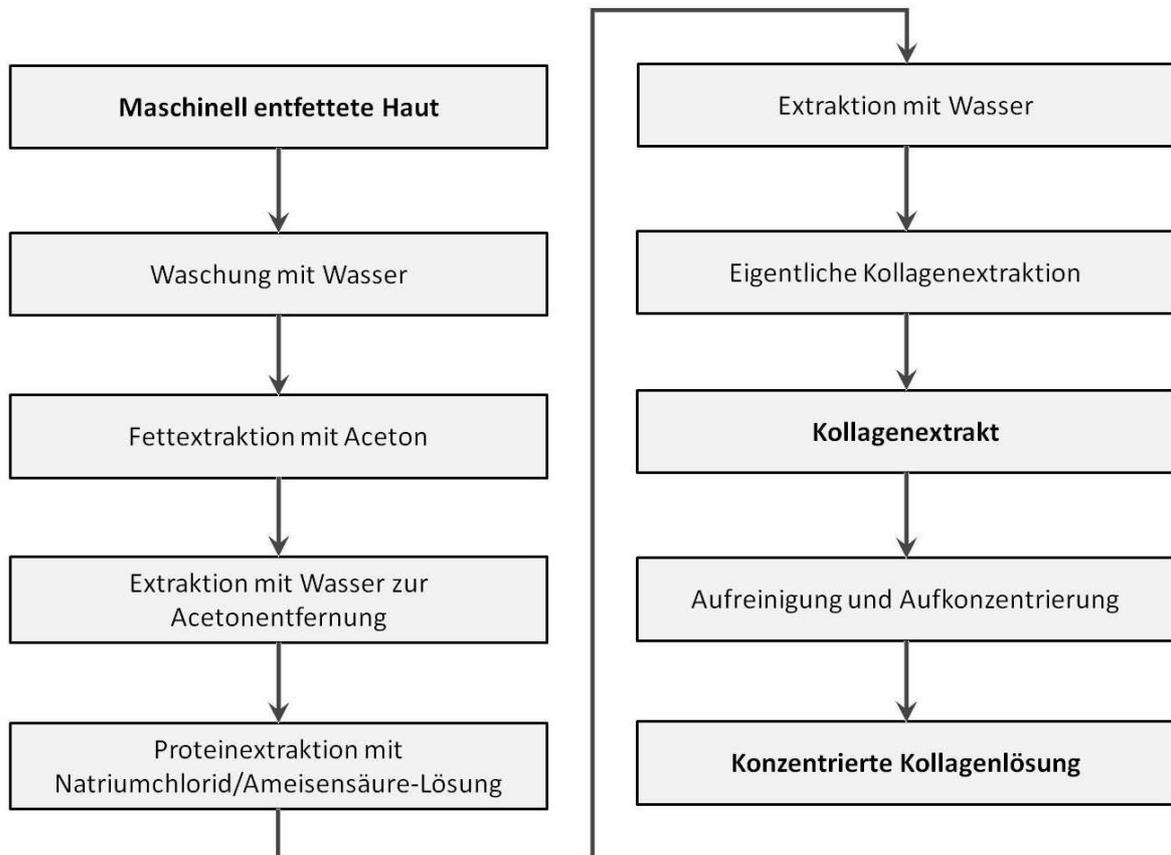


Abb. 1: Grundverfahren für die Kollagenextraktion

Anschließend werden konkrete Beispiele für das Verfahren zur Isolation des löslichen Kollagens ausgeführt.

- *Aufbereitung der Schweinehaut für die Kollagenextraktion*

Rohe, enthaarte und maschinell weitgehend entfettete Schweinehaut (1,5 bis 2,5 mm dick), die gegebenenfalls in einer NaCl-Lösung zur Konservierung gelagert war, wird in Stücke (etwa 2 bis 4 mm² Oberfläche) geschnitten.

Schritt 1: Vorreinigung – zur Abtrennung von Schmutz- und Blutresten sowie gegebenenfalls zur NaCl-Entfernung, Hydratisierung und Auflockerung des Gewebes wird die geschnittene Haut mit der 5-fachen Wassermenge dreimal unter Rühren gewaschen (jeweils 2 h Extraktionszeit).

Schritt 2: Hautentfettung – die gewaschene Haut wird dreimal mit reinem Aceton (jeweils 2 h Extraktionszeit, Haut-Aceton-Verhältnis 1:5 w/v) unter Rühren extrahiert.

Schritt 3: Aufquellen der Haut – zur nochmaligen Hydratisierung der Haut wird diese nach der Acetonextraktion erneut dreimal mit reinem Wasser (jeweils 2 h Extraktionszeit, Haut-Wasser-Verhältnis 1:5 w/v) unter Rühren extrahiert.

Schritt 4: Eiweißabtrennung – nichtkollagene Eiweiße sind aus der Haut abzutrennen. Zu diesem Zweck wird eine Lösung, die 6 % NaCl (w/v) und 1 % Ameisensäure (w/v) enthält, bereit. Die aufgequollene Haut wird mit dieser Lösung zweimal unter Rühren extrahiert (jeweils 24 h Extraktionszeit, Haut-Lösung-Verhältnis 1:5 w/v).

Schritt 5: Erneutes Aufquellen der Haut – dieser Schritt erfolgt analog Schritt 3. Wie bei allen o. g. Extraktionen wird nach Ablauf der Extraktionszeit die Haut von dem Extraktionsmittel abgetrennt.

- *Kollagenextraktion aus Schweinehaut mittels Essigsäure*

20 g der aufbereiteten Haut (s. o.) werden mit 125 ml Essigsäure (0,1 M bis 1,0 M, bevorzugt 0,5 M) versetzt und unter Rühren 48 h bei 25 °C extrahiert. Anschließend wird die flüssige Phase (Kollagenlösung) von der festen Phase (Hautrückstand) abgetrennt. Die Kollagenlösung wird dann mittels Ultrafiltration (Cross-Flow-Filtration, UF-Membrane aus Polyethersulfon, MWCO 50 kDa) gereinigt und aufkonzentriert. Die gewonnene Kollagenlösung enthält hauptsächlich Tropokollagenmoleküle.

- *Kollagenextraktion aus Schweinehaut mittels einer Harnstofflösung*

20 g der aufbereiteten Haut werden mit 125 ml Harnstofflösung (4 M bis 8 M, bevorzugt 6 M) versetzt und unter Rühren 48 h bei 25 °C extrahiert. Anschließend wird die Kollagenlösung von dem Hautrückstand abgetrennt und mittels Dialyse (Dialyseschlauch aus regenerierter Cellulose, Porengröße 8-15 kDa) gegen 0,1 M Essigsäure gereinigt. Die gewonnene Kollagenlösung enthält hauptsächlich Tropokollagenmoleküle.

- *Kollagenextraktion aus Schweinehaut unter Anwendung von Pepsin*

20 g der aufbereiteten Haut (s.o.) werden mit 125 ml einer 0,5 M Essigsäurelösung, die 5 % Pepsin (w/v) enthält, versetzt und unter Rühren 48 h bei 5 °C extrahiert. Anschließend wird 1 l einer 0,1 M Essigsäurelösung zugesetzt, und die Mischung zur weiteren Enzymeinwirkung drei Wochen bei 25 °C stehen gelassen. Nach Zugabe von 0,1 M Essigsäure bis zu einem Ge-

samtvolumen von 3 l und Einstellung des pH-Werts auf 8 bis 9 mittels 10 M NaOH wird das Pepsin gefällt und durch Zentrifugation vom Überstand (Kollagenlösung) abgetrennt. Zur Reinigung der gewonnenen Kollagenlösung wird der pH-Wert auf 3 bis 4 mit Essigsäure eingestellt und das Kollagen mit NaCl (2,5 M NaCl in der Gesamtmischung) ausgefällt und dann abzentrifugiert. Es folgen zwei weitere Reinigungsschritte. In jedem dieser Schritte wird das Kollagen erneut in 0,1 M Essigsäure aufgelöst, mit NaCl (1,8 M NaCl in der Gesamtmischung) wieder ausgefällt und anschließend abzentrifugiert. Um enthaltenes NaCl zu entfernen, wird das gereinigte Kollagen zum Schluss gegen 0,1 M Essigsäure dialysiert (Dialyseschlauch aus regenerierter Cellulose, Porengröße 8-15 kDa). Die gewonnene Kollagenlösung enthält hauptsächlich Atelokollagen.

Die Kollagenausbeute wurde sowohl über eine spektrophotometrische Hydroxyprolinbestimmung als auch über eine Aminosäureanalyse ermittelt. Die für Kollagene typische Aminosäure Hydroxyprolin wird traditionell als Maß für den Gehalt eines Produkts an Kollagen angesehen. Die spektrophotometrische Hydroxyprolin-Bestimmung konnte nach der Methode von Stegemann und Stalder, 1967, ausgeführt werden. Danach wird das zu untersuchende Produkt zunächst bei 121 °C für 1-1,5 Stunden unter Druck (im Autoklaven) schonend und effektiv total hydrolysiert. Im Hydrolysat wird der Hydro-Gehalt nach dessen Oxidation mittels Chloramin T durch eine Farbreaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd bestimmt. Für die Aminosäureanalyse werden die Proben mit 6N HCl bei 110 °C für 24 h hydrolysiert. Die getrockneten Hydrolysate löst man in einem Natriumcitrat-Ladepuffer (pH 2,2), um danach mittels Ionenaustausch-Chromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin (Aminosäureanalysator Biochrom 30, Großbritannien) zu analysieren. Für die Umrechnung vom Hydroxyprolin-Gehalt auf den Kollagengehalt wird ein Gehalt von 14 mg Hydroxyprolin pro 100 mg Kollagen angenommen (Umrechnungsfaktor 7,14).

Eine weitere Charakterisierung der gewonnenen Kollagene kann mittels Gelelektrophorese, Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) und Quervernetzungsanalyse vorgenommen werden. Als Elektrophoreseverfahren wird die SDS-PAGE-Elektrophorese (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) eingesetzt, wobei die Polyacrylamidkonzentration 5 % bzw. 7,5 % im Sammelgel bzw. im Trenngel beträgt. Das CD-Spektrum der Kollagenlösungen wird im Wellenlängenbereich von 190 bis 260 nm mit dem Spektropolarimeter Jasco J-715 (mit Thermocontroller) aufgenommen.

Für die Analytik der quervernetzten Kollagene war zunächst eine Reduktion der entsprechenden Probe mit Borhydriden durchzuführen, gefolgt von einer sauren Hydrolyse und der klassischen Erfassung der Aminosäuren mittels Analysator (s.o.).

Die Methoden zur Messung der Adhäsivität der Kollagenlösungen und daraus hergestellter Klebemittel unter Zusatz von Hyaluronsäure (adhäsive Polyionenkomplexe) im biologischen Gewebe konnte von der Charité-Gruppe entwickelt (Dehne et al, 2011) und von der CellServe GmbH praktiziert werden. Dafür werden standardisierte Rohstanzen aus vitalem Knochen- und Knorpelgewebe angefertigt und unter standardisierten Bedingungen Reihemessungen (n = 5) durchgeführt. Die Adhäsivität wird an Hand verschiedener Messsysteme (Abbildung 8) mit einer Zwick Z005-Prüfmaschine gemessen. Als Referenz-Klebstoff dient Fibrinkleber der Firma Baxter (TISSU-COL Duo S).

Die Bestimmung der Gesamtladungsdichte der Polymere im Zusammenhang mit der Bildung von Polyionenkomplexen aus Kollagen und Hyaluronsäure erfolgt über die Messung des Strömungspotenzials am Partikelladungsdetektor PCD-03 der Firma Müttek. Zur Untersuchung der pH-Ab-

hängigkeit der Gesamtladungsdichte wird eine Ladungstitration durch Zugabe eines entgegengesetzten geladenen Polyelektrolyts durchgeführt, bei der sowohl das Strömungspotential als auch der pH-Wert gemessen werden.

Oberflächenanalysen von gefriergetrockneten Polyionenkomplexen können mit dem Röntgenphotoelektronenspektrometer Kratos Axis 165 unter Verwendung von monochromatisierter Al-K α -Strahlung durchgeführt werden. Zum Vergleich werden die Ausgangspolymere analog analysiert. Gefriergetrocknete Polyionenkomplexe untersucht man ebenfalls mittels Festkörper-IR-Spektroskopie.

Sowohl die Aminosäure- und Quervernetzungsanalysen als auch die CD-Spektroskopie- und SDS-PAGE-Untersuchungen wurden im Kompetenzzentrum Tissue Engineering (KTE) in Lübeck durchgeführt. Die Adhäsivitätsmessungen führte die CellServe GmbH aus. Die Bestimmung der Gesamtladungsdichte und die Oberflächenanalysen erfolgten im Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung (IAP). Die IR-Festkörperspektren wurden an der Beuth Hochschule für Technik Berlin aufgenommen.

3. Ergebnisse und Auswertung

Die Abbildung 2 zeigt die erreichten Kollagenausbeuten bei ausgewählten Extraktionen mit den o.g. Extraktionsmitteln.

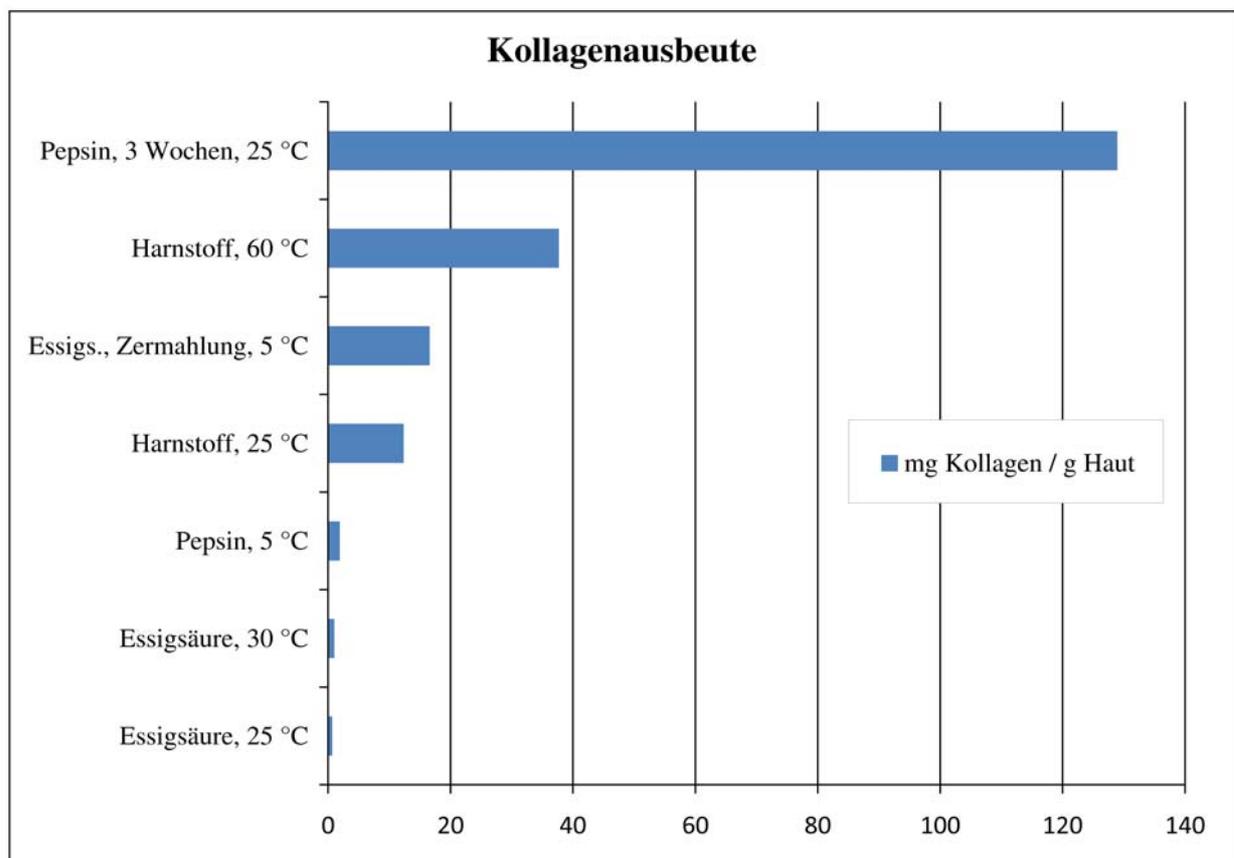


Abb. 2: Kollagenausbeute bei ausgewählten Extraktionsverfahren

Wie in der vorigen Publikation erwähnt (Petrova et al., 2011) und bei Bailey, 1998, beschrieben, kann Kollagen mittels saurer Lösungen aus Rohstoffen isoliert werden, in denen die divalenten Quervernetzungen Dehydro-hydroxylysino-norleucin (deH-HLNL) und Dehydro-lysino-norleucin (deH-LNL) überwiegen. Das trifft z.B. bei der Haut von sehr jungen Tieren zu. Die sehr niedrigen Kollagenausbeuten bei der Extraktion mit sauren Lösungen zeigen, dass das Kollagen in der rohen Haut (aus einem einjährigen Mastschwein) bereits hochvernetzt war. Nur über eine sehr intensive mechanische Beanspruchung der Haut war es möglich gewesen, akzeptable Ausbeuten zu bekommen, mit dem Nachteil, dass feine Partikel mit herausgelöst werden, wodurch die Reinigung der Extrakte stark erschwert wird.

Harnstoff als chaotrope Substanz verringert hydrophobe Effekte, wirkt denaturierend auf Proteine und überführt über die „Beeinflussung der strukturierten Polypeptidketten“ das entsprechende Protein in die sogenannte „Knäuelkonformation“ (random-coil). Allgemein gilt das für die meisten Polypeptidketten, die keine Quervernetzungen aufweisen. In unserem Fall werden aber trotz der analytisch erfassten Quervernetzungen originäre H-Brücken aufgebrochen, so dass das Lösungsmittel H₂O wirksam werden kann. Aus dem eingesetzten Rohstoff konnten mit Harnstofflösungen höhere Kollagenausbeuten als mit sauren Lösungen erreicht werden.

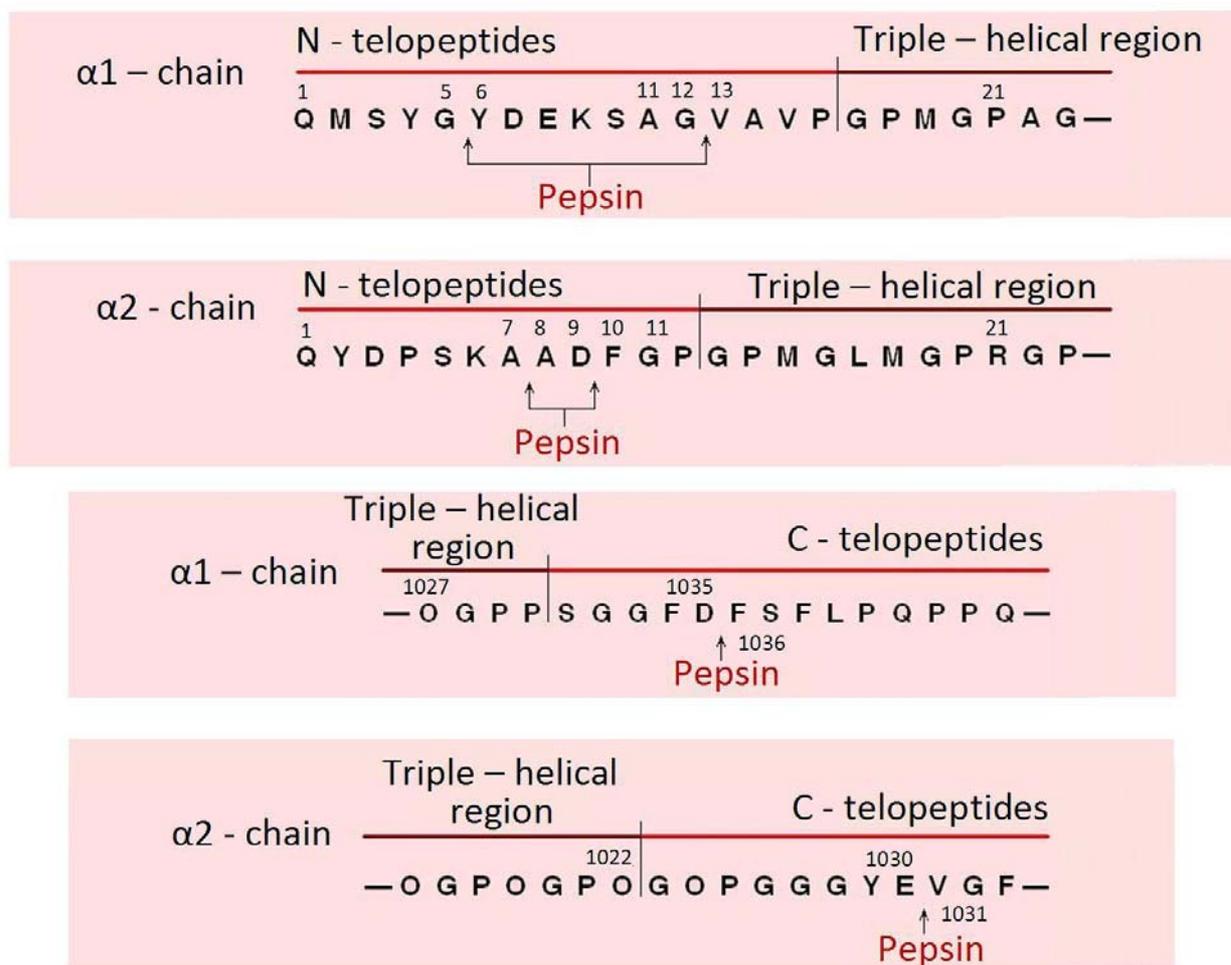


Abb. 3: Angriffsstellen von Pepsin im Kollagenmolekül (vgl. Kunii et al., 2010)

A: Alanin; D: Asparaginsäure; E: Glutaminsäure; F: Phenylalanin; G: Glycin; K: Lysin; L: Leucin; M: Methionin; O: Hydroxyprolin; P: Prolin; Q: Glutamin; R: Arginin; S: Serin; V: Valin; Y: Tyrosin

Pepsin ist in der Lage, kovalente Peptidbindungen in den Peptidketten, speziell in den Telopeptidregionen, abzubauen. Kunii et al., 2010, bieten einen Überblick über die Angriffsstellen von Pepsin im Kollagenmolekül. Diese werden in der Abbildung 3 dargestellt. Trotz Anwesenheit hochvernetzten Kollagens im Rohstoff können mit Pepsin hohe Kollagenausbeuten erzielt werden. Bei Raumtemperatur und einer Einwirkungszeit von drei Wochen wurde die höchste Kollagenausbeute in den durchgeführten Versuchen erreicht.

Kollagenprodukt	Tropokollagen	Tropokollagen	Atelokollagen
Extraktionsmittel	Säurelösung	Harnstofflösung	Essigsäure-Pepsin-Lösung
Hyp*	80,06	84,56	88,81
Asp *	46,31	42,71	46,28
Thr *	15,71	17,16	16,34
Ser *	29,47	34,12	35,72
Glu *	76,80	74,93	74,41
Pro *	134,90	135,32	130,94
Gly *	331,87	336,85	337,22
Ala *	111,29	109,37	108,23
Val *	25,89	22,97	23,55
Met *	4,23	3,03	4,86
Ile *	10,30	9,69	10,34
Leu *	25,47	24,52	22,32
Tyr *	1,69	3,12	1,45
Phe *	13,54	13,67	12,44
His *	5,92	5,46	7,57
Hyl *	5,77	6,30	6,11
Lys *	28,74	25,99	27,33
Arg *	52,04	50,76	46,08
Hyp/Pro	0,59	0,62	0,68
Hyp/(Hyp+Pro)	0,37	0,38	0,40
Hyl/Lys	0,20	0,24	0,22
Hyl/(Hyl+Lys)	0,17	0,20	0,18
Hyl/Hyp	0,07	0,07	0,07
µg Protein injiziert	3,17	10,18	2,78
µg Protein/Probe	3959,32	2544,37	2782,96
µg Kollagen	3251,17	2216,06	2550,18
% Kollagen	82,10	87,10	91,60

Tab. 1: Aminosäurezusammensetzung von Tropokollagen und Atelokollagen
*Anzahl der jeweiligen Aminosäure pro 1000 Aminosäuren

Lösliche Kollagene, die mit sauren Lösungen oder Harnstoff extrahiert werden, enthalten die Telopeptide. Diese Extraktionsmittel wirken auf die kovalenten Quervernetzungen, ohne die Peptidkette anzugreifen. Das gewonnene Kollagen wird als Tropokollagen bezeichnet. Das mittels Pepsin isolierte lösliche Kollagen enthält dagegen keine Telopeptide und wird deswegen Atelokollagen genannt. Die Aminosäureanalyse zeigte allerdings, dass die eingesetzten Extraktionsmethoden wenig Einfluss auf die Aminosäurezusammensetzung der gewonnenen Kollagene haben (siehe Tabelle 1).

Die Aussagen über die Anwesenheit von nativem löslichen Kollagen, Gelatine und/oder fibrillärem Kollagen bei der Charakterisierung der hergestellten Kollagenextrakte wurden mittels CD-Spektroskopie, SDS-PAGE und Quervernetzungsanalyse gewonnen.

In der CD-Spektroskopie³ (Abbildung 4 als Beispiel) zeigen Proben mit nativem Kollagen im Gegensatz zu denaturierten Kollagenen Maxima bei 221 nm. Dieser Peak stammt von der Tripelhelix des Kollagens. Bei reinen Lösungen aus nativem Kollagen kann man aus der Höhe des Peaks die Konzentration von tripelhelikalem Kollagen berechnen. Liegt eine Mischung aus denaturiertem und nativem Kollagen vor, ist eine Konzentrationsaussage über den 221nm Peak schwierig. Denaturiertes Kollagen trägt nicht zur Elliptizität (Y-Achse) bei. Weitere Informationen kann man vom negativen Minimum bei etwa 197 nm erhalten. Es kann 6-mal größer sein als das positive Maximum. In nicht reinen Proben interferieren andere Proteine mit diesem Minimum und verringern den Quotienten Ellipt. 197 nm/ Ellipt. 221 nm.

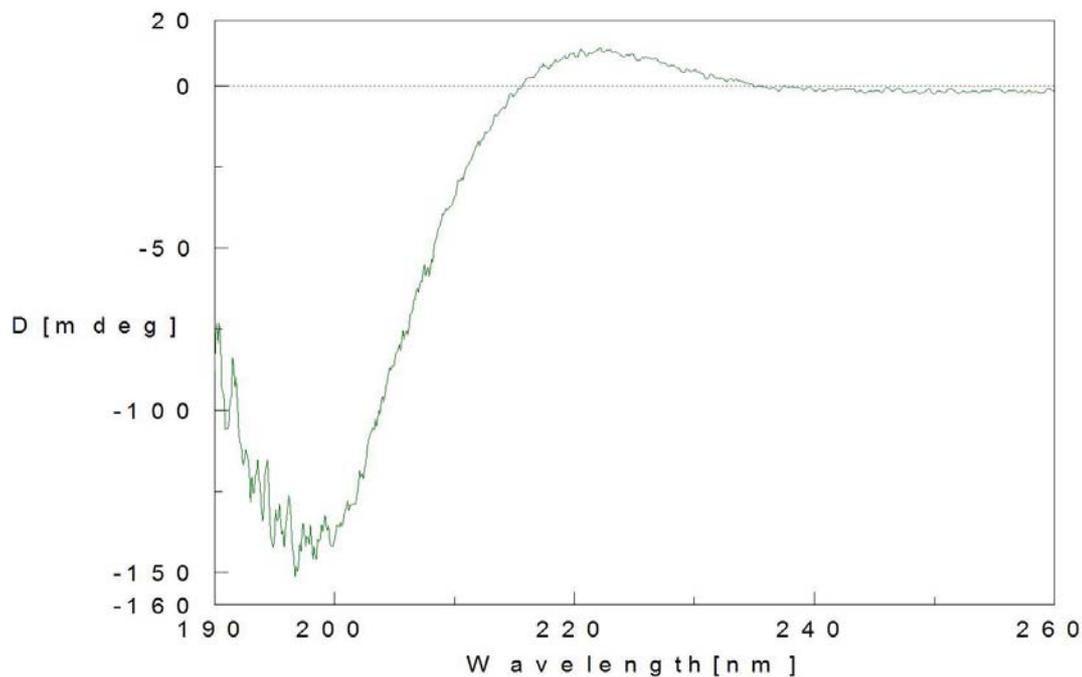


Abb. 4: CD-Spektrogramm einer mit Harnstoff extrahierten Kollagenprobe

In der Schweinehaut ist hauptsächlich Kollagen Typ I zu finden. In den Elektropherogrammen ist natives Kollagen von Typ I durch Banden bei ca. 100 kDa ($\alpha 1/\alpha 2$ -Ketten), ca. 200 kDa ($\beta 11/\beta 12$ -Ketten) und ca. 300 kDa (γ -Ketten) zu erkennen (siehe Abbildungen 5, 6 und 7). Gelatine (abge-

3 Auswertung nach KTE

bautes Kollagen) zeigt Banden unter 100 kDa. Fibrilläres Kollagen zeichnet sich durch Molekulargewichte weit über 300 kDa aus und verbleibt am Start der jeweiligen Bahn (Laufweite gegen Null).

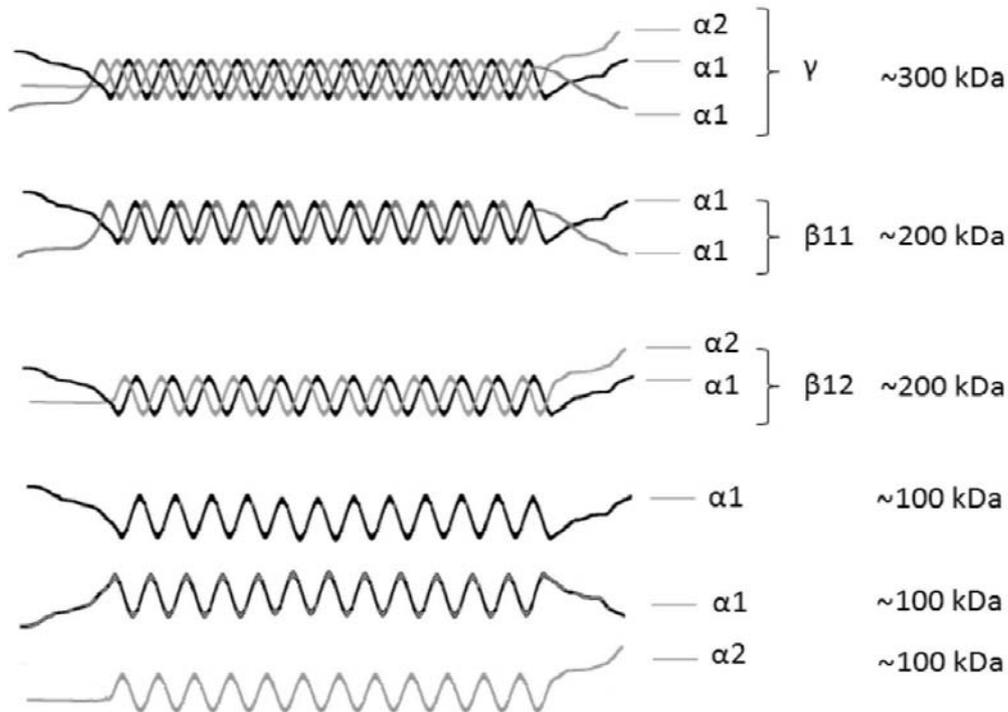


Abb. 5: Darstellung einer Struktureinheit von Kollagen Typ I
Die Tripelhelix, bestehend aus drei einfachen Polypeptidketten (α -Ketten), stellt ein γ -Molekül dar; zwei α -Ketten bilden ein β -Molekül; Teloptide als lineare Bereiche am Ende der Ketten

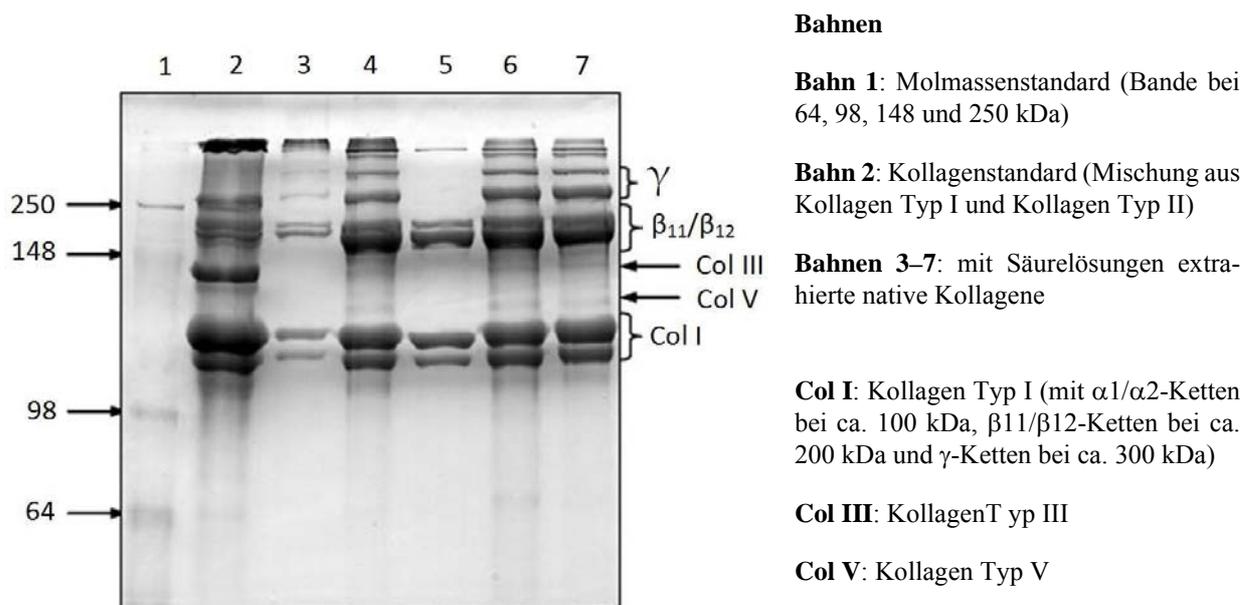
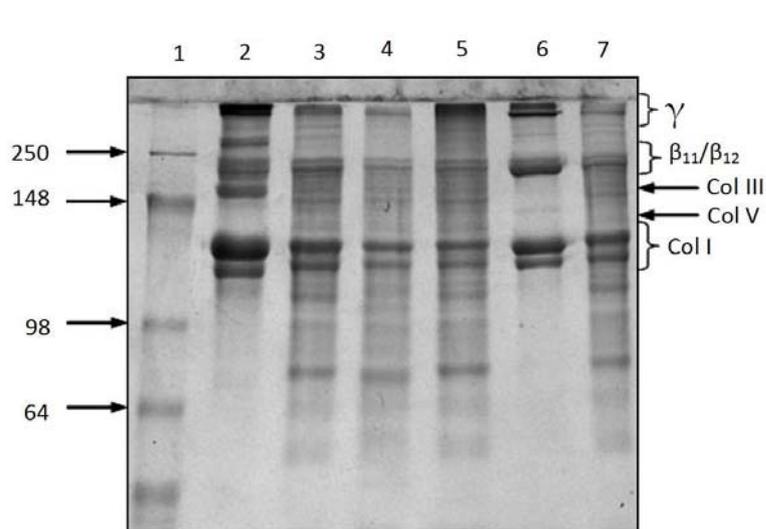


Abb. 6: SDS-PAGE-Analyse von mit Säurelösungen extrahierten Kollagenen



Bahnen

Bahn 1: Molmassenstandard (Bande bei 64, 98, 148 und 250 kDa)

Bahn 2: Kollagenstandard (Mischung aus Kollagen Typ I und Kollagen Typ II)

Bahnen 3, 4, 5 und 7: mit Harnstoff extrahierte Kollagene (Bahnen 3,4 und 7 bei 25 °C, Bahn 5 bei 60 °C)

Bahn 6: mit Pepsin bei 5 °C extrahiertes Kollagen

Col I: Kollagen Typ I; Col III: Kollagen Typ III; Col V: Kollagen Typ V

Abb. 7: SDS-PAGE-Analyse von mit Harnstoff oder Pepsin extrahierten Kollagenen

Extraktionsmittel	Quervernetzungstyp (mol/mol Kollagen)					
	DHLNL (divalent)	HLNL (divalent)	HP (trivalent)	LP (trivalent)	HHLNL (trivalent)	HHMD (tetra- valent)
Essigsäure, 5 °C	0,012	0,036	n.d.	n.d.	0,036	n.d.
Essigsäure, 25 °C,	0,004.	0,028	n.d.	n.d.	0,020	n.d.
Harnstoff, 25 °C	n.d.	0,021	n.d.	n.d.	0,058	n.d.
Harnstoff, 60 °C	n.d.	0,011	n.d.	n.d.	0,125	n.d.
Pepsin, 5 °C	0,043	n.d.	0,054	n.d.	0,262	n.d.
Pepsin, 25°C	n.d	n.d.	0,006	n.d.	0,269	0,010

Tab. 2: Quervernetzungsanalyse von ausgewählten Kollagenproben

HP: Hydroxylysinopyridnolin; LP: Lysinopyridinolin; HHLNL: Histidinohydroxylysinonorleucin
DHLNL: Dihydroxylysinonorleucin; HLNL: Hydroxylysinonorleucin; HHMD: Histidinohydroxymerodesmosin;
n.d.: unter der Nachweisgrenze

Über eine Quervernetzungsanalyse ist es ebenfalls möglich, die Anwesenheit von fibrillärem Kollagen zu erkennen. Wenn auch different, so findet man in Abhängigkeit von der jeweiligen Extraktionsmethode einen geringen, aber dennoch analytisch erfassbaren Anteil an di-, tri-, und tetravalent quervernetzten Strukturanteilen in den gewonnenen Kollagenlösungen. Die mit sauren Lösungen extrahierten Produkte enthalten divalente, aber auch trivalente Quervernetzungen, die mit Harnstoff extrahierten Kollagene weisen di-, aber hauptsächlich trivalente Quervernetzungen auf, und bei den mit Pepsin extrahierten Produkten sind alle drei Quervernetzungen anzutreffen (siehe Tabelle 2). Mit der Verschärfung der Extraktionsbedingungen (z.B. Erhöhung der Temperatur oder der mechanischen Beanspruchung) und mit der Anwendung von Harnstoff und Pepsin steigt also die Konzentration höhergradiger Quervernetzungen. Entgegen mitgeteilter Erfahrun-

gen, dass die Extraktion von Kollagenen aus den verwendeten Rohstoffen mittels der angewandten Methoden nur über die Aufspaltung spezifischer Quervernetzungen möglich ist (Petrova et al., 2011), belegt Tabelle 2, dass die Kollagenlösungen dennoch sehr kleine Anteile an unlöslichem Kollagen (fibrilläres Kollagen) enthalten. Unsere Extraktionsversuche führen allgemein zum Schluss, dass höhere Kollagenausbeuten zumeist weitere Reinigungsschritte nach sich ziehen.

Die Ergebnisse der Adhäsivitätsmessung zeigt Abbildung 8. Mit den Messsystemen „cartilage to cartilage (CtoC)“, „bone to bone (BtoB)“ und „pullout cartilage (PoC)“ wird ausschließlich die Adhäsivität von Fibrin und der zellfreien Kollagenprodukte bestimmt. Im Messsystem „pullout transplant (PoT)“ wird die Verklebung zellbeladener Scaffolds (Transplantate) simuliert. Eine solche Messanordnung zur Defektfüllung hat vor allem für das Tissue Engineering eine praktische Relevanz. Dargestellt sind in hellgrau die Ergebnisse der 5 einzelnen Messwerte in N/m^2 , in blau der Mittelwert und in rot der Vergleichswert für Fibrin.

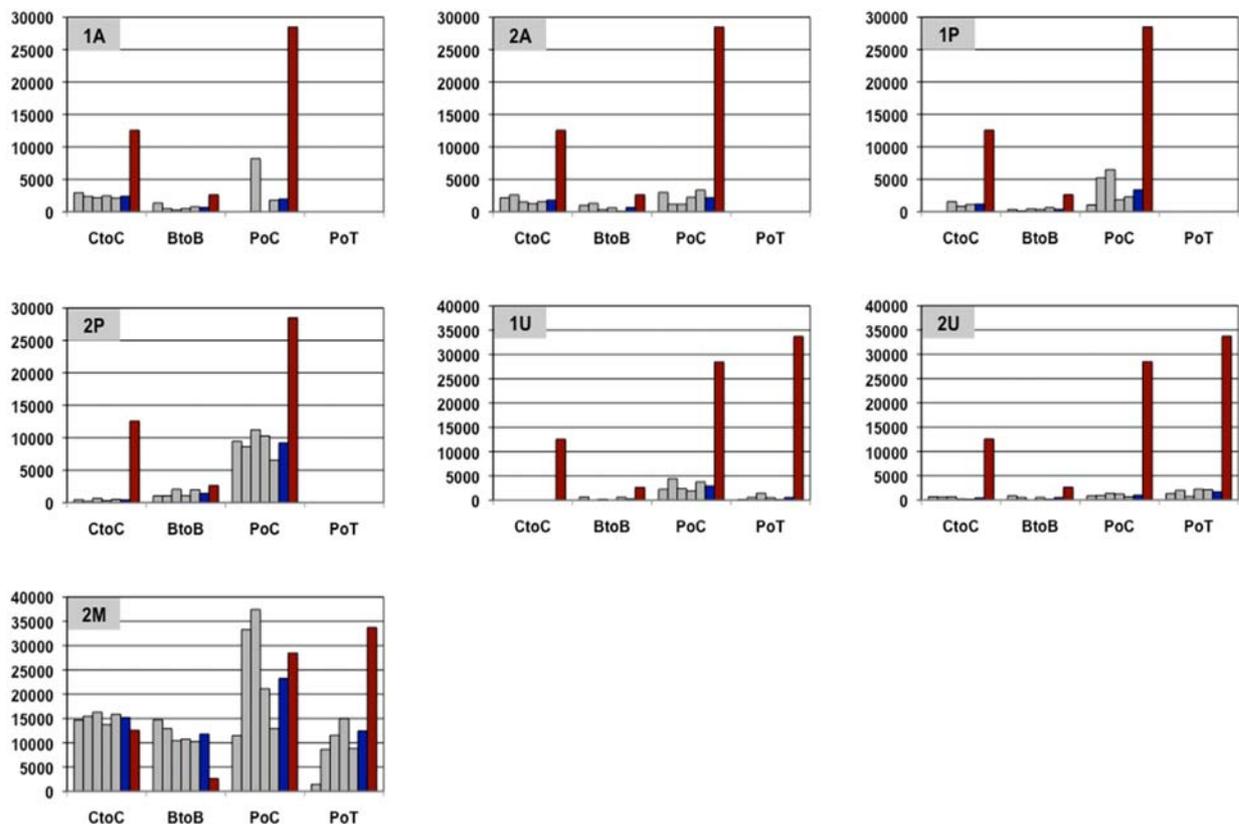


Abb. 8: Adhäsivitätsmessung (N/m^2) selbst hergestellten löslichen Kollagens und von Fibrin
Messsysteme: CtoC (cartilage to cartilage), BtoB (bone to bone), PoC (pullout cartilage), PoT (pullout Transplantat).
Graue Balken: 5 Messwerte; blauer Balken: Mittelwert; roter Balken: Adhäsivität von Fibrin. Nur im PoT System war ein Einsatz von zellbeladenen Fibrin/PGLA Scaffolds sinnvoll.
1A und 2A: mit Säurelösungen extrahierte lösliche Kollagene; 1P und 2P: mit Pepsin extrahierte lösliche Kollagene;
1U und 2U: mit Harnstoff extrahierte lösliche Kollagene (2U mit 0,2%iger Hyaluronsäurezusatz); 2M: Polyionkomplex aus löslichem Kollagen und Hyaluronsäure

Hinsichtlich der Adhäsivität hat sich für die sauer extrahierten Kollagene 1A und 2A, für die pepsinolytisch gewonnenen Kollagene 1P und 2P sowie für die harnstoffvermittelten Kollagenextrakte 1U und 2U gezeigt, dass Fibrin in jedem Messsystem deutlich bessere

Eigenschaften hat, wobei 1U bzw. 2U zusätzlich im PoT System gemessen und mit zellbeladenem Fibrin verglichen werden. Die Adhäsivität der gewonnenen Kollagenextrakte, auch nach einer Aufkonzentrierung, ist also für eine direkte Anwendung als Gewebekleber unzureichend. Nur die Substanz 2M, bestehend aus Kollagen und Hyaluronsäure, zeigt als Gewebekleber eine dem Fibrin überlegene Wirkung, allerdings nicht in dem die Defektfüllung simulierenden System. Ursache der Klebewirkung ist hier die Bildung eines Polyionenkomplexes (PIK) zwischen der anionischen Hyaluronsäure und dem kationischen Kollagen unter sauren Bedingungen. Im PIK ist eine Vielzahl an freien funktionellen Gruppen vorhanden, die mit polaren Gruppen der umgebenden Gewebe interagieren können, ohne kovalente Bindungen einzugehen. Bei Erhöhung des pH-Wertes treten allerdings Änderungen in der Ladung der Polymere auf, und die Adhäsivität des Materials sinkt. Neben dem pH-Wert beeinflussen auch Begleitsubstanzen, z.B. Salze oder Harnstoff (siehe z.B. Probe 2U), die Stabilität des PIKs. Die Anwesenheit von Gelatine und fibrillärem Kollagen beeinträchtigt die Klebeigenschaften. Nur unter Einsatz von nativem, löslichem Kollagen resultiert eine gute Adhäsivität.

In den IR-Absorptionsspektren eines gefriergetrockneten PIK aus Kollagen und Hyaluronsäure (Abbildung 9) sind folgende Banden zuzuordnen: -Amid-NH-/H-Brücken bei ca. 3400 cm^{-1} (aber möglicherweise auch -OH-Banden); Amid-I- und Amid-II-Bande bei $1650\text{ bis }1690\text{ cm}^{-1}$ bzw. $1530\text{ bis }1640\text{ cm}^{-1}$; die COOH-Bande bei $1710\text{-}1760\text{ cm}^{-1}$, gestützt durch die Nebenbande für COO(-) bei ca. 1400 cm^{-1} ; die Absorption bei ca. $1030\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ ist dem C-O-C-Strukturelement der Kohlenhydrate (in der Cycloform) zuzuordnen. Die IR-Untersuchungen belegen die Wechselwirkung und Stabilisierung der helikalen Anordnung der beiden Polymere im gebildeten Polyionkomplex.

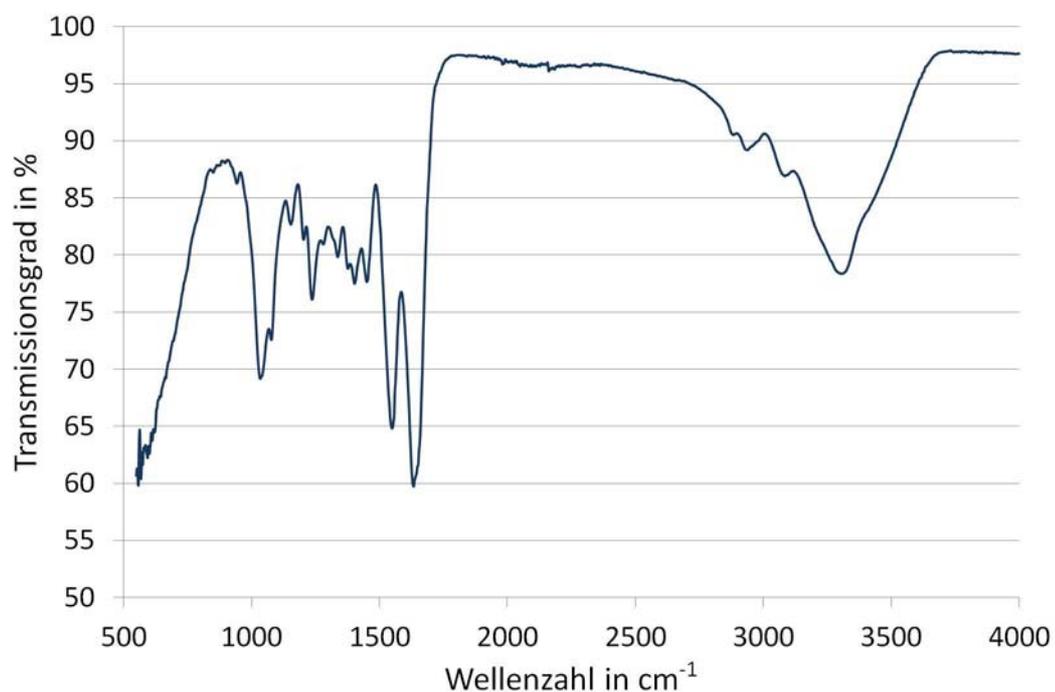


Abb. 9: IR-Spektrum eines gefriergetrockneten PIK aus Kollagen und Hyaluronsäure

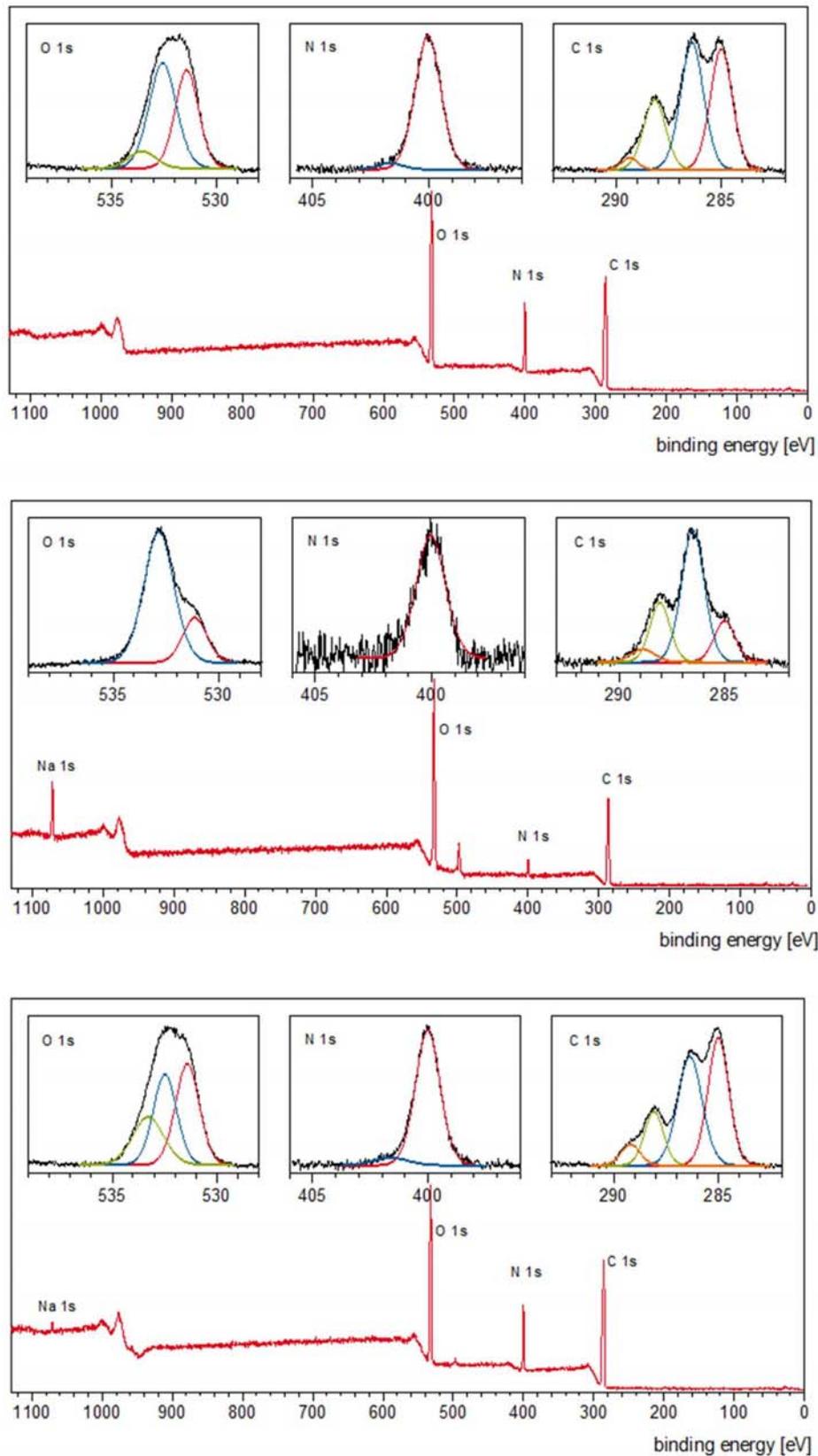


Abb. 10: Röntgenoberflächenanalyse von Kollagen (oben), Na-Hyaluronat (in der Mitte) und einem PIK aus Na-Hyaluronat und Kollagen (unten)

Röntgen-Oberflächenanalysen der PIK und der Ausgangspolymere zeigen, dass die kleineren Kollagenmoleküle sich ionisch an der Oberfläche der größeren Hyaluronsäuremoleküle binden (Tabelle 3 und Abbildung 10). Im Inneren der PIK befinden sich die Hyaluronsäure, an der Oberfläche die Kollagenmoleküle.

Neben der Herstellung von Produkten mit adhäsiven Eigenschaften aus den löslichen Kollagenen war zu versuchen, Scaffolds daraus herzustellen. Scaffolds bilden die Grundlage für die Rekonstruktion von biologischem Gewebe in der regenerativen Medizin. Sie dienen dabei als eine formgebende, temporäre Stützmatrix für die Zellen. Aus allen drei Varianten für Kollagenextrakte (Extraktion mit sauren Lösungen, Pepsin oder Harnstoff) konnte man gelförmige, spritzfähige Scaffolds erzeugen. Die löslichen Kollagene waren allerdings nicht geeignet, um feste Scaffolds über eine Gefriertrocknung zu generieren. Eine chemische Modifizierung könnte zu besseren Scaffold-Bildungseigenschaften führen, allerdings über sehr kostenaufwendige Verfahren. Zudem sind zytotoxische Probleme nicht auszuschließen. Bei der Herstellung von festen Scaffolds aus löslichen Kollagenen mittels Gefriertrocknung treten zwar teilweise irreversible intra- und intermolekulare Bindungen und somit Vernetzungen auf, die zur Bildung von Mikrofibrillen und einer festen Struktur führen. Es fehlen aber die Struktur gebenden Kollagenfasern, die den Scaffolds aus unlöslichen Kollagen die nötige Stabilität verleihen.

Substanz	C [%]	O [%]	N [%]	Na [%]	Ca [%]
Na-Hyaluronat	57,9	34,6	4,2	3,3	
Kollagen	64,9	23,2	11,8		
PIK aus Na-Hyaluronat und Kollagen	67,5	22,5	9,7	0,3	
PIK aus Na-Hyaluronat und Kollagen (Arginin und Ca(OH) ₂ -Zusätze)	63,8	20,3	15,3		0,6

Tab. 3: Oberflächen-Elementaranalyse von Na-Hyaluronat, Kollagen und PIK aus Na-Hyaluronat und Kollagen

4. Anwendungen – ein Ausblick

Die hier mitgeteilten Anwendungen löslicher Kollagen, hervorgehoben in medizinischem Bereich, basieren sämtlich auf der Verwendung von im Zuge von Schlachtungen in großen Mengen anfallenden Schweineschwarten. Deren Nutzung setzt eine detaillierte Kenntnis der chemischen und biochemischen Eigenschaften, gekoppelt mit analytischen Befunden, voraus.

Nach unseren Erfahrungen können aus den löslichen Kollagenen gelförmige Scaffolds hergestellt werden. Hervorzuheben ist jedoch die Herstellung eines „Biokompatiblen Klebemittels“ und dessen Nutzung in der regenerativen Medizin durch unseren Partner die Charité-Universitätsmedizin Berlin. Beide Partner, das IASP und die Charité, haben dazu das Patent „Biokompatibles Klebemittel sowie Verfahren zu dessen Herstellung“ angemeldet (Amtliches Aktenzeichen: 102011077809.8). Der neuartige Kleber zielt ab auf weitere Anwendungen in der regenerativen Medizin/Tissue-Engineering. Dieser dynamisch wachsende Forschungs- und Entwicklungsbereich mit seinen immer mehr zugelassenen klinischen Verfahren und Produkten revolutioniert derzeit viele medizinische Bereiche und wird als eines der stärksten Wachstumsmärkte mit Umsatzpotentialen im Milliardenbereich angesehen. Die einfache, schnelle, sichere und feste Verankerung von Zellträgern und Zellprodukten im Körper stellt jedoch in mehreren anzuwendenden

Bereichen der regenerativen Medizin – einbezogen dem entsprechenden Veterinärmedizinbereich – ein Problem dar. Das von uns neu entwickelte Produkt soll zu besseren Verfahren in der regenerativen Medizin führen.

Lösliches Kollagen kann, so wird berichtet, zur Bekämpfung von Harninkontinenz eingesetzt werden. Dazu erfolgt eine Kollagenunterspritzung von Strukturen des Verschlussapparats der Blase. Je nach Schweregrad kann die Inkontinenz komplett beseitigt, zumindest jedoch erheblich gebessert werden.

In der Kosmetik beruht der Einsatz löslicher Kollagene auf der gleichzeitigen Nutzung ihrer regenerierenden und Wasser bindenden Eigenschaften. Letztere kann auf die helikale bzw. tripelhelikale Struktur der Wirtmoleküle zurückgeführt werden – die Helices selber können Wassermoleküle einlagern, und zudem ist durch die Vielzahl von H-Brücken auch eine externe Anbindung dieser polaren Moleküle an die Kollagenmoleküle begründet. Cremes und Lotions auf Kollagenbasis tragen zur Erhöhung der Hautfeuchtigkeit bei; darüber können Hautschädigungen infolge Sonneneinstrahlung und gleichzeitig die Hautfaltentiefe reduziert werden. Dabei sind Body-Lotions, spezielle Gesichtspflegeprodukte wie etwa Masken und Hand-Cremes stark gefragt. In Verbindung mit Fettsäuren sind Shampoos auf Kollagenbasis, bei gleichzeitiger guter Waschleistung, dermatologisch besonders verträglich.

Für eine weitergehende Nutzung des Kollagens in den Rohstoffen sollte auch das nach Isolierung des löslichen Teils zurückbleibende unlösliche, weil vernetzte Kollagen Anwendung finden. Ein mögliches Einsatzgebiet für unlösliche Kollagene ist die Herstellung von blutungsstillenden Schwämmen aus Kollagenfasern, Wundverbänden aus Kollagenvlies, zeitweiliger Hautersatz oder von festen Scaffolds für die regenerative Medizin. Angesagt wäre auch die Produktion von filmartigen Materialien zur Umhüllung von Lebensmitteln wie Wurstbrät (z.B. Eckmayer et al., 2003; Maser, 1996). In diesem Zusammenhang könnte eine Optimierung der relevanten technofunktionellen Eigenschaften der Kollagene mittels chemischer Vernetzungsmethoden erforderlich sein (Avery und Bailey, 2008; Gagnieu, C., 1998; Fietzek et al., 1996; Heidemann, 1996).

In eine weitere Nutzung der hier mitgeteilten experimentellen Ergebnisse wären andere Kollagentypen einerseits und andere Polysaccharide für die Bildung von Polyionenkomplexen andererseits einzubeziehen.

Danksagung

Die für diese Publikation notwendigen Recherchen und experimentellen Arbeiten wurden im Rahmen des Verbundprojekts „Hochadhäsives lösliches Kollagen“ durchgeführt, das mit Mitteln des Landes Berlin und des Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) über die Investitionsbank Berlin gefördert wurde.

Literatur

- Bailey, A. J.; Paul R. G.; Knott, L.: Mechanisms of maturation and ageing of collagen, *Mechanisms of Ageing and Development*, 106(1998), 1-56
- Davidson, J. R.; Cooper, R. D.: Intermolecular Relationship between Neutral-salt-soluble and Acid soluble collagen, *Nature*, 217(1968), 168-169

- Avery, N. C.; Bailey, A. J.: Restraining Cross-Links Responsible for the Mechanical Properties of Collagen Fibers: Natural and Artificial; in „Collagen Structure and Mechanics”, Herausgeber Fratzl, P., Springer Science+business Media, 2008
- Dehne, T.; Zehbe, R., Valbuena, R.; Schubert, H.; Sittinger, M.; Ringe, J.: A method to screen and evaluate tissue adhesives for joint tissue, Poster, Annual meeting of the European Chapter of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), Granada, Spanien, 7-10 Juni, 2011
- Dehne, T.; Zehbe, R.; Valbuena, R.; Schubert, H.; Sittinger, M., Ringe, J.: A method to screen and evaluate tissue adhesives for joint tissue engineering, Histology and Histopathology 26(2011) (Supplement 1), 305, Abstract
- Eckmayer, Z.; Dorstewitz, R.; Schlösser, L.; Böhni, J. A.; Geistlich, P.: Verfahren zur Herstellung einer Kollagenmembran aus Schweinehaut, Patent DE 10060643 C2, 16.10.2003
- Fessler, H. J.: Some properties of Neutral-salt-soluble collagen, Biochem. J., 76(1960), 463-471
- Fietzek, P. P.; Notbohm, H.; Mueller, P. K.: Kollagenprodukte in der klinischen Anwendung, 1. Freiburger Kollagensymposium, 24-25 Oktober, 1996, Freiberg/Sachsen, Herausgeber: FILK
- Gagnieu, C.: Vernetzbare Kollagenderivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zur Herstellung von Biomaterialien, Patent DE 69315483 T2, 02.07.1998
- Heidemann, E.: Natürliche und künstliche Quervernetzungen am Kollagen, 1. Freiburger Kollagensymposium, 24-25 Oktober, 1996, Freiberg/Sachsen, Herausgeber: FILK
- Kunii, S.; Morimoto, K.; Nagai, K.; Saito, T.; Sato, K.; Tonomura, B.: Actinidain-hydrolyzed Type I Collagen Reveals a Crucial Amino Acid Sequence in Fibril Formation, The Journal of Biological chemistry 285(2010)23, 17465-17470
- Maser, F., Wursthüllen auf Basis von Kollagen – Herstellung, Anwendung und Bedeutung, 1. Freiburger Kollagensymposium, 24-25 Oktober, 1996, Freiberg/Sachsen, Herausgeber: FILK
- Petrova, A.; Westphal, G.; Valbuena, R.; Ringe, J.: Struktur und technofunktionelle Eigenschaften von Kollagenen tierischen Ursprungs, LIFIS ONLINE [13.09.11],
URL: www.leibniz-institut.de/archiv/petrova_13_09_11.pdf
- Stegemann, H.; Stalder, K.: Determination of hydroxyproline, Clinica Chimica Acta 18(1967)2, 267-273

[09.11.11]

Kontakt:

Dr. Rafael Valbuena
Institut für Agrar- und Stadtökologische Projekte
an der Humboldt-Universität zu Berlin
Philippstraße 13, Haus 16
D – 10115 Berlin
rafael.valbuena@agrار.hu-berlin.de

		<p>Das Vorhaben "Hochadhäsives lösliches Kollagen" wurde von der Europäischen Union kofinanziert (Europäischer Fonds für regionale Entwicklung)</p> <p>Investition in ihre Zukunft</p>
---	---	---