

Universität Rostock

Institut für Biomedizinische Technik



**Entwicklung von antiproliferativ und neurotroph
wirkenden Poly(dimethylsiloxan)-Oberflächen zur
Verbesserung der Langzeitfunktionalität von Cochlea-
Implantaten**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

Vorgelegt von

Anne Bohl, geb. am 29.08.1983 in Rostock

aus Rostock

Rostock 18.03.2018

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom 01.03.2009 bis 09.11.2014 am Institut für Biomedizinische Technik der Universität Rostock angefertigt.

Gutachter:

Prof. Dr. Udo Kragl, Universität Rostock, Institut für Chemie

Prof. Dr. Werner Weitschies, Universität Greifswald, Institut für Pharmazie

Prof. Dr. Thomas Lenarz, Hannover, Medizinischen Hochschule

Jahr der Einreichung: 2019

Jahr der Verteidigung: 2019

Danksagung

Hiermit danke ich recht herzlich Frau Prof. Sternberg für die Ausgabe meines Promotionsthemas, Herrn Prof. Kragl für die Zweitbetreuung und Herrn Prof. Schmitz für die Bereitstellung der technischen Möglichkeiten zur Bewerksstellung dieser Aufgabenstellung.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Henning Rohm für die Betreuung während der ersten Promotionszeit und dafür, dass er auch nach seinem Arbeitsplatzwechsel mir immer mit einem guten Rat zur Seite stand.

Im weiteren Danke ich Frau Andrea Rohde und Frau Caroline Dudda für die Bearbeitung und die Auswertung der analytischen Proben.

Natürlich gilt mein Dank auch der ganzen Chemie-Arbeitsgruppe des IBMT, die für ein nettes Arbeitsklima sorgten und bei Problemen gerne einen guten Ratschlag gaben.

Ein besonderer Dank gilt vielen weiteren Mitarbeitern des Institutes für Biomedizinische Technik, die für mich zu jeder Zeit ein offenes Ohr hatten und mir bei anfallenden Problemen gerne einen Lösungsvorschlag boten.

Zuletzt danke ich meiner Familie sowie meinen Freunden, die mich auch an schlechten Tagen offen empfangen und sich all meine Sorgen und Nöte anhörten.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Rostock, März 2018

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Zielstellung	7
3. Theoretische Grundlagen	11
3.1. Polymerbasierte Implantatbeschichtungen	11
3.2. Chemische Modifikationen von Implantatoberflächen	16
3.3. Wirkstofffreisetzungssysteme zur Minimierung implantatbedingter Fremdkörperreaktionen	21
3.4. Biofunktionalisierungen zur Optimierung der Implantat-Gewebe-Interaktion	25
3.5. Degradation und Biodegradation von Polymeren.....	28
4. Materialien und Methoden	33
4.1. Materialien zur Herstellung der Probekörper, der Oberflächenmodifizierungen und der Polymerbeschichtungen	33
4.1.1. Poly(dimethylsiloxan), Poly(L-lactid), Poly(4-hydroxybuttersäure), Hyaluronsäure, Poly(L-lysin)	33
4.1.2. Dexamethason.....	35
4.1.3. Brain-derived neurotrophic factor	35
4.1.4. Crosslinker.....	36
4.2. Methoden zur Oberflächenmodifizierung	36
4.2.1. Chemische Oberflächenaktivierung von Poly(dimethylsiloxan)-Probekörpern und Polymer-Scheiben	36
4.2.2. Auftragung einer polymerbasierten Implantatbeschichtung auf Poly(dimethylsiloxan)-Probekörper und Polymer-Scheiben.....	40
4.2.3. Ankopplung von BDNF an Poly(dimethylsiloxan)- und Polymer-Scheiben	42
4.3. Methoden zur Charakterisierung der Oberflächenmodifizierung	43
4.3.1. Infrarotspektroskopie (IR-Spektroskopie)	43
4.3.2. Kontaktwinkelmessungen	43
4.3.3. Environmental Scanning Elektronen Mikroskopie.....	44
4.3.4. Schichtdickenbestimmung der polymerbasierten Beschichtungen	44
4.3.5. Simulierte CI-Elektroden-Implantation.....	45
4.3.6. Energiedispersive Röntgenspektroskopie	45
4.3.7. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) für Polymer- und PDMS-Scheiben	45
4.4. <i>In vitro</i> Modelle	47

4.4.1.	<i>In vitro</i> Freisetzungsmodelle	47
4.4.2.	Methoden zum Nachweis der freigesetzten Wirkstoffe	48
4.4.3.	<i>In vitro</i> Degradationsmodell	50
4.4.4.	Methoden zur Verfolgung der Degradation.....	55
5.	Ergebnisse	57
5.1.	Charakterisierung der chemischen Oberflächenfunktionalisierung von PDMS-Probekörpern	57
5.1.1.	Aminogruppenfunktionalisierung von PDMS-Probekörpern.....	58
5.1.2.	Polymerlayer auf PDMS-Probekörpern	58
5.2.	Charakterisierung der Schichtmorphologie und Untersuchung der Schichthaftung von Polymer-Sprühschichten auf PDMS-Probekörpern	62
5.2.1.	Begutachtung der Schichtmorphologie.....	62
5.2.2.	Untersuchungen zur Schichthaftung	65
5.2.3.	Bestimmung der Schichtdicke	67
5.3.	<i>In vitro</i> Freisetzung von Dexamethason.....	68
5.3.1.	Stabilitätsuntersuchungen von DMS	69
5.3.2.	Beobachtungen der Freisetzungskinetik von DMS aus Polymer-Beschichtungen	69
5.3.3.	Freisetzungverlauf von Dexamethason aus PDMS	71
5.3.4.	Verfolgung der kombinierten Dexamethason-Freisetzung aus PDMS und P(4HB)-Beschichtungen.....	72
5.4.	<i>In vitro</i> Freisetzung des Wachstumsfaktors Brain-derived neurotrophic factor	75
5.4.1.	Stabilitätsuntersuchungen von BDNF.....	75
5.4.2.	Beladung von PDMS- und Polymer-Scheiben mit BDNF.....	77
5.4.3.	<i>In vitro</i> BDNF-Freisetzung.....	81
5.5.	<i>In vitro</i> Degradation der Polymere P(4HB) und PLLA	84
5.5.1.	Charakterisierung der Oberflächen von degradierten Polymer-Proben	85
5.5.2.	Molmassen- und Massenverlust von degradierten Polymerproben	89
5.5.3.	Thermoanalysen degradierter Polymerproben	91
6.	Zusammenfassung und Diskussion	93
7.	Ausblick	100
8.	Anhang	101
9.	Literaturverzeichnis	101
10.	Chemikalienliste	114
11.	Geräteliste	118

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Cochlea-Implantat-Systeme von der Firma Cochlear™	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines eingesetzten Cochlea-Implantat-Systems	2
Abbildung 3: Schematische Darstellungen a) Querschnitt durch eine humane Cochlea; b) Implantierter Elektrodenträger in der Cochlea.....	3
Abbildung 4: Histologischer Schnitt durch eine Meerschweinchen Cochlea	4
Abbildung 5: Schematische Darstellung einer gesunden Hörnervenzelle	5
Abbildung 6: Mikroskopische Abbildungen von Spiralganglienzellen; Schematische Dar- stellungen des Cortischen Organs	6
Abbildung 7: Schematische Darstellung des zu entwickelnden Drug Delivery Systems... 7	7
Abbildung 8: Schematische Darstellung der untersuchten BDNF Delivery Systeme.....	8
Abbildung 9: Strukturformel von a) Poly(L-lactid), b) Poly(4-hydroxybuttersäure), c) Poly- (dimethylsiloxan), d) Hyaluronsäure und e) Poly(L-lysin)	12
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Reaktion einer PDMS-Oberfläche mit Sau- erstoffplasma und anschließender 3-Aminopropyltriethoxysilan-Modifizie- rung	19
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Reaktion einer Carbonsäure mit EDC/NHS an eine Amino-funktionalisierte Oberfläche.....	20
Abbildung 12: Strukturformel von a) Progesteron, b) Hydrocortison und c) Dexametha- son	22
Abbildung 13: Klassifizierung von Local Drug Delivery Systemen	23
Abbildung 14: Strukturformeln der eingesetzten homobifunktionalen N-Hydroxysuccin- imidester.....	26
Abbildung 15: Schematische Darstellung einer Zwei-Schritt-Reaktion mit drei Kompo- nenten	28
Abbildung 16: Schematische Darstellung der a) Oberflächendegradation und b) Bulkde- gradation	29
Abbildung 17: Reaktionsschemen der hydrolytischen Polymerdegradation an den Bei- spielen von a) PLLA und b) P(4HB).....	29
Abbildung 18: Reaktionsschema des L-Milchsäure-Abbaus	30
Abbildung 19: Foto der untersuchten Probekörper	33
Abbildung 20: Schematische Darstellung Sprühdüse mit Sprühstrahl und PDMS-Probe- körper	41

Abbildung 21: a) Darstellung der möglichen Oberflächenbenetzung mit Wasser, b) Foto eines Wassertropfens auf einer P(4HB)-Oberfläche zur Kontaktwinkelbestimmung.....	44
Abbildung 22: Schematische Darstellung der Reaktion bei einem Oberflächen-ELISA	46
Abbildung 23: Schematische Darstellung des Nachweises von BDNF in Lösung mit Hilfe eines ELISA-Kits der Firma RayBiotech®.....	49
Abbildung 24: Reaktionsgleichung der Standard-Assays zur Bestimmung der Enzymaktivität von Lactatdehydrogenase (LDH) und Butyrylcholinesterase	53
Abbildung 25: UV-VIS-Spektren von a) 0,05 mM NADH und b) 0,05 mM S-But gegen Wasser als Referenz	54
Abbildung 26: Kontaktwinkelmessungen zur Parameter-Studie von Plasma-funktionalisierten PDMS-Scheiben	57
Abbildung 27: IR-Spektren von PDMS-, PLLA- und P(4HB)-Scheiben sowie PDMS-Scheiben mit PLLA- bzw. P(4HB)-Layer (je d = 6 mm).....	59
Abbildung 28: IR-Spektren von PDMS-Scheiben (modifiziert und unmodifiziert), mit P(4HB)-Layer (je d = 6 mm).....	61
Abbildung 29: ESEM-Bilder von PDMS-Scheiben	62
Abbildung 30: ESEM-Aufnahmen von unmodifizierten und beschichteten PDMS-Fäden und -Scheiben	63
Abbildung 31: ESEM-Aufnahmen von beschichteten PDMS-Scheiben	64
Abbildung 32: ESEM-Aufnahme eines mit P(4HB)/DMS 85/15 % (w/w)-beschichteten Cochlea-Implantat-Elektroden-trägers	65
Abbildung 33: ESEM-Aufnahmen von P(4HB)-beschichteten PDMS-Scheiben.....	66
Abbildung 34: ESEM-Aufnahmen von P(4HB)/DMS 85/15 % (w/w)-beschichteten Cochlea-Implantat-Elektroden-trägern	67
Abbildung 35: ESEM-Aufnahmen von in Harz eingegossenen mit P(4HB)-beschichteten PDMS-Fäden.....	68
Abbildung 36: DMS-Stabilität in 0,9 %-iger NaCl-Lösung und künstlicher Perilymphe...	69
Abbildung 37: <i>In vitro</i> DMS-Freisetzung von DMS-haltigen Polymer-Beschichtungen auf PDMS-Scheiben (d = 6 mm) in 0,9 %-iger NaCl-Lösung bei 37 °C	70
Abbildung 38: <i>In vitro</i> DMS-Freisetzung von DMS-haltigen PDMS-Probekörpern (Scheiben (d = 6 mm) und Fäden (l = 40 mm, d = 0,3 mm))	71
Abbildung 39: <i>In vitro</i> DMS-Freisetzung von DMS-haltigen und zusätzlich beschichteten PDMS-Scheiben	73

Abbildung 40: <i>In vitro</i> DMS-Freisetzung von DMS-haltigen und zusätzlich beschichteten PDMS-Scheiben	74
Abbildung 41: Stabilität von BDNF ($c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$) in verschiedenen Medien	77
Abbildung 42: Beladung von unmodifizierten und oberflächenaktivierten PDMS- und Polymer-Scheiben ($d = 6 \text{ mm}$) mit BDNF	78
Abbildung 43: Beladung von unmodifizierten, oberflächenaktivierten und DSS-modifizierten P(4HB)-Scheiben ($d = 6 \text{ mm}$) mit BDNF	79
Abbildung 44: BDNF-Beladung von unmodifizierten und Crosslinker-modifizierten P(4HB)- und PLLA-Scheiben ($d = 6 \text{ mm}$)	80
Abbildung 45: EDX-Spektrum von unmodifizierten, DSS- und BSOCOES-modifizierten PLLA-Scheiben.....	81
Abbildung 46: <i>In vitro</i> BDNF-Freisetzung von unmodifizierten und DSS-modifizierten BDNF-beladenen P(4HB)- und PLLA-Scheiben ($d = 6 \text{ mm}$).....	82
Abbildung 47: <i>In vitro</i> BDNF-Freisetzung von Crosslinker-modifizierten BDNF-beladenen PLLA-Scheiben ($d = 6 \text{ mm}$)	83
Abbildung 48: <i>In vitro</i> BDNF-Freisetzung von PECML-beschichteten P(4HB)-Scheiben ($d = 6 \text{ mm}$).....	84
Abbildung 49: ESEM-Aufnahmen von P(4HB)-Proben der enzymatischen Degradation	86
Abbildung 50: ESEM-Aufnahmen von P(4HB)- und PLLA-Proben zu den Degradationszeiträumen 0 Wochen und 52 Wochen	87
Abbildung 51: Änderung der molaren Masse im Verlauf der <i>in vitro</i> Degradation über 52 Wochen bei hydrolytisch und enzymatisch degradierter P(4HB) und PLLA	89
Abbildung 52: Beobachtung der Trockenmasse im Verlauf der <i>in vitro</i> Degradation über 52 Wochen bei hydrolytisch und enzymatisch degradierter P(4HB)	90
Abbildung 53: Verfolgung der Kristallinität im Verlauf der <i>in vitro</i> Degradation über 52 Wochen bei hydrolytisch und enzymatisch degradierter P(4HB) und PLLA	91
Abbildung 54: Veränderung des Schmelzpunktes im Verlauf der <i>in vitro</i> Degradation über 52 Wochen bei hydrolytisch und enzymatisch degradierter P(4HB)	92
Abbildung 55: GPC-Chromatogramm von PLLA und P(4HB) nach 0, 5 und 48 Wochen enzymatisch degradierter Proben ($n = 1$)	101
Abbildung 56: Schmelzkurven für PLLA und P(4HB).....	101

Abbildung 57: Veränderung des Schmelzpunktes im Verlauf der in vitro Degradation
über 52 Wochen bei hydrolytisch und enzymatisch degradierter PLLA
..... 102

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht möglicher Oberflächenmodifizierungen von PDMS	17
Tabelle 2: Gegenüberstellung ausgewählter chemischer Eigenschaften von Crosslinkern	26
Tabelle 3: Eingewogene Massen der untersuchten Crosslinker für 5 Polymer-Filme (d = 6 mm) und 4 mL DMSO (c = 1,2 mmol L ⁻¹)	36
Tabelle 4: Variierte Parameter des Plasmaprozesses bei PDMS-Probekörpern für Ammoniakgas und Sauerstoffgas	37
Tabelle 5: Versuche zur Ankopplung einer P(4HB)-Layer an PDMS-Scheiben in jeweils 3 mL Reaktionsmedium	39
Tabelle 6: Übersicht der Prozessparameter zur Erzeugung funktioneller Gruppen mit Hilfe von plasmachemischen Prozessen	40
Tabelle 7: Übersicht der für die Stabilitätsuntersuchungen von BDNF (je 1 µg mL ⁻¹) getesteten Lösungen bei Raumtemperatur (RT) und 37 °C	48
Tabelle 8: Übersicht der Parameter der hydrolytischen und enzymatischen Degradationsuntersuchungen	51
Tabelle 9: Volumina zur Herstellung des Degradationsmediums der enzymatischen Degradation	52
Tabelle 10: Parameter der Standard-Assays für Lactatdehydrogenase und Butyrylcholinesterase	53
Tabelle 11: Ermittelte Extinktionskoeffizienten von NADH und S-Butyrylcholinthioiodid	55
Tabelle 12: Ermittelte Kontaktwinkel von unmodifizierten und funktionalisierten PDMS-Scheiben	58
Tabelle 13: IR-Spektren-Auswertung der Versuche zur Ankopplung einer P(4HB)-Layer an aminofunktionalisierte PDMS-Scheiben (d = 6 mm)	60
Tabelle 14: Prozentual nach 1008 Stunden freigesetzte DMS-Menge aus DMS-haltigen PDMS-Probekörpern	72
Tabelle 15: Freisetzung von beschichteten, DMS-haltigen PDMS-Scheiben (d = 6 mm, n = 5) nach 42 Wochen und extrapolierter Zeitpunkt der Depoterschöpfung	75
Tabelle 16: Stabilitätsuntersuchungen von BDNF (je 1 µg mL ⁻¹) nach jeweils 24 Stunden bei Raumtemperatur (RT) und 37 °C	76
Tabelle 17: Kontaktwinkelmessungen an P(4HB)- und PLLA-Scheiben (10 x 5 mm, n = 5) zu verschiedenen Degradationszeiträumen	88
Tabelle 18: Chemikalienliste	114
Tabelle 19: Geräteliste	118

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzung / Symbol	Erklärung / Bezeichnung	Einheit
CI	Cochlea-Implantat	
z.B.	zum Beispiel	
bzw.	beziehungsweise	
u.a.	unter anderem	
PLLA	Poly(L-lactid)	
P(4HB)	Poly(4-hydroxybuttersäure)	
PDMS	Polydimethylsiloxan	
PLL	Poly(L-lysin)	
HA	Hyaluronsäure	
CHCl ₃	Chloroform	
EtCl ₂	1,2 Dichlorethan	
NaAc	Natriumacetat	
NHS	N-Hydroxysuccinimid	
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidehydrochloride	
BDNF	Recombinant human Brain derived neurotrophic factor	
NaCl	Natriumchlorid	
NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DSC	N,N'-Disuccinimidylcarbonat	
DSG	Disuccinimidylglutarate	
DSS	Disuccinimidylsuberate	
DSSeb	Disuccinimidylsebacate	
EGS	Ethyleneglycol bis(succinimidyl succinate)	
BSOCOES	Bis[2-(N succinimidyl-oxycarbonyloxy)ethyl] sulfone	
NH ₃ -Plasma	Ammoniakplasma	
O ₂ -Plasma	Sauerstoffplasma	

APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilane
DMF	N,N-Dimethylformamide
NaOH	Natriumhydroxyd
KCl	Kaliumchlorid
Enzyme-linked Immunosorbent Assay	ELISA
CaCl ₂	Calciumchlorid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
LDH-4	Lactatdehydrogenase Isoenzym 4
LDH-5	Lactatdehydrogenase Isoenzym 5
But	Butyrylcholinesterase from human serum
β-NADP-Na ₂	β-Nicotinamidadeninukleotidphosphat Dinatriumsalz
PBS	Phosphate buffered saline

1. Einleitung

Nicht sehen trennt den Menschen von Dingen – nicht hören trennt den Menschen vom Menschen (Immanuel Kant).

Die Sinnesorgane in ihrer Gesamtheit informieren uns über die Umwelt und schon Immanuel Kant wusste, dass das Hören einer unserer wichtigsten Sinne ist. Denn speziell das Hören ist für die kognitive, sprachliche, intellektuelle und psychosoziale Entwicklung eines Jeden von großer Bedeutung [1]. Erst wenn es nicht mehr richtig funktioniert oder gar ausgefallen ist, bemerkt man, was für eine große Rolle das Gehör spielt [2].

Eine Störung des Gehörs kann von leichter Schwerhörigkeit bis hin zu Gehörlosigkeit reichen und kann verschiedene Ursachen haben, die im gesamten Bereich der Hörorgane liegen können. Die häufigste Ursache einer hochgradigen Innenohrschwerhörigkeit ist eine Schädigung der Sinneszellen in der Cochlea (Gehörschnecke). Diese Sinneszellen werden als Haarzellen bezeichnet und wandeln die akustischen Schwingungen in elektrische Impulse um, die über den Hörnerv an das Gehirn weiter geleitet werden. Eine Schädigung der Haarzellen unterbricht daher den Informationstransport zum Gehirn [3].

In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts konnten erste Erfolge bei der Stimulation des menschlichen Hörnervs mit Hilfe von Elektroden erzielt werden. Die damals eingesetzten Elektroden bewirkten, dass Sprache von anderen Umweltlauten zu unterscheiden war. Ein Wortverstehen konnte jedoch vorerst nicht erreicht werden. Die Weiterentwicklung der Übertragungstechnologie und Elektroden führten zu einer Verbesserung der Hörqualität, des Tragekomforts sowie zur Minimierung von Komplikationen [4].

Im Jahr 2011 gab es weltweit ca. 300.000 Menschen, die ein Cochlea-Implantat-System trugen, von denen etwa 30.000 in Deutschland lebten [5]. Die folgende Abbildung 1 zeigt beispielhaft ein Cochlea-Implantat (CI)-System [143], von dem in Deutschland derzeit jährlich ca. 2000 implantiert werden. Zur Verdeutlichung des Aufbaus eines CI-Systems sind das außen am Kopf angebrachte Mikrophon, der Sprachprozessor und die Sendespule (Abbildung 1a)), die implantierte Empfängerspule mit den Elektroden (Abbildung 1b)) und der CI-Elektrodenträger mit den einzelnen CI-Elektrodenflächen (Abbildung 1c)) dargestellt.



Abbildung 1: Cochlea-Implantat-Systeme von der Firma Cochlear™ [143]; a) Sichtbarer Teil des Cochlea-Implantat-Systems; b) Cochlea-Implantat; c) Cochlea-Implantat-Elektrode in Großaufnahme

Das CI-System (Abbildung 2 [144]) nimmt über ein außen am Kopf angebrachtes Mikrofon (1) die Schallschwingungen auf und wandelt diese im Sprachprozessor (2) in elektrische Signale um. Die kodierten Signale werden von der Übertragungsspule (3) drahtlos auf das unter der Haut implantierte CI (4) übertragen und von diesem entschlüsselt. Die daraus folgenden elektrischen Impulse werden über die im CI-Elektrodenträger (5) befindlichen Elektroden in die Cochlea weitergeleitet und reizen dort frequenzabhängig an unterschiedlichen Stellen die verbliebenen intakten Nervenfasern (6) [6]. Dabei werden bei tiefen Tönen die Nervenzellen an der Spitze des CI, also tief im Inneren der Cochlea stimuliert und bei hohen Tönen die Zellen direkt am Eingang der Cochlea [7].

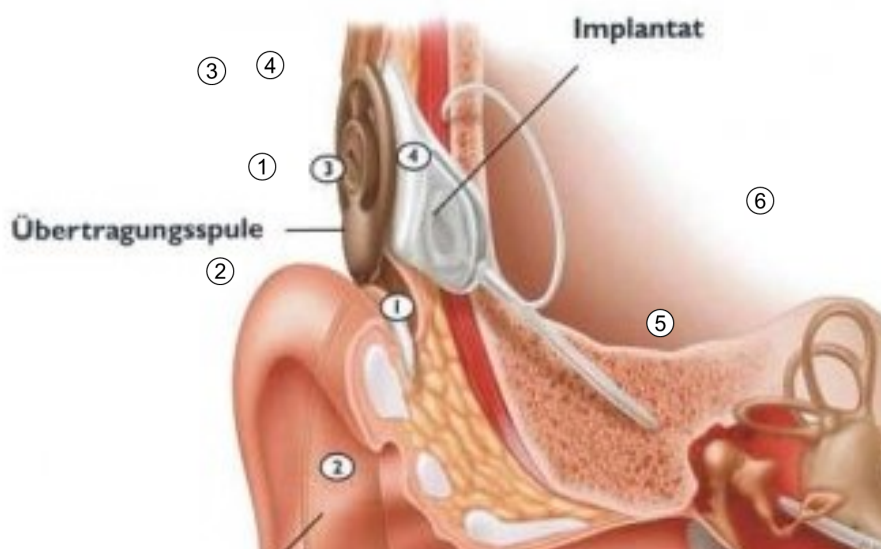


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines eingesetzten Cochlea-Implantat-Systems [144]

Die humane Cochlea ist aus drei übereinander liegenden, spiralförmig aufgewickelten, konischen Röhren in einer knöchernen Hülle aufgebaut. Abgerollt wäre die Cochlea ca. 30 mm lang. Der Durchmesser verjüngt sich während des Verlaufes von etwa 0,9 mm auf 0,3 mm [8]. Die Röhren sind mit Lymphflüssigkeit (Perilymphe und Endolymphe), einer klaren, eiweißarmen, elektrolythaltigen Flüssigkeit gefüllt und werden als Scala vestibuli, Endolymphatischer Raum und Scala tympani bezeichnet (Abbildung 3) [8, 9].

In der Abbildung 3 sind ein Querschnitt durch eine humane Cochlea (3a) [10]) und ein implantierter Elektrodenträger in einer humanen Cochlea (3b) [11]) dargestellt.

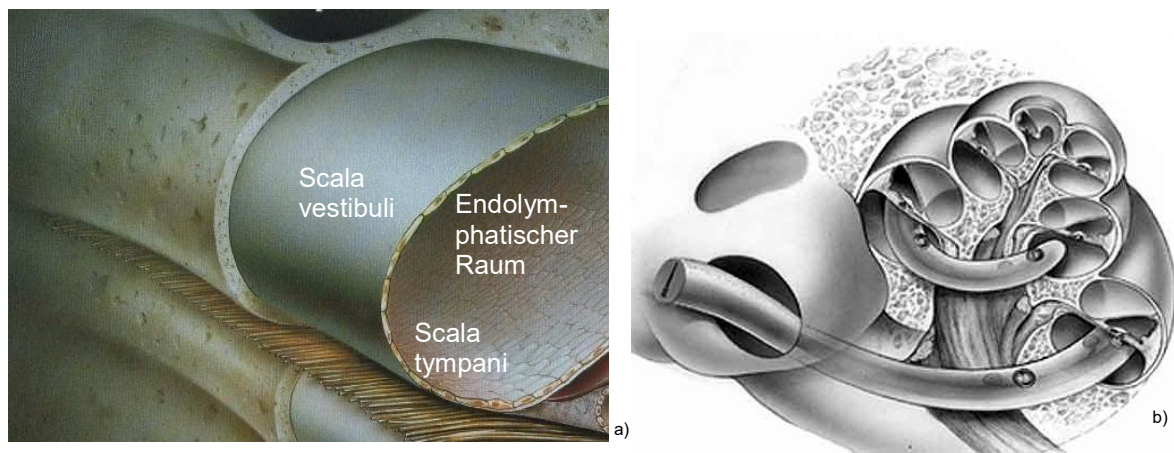


Abbildung 3: Schematische Darstellungen a) Querschnitt durch eine humane Cochlea [10]; b) Implantierter Elektrodenträger in der Cochlea [11]

Bei einem gesunden, hörenden Ohr wird der Schall mit der Ohrmuschel aufgefangen und über den äußeren Gehörgang zum Trommelfell weiter geleitet. Das Trommelfell beginnt zu vibrieren und überträgt die Schwingung auf die Gehörknöchelchen (Hammer, Ambos und Steigbügel). Der Steigbügel drückt auf das ovale Fenster und versetzt so die Perilymphe in der Scala vestibuli in Schwingung. Dort wird die Flüssigkeitsbewegung an den Haarzellen in ein Nervensignal umgewandelt, über die peripheren Fortsätze der Nervenzellen (Dendriten) an diese übertragen und über den Hörnerv an das Gehirn weitergeleitet [12].

Im Gegensatz dazu ist beim Hören mit einem CI der Elektrodenträger über das ovale Fenster in die Scala tympani implantiert und stimuliert dort direkt elektrisch die Dendriten des Hörnervs [13]. Somit kann man sagen, dass das CI der erste funktionierende Ersatz für ein Sinnesorgan ist [1].

Die heutigen CI-Systeme wurden auf Basis der Herzschrittmachertechnologie entwickelt, weshalb auch auf eine breite Erfahrung im Hinblick auf die Verwendung von geeigneten Materialien (wie z.B. Poly(dimethylsiloxan), Titan und Platin) zurückgegriffen werden konnte. Deshalb war bereits in der Anfangsphase der CI-Einführung eine gute

Biokompatibilität des Implantats gegeben und eine Funktionsdauer von mehreren Jahrzehnten konnte angestrebt werden [14].

So weist das Trägermaterial des CI, Poly(dimethylsiloxan) (PDMS), verschiedene für den Einsatz als Implantatmaterial positive Eigenschaften auf. Es zeigt unter anderem eine gute mechanische Stabilität, Biokompatibilität und Langzeitstabilität. Allerdings bewirkt es eine starke Induktion des Bindegewebewachstums um den Elektrodenträger. Dieses neu gebildete Bindegewebe kann wie ein Isolator wirken, der die Signalübertragung von der CI-Elektrode auf den Hörnerv in einem Maß einschränkt [13], welches bis zum Implantatversagen führen kann und damit dann den Ersatz des CI notwendig macht [15].

In der Abbildung 4 sind histologische Schnitte durch die Cochlea von Meerschweinchen zu sehen. Die Abbildung 4a) zeigt einen Querschnitt durch eine Cochlea, bei der die Position des zu implantierenden CI eingezeichnet ist [16]. Bei Abbildung 4b), die einen Schnitt durch eine implantierte Cochlea zeigt, erkennt man deutlich das neu gebildete Bindegewebe um den Elektrodenkanal (eingefärbter Bereich) [14].

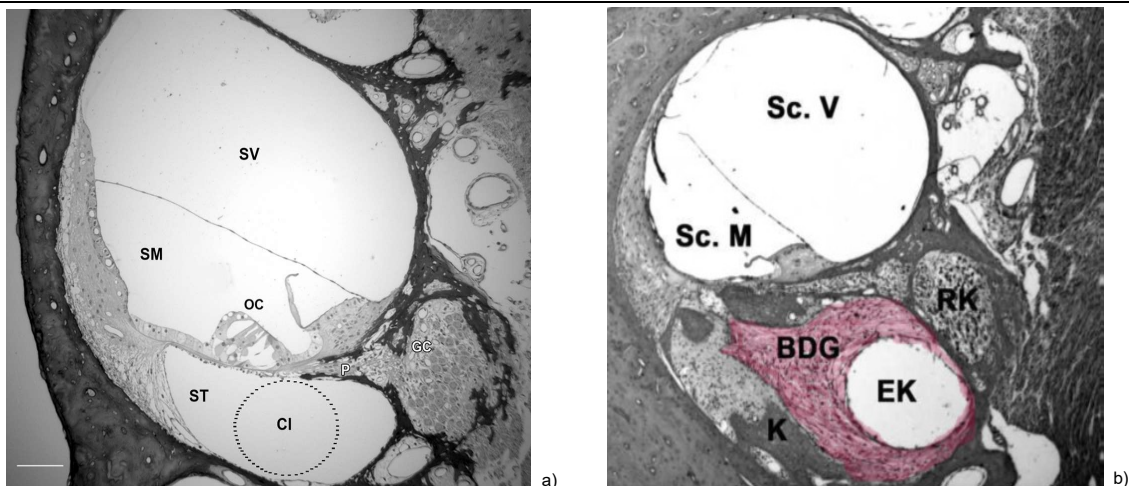


Abbildung 4: Histologischer Schnitt durch eine Meerschweinchen Cochlea; a) Cochlea, bei der die Position des Cochlea-Implantats eingezeichnet ist [16] (SV: Scala vestibuli, SM: Endolymphatischer Raum, OC: Cortisches Organ, ST: Scala tympani, GC und P: Spiralganglienzellen (GC) und Dendriten (P) im Rosenthalschen Kanal); b) Cochlea nach Implantation mit Bildung von Bindegewebe [14] (Sc. V: Scala vestibuli, Sc. M: Endolymphatischer Raum, BDG: Bindegewebe, RK: Rosenthalscher Kanal, EK: Elektrodenkanal, K: Knochen)

Um die Bildung des Bindegewebes um den Elektrodenträger einzudämmen und damit dauerhaft eine gute Signalübertragung auf den Hörnerv zu ermöglichen, werden antiproliferativ wirkende Pharmaka eingesetzt [17]. Dabei werden verschiedene Konzepte bei der Pharmakaapplikation verfolgt. So werden die Pharmaka über das runde Fenster direkt in die Cochlea appliziert oder mit Hilfe von Pumpen oder Reservoirs an definierten Orten in die Cochlea gebracht [18, 19]. Diese Arten der Pharmakaapplikation erzeugen

allerdings immer einen Konzentrationsgradienten entlang der Cochlea [20, 21] und bergen damit das Risiko, das am Ort der Applikation toxische Konzentrationen des Pharmakons vorliegen und im Inneren der Cochlea die Pharmakakonzentration gegen Null geht. Neuere Konzepte zielen darauf den Elektrodenträger selbst zu funktionalisieren. Ansätze sind hierbei z.B. neue Implantatmaterialien bzw. chemische Funktionalisierungen des PDMS, Oberflächenstrukturierungen sowie Anbindung und/oder lokaler Freisetzung von Wirkstoffen (Local Drug Delivery) [14].

Neben dem Bindegewebswachstum stellt die Schädigung der Haarzellen ein weiteres Problem bei der CI-Anwendung dar. Abbildung 5 zeigt den schematischen Aufbau einer gesunden Hörnervenzelle [22], bei der die Dendriten (2) direkt an den Haarzellen (1) andocken und die Spiralganglienzelle (3) (SGZ; Zellkörper der Nervenzelle) intakt ist.

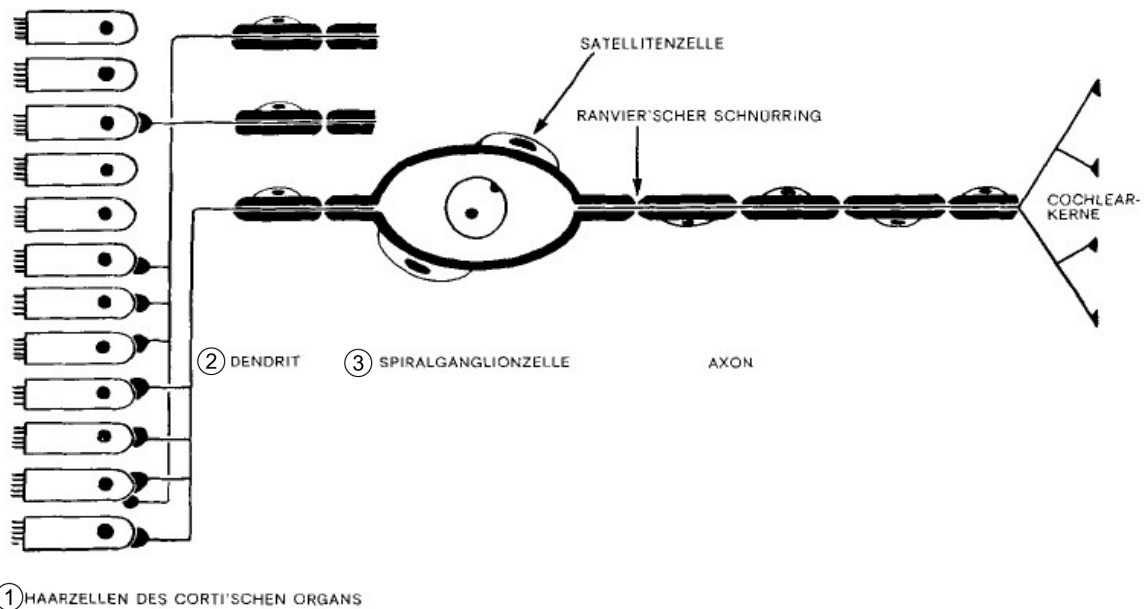


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer gesunden Hörnervenzelle [22]

Durch die Schädigung der Haarzellen und das damit verbundene Ausbleiben von Nervenimpulsen erfolgen ein Zurückziehen der Dendriten und ein Verlust der im Rosenthalschen Kanal befindlichen SGZ [23]. Dadurch entsteht ein großer Abstand zwischen dem Elektrodenträger und den Hörnerven, der zu einem schlechteren Frequenzunterscheidungsvermögen führt und damit zu einer deutlich schlechteren Effektivität [14] des CI-Systems. Durch neurotroph wirkende Substanzen (Nervenwachstumsfaktoren wie z.B. Neurotrophin-3, brain-derived neurotrophic factor und glial cell-line derived neurotrophic factor) kann das Überleben der SGZ verbessert und das Aussprossen der Dendriten der SGZ angeregt werden [23]. In

Abbildung 6a), b) und c) sind SGZ im Rosenthalschen Kanal einer Meerschweinchen-Cochlea dargestellt. Die Abbildungen 6d), e) und f) zeigen schematische Darstellungen des Cortischen Organs, in dem im Normalfall die Dendriten des Hörnervs auf die Haarzellen treffen. Dabei zeigen die Abbildungen 6a) und d) den Zustand eines normal hörenden Tieres mit vorhandenen SGZ (6a)) und ausgeprägten SGZ-Dendriten (6d)), die Abbildungen 6b) und e) den Zustand nach Ertaubung (SGZ sind zurück gebildet bzw. nicht mehr vorhanden (6b)) und die Dendriten degeneriert (6e)) und die Abbildungen 6c) und f) zeigen den Zustand nach Ertaubung, wenn frühzeitig Nervenwachstumsfaktoren gegeben werden (SGZ überleben (6c)) und die Dendriten der SGZ sprossen aus, haben aber keinen Kontakt zu Haarzellen (6f)) [24].

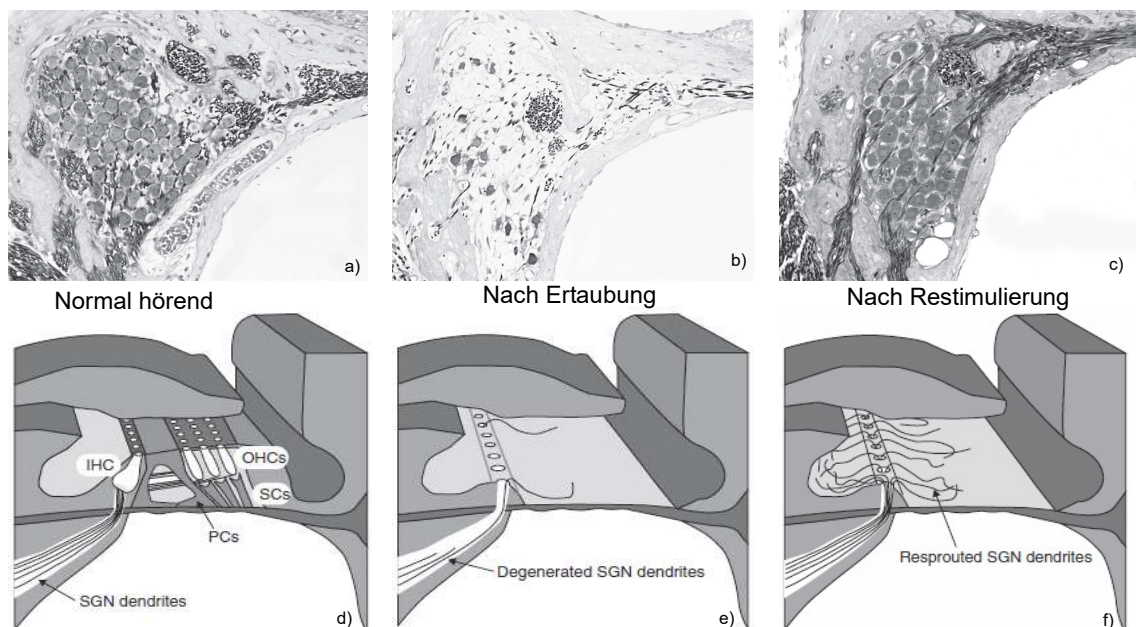


Abbildung 6: Mikroskopische Abbildungen [24]: a) – c): Spiralganglienzellen im Rosenthalschen Kanal von Meerschweinchen Cochlea; d) – f): Schematische Darstellungen des Cortischen Organs (SGN: Spiralganglienzellen, IHC: Innere Haarzellen, OHC: Äußere Haarzellen, SC und PC: Stützzellen des Cortischen Organs)

Die Applikation der Nervenwachstumsfaktoren kann z.B. über Pumpensysteme oder Nervenwachstumsfaktoren produzierende Zellen erfolgen [25]. Bei den Pumpensystemen ist die unzureichende Stabilität des Nervenwachstumsfaktors in den Reservoiren und das hohe Risiko der Kolonisation durch Bakterien das Hauptproblem [26]. Der Eintrag von Nervenwachstumsfaktoren erzeugenden Zellen birgt ebenso viele Komplikationen. Eine viel versprechende Alternative, um Nervenwachstumsfaktoren zu applizieren, ist die Funktionalisierung des Elektrodenträgers selbst mit bioaktiven Beschichtungen in Form von Polymerbeschichtungen oder biologisch/biochemische Funktionalisierungen [14, 27].

2. Zielstellung

Die Modifizierung des Elektrodenträgers ist ein vielversprechender Ansatz zur Verbesserung der Langzeitfunktionalität von Cochlea-Implantaten. Dabei gilt es einerseits antiproliferative Konzepte zu entwickeln, die die Entstehung des Bindegewebewachstums nach der Cochlea-Implantat-Insertion hemmen sollen, und andererseits neurotroph wirkende Konzepte, bei denen die degenerierenden Spiralganglionzellen positiv beeinflusst werden, zu realisieren. Es ist zu untersuchen, ob der Elektrodenträger des Cochlea-Implantats als Oberfläche für wirkstofffreisetzende, degradierbare Polymerbeschichtungen und damit als Grundlage eines Local Drug Delivery Systems dienen kann.

Die Entwicklung von Local Drug Delivery Systemen zur gezielten Freisetzung von Dexamethason (DMS), als antiproliferativ wirkendes Pharmakon und dem Wachstumsfaktor Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), als neurotroph wirkendes Biomolekül stehen dabei im Vordergrund. Die Abbildung 7 zeigt den schematischen Aufbau der angestrebten Drug Delivery Systeme. Dabei zeigt die Abbildung 7a) den Aufbau eines DMS freisetzenden Systems, bei dem sowohl das Elektrodenträgermaterial (Poly(dimethylsiloxan)) selbst mit DMS beladen wurde (1), aber auch DMS in einer biodegradierbaren Beschichtung um den Elektrodenträger (3) herum aufgebracht war. Die Abbildung 7b) zeigt den schematischen Aufbau eines BDNF freisetzenden Systems, bei dem auf dem Elektrodenträger (4) eine biodegradierbare Beschichtung (5) als Grundlage für BDNF-freisetzende Systeme (6) aufgebracht war. Bei beiden Drug Delivery Systemen ist eine Polymer-Layer (2) zwischen Elektrodenträger und Beschichtung zur Erhöhung der Haftfestigkeit der Beschichtung aufgebracht worden.

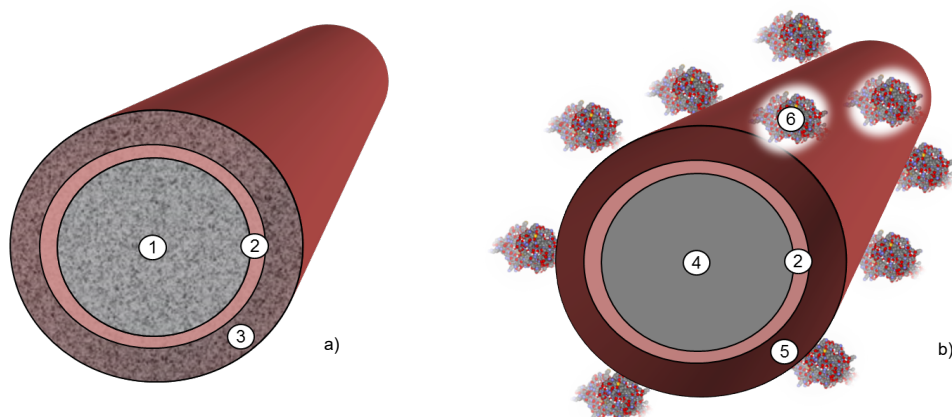


Abbildung 7: Schematische Darstellung des zu entwickelnden Drug Delivery Systems; a) DMS freisetzendes System, b) BDNF freisetzendes System

Zunächst galt es eine fest haftende, biodegradierbare Beschichtung aus Poly(4-hydroxybuttersäure) (P(4HB)) bzw. Poly(L-lactid) (PLLA) auf Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) zu etablieren und die dabei entstandenen Oberflächen zu charakterisieren. Die für die Erhöhung der Haftfestigkeit entwickelte kovalent an PDMS gebundene Polymer-Layer galt es spektroskopisch und mikroskopisch zu untersuchen und die anschließend aufgetragenen biodegradierbaren P(4HB)- und PLLA-Beschichtungen, sowie auch das PDMS hinsichtlich des DMS-Freisetzungsverhaltens zu analysieren. Zur Charakterisierung dieses Freisetzungsverhaltens sollte das humane, cochläre System möglichst nachempfunden werden, weshalb ein speziell angepasstes, quasi-stationäres Freisetzungsmo­dell entwickelt werden musste.

Für das neurotroph wirkende Konzept wurde auf den Wachstumsfaktor BDNF zurückgegriffen, welcher über verschiedene Verfahren auf einer P(4HB)- bzw. PLLA-Oberfläche aufgebracht wurde. Eine Übersicht über die verschiedenen BDNF Freisetzungssysteme ist in der Abbildung 8 dargestellt. Es wurde BDNF direkt auf dem Probekörper immobilisiert (Abbildung 8a)), BDNF über Crosslinker an die Oberfläche kovalent, aber hydrolytisch spaltbar ange­koppelt (Abbildung 8b)) und BDNF mit Hilfe des Layer-by-Layer-Verfahrens in eine komplexe Polyelektrolytschicht bestehend aus Poly(L-lysin) und Hyaluronsäure eingelagert, einerseits als separate BDNF enthaltene Schicht (Abbildung 8c)) und andererseits durch Quellung zweier unterschiedlich dicker Schichten (Tetralayer 5 und Tetralayer 15) aufgenommen (Abbildung 8d)).

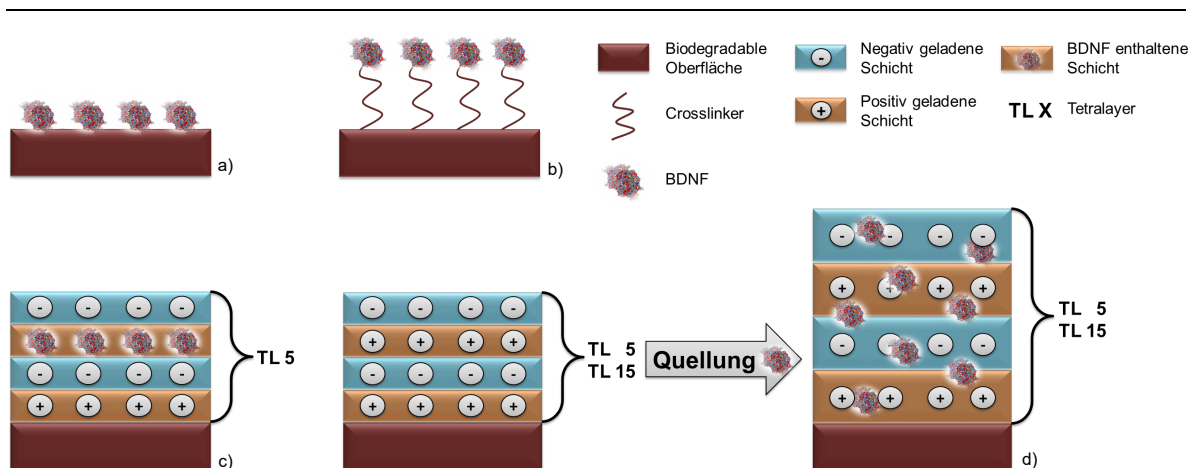


Abbildung 8: Schematische Darstellung der untersuchten BDNF Delivery Systeme; a) BDNF immobilisiert, b) BDNF über Crosslinker gebunden, c) BDNF als separate Schicht einer komplexen Polyelektrolytschicht, d) BDNF erst durch Quellung in eine komplexe Polyelektrolytschicht eingelagert

Für alle dargestellten BDNF Delivery Systeme galt es, die BDNF-Freisetzung in einem der humanen Cochlea angepasstem Modell zu verfolgen. Thematisch bildete die Untersuchung der Anbindung über Crosslinker dabei einen Schwerpunkt, da zum Einen der

Einfluss bestimmter Strukturmerkmale der Crosslinker (unterschiedliche Spacerarmlänge bzw. funktionelle Gruppen im Spacerarm) auf die BDNF-Freisetzungseigenschaft betrachtet wurde, zum Anderen aber auch plasma- und nasschemische Methoden entwickelt bzw. angepasst wurden, die eine kovalente Anbindung der Crosslinker an die biodegradierbare Polymeroberfläche ermöglichen.

Abschließend wurde die Degradation der Polymere P(4HB) und PLLA vergleichend in künstlicher Perilymphe ohne und mit dem Zusatz von in der humanen Cochlea vorkommender Enzyme untersucht.

3. Theoretische Grundlagen

3.1. Polymerbasierte Implantatbeschichtungen

Definitionsgemäß ist ein medizinisches Implantat ein im Körper platzierter Gegenstand, der aus einem oder mehreren Materialien besteht und dort teilweise oder ganz mit einer Zellschicht umgeben wird [28]. Es dient der Unterstützung oder des Ersatzes von Zellen, und Geweben [29], wobei die Art und die Funktion des zu ersetzenden Gewebes die Auswahl der eingesetzten Materialien bestimmt [30]. Diese sollen nicht nur die gewünschte Funktion im Körper gewährleisten, sondern in der Regel die vollständige, dauerhafte Aufnahme des Implantates in den Körper zum Ziel haben [29]. Hierfür ist insbesondere die Biokompatibilität des Implantatmaterials relevant [30]. Die Biokompatibilität bezeichnet die Verträglichkeit des Implantatmaterials mit einem biologischen System, wobei im optimalen Fall die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Materials mit denen des umliegenden Gewebes übereinstimmen [31]. Heute immer noch gebräuchlich sind inerte, biokompatible Implantatmaterialien. Sie verhalten sich im Körper weitgehend neutral, führen zu keinen Abbauprodukten und haben auf den Stoffwechsel keinen bedeutenden Einfluss [29].

In den 60-er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts wurde auf Grund unzureichender Sterilität und damit einhergehender Infektionen bei Verwendung von mehrfach nutzbaren Glas- oder Metallartikeln der Einsatz von synthetischen Polymeren in Form von Einwegartikeln voran getrieben [32]. Polymere sind Verbindungen mit hoher relativer molarer Masse, wobei die Struktur durch mehrfache Wiederholung von Monomeren, also Molekülen geringer relativer molarer Masse gebildet wird [33]. Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten, die verschiedenen, monomeren Bausteine zu hochmolekularen, linearen, verzweigten oder vernetzten Strukturen aneinander zu reihen [34].

Die in dieser Arbeit verwendeten Polymere (Abbildung 9) können in biodegradierbare Polymere (Polymere, die im Organismus abgebaut werden) und biostabile Polymere (Polymere, die unter physiologischen Bedingungen im Organismus nicht abgebaut werden) unterschieden werden. Als biodegradierbare Polymere kommen die Polyester Poly(L-lactid) (Abbildung 9a) und Poly(4-hydroxybuttersäure) (Abbildung 9b) zum Einsatz, deren Grundbausteine durch Esterbindungen (-CO-O-) verknüpft sind [35]. Weitere zum Einsatz kommende biodegradierbare Polymere sind Hyaluronsäure (Abbildung 9d)) und Poly(L-lysin) (Abbildung 9e)). Als biostabiles Polymer wird Poly(dimethylsiloxan)

(Abbildung 9c)) eingesetzt, bei dem die Silizium-Atome über Sauerstoff-Atome verknüpft und die restlichen freien Valenzen des Siliziums mit Methylgruppen abgesättigt sind [36]. Die Strukturformeln der genannten Polymere sind in der Abbildung 9 gezeigt.

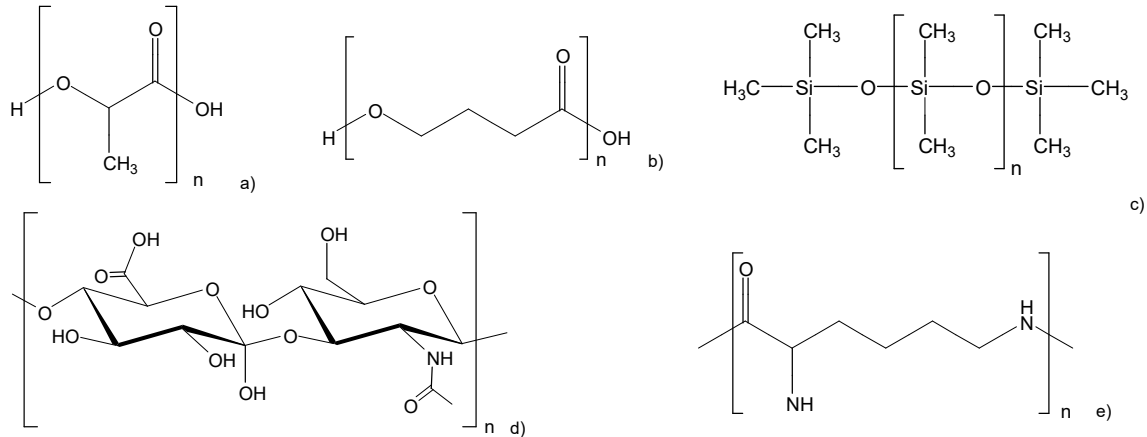


Abbildung 9: Strukturformel von a) Poly(L-lactid), b) Poly(4-hydroxybuttersäure), c) Poly(dimethylsiloxan), d) Hyaluronsäure und e) Poly(L-lysin)

Poly(L-lactid)

Poly(L-lactid) (PLLA, Abbildung 9a)) ist eine resorbierbare, lineare Poly(α -hydroxycarbonsäure), die durch eine katalysierte Ringöffnungspolymerisation von Lactiden bei Temperaturen von 140-180 °C synthetisiert wird [32].

Die Kristallinität, die Glasübergangstemperatur (T_g) und die Hydrophobizität sind ausschlaggebend für die Anwendung von PLLA als wirkstofffreisetzender Trägerwerkstoff. Mit einem Kristallinitätsgrad von ca. 24 % gehört das in dieser Arbeit verwendete hochmolekulare PLLA zu den teilkristallinen Polymeren, welches einen relativ hohen Anteil amorpher Bereiche aufweist. Mit $T_g = 65$ °C hat das Polymer eine Glasübergangstemperatur oberhalb der menschlichen Körpertemperatur von 37 °C. Damit sind beim Einsatz von hochmolekularem PLLA als Trägerwerkstoff im Organismus die amorphen Bereiche des Polymers glasartig und spröde. Gegenüber Wasser weist PLLA einen Kontaktwinkel von ca. 81 ° auf und zählt damit zu den noch hydrophilen Trägerwerkstoffen. Dadurch und vorallem aufgrund der Glasübergangstemperatur gehört das hochmolekulare PLLA im Vergleich zu den weiteren in dieser Arbeit untersuchten Trägerwerkstoffen eher zu den langsam wirkstofffreisetzenden Polymeren [37].

Die Degradation von PLLA wird vor allem durch die Diffusion von Wasser in den Bulk (das Innere des untersuchten Probekörpers) gesteuert. Dabei wird der Einfluss von Enzymen auf den Degradationsprozess eher gegensätzlich diskutiert. Zum Einen konnte eine erhöhte Aktivität von verschiedenen Enzymen in unmittelbarer Nähe des Implantats beobachtet werden [38], zum Anderen konnten Studien zeigen, dass bei

hochmolekularem PLLA die Degradationsgeschwindigkeit *in vitro* zu der *in vivo* vergleichbar ist [39], und somit der Einfluss der Enzyme auf die Degradation gering ist [32]. PLLA wird sukzessiv durch hydrolytische Spaltung der Esterbindungen abgebaut, bis L(+)-Milchsäure entsteht, die von Natur aus unter anderem bereits im Blut, im Muskelserum, in den Nieren und anderen Organen vorhanden ist. Vert et al. stellten fest, dass die PLLA-Oberfläche, die in Kontakt mit wässrigem Medium steht, sich mit geringerer Degradationsrate abbaut als der Bulk [40]. Deshalb kann in der Regel im Laufe des Degradationsprozesses eine bimodale Molekulargewichtsverteilung beobachtet werden, da eine pH-Wert-Verschiebung durch saure Abbauprodukte die Degradation im Inneren beschleunigt (Autokatalyse). Ein Masseverlust des degradierenden Probekörpers ist erst nach Unterschreitung einer bestimmten molaren Masse (kritische Molmasse, ca. $10.000 - 15.000 \text{ g mol}^{-1}$) festzustellen, da nur die Milchsäure bzw. die kurzkettigen Oligomere der Milchsäure als wasserlösliche Degradationsprodukte den Probekörper verlassen und somit die Gesamtmasse verringern können [39]. Bei *in vivo* Versuchen konnte gezeigt werden, dass Implantate mit niedrigeren molaren Massen schneller degradieren, als Proben mit höheren molaren Massen [41].

Das in dieser Arbeit genutzte PLLA-L214 weist ein Molekulargewicht von etwa $720.000 \text{ g mol}^{-1}$ auf und ist damit ein PLLA mit höherer molarer Masse.

Die häufigste Anwendung von PLLA im Implantatbereich ist in der Osteosynthese und als Nahtmaterial, aber auch als Hohlfaser zur Nervenkonstruktion und als Trägerwerkstoff für kontrollierte Wirkstofffreisetzungssysteme [39].

Poly(4-hydroxybuttersäure)

Die in der vorliegenden Arbeit genutzte hochmolekulare Poly(4-hydroxybuttersäure) (P(4HB), Abbildung 8b)), ist eine durch das Bakterium *Escherichia coli* K12 produzierte, biodegradierbare, lineare Poly(γ -hydroxycarbonsäure). Während des Fermentationsprozesses wird das Polymer, bei Vorhandensein eines Überschusses einer verwertbaren Kohlenstoffquelle und gleichzeitiger Reduzierung eines essenziellen Nährstoffes als Stoff- und Energiespeicher innerhalb der Zellen angelegt [42, 43]. Am Ende des Fermentationsprozesses kann das Polymer in sehr reiner Form aus den Zellen extrahiert werden. Typische Ausbeuten von *Escherichia coli* K12 produzierter P(4HB) liegt bei mehr als 50 g pro Liter Fermentationsbrühe innerhalb von 48 Stunden [44].

Der Kristallisationsgrad der in dieser Arbeit genutzten hochmolekularen P(4HB) liegt bei ca. 75 %. Es handelt sich bei diesem Polymer also ebenso um ein teilkristallines Polymer, dass allerdings einen im Vergleich zu PLLA-L214 relativ hohen Anteil kristalliner und deutlich weniger amorpher Bereiche aufweist. Die Glasübergangstemperatur von

P(4HB)-PHA4400 ist mit $T_g = -51\text{ °C}$ [44] deutlich unterhalb der menschlichen Körpertemperatur von 37 °C . Somit liegen die amorphen Teile dieses Polymers im Organismus gummiartig, elastisch vor. Der Kontaktwinkel beträgt ca. 72 ° . Deshalb ist diese P(4HB) ebenso wie PLLA-L214 als hydrophiler Trägerwerkstoff einzustufen.

Das Biopolymer P(4HB) weist *in vivo* erwartungsgemäß eine höhere Degradationsrate auf als *in vitro*. Dies kann damit erklärt werden, dass Enzyme die *in vivo*-Degradation beschleunigen [32]. Bei der enzymatischen Degradation können verschiedene Enzyme beteiligt sein. So können zum Beispiel Lipasen [45], Hydrolasen [46] und Depolymerasen [47] Poly(hydroxyalkanoate) degradieren. Da Enzyme ein relativ hohes Molekulargewicht haben, können sie nicht in das Polymer diffundieren und die Degradationskinetik wird durch Adsorption der Enzyme an der Oberfläche kontrolliert [32]. Das Monomer von P(4HB) ist 4-Hydroxybuttersäure. Die durchschnittliche molare Masse der verwendeten P(4HB)-PHA4400 beträgt etwa $160.000\text{ g mol}^{-1}$.

Die Anwendung von medizinisch genutzter P(4HB) wird derzeit vor allem im vaskulären Bereich gesehen. P(4HB) als Scaffold-Material für autologes Herz-Kreislauf-Gewebe [44] und als wirkstofffreisetzender Trägerwerkstoff für Koronarstents sind nur zwei mögliche Anwendungsbereiche.

Hyaluronsäure

Hyaluronsäure ist ein in höheren Lebewesen vorkommendes hochmolekulares Polysaccharid, das aus N-Acetyl- β -D-Glucosamin- und β -D-Glucuronsäuremonomeren aufgebaut ist [49] (Abbildung 8d)). Isoliert wurde Hyaluronsäure ursprünglich unter anderem aus Hahnenkämmen [48], kann in hochmolekularer Form aber mittlerweile auch fermentativ durch einen rekombinanten Escherischia coli-Stamm hergestellt werden [50]. Beim Auflösen fester Hyaluronsäure-Partikel in Wasser quellen zunächst die äußeren, leicht wasserzugänglichen Bereiche auf, was einen weiteren Wasserzutritt erschwert. Unter physiologischen Bedingungen kann Hyaluronsäure Polyanionen bilden ($pK_a \sim 2,9$) [51], da in wässrigen Lösungen Carboxylgruppen deprotoniert werden können. Dadurch entsteht eine Abstoßung der nah aneinander liegenden Kettenabschnitte und die Tendenz Wasser zu binden ist vergrößert. Unter physiologischen Bedingungen liegen diese Ketten in helicaler Konformation vor und lagern sich zu kompakten Gebilden zusammen [50]. Das aus Hyaluronsäure und ihren Polyanionen entstehende Netzwerk wird als Hydrogel bezeichnet. So wird definitionsgemäß ein Wasser enthaltendes Gel genannt, dessen Polymerketten chemisch oder physikalisch zu einem dreidimensionalen, in Wasser quellenden Netzwerk verknüpft sind [53].

Die Degradation von Hyaluronsäure erfolgt hauptsächlich enzymatisch durch Hyaluronidasen. Diese bauen die Hyaluronsäure nach einem hydrolytischen Mechanismus ab, aber auch die bei Entzündungen vermehrt produzierten reaktiven, oxidierenden Spezies (z.B. Wasserstoffperoxid und das Hydroxyl-Radikal) tragen zum Abbau der Hyaluronsäure bei [50].

Hyaluronsäure und Hyaluronsäure-haltige Produkte finden vielfältig Einsatz in kosmetischen und speziellen medizinischen Anwendungen. Hyaluronsäure wird z.B. bei chirurgischen Eingriffen am Auge als Ersatz des Kammerwassers, als Weichgewebeersatz [50] oder als Trägermaterial für die Wirkstofffreisetzung [54] eingesetzt.

Poly(L-lysin)

Poly(L-lysin) ist das Polymer der Aminosäure L-Lysin (Abbildung 8e)). Charakteristisch für dieses synthetisch hergestellte Polymer [55] ist die Peptidbindung zwischen der Carboxyl- und der α -Amino-Gruppe des Lysins. Die ϵ -Amino-Gruppe der Lysineinheit wird unter physiologischen Bedingungen protoniert ($pK_a \sim 9$) [56], wodurch Polykationen entstehen. Durch die positive Ladung kommt es zur elektrostatischen Abstoßung innerhalb der Ketten, wodurch eine eher gestreckte Konformation entsteht [57]. Diese Eigenschaften werden zum Aufbau von komplexen Polyelektrolytschichten, so genannten PECML (polyelectrolyte complex multilayer) genutzt, die durch alternierende Adsorption von kationischen und anionischen Polyelektrolytschichten im Layer-by-Layer-Verfahren aufgebaut werden [58]. In die entstehenden PECML lassen sich sehr gut Proteine inkorporieren, die stark mit der PECML interagieren, ohne dabei ihre Konformation und biologische Aktivität zu verlieren [62]. Bei anschließender Quellung des Netzwerkes und Degradation der Polyelektrolyte (Poly(L-lysin) wird durch verschiedene Peptidasen abgebaut [59]), können die Proteine freigesetzt werden. Somit kann Poly(L-lysin) als Bestandteil einer PECML ebenfalls, so wie die vorher genannten Polymere auch, als Trägermaterial bei der Wirkstofffreisetzung eingesetzt werden.

Poly(dimethylsiloxan)

Poly(dimethylsiloxan) (PDMS, Abbildung 8c)) ist ein synthetisch hergestelltes Polymer, das aus einem Gerüst aus Silizium- und Sauerstoffatomen besteht. Dabei sind die freien Valenzen des Siliziums mit Methylgruppen abgesättigt [63]. Die Methylgruppen führen dazu, dass das in dieser Arbeit genutzte medizinische PDMS (Nusil-MED-4432) mit einem Kontaktwinkel von ca. 94° hydrophob ist. Die bei diesem Polymer vorliegende Silizium-Sauerstoff-Kette ist äußerst flexibel, aber trotzdem sehr stabil. PDMS hat eine große

Thermostabilität und chemische Beständigkeit. Die Glasübergangstemperatur von $T_g = -127^\circ\text{C}$ [63] liegt weit unterhalb der menschlichen Körpertemperatur.

Ausgehend von elementarem Silizium wird in mehreren Schritten ein hochviskoses, reines, niedermolekulares PDMS-Öl hergestellt, das abschließend durch eine platinkatalysierte Vinylhydrosilylation zum Elastomer vernetzt wird [64]. Der letzte Vernetzungsschritt ist frei von Nebenprodukten, wodurch die biologische Verträglichkeit ausschließlich auf die vollständig vernetzte Molekülstruktur der Dimethylsiloxan-Ketten zurückzuführen ist [63].

PDMS-Elastomere weisen eine hohe Beständigkeit gegenüber hydrolytischer und enzymatischer Degradation auf, so dass auch nach zweijähriger Implantation keine Anzeichen von Degradation des Materials erkennbar waren oder eine Veränderung der mechanischen Eigenschaften beobachtet werden konnte [32].

Diese vollständig vernetzten PDMS-Elastomere finden vielfältigen Einsatz in der Medizin. Gerade durch die Degradationsbeständigkeit eignen sich PDMS-Elastomere als Material für Langzeitimplantate mit längerem oder dauerhaftem Kontakt mit dem Organismus. Neben Implantaten zur Rekonstruktion der weiblichen Brust oder für flexible Gelenke z.B. Finger-, Zehen- und Handgelenk [32], wird es auch als Trägermaterial von Elektroden bei Herzschrittmachern und Cochlea-Implantaten genutzt [14].

3.2. Chemische Modifikationen von Implantatoberflächen

Lange Zeit wurde PDMS als perfektes Implantatmaterial angesehen, da angenommen wurde, dass es im menschlichen Organismus vollständig inert und biokompatibel sei. Mittlerweile wurde diese Annahme jedoch in verschiedenen Studien zur Biokompatibilität von PDMS bei Langzeitimplantaten widerlegt [65].

Bei Implantaten mit einer PDMS-Oberfläche können, wie bei anderen Implantatmaterialien auch, bei einer Fremdkörperreaktion des Organismus unspezifische Biomoleküle an der Oberfläche adsorbieren (so genanntes Biofouling) und eine Gewebekapselung stattfinden. Dieses kann zum Funktionsverlust des Implantats führen. Gerade die bei Cochlea-Implantaten angestrebte Langzeitapplikation kann aufgrund solcher Fremdkörperreaktionen scheitern.

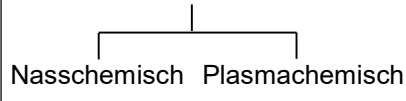
Die Dauer und Intensität der Fremdkörperreaktion steht dabei in direktem Zusammenhang mit der Größe und Form des Implantats, sowie mit dem Ausmaß der Läsion während des Implantationsvorgangs [66], kann aber auch durch weitere Faktoren wie die chemische Zusammensetzung, die Oberflächenenergie, die Hydrophilie/Hydrophobie der Implantatoberfläche, durch das Herauslösen von chemischen Verbindungen aus dem Implantatwerkstoff sowie durch das Auftreten von Relativbewegungen beeinflusst werden [30]. Bei

der PDMS-Oberfläche des Cochlea-Implantats spielt die Oberflächeneigenschaft Hydrophobie, mit der die Anlagerung von Biomolekülen unmittelbar zusammenhängt eine wichtige Rolle [67]. Ein Zusammenhang zwischen der Oberflächenhydrophobie, der gesteigerten Proteinadsorption und der Veränderung der Tertiärstruktur der an der Oberfläche gebundenen Proteine, sowie dem Verlust der biologischen Aktivität dieser konnte beobachtet werden [68].

Durch eine Oberflächenmodifizierung des PDMS kann eine Änderung der Oberflächeneigenschaften erreicht werden, die zu einer Verbesserung der Wechselwirkung der Oberfläche mit dem physiologischen System genutzt werden kann, ohne dass es zu einer Veränderung der mechanischen Eigenschaften des PDMS kommt.

Die Oberflächenmodifizierung kann in Verfahren unterteilt werden, bei denen das Polymer an der Oberfläche chemisch unverändert bleibt, wie zum Beispiel durch einfache Physisorption und Verfahren, bei denen die PDMS-Oberfläche verändert wird (Tabelle 1 [69]). Beim letztgenannten Verfahren werden durch chemische Modifizierungen bestimmte funktionelle Gruppen an der Oberfläche erzeugt oder Moleküle mit reaktiven Gruppen angekoppelt [69]. Die Generierung funktioneller Gruppen an der Oberfläche von Polymeren wie PDMS erfolgt häufig mit Hilfe etablierter nasschemischer Methoden [70].

Tabelle 1: Übersicht möglicher Oberflächenmodifizierungen von PDMS [69]

Unveränderte PDMS-Oberfläche	Chemisch veränderte PDMS-Oberfläche	
Adsorption	Erzeugung funktioneller Gruppen	Kovalente Ankopplung von Molekülen
	 <pre> graph TD A[Erzeugung funktioneller Gruppen] --> B[Nasschemisch] A --> C[Plasmachemisch] </pre>	

Eine direkte nasschemische Funktionalisierung unter Anbindung von Molekülen mit reaktiven Gruppen ist bei PDMS-Oberflächen jedoch nicht möglich, da PDMS selbst keine reaktiven funktionellen Gruppen besitzt, die für eine nasschemische Oberflächenreaktion herangezogen werden können und außerdem eine hohe Oxidationsbeständigkeit vorliegt [71].

Eine schnelle und effektive Methode zur Modifizierung von Oberflächeneigenschaften und zur Erzeugung funktioneller Gruppen ist die Niedertemperatur-/Niederdruck-Plasmatechnik, bei der mit geringem Einsatz von Energie und Material eine große Variabilität der physikalisch-chemischen Oberflächeneigenschaften erzielt werden kann [70]. Zur Erzeugung eines Plasmas wird einem gasförmigen System Energie zugeführt. Dadurch werden die Zusammenstöße zwischen den Teilchen verstärkt, sodass diese auseinander brechen und elektrisch neutrale Gasteilchen, Ultraviolettstrahlung sowie Elektronen und Ionen

entstehen. Dieser Zustand wird als Plasma oder auch „vierter Aggregatzustand“ bezeichnet [71, 72]. Die einzelnen Plasmabestandteile, die hochreaktiv sind, stehen in ständigem Wechsel miteinander und mit der zu behandelnden Oberfläche, wobei die einzelnen Bestandteile in unterschiedlicher Weise auf das Material wirken. So können Elektronen durch einen Energietransfer bei der Kollision mit der Materialoberfläche kovalente Bindungen brechen und damit chemische Reaktionen initiieren. Ionen und Neutralteilchen verändern die chemische Struktur der oberflächennahen Bereiche (wenige Nanometer Tiefe). Die Ultraviolettstrahlung, die bis zu einer Tiefe von etwa 100 nm [71] reicht, kann die Bindungen des Polymers (vor allem langkettige Kohlenstoffketten) spalten, was zu einer Reduzierung der molaren Masse führt [73].

Ein großer Vorteil der Plasmatechnik gegenüber der nasschemischen Oberflächenmodifikation ist die auf die Polymeroberfläche begrenzte Reaktion, die zu einer chemisch veränderten Oberfläche führt, das Innere des Materials aber in der Regel nicht verändert. Dabei ist der Grad der Veränderung von der Gaszusammensetzung, dem Energieeintrag und der Dauer der Plasmaeinwirkung auf den Werkstoff abhängig [74]. So treten bei längeren Plasmabehandlungszeiten neben der Oberflächenreaktion auch Materialabträge bzw. ein Aufbau von neuen substratfremden Schichten auf der Oberfläche auf [71].

Mit Reaktivgasen wie z.B. Ammoniak oder Sauerstoff können Radikale oder spezielle funktionelle Gruppen an der Oberfläche erzeugt werden. Dabei kommt Sauerstoffplasma (O_2 -Plasma) zur Erzeugung von z.B. Hydroxy- (-OH), Carbonyl- (-C=O) oder Carboxy-Gruppen (-COOH) und Ammoniakplasma (NH_3 -Plasma) zur Erzeugung von stickstoffhaltigen funktionellen Gruppen wie z.B. Amino- (- NH_2) oder Imino-Gruppen (-C=NH) zum Einsatz [75]. Die erzeugten funktionellen Gruppen können direkt mit dem Biomaterial wechselwirken, aber auch als Ausgangspunkt für nasschemische Reaktionen oder die Anbindung von biologisch aktiven Wirkstoffen dienen.

Ein Nachteil plasmachemisch erzeugter PDMS-Oberflächenmodifikationen ist die durch Umorientierungsprozesse der funktionellen Gruppen in die Bulkphase hervorgerufene kurze Lebensdauer der Funktionalisierungen an der Oberfläche [76]. Für eine stabile Oberflächenmodifizierung werden in einem so genannten „grafting-to“-Prozess kovalent niedermolekulare oder polymere Verbindungen an die funktionellen Gruppen der Materialoberfläche angekoppelt. Neben der Stabilisierung der funktionellen Gruppen durch Ankopplung dieser Verbindungen kann eine Verbesserung der Adhäsionseigenschaften erreicht werden, was bei polymerbasierten Implantatbeschichtungen zur Biokompatibilitätserhöhung der Implantatoberfläche beiträgt.

Ein Beispiel für eine niedermolekulare Verbindung, die zur Oberflächenmodifizierung von PDMS häufig genutzt wird, ist 3-Aminopropyltriethoxysilan, ein strukturell einfaches Amino-funktionalisiertes Silan (Aminosilan), das eine Aminogruppe über einen Propyl-Spacer mit einer Triethoxysilangruppe verbindet. Durch Anbindung der Silangruppe an die durch O₂-Plasma erzeugten Hydroxygruppen an der PDMS-Oberfläche kann eine Amino-funktionalisierte Oberfläche erzeugt werden (Abbildung 10). Aufgrund des kurzen Propyl-Spacers bildet sich keine geordnete Monolage, sondern eher eine dreidimensionale Amino-haltige Netzwerkstruktur aus. Dadurch stehen weniger Aminogruppen an der Oberfläche zur Verfügung, da eine Vielzahl dieser Gruppen im PDMS-Netzwerk eingeschlossen sind. Somit ist mit dieser Methode die Erzeugung einer definierten Aminogruppen-Konzentration an der Oberfläche nur begrenzt möglich [77].

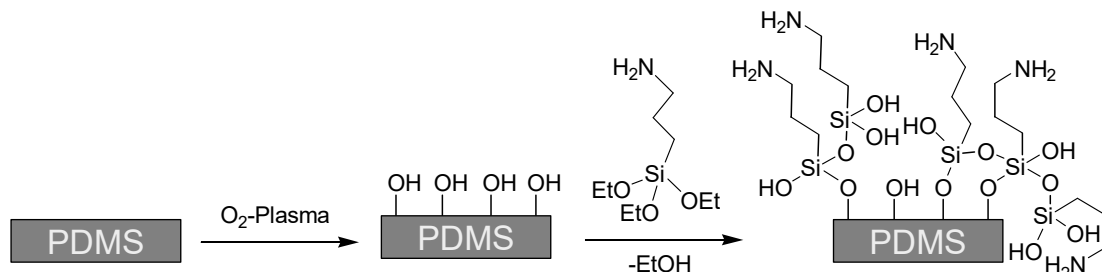


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Reaktion einer PDMS-Oberfläche mit Sauerstoffplasma und anschließender 3-Aminopropyltriethoxysilan-Modifizierung [77, 78]

An die auf diesem Weg erzeugte stabilere Amino-funktionalisierte, aber auch an eine durch NH₃-Plasma Amino-funktionalisierte Oberfläche können in einem weiteren „grafting to“-Prozess polymere Verbindungen angebunden werden, die zur weiteren Verbesserung der Adhäsionseigenschaften der PDMS-Oberfläche beitragen. Die in der vorliegenden Arbeit zur Erzeugung von polymerbasierten Implantatbeschichtungen verwendeten Polyhydroxycarbonsäuren (PLLA und P(4HB)) verfügen über Carboxygruppen, die mit den Aminogruppen der modifizierten PDMS-Oberfläche eine stabile Amid-Bindung eingehen können. Zur Vermittlung der Bindung zwischen Carboxy- und Aminogruppen wird häufig der Crosslinker 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC) genutzt, der als Aktivator für die Carbonsäure wirkt [79]. Das Carbodiimid EDC gehört zur Gruppe der Zero-Length Crosslinker, die bei der Bindung kein zusätzliches Atom einführen. Dabei reagiert EDC zunächst mit der Carbonsäure zu einem reaktiven Intermediat. Der gebildete o-Acylisoharnstoff kann mit primären Aminen unter Entstehung einer Amid-Bindung reagieren. Zur Steigerung der Effizienz des Crosslinkers EDC kann N-Hydroxysuccinimid (NHS) eingesetzt werden [79]. Dabei entsteht aus dem o-Acylisoharnstoff-Intermediat ein zwar stabileres, aber fast ebenso hoch reaktives

NHS-Ester-Intermediat, welches wiederum sofort mit dem primären Amin reagiert (Abbildung 11) [79].

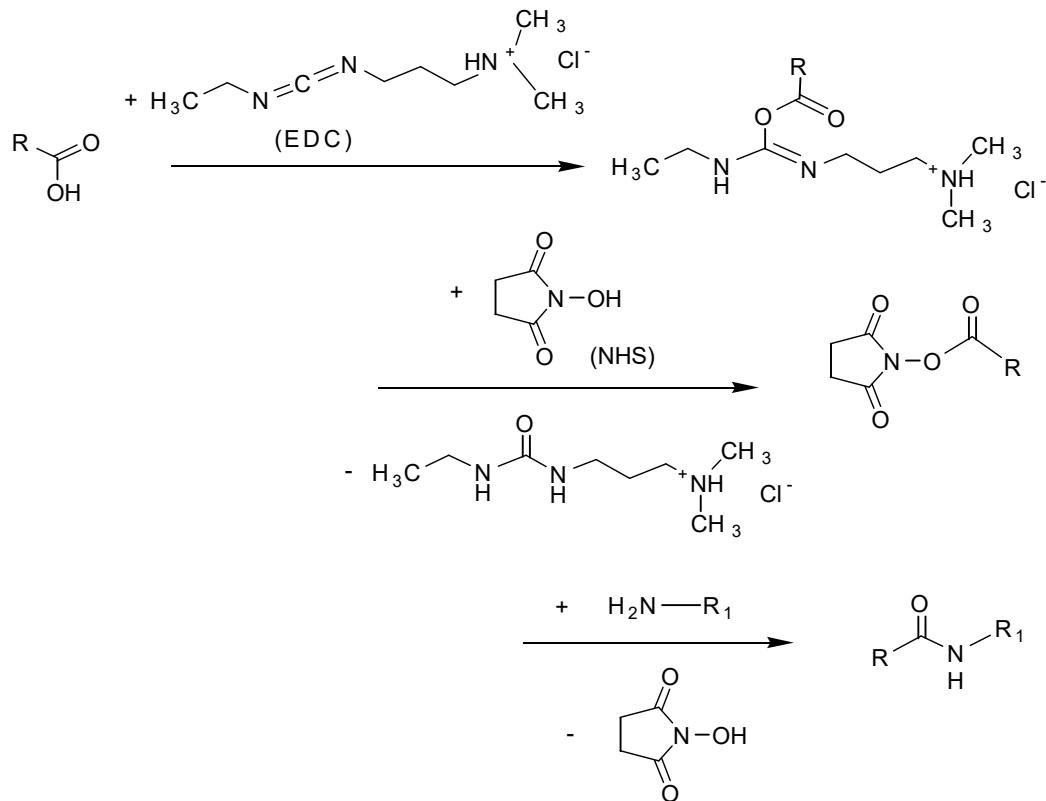


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Reaktion einer Carbonsäure mit EDC/NHS an eine Amino-funktionalisierte Oberfläche [79]

Zur Erzeugung einer polymerbasierten Implantatbeschichtung können verschiedene Verfahren zum Einsatz kommen. Die erhaltenen Beschichtungen unterscheiden sich vor allem in ihren mechanischen Eigenschaften und der Oberflächenbeschaffenheit. Die Beschichtung sollte homogen, formschlüssig und reproduzierbar hinsichtlich Schichtqualität, -masse, -dicke, -verteilung und -zusammensetzung sein. Die Beschichtung kann mit Hilfe einer Polymerschmelze oder eines Polymer-Lösungsmittel-Gemisches erzeugt werden. Die Polymerschmelze ist bei der Anwendung auf Implantatoberflächen allerdings nicht gebräuchlich, da sehr häufig hohe Temperaturen zur Erzeugung einer Polymerschmelze genutzt werden müssen. Das Polymer-Lösungsmittel-Gemisch kann hingegen bei Raumtemperatur im Tauch- oder Sprühverfahren verarbeitet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die polymerbasierte Implantatbeschichtung mit einem Sprühverfahren erzeugt, bei dem das Polymer-Lösungsmittel-Gemisch mit Hilfe von Druckluft fein verteilt auf die Implantatoberfläche auftrifft, wo das Lösungsmittel verdunstet und einen Polymerfilm entstehen lässt [80].

Eine weitere Möglichkeit zur Erzeugung polymerbasierter Implantatbeschichtungen ist der Aufbau einer komplexen Polyelektrolytschicht (PECML, siehe Kapitel 3.1). Aufgrund der kationischen Eigenschaften von Poly(L-lysin) kann es sehr gut mit Hyaluronsäure, die polyanionische Eigenschaften aufweist, zum Aufbau von biokompatiblen PECML kombiniert werden [58, 60].

3.3. Wirkstofffreisetzungssysteme zur Minimierung implantatbedingter Fremdkörperreaktionen

Bei der Einbringung von Implantaten kommt es immer auch zu einer Verletzung von gesundem Gewebe. Dieses ruft im menschlichen Organismus eine Reaktion auf den implantierten Fremdkörper hervor und geht mit einer lokalen Entzündungsreaktion einher [66]. Eine Entzündung ist ein Prozess, bei dem Bindegewebe und auch Blutgefäße auf Reize (z.B. mechanische Reize oder Mikroorganismen) reagieren und versuchen diese Reizquelle zu eliminieren und die entstandene Gewebeschädigung zu reparieren [81]. Nach der bereits in Kapitel 3.2 kurz beschriebenen anfänglichen Adsorption von Proteinen an die Implantat-Oberfläche, werden bei verschiedenen komplexen Prozessen Leukozyten an die Proteine angelagert. Damit verbunden kommt es zur Bildung und Freisetzung von Entzündungsmediatoren (niedermolekulare Spezies (z.B. Histamin oder aktivierte Sauerstoffspezies) sowie zahlreiche Proteinsignalstoffe), was die Einwanderung von Fibroblasten zur Folge hat, welche zu einer bindegewebigen Umhüllung des Implantats führen [81, 82, 43]. Für eine gute Funktionstüchtigkeit des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Cochlea-Implantats ist eine Verringerung bzw. möglichst eine Vermeidung der bindegewebigen Umhüllung des Cochlea-Implantat-Elektrodrägers anzustreben [14, 83].

Dazu können Wirkstoffe mit entzündungshemmenden Eigenschaften, welche die Bildung, Freisetzung oder Wirkung der Entzündungsmediatoren hemmen, zum Einsatz kommen. Eine solche Wirkstoffgruppe bilden die Glucocorticoide, die ihre Wirkung hauptsächlich über die Bindung an die Glucocorticoid-Rezeptoren entfalten, was zu einer Senkung der Expression entzündungsfördernder Gene und einer Steigerung der Expression entzündungshemmender Gene führt [81].

Glucocorticoide sind eine Untergruppe der Corticoide. Corticoide wiederum sind ein Sammelbegriff für die Steroid-Hormone der Nebennierenrinde von denen etwa 30 natürliche und zahlreiche synthetisch hergestellte Vertreter bekannt sind [84]. Allen gemein ist das Progesteron-Grundgerüst (Abbildung 12a)). Die typischen Strukturmerk-

male der Glucocorticoide sind die α -Ketolgruppe am C(17)-Atom, die α,β -(4,5)-ungesättigte Ketogruppe am C(3)-Atom und die Sauerstoff-Funktion am C(11)-Atom [81] (Abbildung 12b) zeigt dieses am Beispiel des Hydrocortisons). Durch Dehydrierung in 1,2-Stellung wird die Selektivität gegenüber dem Glucocorticoid-Rezeptor erhöht und die Einführung von Substituenten am C(16)-Atom sowie eine Fluorierung am C(9)-Atom steigern die Affinität zum Glucocorticoid-Rezeptor [81] (ein Beispiel dafür ist Dexamethason, gezeigt in Abbildung 12c)).

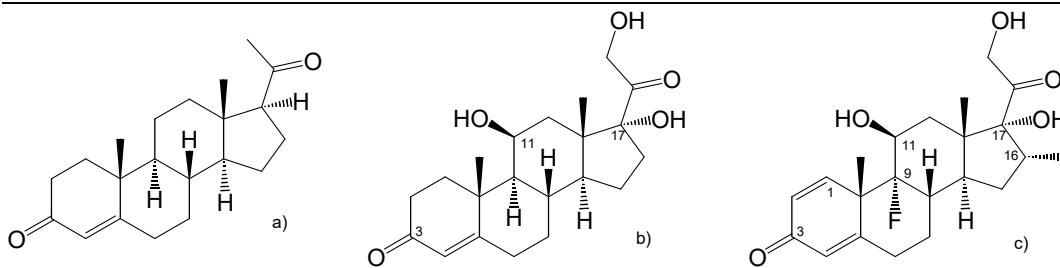


Abbildung 12: Strukturformel von a) Progesteron, b) Hydrocortison und c) Dexamethason

Das 1899 erstmals synthetisierte [85] künstliche Glucocorticoid Dexamethason ist eine farblose, geruchlose, kristalline Substanz mit einem Schmelzpunkt von 255-264 °C und einer molaren Masse von $M = 392,5 \text{ g mol}^{-1}$. Es ist in Wasser schwer, in organischen Lösungsmitteln wie Ethanol oder Chloroform sehr gut löslich. Es ist als Substanz oder in festen pharmazeutischen Zubereitungen bei einer Lagerung unter Lichtausschluss stabil [86, 87]. Die Plasmahalbwertszeit von Dexamethason beträgt 3 – 4,5 Stunden, da dosisabhängig bis 80 % des eingesetzten Dexamethasons am Plasmaeiweiß binden [86]. Dexamethason hat im medizinischen Bereich durch seine 30-fach stärkere Wirkung als das natürliche Nebennierenrinden-Hormon Hydrocortison (Abbildung 11b)) einen vielfältigen Einsatz [85]. So findet es u.a. Anwendung bei der Behandlung allergischer Reaktionen (z.B. Heuschnupfen, Asthma bronchiale), bei entzündlichen Erkrankungen des Auges und des Darms, bei verschiedenen Hauterkrankungen oder zur Vorbeugung von Transplantat-Abstoßungsreaktionen [86]. Auch bei akutem Hörverlust ausgelöst von verschiedenen Ursachen, sowie beim Insertionstrauma nach Cochlea-Implantation, werden Glucocorticoide, insbesondere auch Dexamethason eingesetzt [88]. Dabei ist die systemische Therapie, bei der der Wirkstoff dem Blutkreislauf zugefügt wird nicht zielführend, da die Blut-Cochlea-Barriere ähnlich wie die Blut-Hirn-Schranke funktioniert und den Übertritt des Wirkstoffs aus dem Blutstrom in die Cochlea einschränkt. Eine lokale Applikation ermöglicht höhere Wirkstoffspiegel in der Cochlea bei gleichzeitiger Verringerung der systemischen Nebenwirkungen [88]. In der Regel werden die Wirkstoffe direkt intracochleär mit Hilfe von Pumpen oder intratympanal mit Hilfe von Reservoiren am runden

Fenster der Cochlea appliziert [18]. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Innenohrflüssigkeit nicht aktiv durchmischt wird und sich die Wirkstoffe somit vorrangig durch Diffusion verteilen. Für eine gezielte, kontrollierte Freisetzung der Wirkstoffe und damit einhergehend eine verbesserte Verteilung innerhalb der Cochlea, kann z.B. das Implantat selbst als Medikamententräger genutzt werden [89] oder es können auch die in Kapitel 3.2 vorgestellten polymerbasierten Implantatbeschichtungen zum Einsatz kommen. Dabei kann Dexamethason direkt bei der Herstellung der Cochlea-Implantate mit dem noch unvernetztem PDMS vermischt werden [89, 90], um dann später beim Kontakt mit der wässrigen Perilymphe der Cochlea herausgelöst zu werden. Bei polymerbasierten Implantatbeschichtungen kann der Wirkstoff sowohl mit Hilfe eines Sprühverfahrens zusammen mit dem gelöstem Beschichtungspolymer direkt auf die Implantat-Oberfläche aufgebracht werden, aber auch an die Implantatbeschichtung kovalent angekoppelt werden. Die so erzeugten Local Drug Delivery Systeme (LDD-Systeme) können nach Planck et al. [91] nach dem bestimmenden Wirkstoffabgabemechanismus klassifiziert werden (Abbildung 13) [92].

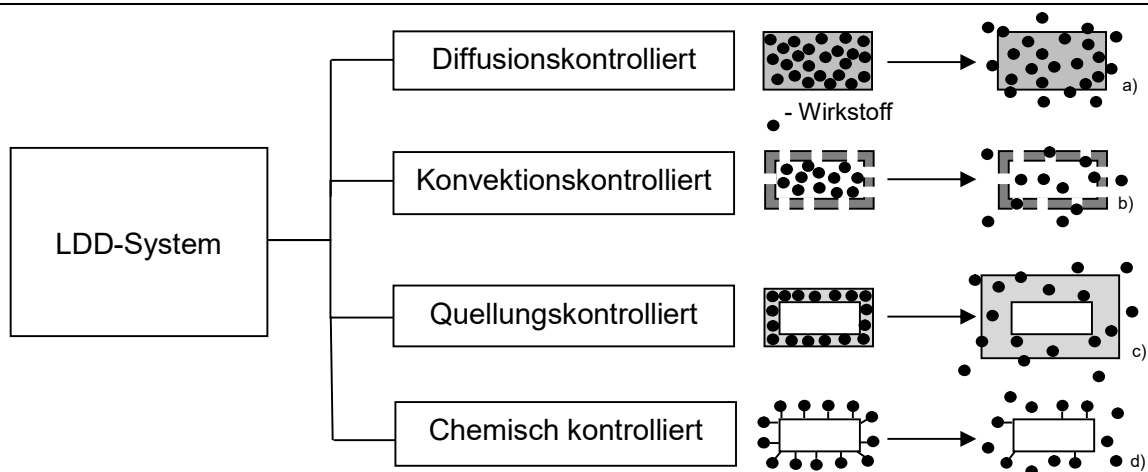


Abbildung 13: Klassifizierung von Local Drug Delivery Systemen [92]; a) der Wirkstoff ist in einer Polymermatrix gelöst, b) der Wirkstoff befindet sich in einem Reservoir, welches durch eine Membran zur Umgebung abgegrenzt wird, c) der Wirkstoff ist in einer quellbaren Polymerschicht, d) der Wirkstoff ist kovalent an die Polymermatrix gebunden

Bei einem rein diffusionskontrolliertem LDD-System (Abbildung 13a)) wird die Wirkstoffabgabe aus der Polymermatrix bestimmt durch die spontane Diffusion des in der Matrix homogen verteilten Wirkstoffes entlang des Konzentrationsgradienten. Dabei ist nicht nur die Abgabe des Wirkstoffes aus der Matrix an die Umgebung zu betrachten, sondern vor allem auch die Diffusion des Wirkstoffes innerhalb der kristallinen Polymermatrix. Damit ist die Wirkstoffabgabecharakteristik (Wirkstofffreisetzung) polymerabhängig und es kann nicht immer eine proportionale Wirkstofffreisetzung (freigesetzte Wirkstoffmenge vs. Zeit)

erwartet werden. Abhängig von der Geometrie des Probekörpers (z.B. Scheibe, Zylinder oder Kugel) kann die Wirkstofffreisetzung variieren, sowie in Früh- und Spätphasen eingeteilt werden [91, 93]. Die Wirkstofffreisetzung ist allerdings nicht nur polymerabhängig, auch die Anfangsbeladung der Polymermatrix mit dem entsprechendem Wirkstoff und damit einhergehend dessen Löslichkeit in der Matrix spielen eine große Rolle.

Bei konvektionskontrollierten LDD-Systemen (Abbildung 13b)) liegt eine hohe Konzentration von Wirkstoffen in einem Reservoir vor. Dieses ist umgeben von einer porösen Membran. Die Wirkstofffreisetzung erfolgt über die Konvektion durch wassergefüllte Poren. Allerdings ist hierbei durch das Vorhandensein eines Konzentrationsgradienten nicht immer eine feste Abgrenzung zu den diffusionskontrollierten Matrixsystemen möglich. Beiden Wirkstofffreisetzungssystemen ist die Unabhängigkeit von den Umgebungsbedingungen gemein [91].

Auch die Abgrenzung zwischen diffusions- und quellungskontrollierten LDD-Systemen ist nicht immer scharf möglich. Bei quellungskontrollierten Systemen (Abbildung 12c)), liegt der Wirkstoff gelöst oder dispergiert in einer glasartig, festen Polymermatrix vor, aus der dieser nicht direkt freigesetzt werden kann. Bei Kontakt mit einem flüssigen Medium wird das Polymernetzwerk solvatisiert. Die einzelnen Segmente des Polymernetzwerkes können sich strecken. Beim Quellen entsteht ein Energiegewinn durch die Wechselwirkung zwischen Lösemittel und Polymer. Dem entgegen wirken die elastischen Kräfte des Polymernetzwerkes. Das Quellvermögen ist demnach von den Wechselwirkungen zwischen der umgebenden Flüssigkeit und dem polymeren Netzwerk abhängig [94]. Aus den aufgequollenen Bereichen kann der zuvor fest eingeschlossene Wirkstoff in das umgebende Medium diffundieren. Dabei ist neben dem Konzentrationsgradienten, der dann zwischen LDD-System und umgebendem Medium vorliegt, auch die Wechselwirkung zwischen Wirkstoff und Polymermatrix ein freisetzungsbeeinflussender Parameter [95].

Bei chemisch kontrollierten LDD-Systemen kann der Wirkstoff kovalent an die Polymeroberfläche angebunden (Abbildung 13d)), oder fest in eine degradierbare Polymermatrix eingebettet sein. Bei degradierbaren Systemen ist der Wirkstoff gleichmäßig innerhalb der Polymermatrix verteilt und wird erst beim Abbau der Matrix freigegeben. Die Freisetzungskinetik wird dabei nicht nur durch die Auswahl des Polymers entschieden, auch die Geometrie des Probekörpers hat einen bedeutenden Einfluss [91]. Der Abbau kann dabei sowohl enzymatisch, als auch durch Hydrolyse geschehen. Bei realen LDD-Systemen wird die Freisetzung allerdings nicht nur durch den Polymerabbau, sondern ebenso durch die Diffusion des Wirkstoffes aus der Polymermatrix heraus beeinflusst [95].

3.4. Biofunktionalisierungen zur Optimierung der Implantat-Gewebe-Interaktion

Bei der Anbindung von Pharmaka an eine Polymeroberfläche wird die vollständige Aufrechterhaltung der biomolekularen Funktion des Wirkstoffes angestrebt [80]. Die Wahl der Fixierungsmethode hängt dabei von der geplanten Anwendung und der Polymeroberfläche ab. Die rein adsorptive Wirkstoffbeschichtung ist zwar nur über kurze Zeit stabil, wird aber trotzdem auf Grund der einfachen Herstellung häufig eingesetzt [96, 97]. Mit Hilfe einer kovalenten Anbindung über die funktionellen Gruppen der Polymeroberfläche und des Wirkstoffes, kann eine stabilere Bindung des Wirkstoffes an die Polymeroberfläche erzeugt werden [98, 99].

Die Anbindung kann sowohl über unter physiologischen Bedingungen spaltbare als auch über nicht spaltbare Bindungen erfolgen. Die Spaltung kann hydrolytisch oder enzymatisch geschehen. Dabei kann es zur Einschränkung der biologischen Aktivität des Wirkstoffes kommen, wenn gerade die für die biologische Wirksamkeit der Substanz relevanten funktionellen Gruppen in die Bindung mit einbezogen sind. Die kovalente Anbindung der Wirkstoffe an die funktionellen Gruppen der Polymeroberfläche kann über Crosslinker erfolgen.

Crosslinker sind Reagenzien, die zwei oder mehr Moleküle miteinander kovalent verknüpfen (bi- oder multifunktionale Crosslinker). Die Endgruppen des Crosslinkers, die über einen Spacer miteinander verbunden sind, reagieren dazu mit funktionellen Gruppen von Proteinen oder anderen Molekülen [100].

Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Crosslinkern handelt es sich um homobifunktionale Crosslinker, die an beiden Seiten des Spacers die gleiche funktionelle Gruppe aufweisen. Sie unterscheiden sich lediglich in der Spacerlänge und den funktionellen Gruppen, die sie tragen. Dies sind N-Hydroxysuccinimid-Ester, die bevorzugt mit Aminen reagieren. In der Abbildung 14 sind die entsprechenden Strukturformeln gezeigt und die Unterschiede in den verschiedenen Spacern kenntlich gemacht. Außerdem sind ausgewählte Eigenschaften in der Tabelle 2 einander gegenüber gestellt.

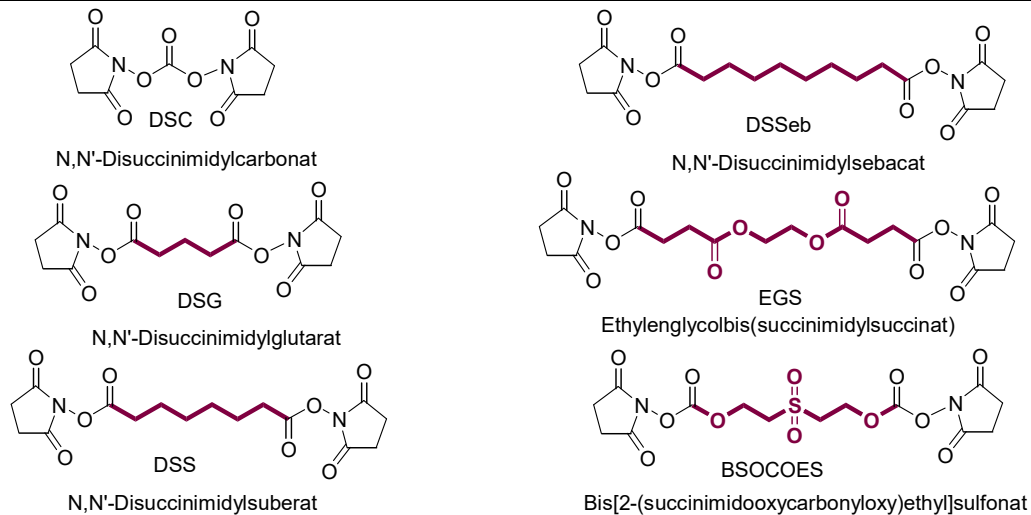


Abbildung 14: Strukturformeln der eingesetzten homobifunktionalen N-Hydroxysuccinimidester

Tabelle 2: Gegenüberstellung ausgewählter chemischer Eigenschaften von Crosslinkern

Crosslinker	Anzahl der Atome im linearen Spacermolekül	Spacerlänge [Å°]	M [g/mol]	Sonstiges
N,N'-Disuccinimidylcarbonat (DSC) [148]	0 (Zero-length)	0	256,17	Nicht wasserlöslich
N,N'-Disuccinimidylglutarat (DSG) [101, 145]	5	7,7	326,26	Nicht wasserlöslich Zellmembran permeabel
N,N'-Disuccinimidylsuberat (DSS) [102, 146]	8	11,4	368,35	Nicht wasserlöslich Zellmembran permeabel
N,N'-Disuccinimidylsebacat (DSSeb) [103, 147]	10	14,1	396,39	Nicht wasserlöslich Zellmembran permeabel
Ethylenglycol(succinimidyl)succinat (EGS) [104]	12	16,1	456,36	Nicht wasserlöslich Zellmembran permeabel Mit Hydroxylamin spaltbar
Bis[2-(succinimidooxycarbonyloxy)ethyl]sulfonat (BSOCOES) [105]	9	13	436,35	Nicht wasserlöslich Langsame Hydrolyse in wässrigen Puffersystemen Basisch spaltbar

Die Reaktion der drei Reaktionspartner Polymeroberfläche, Crosslinker und Wirkstoff kann sowohl in einer Ein-Schritt-Reaktion, bei der alle Komponenten gleichzeitig im Reaktionsmedium vorliegen, oder in einer Zwei-Schritt-Reaktion, bei der zuerst der

Crosslinker mit den funktionellen Gruppen der Polymeroberfläche und in einem zweiten Schritt das freie Ende des Crosslinkers mit der funktionellen Gruppe des Wirkstoffs reagiert, erfolgen. Beide Reaktionsarten haben sowohl Vor- als auch Nachteile. Bei Ein-Schritt-Reaktionen erfolgt die initiale Reaktion des homobifunktionalen Crosslinkers mit nur einem Reaktionspartner (Polymeroberfläche oder Wirkstoff) zu einem reaktiven Intermediat. Dieses reagiert entweder wie gewünscht mit der dritten Komponente des Systems (entsprechend Wirkstoff oder Polymeroberfläche), kann aber auch mit derselben, bereits angebondenen Komponente oder intramolekular mit einer nebenliegenden, weiteren funktionellen Gruppe oder mit weiteren Crosslinkermolekülen, die dann polymerisieren können, reagieren [106]. Mit einer kontrollierten Zwei-Schritt-Reaktion kann diese Polymerisation eingeschränkt, aber nicht gänzlich vermieden werden. Die häufigste Konkurrenzreaktion der Zwei-Schritt-Reaktion ist die Hydrolyse des im ersten Schritt entstandenen Intermediats bevor im zweiten Schritt das zweite Molekül reagieren kann.

Die an die Polymeroberfläche angebondenen Crosslinker können genutzt werden, um Biomoleküle zur Verbesserung der Implantat-Gewebe-Interaktion anzubinden. Dabei wurden für Cochlea-Implantate spezielle Wachstumsfaktoren als vielversprechende Kandidaten identifiziert. Wachstumsfaktoren sind Signalmoleküle, die an spezifische Rezeptoren binden, diese aktivieren und damit die Zellproliferation, das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung beeinflussen [107]. Sie finden sich in allen Geweben, in denen Zellteilung stattfindet. Mittlerweile ist eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren bekannt, die verschiedene Wirkungen aufweisen. Eine Gruppe sind die Neurotrophine, die das Überleben, das Wachstum und die Differenzierung von Neuronen beeinflussen [107]. Aus dieser Gruppe ist speziell das Neurotrophin Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) für die Anwendung in der Otologie erforscht und eine positive Wirkung auf das Überleben von Spiralganglienzellen und Haarsinneszellen konnte *in vitro* nachgewiesen werden [107].

BDNF wurde erstmals 1982 beschrieben [108] und wird seit 1989 erfolgreich kloniert [109]. Das in dieser Arbeit eingesetzte rekombinante humane BDNF wird in *E. coli* produziert, hat ein Molekulargewicht von 27 kDa und besteht aus einer Polypeptidkette, die 119 Aminosäuren (13 verschiedene wie z.B. Lysin, Serin, Asparaginsäure) umfasst [110, 111]. Die verschiedenen Aminosäuren bieten eine Vielzahl von funktionellen Gruppen (z.B. Hydroxy- (-OH), Carboxy- (-COOH) und Amino-Gruppen (-NH₂)), an die das freie, nicht angekoppelte Ende des homobifunktionalen Crosslinkers anbinden kann. Ein mögliches Reaktionsschema ist in Abbildung 15 dargestellt. Gezeigt ist eine Zwei-Schritt-Reaktion, bei der im ersten Reaktionsschritt der Crosslinker DSS an eine mit Sauerstoffplasma funktionalisierte oder nasschemisch degradierte Polymeroberflächen unter Bildung einer

hydrolytisch spaltbaren Esterbindung angebunden wird. Im zweiten Reaktionsschritt reagiert das freie Ende des Crosslinkers mit einer der funktionellen Gruppen des BDNF, wobei die Amino-Gruppe im Vergleich zu den anderen genannten funktionellen Gruppen aufgrund ihrer Reaktivität bevorzugt wird [112], und damit eine stabilere, hydrolytisch nicht spaltbare Bindung bildet.

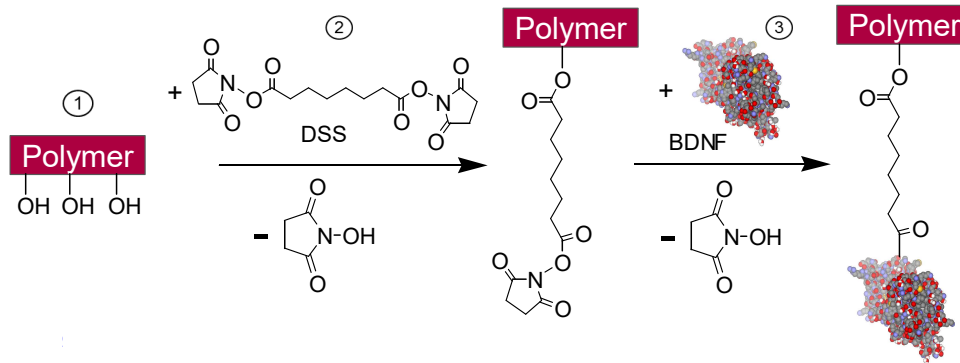


Abbildung 15: Schematische Darstellung einer Zwei-Schritt-Reaktion mit drei Komponenten: funktionalisierte Polymer-Oberfläche (1), Crosslinker DSS (2) und Wachstumsfaktor BDNF (3)

In der Gesamtreaktion entsteht somit eine hydrolytisch spaltbare Bindung, welche die Freisetzung eines BDNF-Intermediats ermöglicht. Die zurückbleibende Polymer-Oberfläche des beschichteten Elektrodenträgers des Cochlea-Implantats unterliegt anschließend einer hydrolytischen und enzymatischen Degradation.

3.5. Degradation und Biodegradation von Polymeren

Als Degradation von Polymeren wird laut IUPAC die „chemische Veränderung in einem polymeren Material, welches in der Regel zu unerwünschten Veränderungen in den Gebrauchseigenschaften des Materials führt“ [113] bezeichnet. Bei den meisten Polymeren äußert sich die Degradation in einer Abnahme der molaren Masse [113]. Der Vorteil des gezielten Einsatzes von biodegradierbaren Polymeren im medizinischen Bereich ist, dass diese Materialien vollständig abgebaut werden können.

Die Degradation von Polymeren kann in Oberflächen- und Bulkdegradation unterteilt werden [114]. Bei der Oberflächendegradation (Abbildung 15a)) ist die Diffusionsgeschwindigkeit von Wasser in die Polymermatrix kleiner als die Abbaugeschwindigkeit des Polymers, wodurch der Abbau von der Oberfläche ausgehend in einer dünnen Oberflächenschicht stattfindet und sich die molare Masse im Inneren des Bauteils nahezu nicht verändert [115]. Bei der Bulkdegradation (Abbildung 15b)) ist die Diffusion des Wassers in das Innere des Materials schneller als das Polymer abgebaut wird. Somit können die Bindungsspaltungen gleichmäßig über den gesamten Querschnitt des Probekörpers statt-

finden [115] (Abbildung 16 [116]). Daraus resultiert, dass bei der Oberflächendegradation lange kein Abbau der molaren Masse messbar ist, während beim Bulkabbau eine kontinuierliche Abnahme der molaren Masse beobachtet werden kann.

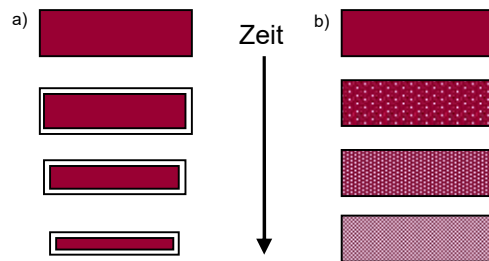


Abbildung 16: Schematische Darstellung der a) Oberflächendegradation und b) Bulkdegradation [116]

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Poly(hydroxycarbonsäuren) erfolgt die Degradation vorwiegend als Bulkdegradation. Dringt Wasser in den Bulk des Polymeren, so finden wiederholt Esterspaltungen statt, die eine Reduzierung der molaren Masse bewirken (Abbildung 17). Gleichzeitig werden bei der Esterspaltung Carbonsäuremoleküle freigesetzt, die im Bulk des Polymeren zu einer Erniedrigung des pH-Wertes führen und so die Degradation autokatalytisch beschleunigen (vergleiche Kapitel 3.1, Degradation nach Vert [117]).

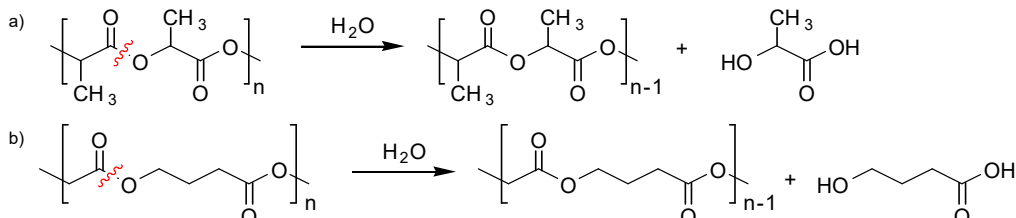


Abbildung 17: Reaktionsschemen der hydrolytischen Polymerdegradation an den Beispielen von a) PLLA und b) P(4HB)

Eine weitere Rolle bei der Degradation spielt der Kristallinitätsgrad, der den Anteil der kristallinen Bereiche an einem teilkristallinen Polymer angibt. Da Wasser leichter in ungerichtete, amorphe als in gerichtete, kristalline Bereiche eindringt, können amorphe Bereiche schneller abgebaut werden [115]. Da Wasser überall im Organismus vorhanden ist, ist die Spaltungsgeschwindigkeit von hydrolysierbaren Bindungen immer maximal, unabhängig vom Implantationsort [115]. Anders verhält es sich mit der Biodegradation, bei der der Abbau der Polymere durch Enzyme katalysiert wird [118]. Die Konzentration und das Vorkommen von Enzymen sind lokal sehr unterschiedlich. So kann die Spaltungsgeschwindigkeit der hydrolytisch spaltbaren Bindung erhöht werden, aber auch Bindungen angegriffen werden, deren Spaltungsgeschwindigkeit rein enzymatisch kontrolliert sind [115].

Als Endprodukt der hydrolytischen Esterspaltung PLLA entsteht L-Milchsäure, die im Organismus durch Anwesenheit des Enzyms Lactatdehydrogenase zunächst zu Pyruvat abgebaut wird [119], das letztendlich über den Zitronensäurezyklus zu Kohlendioxid und Wasser umgewandelt wird [39] (Abbildung 18).

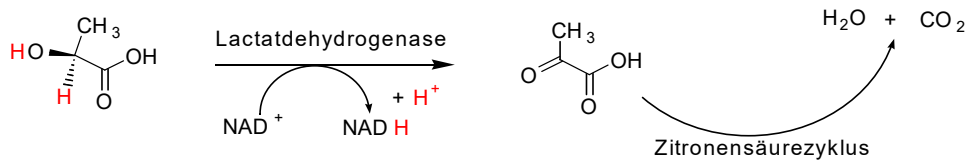


Abbildung 18: Reaktionsschema des L-Milchsäure-Abbaus (NAD: Nicotinamadenindinukleotid) [39,119]

Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27) (LDH) ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, das bei der Oxidation von L-Lactat zu Pyruvat mitwirkt (Abbildung 18). Im menschlichen Organismus existieren fünf Isoformen, die zwar alle die Oxidation des L-Lactats katalysieren, sich aber in ihren physikalischen Eigenschaften (z.B. molare Masse, isoelektrischer Punkt) und in ihren katalytischen Eigenschaften (z.B. pH-Optimum) unterscheiden [120]. LDH gehört in die Enzymklasse der Oxidoreduktasen, die Wasserstoff- und Elektronenübergänge katalysieren (EC 1). Sie greift spezifisch CH-OH-Gruppen an (EC 1.1), wobei NAD⁺/NADH bzw. NADP⁺/NADPH als Elektronenakzeptor/-donator fungieren (EC 1.1.1) [119]. LDH kommt sowohl in den Zellen vor, als auch im Plasma und den Lympheflüssigkeiten des Organismus. Somit ist dieses Enzym auch in der mit Perilymphe, einer klaren, eiweißarmen, elektrolythaltigen Lympheflüssigkeit [9] gefüllten Scala tympani, in die das polymerbeschichtete CI inseriert wird, vorhanden. Die Gesamtaktivität der LDH beträgt 90-250 mU mL⁻¹ [120, 121], alle fünf Isoformen sind etwa zu gleichen Teilen in der Perilymphe vertreten [122].

Neben weiteren Dehydrogenasen (Glutamindehydrogenase, Malatdehydrogenase, Sorbitoldehydrogenase) sind verschiedene Transferasen (Asparagintransferase, Alaninaminotransferase), Phosphatasen (saure und alkalische) und Esterasen (Cholinesterase) Bestandteil der Perilymphe [123].

Von diesen, in der Perilymphe vorkommenden Enzymen, sind es vor allem die Esterasen, die die Geschwindigkeit der hydrolytischen Spaltung der verwendeten Poly(hydroxycarbonsäuren) beschleunigen sollten. So kann speziell die Butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8, oder auch nur Cholinesterase [124]), eine Hydrolase, welche die hydrolytische Spaltung katalysiert (EC 3) genannt werden. Die Aktivität dieses Enzyms beträgt etwa 3700 – 11500 mU mL⁻¹ [124]. Die Esterspaltung (EC 3.1), speziell die Carboxylesterspaltung (EC 3.1.1) ist charakteristisch für dieses Enzym. PLLA und P(4HB) stellen somit

potentielle Substrate für die Butyrylcholinesterase dar, was die Möglichkeit der Biodegradation dieser Polymere eröffnet.

4. Materialien und Methoden

4.1. Materialien zur Herstellung der Probekörper, der Oberflächenmodifizierungen und der Polymerbeschichtungen

Es wurden PDMS-Probekörper verschiedener Geometrien gefertigt bzw. wurden industriell gefertigte CI-Elektroden-träger (Abbildung 19a)) verwendet. Neben PDMS-Scheiben mit einem Durchmesser von $d = 6 \text{ mm}$ kamen PDMS-Fäden ($d = 0,3 \text{ mm}$, $l = 40 \text{ mm}$) und CI-Elektroden-träger zum Einsatz (für die Cochlea Insertion relevante Maße siehe Abbildung 19b) [125]).

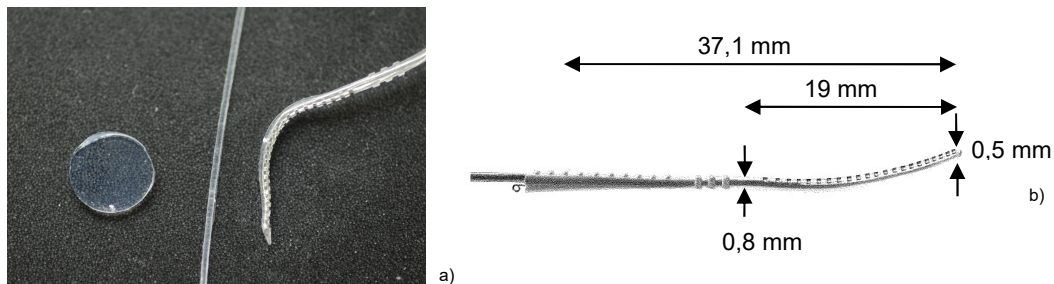


Abbildung 19: a) Foto der untersuchten Probekörper: PDMS-Scheibe, PDMS-Faden und CI; b) Maße des eingesetzten Cochlea-Implantats [125]

Außerdem wurden aus PLLA- und P(4HB)-Folien hergestellte Polymer-Probekörper genutzt. Es wurden einerseits runde Polymer-Scheiben mit einem Durchmesser von $d = 6 \text{ mm}$ und andererseits rechteckige Polymer-Scheiben mit den Maßen $5 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ eingesetzt.

4.1.1. Poly(dimethylsiloxan), Poly(L-lactid), Poly(4-hydroxybuttersäure), Hyaluronsäure, Poly(L-lysin)

Poly(dimethylsiloxan)

Zur Erzeugung der PDMS-Proben (Scheiben und Fäden) wurde das Zweikomponentensystem NuSil MED-4234 herangezogen, das aus einem silikonbasiertem Teil (Part A) und einem Vernetzungsreagenz (Part B) besteht. Beide Teile wurden in einem Verhältnis von 10:1 vermischt und im Vakuum für 2 Stunden (1 mbar) entgast, um entstandene Luftblasen zu entfernen. Zur Erzeugung von PDMS-Folien wurde die Mischung auf eine Polypropylen-Platte gegeben, mit einer zweiten Polypropylen-Platte abgedeckt und mit

einem leichten, manuellen Druck eine PDMS-Folie mit einer Stärke von ca. 1 mm erreicht. Diese wurden bei 110 °C für 1,5 Stunden vernetzt. Nach Erkalten wurden die Deckplatten entfernt und aus der entstandenen PDMS-Folie konnten PDMS-Scheiben mit einem Durchmesser von 6 mm ausgestanzt werden. Zur Herstellung der PDMS-Fäden wurde die Mischung mit Kunststoff-Spritzen in eine zweiteilige Aluminium-Form mit einer 0,4 mm Bohrung gegeben und bei 110 °C für 2 Stunden vernetzt. Anschließend wurde die Form geöffnet und der PDMS-Faden entnommen.

Poly(L-lactid)

Als PLLA-Sprühlösung wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 1,54 g L⁻¹ Polymergranulat (PLLA, Resomer® L214, M_w = 720.000 g mol⁻¹, Boehringer-Ingelheim Pharma, Ingelheim, Deutschland) in Chloroform (CHCl₃) hergestellt. Dazu wurden 1,68 g PLLA in 147 g CHCl₃ unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur über ca. 4 Stunden gelöst. Anschließend wurde die so erhaltene PLLA-Stammlösung mit CHCl₃ verdünnt (1 g PLLA-Stammlösung + 10 g CHCl₃).

Außerdem kamen PLLA-Tauchfolien zur Herstellung von Polymer-Probekörpern zum Einsatz. Dazu wurde eine Lösung von 1,68 g PLLA in 100 mL CHCl₃ hergestellt, in die Edelstahl-Tauchkörper (d = 34 mm; l = 74 mm) bei Raumtemperatur 16 mal eingetaucht wurden. Vor jedem Tauchgang wurden die Tauchkörper um 180 ° gedreht und nach jedem Tauchgang für ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Es entstand eine ca. 100 µm dicke Folie (analysiert mit Hilfe eines Dickenmessgerätes (2109 Mitutoyo, Mitutoyo Europa GmbH, Neuss, Deutschland)), die vorsichtig vom Tauchkörper entfernt wurde und zuerst 2 Tage mit Methanol, sowie weitere 2 Tage mit destilliertem Wasser gewaschen wurde. Danach wurde die Folie für 7 Tage im Vakuumtrockenschrank bei 40 °C (40 mbar) getrocknet und zu Polymer-Probekörpern verarbeitet.

Poly(4-hydroxybuttersäure)

P(4HB) wurde mit einer Konzentration von 2,52 g L⁻¹ als Sprühlösung verarbeitet. Dazu wurden 1 g P(4HB) (TephaFLEX®, M_w = 170.000 g mol⁻¹, Tepha, Inc., Boston MA, USA) in 147 g CHCl₃ unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur über 4 Stunden gelöst und anschließend mit CHCl₃ verdünnt (1 g P(4HB)-Stammlösung + 3 g CHCl₃).

Bei diesem Polymer kamen Gießfolien zur Herstellung von Polymer-Probekörpern zum Einsatz. Dazu wurde eine Lösung aus 1 g P(4HB) in 25 mL CHCl₃ hergestellt und diese in einer Glaspetrischale mit einem Durchmesser von 9 cm gegossen. Dieses wurde zum langsamen Abdampfen bei Raumtemperatur mit einem Filterpapier (ca. 12 cm Durchmesser) bedeckt, das mit einer weiteren Petrischale beschwert wurde. Es entstand eine

ca. 100 µm dicke Folie, die aus der Petrischale vorsichtig entfernt wurde und 2 Tage mit Methanol, sowie weitere 2 Tage mit destilliertem Wasser gewaschen wurde. Danach wurde der Film für 7 Tage im Vakuumtrockenschrank bei 40 °C (40 mbar) getrocknet und zu Polymer-Probekörpern verarbeitet.

Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (HA) wurde als Tauchlösung verarbeitet. Dazu wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 2 g L⁻¹ hergestellt, indem 20 mg HA in 10 mL 100 mM Natriumacetat-Puffer (8,2 g CH₃COONa aufgefüllt auf 1000 mL mit Wasser, pH-Wert 5 (eingestellt mit 10 %-iger Zitronensäure)) [126] über ca. 20 Stunden bei Raumtemperatur gelöst wurden.

Poly(L-lysin)

Auch Poly(L-lysin) (PLL) wurde mit einer Konzentration von 2 g L⁻¹ zu einer Tauchlösung verarbeitet. Dazu wurden 20 mg PLL in 10 mL 25 mM Natriumacetat-Puffer [126] (2,05 g CH₃COONa aufgefüllt auf 1000 mL mit Wasser, pH-Wert 5 (eingestellt mit 10 %-iger Zitronensäure)) gelöst.

4.1.2. Dexamethason

Dexamethason (DMS) wurde einerseits als Bestandteil einer polymerbasierten Beschichtung verarbeitet, andererseits aber auch direkt bei der Herstellung der PDMS-Probekörper inkorporiert.

Zur Herstellung von DMS-haltigen polymerbasierten Beschichtungen wurde zu den Polymer-Sprühlösungen in Methanol gelöstes DMS (15 g L⁻¹) hinzugefügt, bis ein Polymer-zu-DMS-Verhältnis von 70/30 oder 85/15 (% w/w) eingestellt war [126].

Um DMS direkt bei der Herstellung der PDMS-Probekörper zu inkorporieren (1 % oder 5 % (w/w)), wurde die entsprechende Menge DMS zunächst in Tetrahydrofuran gelöst und anschließend mit Part A des PDMS-Systems vermischt [127]. Das weitere Vorgehen erfolgte wie in Kapitel 4.1.1 – Poly(dimethylsiloxan) beschrieben, wobei die Vernetzung allerdings auf 1 Stunde bei 100 °C reduziert wurde.

4.1.3. Brain-derived neurotrophic factor

Der Wachstumsfaktor Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) wurde einerseits als Tauchlösung verarbeitet, aber auch als Reaktionslösung für die Adsorption und die Reaktion mit Crosslinkerbeladenen Polymer-Oberflächen. Hierzu wurde zunächst eine BDNF-Stammlösung mit einer Konzentration von 100 µg mL⁻¹ in Reinstwasser hergestellt.

Für Tauchlösungen erfolgt eine Verdünnung bis zu einer Konzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 100 mM NaAc-Puffer pH-Wert 5 (8,2 g CH_3COONa aufgefüllt auf 1000 mL mit Wasser, pH-Wert 5 (eingestellt mit 10 %-iger Zitronensäure)). Für die Reaktion mit der Polymeroberfläche (Adsorption und Reaktion mit crosslinkerbeladenen Oberflächen) wird ausgehend von der BDNF-Stammlösung eine Konzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 80 mM Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS-Puffer) ($1,265 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{xH}_2\text{O} + 12,1 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{xH}_2\text{O} + 8,5 \text{ g NaCl}$ aufgefüllt auf 1 L mit Wasser, pH-Wert 7,6) hergestellt.

4.1.4. Crosslinker

Die in dieser Arbeit untersuchten Crosslinker wurden mit einer Konzentration von $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ in trockenem Dimethylsulfoxid (DMSO) verarbeitet. Dazu wurden jeweils für 5 Polymer-Scheiben ($d = 6 \text{ mm}$) die in Tabelle 3 gezeigten Mengen in 4 mL DMSO gelöst und dieses anschließend mit den Polymer-Filmen für 4 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln zur Reaktion gebracht. Anschließend wurden die Polymer-Scheiben dreimal mit jeweils 2 mL trockenem DMSO gewaschen und danach bis zur Weiterverarbeitung eingefroren bei $-25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabelle 3: Eingewogene Massen der untersuchten Crosslinker für 5 Polymer-Filme ($d = 6 \text{ mm}$) und 4 mL DMSO ($c = 1,2 \text{ mmol L}^{-1}$)

Crosslinker	M [g/mol]	m [μg]
DSC	256,17	1,23
DSG	326,26	1,57
DSS	368,35	1,77
DSSeb	396,39	1,90
EGS	456,36	2,19
BSOCOES	436,35	2,09

4.2. Methoden zur Oberflächenmodifizierung

4.2.1. Chemische Oberflächenaktivierung von Poly(dimethylsiloxan)-Probekörpern und Polymer-Scheiben

Aminogruppenfunktionalisierung von PDMS-Probekörpern

Allen Oberflächenmodifizierungen ging eine Reinigung der PDMS-Probekörper durch das Abspülen mit Ethanol voraus. Die Oberflächenmodifizierung konnte auf zwei alternativen Wegen realisiert werden. Es wurden Aminogruppen über die direkte Behandlung der

Oberfläche mit Hilfe von NH₃-Plasma erzeugt. Dafür wurde eine 300 W Plasmaanlage (Femto, Diener electronic GmbH & Co. KG, Ebhausen, Deutschland) benutzt. Nach Einlegen der Probe wurde im ersten Schritt die Plasmakammer bis auf 0,09 mbar evakuiert und anschließend mit 0,3 mbar Ammoniakgas geflutet. Beim anschließenden Plasmaprozess wurde die Probe für eine definierte Zeit mit einem Plasma, das durch eine definierte Reaktorleistung erzeugt wurde, behandelt. Nach dem Plasmaprozess wurde die Kammer erneut evakuiert und anschließend mit Luft gespült. In umfangreichen Vorarbeiten, bei denen die Prozessdauer und Reaktorleistung variiert wurden, konnten die optimalen Parameter für den Plasmaprozess ermittelt werden. Tabelle 4 zeigt die untersuchten Parameter und hebt die mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen als optimal ermittelten und somit für weitere Versuche genutzten Parameter hervor (Ammoniakgas – blau markiert).

Tabelle 4: Variierte Parameter des Plasmaprozesses bei PDMS-Probekörpern für Ammoniakgas und Sauerstoffgas; die für optimal befundenen Parameter sind hervorgehoben (Ammoniakgas - blau, Sauerstoffgas - orange)

Reaktorleistung [%]	Prozesszeit [min]		Reaktorleistung [%]	Prozesszeit [min]
15	1		45	1
15	2		45	3
15	3		45	5
15	5		45	10
15	10			
30	1		60	1
30	2		60	3
30	3		60	5
30	4		60	10
30	5		60	20
30	10			

Als alternative Methode zur Erzeugung von Aminogruppen an der PDMS-Oberfläche wurde die Oberflächenaktivierung mit Sauerstoffplasma und anschließender Reaktion mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) durchgeführt. Für die Oberflächenaktivierung mit Sauerstoffplasma wurde wie zuvor bei Ammoniakgas beschrieben vorgegangen. Auch dabei wurden die in Vorversuchen ermittelten optimalen Parameter verwendet (Tabelle 4, Sauerstoffgas – orange markiert).

Die mit Sauerstoffplasma aktivierten PDMS-Probekörper reagierten bei dieser als nasschemischen Prozess bezeichneten Funktionalisierungsmethode mit einer 10 %-igen (v/v) ethanolischen APTES-Lösung für zwei Stunden bei 50 °C (2 mL pro PDMS-Scheibe

(d = 6 mm)). Danach wurden die oberflächenaktivierten PDMS-Probekörper mit Ethanol gespült und im Vakuumtrockenschrank bei 40 °C (40 mbar) für 24 Stunden getrocknet.

Polymerlayer auf DMS-freien PDMS-Probekörpern

Zur Erhöhung der Adhäsion der polymeren Implantatbeschichtung wurde an die zuvor erzeugten Aminogruppen über die Crosslinker 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-Ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) eine Polymerunterbeschichtung (Polymerlayer) angekoppelt. Dafür wurde in CHCl_3 eine PLLA-Konzentration von $1,5 \text{ g L}^{-1}$, sowie $1,8 \text{ g L}^{-1}$ EDC und $1,8 \text{ g L}^{-1}$ NHS hergestellt, diese Lösung auf 60 °C erhitzt und anschließend die Amino-funktionalisierten PDMS-Probekörper für 16 Stunden hinzugefügt. Verwendet wurden für die PDMS-Scheiben je 3 mL und für die PDMS-Fäden je 11 mL. Danach wurden die PDMS-Probekörper aus dem Reaktionsgemisch entnommen, mit CHCl_3 gespült und im Vakuumtrockenschrank für 24 Stunden bei 40 °C (40 mbar) getrocknet.

Für das Polymer P(4HB) wurden mit PDMS-Scheiben verschiedene Vorversuche zur Ankopplung der Polymerlayer durchgeführt (je 3 mL Reaktionslösung). Es wurde der Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel (Tabelle 5 Versuch 1) im Hinblick auf das Stattfinden der Ankopplung untersucht. Auch wurden die Reaktionstemperatur (Tabelle 5 Versuch 2), die Konzentrationen der Reaktionspartner (Tabelle 5 Versuch 3, wobei das Verhältnis von EDC zu NHS immer bei 1:1 blieb), sowie die Reaktionszeit (Tabelle 5 Versuch 4) variiert. Außerdem wurde untersucht, ob die vorhergehende Aminogruppen-Funktionalisierung der PDMS-Oberfläche zur Ankopplung der Polymerlayer notwendig ist. Dafür und für die Polymerlayer-Ankopplung auf PDMS-Fäden (11 mL) und Cochlea-Implantaten (11 mL) wurden die in Versuch 5 (Tabelle 5) aufgezeigten Reaktionsparameter verwendet. Nach Abschluss der Reaktion wurden die Probekörper aus dem Reaktionsgemisch entnommen, mit EtCl_2 (bzw. dem bei Versuch 1 jeweils verwendeten Lösungsmittel) gespült und bei 40 °C im Vakuumtrockenschrank (40 mbar) für 24 Stunden getrocknet.

Tabelle 5: Versuche zur Ankopplung einer P(4HB)-Layer an PDMS-Scheiben in jeweils 3 mL Reaktionsmedium

	Lösungsmittel	c (P(4HB)) [g L ⁻¹]	c (EDC/NHS) [g L ⁻¹]	Temperatur [°C]	Zeit [h]
Versuch 1	CHCl ₃	1,82	1,82	55	16
	1,2-Dichlorethan (EtCl ₂)				
	Aceton				
	Dimethylformamid				
	DMSO				
Versuch 2	EtCl ₂	1,82	1,82	30	16
				55	
				100	
Versuch 3	EtCl ₂	1,82	0,45	55	16
		18,82	1,82		
			4,55		
Versuch 4	EtCl ₂	18,18	1,82	55	0,5
					2
					8
					16
Versuch 5	EtCl ₂	18,18	1,82	55	8

Polymerlayer auf DMS-haltigen PDMS-Scheiben

Die Ankopplung der Polymerlayer an die mit NH₃-Plasma-funktionalisierten DMS-haltigen PDMS-Scheiben über den vorgestellten nasschemischen Prozess, führte zur Quellung des PDMS und somit zur teilweisen Auswaschung des bereits bei der Herstellung inkorporierten DMS. Zur Reduzierung des Verlustes von DMS durch das Auswaschen, wurde die Reaktionszeit auf ein Minimum reduziert (Versuch 6).

Versuch 6

Lösungsmittel	EtCl ₂
c (P(4HB))	18,18 g L ⁻¹
c (EDC/NHS)	1,82 g L ⁻¹
Temperatur, T	55 °C
Zeit, t	5 Minuten

Oberflächenfunktionalisierung von Polymer-Scheiben

Wie bereits für PDMS-Probekörper beschrieben, konnten auch bei PLLA-Scheiben und P(4HB)-Scheiben mit plasmachemischen Prozessen funktionelle Gruppen erzeugt werden. Hierbei kamen sowohl Ammoniakplasma (Tabelle 6 Versuch 7 und Versuch 8),

Sauerstoffplasma (Tabelle 6 Versuch 9 und Versuch 10) und Sauerstoffplasma mit anschließender APTES-Behandlung zum Einsatz. Für Versuche 9 und 10 wurden zunächst die Polymer-Scheiben mit Sauerstoffplasma behandelt und anschließend für 24 Stunden in einer 5 %-igen (v/v) wässrigen APTES-Lösung leicht geschüttelt. Danach wurden die Polymer-Filme entnommen, mit Wasser gespült und für 24 Stunden bei 40 °C im Vakuumtrockenschrank (40 mbar) getrocknet.

Tabelle 6: Übersicht der Prozessparameter zur Erzeugung funktioneller Gruppen mit Hilfe von plasmachemischen Prozessen

	Prozessgas	Polymer	Reaktorleistung [%]	Prozesszeit [min]
Versuch 7	Ammoniak	PLLA	60	10
Versuch 8	Ammoniak	P(4HB)	60	3
Versuch 9	Sauerstoff	PLLA	40	8
Versuch 10	Sauerstoff	P(4HB)	40	6

Eine weitere Möglichkeit zur Erzeugung sauerstoffhaltiger funktioneller Gruppen auf der P(4HB)-Oberfläche ist die Degradation mit Natriumhydroxid (NaOH) [128], wobei eine wässrige 0,25 M NaOH-Lösung 1:1 mit Ethanol vermischt wurde. Diese reagierte 4 Stunden bei 37 °C mit P(4HB) (45 mL Reaktionslösung pro Gießfolie). Der Probekörper wurde anschließend mit Wasser gespült und für 24 Stunden bei 40 °C im Vakuumtrockenschrank (40 mbar) getrocknet.

4.2.2. Auftragung einer polymerbasierten Implantatbeschichtung auf Poly(dimethylsiloxan)-Probekörper und Polymer-Scheiben

Sprühverfahren

Mit Hilfe eines Sprühverfahrens wurden die polymerbasierten Beschichtungen auf Basis von PLLA und P(4HB), sowie DMS-enthaltende Polymerbeschichtungen auf die PDMS-Probekörper aufgebracht. Für diese Verfahren konnte eine elektro-pneumatische Beschichtungsanlage im Institut für Implantattechnologie und Biomaterialien (IIB e.V.) genutzt werden. Dabei konnte durch eine elektronisch steuerbare, Druckluft betriebene Sprühdüse eine Sprühlösung des in CHCl_3 gelösten Polymers fein zerstäubt werden und über den so entstandenen Sprühstrahl gerichtet auf die Probekörper gelangen. Die mit einer speziellen Halterung im Sprühstrahl fixierten Probekörper wurden vertikal durch den Sprühstrahl bewegt, wodurch eine gleichzeitige Beschichtung mehrerer PDMS-Scheiben

möglich war (Abbildung 20a)). Zur Beschichtung von PDMS-Fäden und Cochlea-Implantaten erfolgte neben der vertikalen Bewegung eine zusätzliche Rotation der Probekörper um die Längsachse (Abbildung 20b)). Der fein zerstäubte Sprühstrahl gelangte auf die zu beschichtende Oberfläche. Dort dampfte das restliche Lösungsmittel ab und eine Polymerbeschichtung mit einer angestrebten absoluten Masse von 225 µg (PDMS-Scheiben), 800 µg (PDMS-Fäden) bzw. 290 µg (Cochlea-Implantate) jeweils mit einer Abweichung von ± 10 % blieb zurück. Nach einer 15 minütigen Trockenzeit bei Raumtemperatur, wurden die Proben einer mikroskopischen Sichtkontrolle unterzogen. Anschließend erfolgte die Lagerung im Vakuumtrockenschrank (40 mbar) für 24 Stunden bei 40 °C.

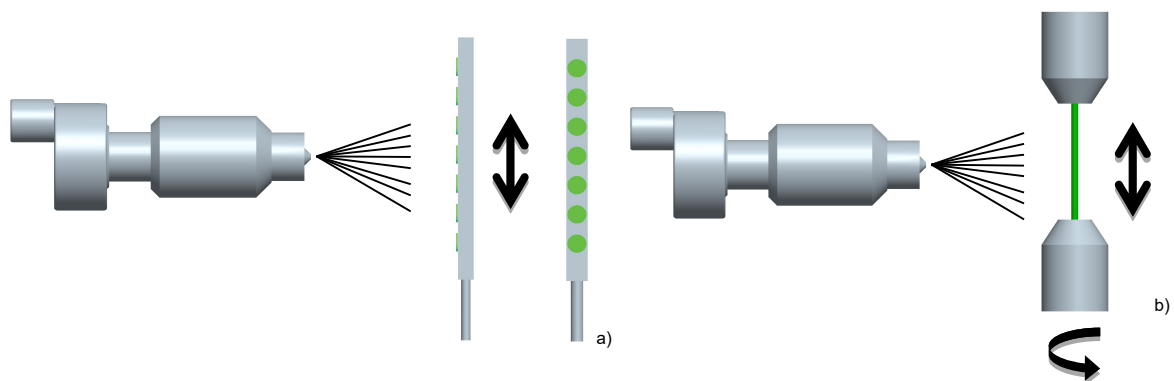


Abbildung 20: Schematische Darstellung Sprühdüse mit Sprühstrahl und PDMS-Probekörper (Probekörper jeweils in grün dargestellt), a) Halterung für PDMS-Scheiben (links Position im Sprühstrahl, rechts Frontalansicht), b) Halterung für PDMS-Fäden

Tauchverfahren – Layer-by-Layer

Eine andere Möglichkeit zur Erzeugung von polymerbasierten Implantatbeschichtungen ist das Layer-by-Layer Verfahren, bei dem komplexe BDNF-freie und BDNF-haltige Polyelektrolytschichten auf Sauerstoffplasma behandelten P(4HB)-Scheiben ($d = 6 \text{ mm}$) aufgebaut wurden. Dafür wurde ein Tauchroboter (KSV Nima, Espoo, Finnland) genutzt, der nach einem vorgegebenen Protokoll arbeitet. Die drei genutzten Protokolle zur Erzeugung einer sogenannten Tetra-Layer sind im Folgenden dargestellt. Dabei wurde mit dem Protokoll 1 eine Beschichtung aufgebaut, in die das Protein BDNF direkt im Tetra-Layer-Aufbau enthalten war (angelehnt an [126]). Mit dem Protokoll 2 und Protokoll 3 wurde eine Beschichtung hergestellt, in die das Protein BDNF erst nach dem Tetra-Layer-Aufbau inkorporiert wurde. Zur BDNF-Inkorporation wurden diese Probekörper für 16 Stunden bei 4 °C in einer BDNF-Tauchlösung (Kapitel 4.1.3 - Brain-derived neurotrophic factor) gelagert.

Protokoll 1 – 5 Wiederholungen

PLL-Lösung (300 s)

3 Waschgänge in 25 mM NaAc (10 s, 20 s, 30 s)

HA-Lösung (300 s)

3 Waschgänge in 100 mM NaAc (10 s, 20 s, 30 s)

BDNF-Lösung (600 s)

1 Waschgang in 100 mM NaAc (10 s)

HA-Lösung (300 s)

3 Waschgänge in 100 mM NaAc (10 s, 20 s, 30 s)

Protokoll 2 – 15 Wiederholungen

PLL-Lösung (300 s)

3 Waschgänge in 25 mM NaAc (10 s, 20 s, 30 s)

HA-Lösung (300 s)

3 Waschgänge in 100 mM NaAc (10 s, 20 s, 30 s)

PLL-Lösung (300 s)

3 Waschgänge in 25 mM NaAc (10 s, 20 s, 30 s)

HA-Lösung (300 s)

3 Waschgänge in 100 mM NaAc (10 s, 20 s, 30 s)

Protokoll 3 – 5 Wiederholungen

PLL-Lösung (300 s)

3 Waschgänge in 25 mM NaAc (10 s, 20 s, 30 s)

HA-Lösung (300 s)

3 Waschgänge in 100 mM NaAc (10 s, 20 s, 30 s)

PLL-Lösung (300 s)

3 Waschgänge in 25 mM NaAc (10 s, 20 s, 30 s)

HA-Lösung (300 s)

3 Waschgänge in 100 mM NaAc (10 s, 20 s, 30 s)

4.2.3. Ankopplung von BDNF an Poly(dimethylsiloxan)- und Polymer-Scheiben

Es wurden verschiedene PDMS-, PLLA- und P(4HB)-Scheiben untersucht. Dabei wurden jeweils mit unaktivierten und den verschiedenen aktivierten Proben (NH₃-Plasma, O₂-Plasma, O₂-Plasma + APTES, NaOH-Degradation (Kapitel 4.2.1)) Adsorptionsversuche durch-

geführt. Außerdem wurde BDNF an Crosslinker-behandelte Polymer-Scheiben angekopelt. Sowohl bei der Adsorption mit den genannten Probekörpern, als auch bei der Reaktion mit Crosslinker-behandelten Polymer-Scheiben wurden die Probekörper in einer $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ BDNF-Lösung ($300 \mu\text{L}$ pro Film ($d = 6 \text{ mm}$)) über 16 Stunden bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ leicht geschüttelt. Anschließend wurden die Probekörper entnommen, mit dem Waschpuffer der Firma RayBio® kurz abgespült und bis zur Weiterverwendung tiefgekühlt bei $-25 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.3. Methoden zur Charakterisierung der Oberflächenmodifizierung

4.3.1. Infrarotspektroskopie (IR-Spektroskopie)

Die Ankopplung der Polymer-Layer an die PDMS-Scheiben wurde mit Hilfe der Infrarot-Spektroskopie analysiert. Dazu wurde ein Fourier-Transformations-IR-Spektrometer (Equinox 55, Fa. Bruker Optik GmbH, Leipzig, Deutschland) verwendet. Die PDMS-Scheiben wurden in einer mit Trockenluft gespülten Kammer mit einer Germaniumkristall-ATR-Einheit (Abgeschwächte Totalreflexion) vermessen. Die IR-Strahlung wird an der Grenzfläche Kristall-PDMS-Scheibe reflektiert und zum Teil absorbiert. Die daraus resultierende Intensitätsänderung ist abhängig von der Wellenzahl und wird als Absorptionsspektrum aufgezeichnet. Die IR-Spektren von unmodifizierten PDMS-Scheiben, sowie aminofunktionalisierten und unmodifizierten den Polymer-Layer-Ankopplungs-Schritt durchlaufende PDMS-Scheiben wurden in einem Bereich von 4000 bis 700 cm^{-1} mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} aufgenommen. Für jedes Spektrum wurden 100 Scans durchgeführt. Die Spektren zeigten charakteristische Absorptionsbanden und konnten untereinander verglichen werden.

4.3.2. Kontaktwinkelmessungen

Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung der erfolgten Oberflächenmodifizierung der Polymer- und PDMS-Scheiben ist die Beobachtung des Benetzungsverhaltens der Oberflächen mit Flüssigkeiten. Wird ein Wassertropfen auf eine Probenoberfläche aufgebracht, so kann anhand des Winkels (Kontaktwinkel, Θ) an der Drei-Phasen-Grenze Luft-Wasser-Oberfläche eine Aussage zur Hydrophilie der Oberfläche getroffen werden. Dabei kann zwischen Spreitung ($\Theta = 0^\circ$), Teilbenetzung ($0^\circ < \Theta < 180^\circ$) und keiner Benetzung ($\Theta = 180^\circ$) unterschieden werden (Abbildung 21a)). Die Abbildung 21b) zeigt ein Foto eines Wassertropfens auf einer P(4HB)-Oberfläche mit den zur Bestimmung des

Kontaktwinkels verwendeten eingezeichneten Hilfslinien (rot – Abgrenzung zwischen Oberfläche und Wassertropfen), Tangente (blau – durch den Drei-Phasen-Grenzpunkt) und Kontaktwinkel (grün).

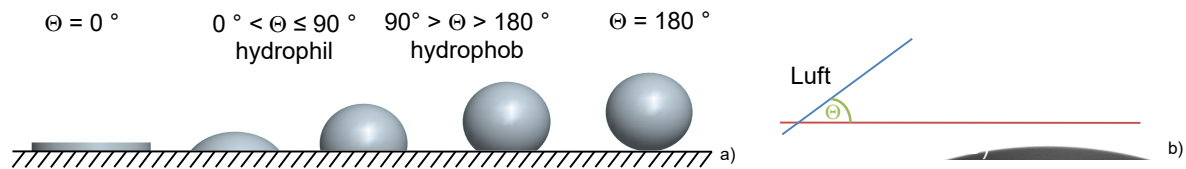


Abbildung 21: a) Darstellung der möglichen Oberflächenbenetzung mit Wasser, b) Foto eines Wassertropfens auf einer P(4HB)-Oberfläche zur Kontaktwinkelbestimmung

Die Ermittlung des Kontaktwinkels erfolgte über die Sessile-Drop-Methode, bei der in diesem Fall als Testflüssigkeit Wasser bei Raumtemperatur auf die zu untersuchenden Probekörper aufgebracht wurden. Zur Messung befand sich der Probekörper auf einem Probetisch zwischen einer diffusen Lichtquelle und einer Digitalkamera, mit der die Tropfenkontur (Tropfenvolumen ca. 10 μL) wie in Abbildung 21b) gezeigt aufgenommen wurden. Mit Hilfe der Young-Laplace-Methode konnte der Kontaktwinkel ermittelt werden [129] (OCA 20, DataPhysics Instruments GmbH, Flindern, Deutschland).

4.3.3. Environmental Scanning Electron Microscopy

Die Oberflächenmorphologie der verschiedenen Probekörper wurde mit Hilfe der Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM, Typ XL30, Fa. Philips, Eindhoven, Niederlande) begutachtet. Dafür wurden die Proben mit einem doppelseitig klebenden leitfähigen Tab auf einen Aluminium-Träger fixiert. Die ESEM-Aufnahmen wurden mit einem Elektronenmikroskop bei 1,2 mbar Druck in einer befeuchteten Atmosphäre, einer Beschleunigungshochspannung von 10 kV und einem Detektorabstand von 10 mm durchgeführt.

4.3.4. Schichtdickenbestimmung der polymerbasierten Beschichtungen

Zur Bestimmung der Schichtdicke der polymerbasierten Beschichtung auf PDMS-Fäden, wurden mit P(4HB) beschichtete PDMS-Fäden in dem Epoxyharz EpoThin eingebettet und anschließend für 24 Stunden ausgehärtet. Überschüssiges Harz wurde mit einer automatisch arbeitenden Poliermaschine (TegraPol-15, STRUERS GmbH, Willich, Deutschland) und einer Aluminium-Oxid-Suspension abgeschliffen und poliert. Die so

erhaltenen Quer- und Längsschnitte der beschichteten PDMS-Fäden wurden im ESEM begutachtet und die Schichtdicke konnte vermessen werden.

4.3.5. Simulierte CI-Elektroden-Implantation

Zur Überprüfung der Stabilität der polymerbasierten Implantatbeschichtungen wurde die Implantation von CI-Elektroden simuliert (n = 3). Dazu wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Pau von der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie "Otto Körner" eine oberflächenmodifizierte CI-Elektrode (NH₃-Plasma + P(4HB)-Layer, Kapitel 4.2.1) beschichtet (Gesamtbeschichtungsmasse 290 µg P(4HB)/DMS 85/15 % w/w, Herstellung vergleiche Kapitel 4.2.2) und der Implantationsprozess an einem humanen Felsenbeinsexplantat simuliert. Die CI-Elektrode wurde in die Scala Tympanie der Cochlea über das runde Fenster eingeführt. Anschließend wurde die beschichtete CI-Elektrode wieder entfernt und ein zweites Mal die Implantation mit dieser Elektrode simuliert. Die Oberflächenmorphologie der CI-Elektrode wurde vor und nach dem simulierten Implantationsprozess im ESEM begutachtet.

4.3.6. Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Die Crosslinker-modifizierten Polymer-Oberflächen wurden mit Hilfe einer Energiedispersiven Röntgenspektroskopie-Einheit des ESEM (energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX)) untersucht. Die zu untersuchenden Polymer-Scheiben wurden mit einem doppelseitig klebenden, leitenden Tab auf einem Aluminiumträger fixiert und bei 1,2 mbar Druck in einer befeuchteten Atmosphäre, bei einer Beschleunigungshochspannung von 10 kV und einem Detektorabstand von 10 mm vermessen. Mittels EDX-Einheit wurden die Proben auf die Elemente Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel analysiert.

4.3.7. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) für Polymer- und PDMS-Scheiben

Zur Bestimmung der Oberflächen-BDNF-Beladung von modifizierten und nicht modifizierten Polymer- und PDMS-Scheiben wurde ein BDNF-ELISA-Kit der Firma RayBiotech® (Human BDNF) verwendet, das auf die Verwendung von Scheiben statt Flüssigkeiten (Kapitel 4.4.2) angepasst wurde (die verwendeten Lösungen wurden nach der dem BDNF-ELISA-Kit beiliegenden Anleitung hergestellt). Bei einem ELISA wird ein spezifisch gegen ein Protein gerichteter Antikörper aufgetragen, an den ein Enzym gebunden ist (Meerrettichperoxidase EC 1.11.1.7 (Horseradish peroxidase, HRP)), das die Umsetzung

eines Substrates zu einem farbigen Produkt bewirkt, welches photometrisch nachgewiesen werden kann. Eine schematische Darstellung des Nachweises ist in Abbildung 22a) gezeigt. Die Abbildung 22b) zeigt einen Ausschnitt einer 96-Well-Platte am Ende eines ELISA-Test, bei dem das Substrat bereits zu einem farbigen Produkt umgesetzt wurde und durch Zugabe einer weiteren Lösung die Reaktion gestoppt wurde. Die Reaktionsgleichung der zugrundeliegenden Farbreaktion ist in Abbildung 22c) dargestellt.

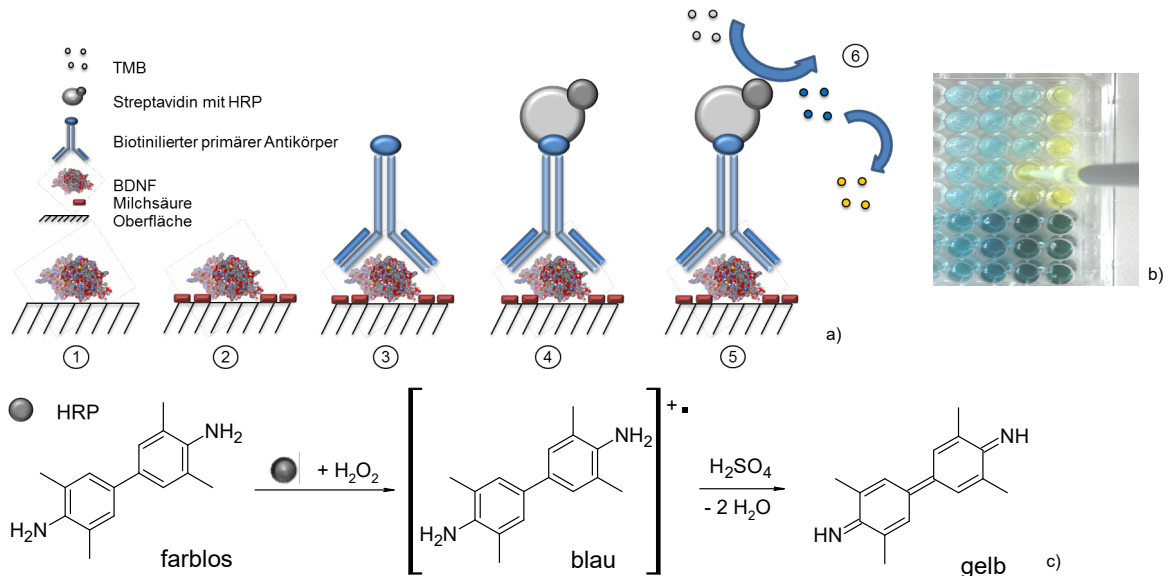


Abbildung 22: a) Schematische Darstellung der Reaktion bei einem Oberflächen-ELISA, b) Ausschnitt eines Fotos einer 96-Well-Platte mit TMB-gefärbten BDNF-beladenen-Scheiben (blau) und zugegebener Stopp-Lösung (gelb), c) Reaktionsgleichung der Farbreaktion

Je fünf BDNF-beladene Scheiben (1) (Herstellung siehe Kapitel 4.1.3) wurden auf einen Federdraht ($d = 0,3 \text{ mm}$) aufgereiht und in 4 mL Glasvials zunächst mit 1,5 mL einer 2 %-igen Milchpulver-Lösung in PBS-Puffer (2) für 45 Minuten geblockt, um freie, nicht BDNF-bedeckte Stellen auf der Oberfläche zu blockieren. Danach wurden die Scheiben vier mal mit je 1,5 mL des im BDNF-ELISA-Kit enthaltenen Waschpuffers gewaschen, um dann mit je 1,5 mL des biotinylierten, BDNF-spezifischen Antikörpers (3) aus dem Kit für 1 Stunde unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur behandelt zu werden. Anschließend erfolgte erneut ein vierfacher Waschschrift mit je 1,5 mL des Waschpuffers. Nun folgte die Inkorporation mit 1,5 mL einer HRP-konjugierten Streptavidin-Lösung (4) für 45 Minuten bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln. Nach einem weiteren Waschschrift (vier mal mit je 1,5 mL Waschpuffer) wurden die einzelnen Scheiben vom Federdraht genommen, in je ein Well einer 96-Well-Platte gelegt und 100 μL der Färbelösung 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben (5). Dieses wurde für ca. 20 - 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss leicht geschüttelt. Anschließend wurden 50 μL einer 2 M Schwefelsäure-Lösung zum Stoppen der Farbreaktion zu jedem Well

hinzugegeben (6) (Abbildung 21b) und Abbildung 21b)). Die entstandenen gefärbten Lösungen wurden in eine zweite 96-Well-Platte umpipettiert und die Intensität dieser Lösungen bei 450 nm fluorimetrisch mit einem Mikrotiterplattenleser (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) vermessen.

4.4. *In vitro* Modelle

4.4.1. *In vitro* Freisetzungsmodelle

Zur Simulation der Bedingungen in der Cochlea wurde ein quasi-stationäres Freisetzungsmodell entwickelt. Ausgehend von am Institut für Biomedizinische Technik etablierten Freisetzungsmodellen (non sink-Bedingungen: der Wirkstoff steht mit dem gesamten Freisetzungsmedium in Kontakt und es liegt so gut wie kein Flüssigkeitsaustausch vor, also ein quasi geschlossenes System [149]) wurde das Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis bis auf ein noch händelbares Minimum reduziert sowie die Durchmischungsrate und der Probeentnahme-Zyklus angepasst. Außerdem wurden Stabilitätsuntersuchungen von DMS und BDNF durchgeführt.

Dexamethason

In ein 4 mL-Glas-Vial wurde jeweils eine DMS-beladene PDMS-Scheibe ($d = 6$ mm) bzw. ein DMS-beladener PDMS-Faden ($l = 4$ mm, $d = 3$ mm), die jeweils mit einem Federdraht ($d = 0,3$ mm) fixiert waren, gegeben und als Freisetzungsmedium 500 μ L 0,9 %-ige wässrige Natriumchlorid-Lösung (NaCl) hinzugefügt. Dieses wurde bei 37 °C ruhend und dunkel gelagert. Nach 24 Stunden wurden zur Bestimmung des DMS-Gehaltes 100 μ L entnommen, das Freisetzungssystem mit 100 μ L NaCl auf 500 μ L wieder aufgefüllt und für weitere 24 Stunden bei 37 °C gelagert. Jedes Vial wurde manuell vor und nach der Zugabe des Freisetzungsmediums sowie weitere vier mal pro Tag kurz geschüttelt.

Brain-derived neurotrophic factor

Für das *in vitro* Freisetzungsmodell von BDNF wurden jeweils fünf gleiche BDNF-beladene Polymer-Scheiben lose in ein 1 mL-Glas-Vial gegeben und als Freisetzungsmedium 500 μ L einer Lösung aus 0,9 %-iger NaCl-Lösung + 0,5 % Albumin (bovines Serum Albumin (BSA)) hinzugefügt. Dieses wurde ruhend und dunkel bei Raumtemperatur gelagert. Nach 24 Stunden wurden 100 μ L zur Bestimmung des BDNF-Gehaltes entnommen, das Freisetzungssystem mit 100 μ L NaCl/BSA auf 500 μ L wieder aufgefüllt und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Jedes Vial wurde manuell vor und nach der Freisetzungsmediumzugabe sowie weitere viermal pro Tag geschüttelt.

Stabilität von BDNF und DMS

Zur Bestimmung der Stabilität von DMS unter Freisetzungsbedingungen (37 °C, ruhend, dunkel) wurden 10 mg DMS in 10 mL Methanol gelöst und davon 100 µL entnommen und mit 0,9 %-iger NaCl in Wasser bzw. mit künstlicher Perilymphe ((KP), 8 g NaCl, 0,37 g KCl, 1,8 g Glucose, 0,14 g Na₂HPO₄, 0,22 g CaCl₂, 0,2 g MgCl₂, 1 g NaHCO₃, aufgefüllt auf 1 L mit Wasser [130], pH-Wert 7,3 (eingestellt mit 1:50 verdünnter Phosphorsäure)) auf jeweils 10 mL aufgefüllt. Zu Beginn (Zeitpunkt t = 0 Stunden) sowie im Folgenden jeweils im Abstand von 24 Stunden wurden je 500 µL entnommen.

Um ein Medium für die Freisetzungsversuche zu finden, in denen BDNF über einen möglichst langen Zeitraum stabil ist, wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Lösungen getestet. Dazu wurde die in Kapitel 4.1.3 beschriebene wässrige BDNF-Konzentration von 100 µg mL⁻¹ mit den zu testenden Medien jeweils auf eine Konzentration von 1 µg mL⁻¹ verdünnt. Zu den Zeitpunkten t = 0 Stunden und t = 24 Stunden wurden dann jeweils 100 µL entnommen. Dazwischen standen die Proben dunkel, ruhend und bei Raumtemperatur bzw. 37 °C.

Tabelle 7: Übersicht der für die Stabilitätsuntersuchungen von BDNF (je 1 µg mL⁻¹) getesteten Lösungen bei Raumtemperatur (RT) und 37 °C

	Ohne Zusätze		+ 0,5 % BSA (w/w)	+ 0,01 % Tween 80 (v/v)
	RT	37 °C	RT	RT
KP pH-Wert 7,3	X	X	X	X
0,08 mM PBS pH-Wert 7,6	X	X	X	X
0,9 %-ige NaCl	X	X	X	X
100 mM NaAc pH-Wert 5	X			
Wasser	X	X		
Diluent B aus dem ELISA-Kit	X	X		
Diluent A aus dem ELISA-Kit	X	X		

4.4.2. Methoden zum Nachweis der freigesetzten Wirkstoffe

Dexamethason – Hochleistungsflüssigchromatografie (HPLC)

Der DMS-Gehalt wurde für alle Proben (Freisetzungs- und Stabilitätsuntersuchungen) mit Hilfe einer HPLC-Anlage der Firma Knauer (Wissenschaftlicher Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH, Berlin, Deutschland (Säule: Chromolith FastGradient RP 18e 50-2; Laufmittel: Methanol/Wasser (50/50 % v/v); isokratisch; Flussgeschwindigkeit: 0,4 mL min⁻¹; Säulentemperatur: 40 °C; Wellenlänge: 240 nm)) bestimmt. Die Proben für

die Stabilitätsuntersuchungen wurden unverdünnt vermessen. Die Proben der Freisetzungsstudie wurden vor dem Messen mit 900 µL 0,9 %-iger NaCl-Lösung verdünnt.

Brain-derived neurotrophic factor - Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die aus den Proben freigesetzten BDNF-Konzentrationen wurden mit einem ELISA-Kit der Firma RayBiotech® (Human BDNF) bestimmt. Das bereits im Kapitel 4.3.7 ausführlich beschriebene Prinzip dieses Testes ist in der Abbildung 23 dargestellt.

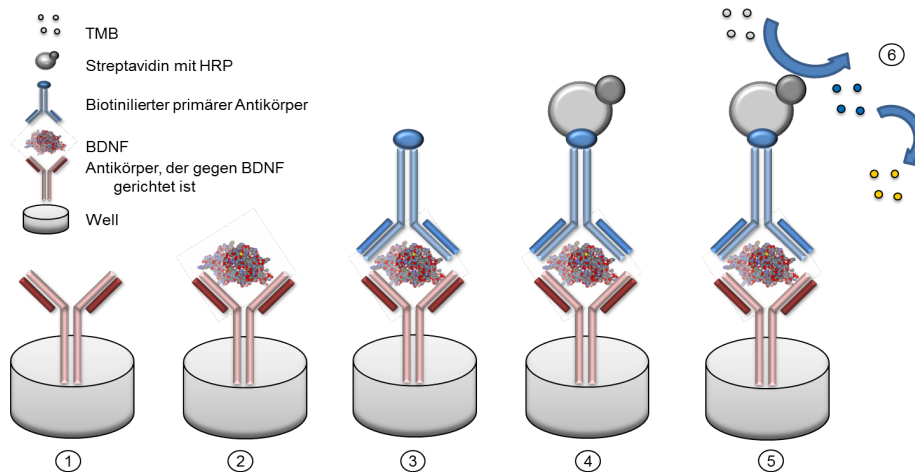


Abbildung 23: Schematische Darstellung des Nachweises von BDNF in Lösung mit Hilfe eines ELISA-Kits der Firma RayBiotech®

Die den Freisetzungs- oder den Stabilitätsuntersuchungen entnommenen 100 µL-Proben wurden jeweils direkt in die BDNF-spezifisch modifizierte 96-Well-Platte des ELISA-Kits (1) pipettiert und dort gemeinsam mit der nach Kit-Anleitung (User Manual, Revised May 27, 2011) hergestellten BDNF-Kalibrationsreihe für 16 Stunden bei 4 °C unter leichtem Schütteln immobilisiert (2). Danach wurde die Lösung aus den Wells entfernt und diese viermal mit je 300 µL des im BDNF-ELISA-Kit enthaltenen Waschpuffers gewaschen, um dann mit je 100 µL des biotinylierten, BDNF-spezifischen Antikörpers (3) aus dem Kit für 1 Stunde bei leichtem Schütteln bei Raumtemperatur behandelt zu werden. Anschließend erfolgten weitere Waschschrte (viermal mit je 300 µL Waschpuffer), sowie die Inkorporation mit 100 µL einer HRP-konjugierten Streptavidin-Lösung (4) für 45 Minuten bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln. Nach erneutem Waschen (viermal mit je 300 µL Waschpuffer) wurden 100 µL der Färbelösung TMB hinzugegeben (5), dieses für ca. 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln leicht geschüttelt und anschließend zum Stoppen der Färbereaktion 50 µL einer 2 M Schwefelsäure-Lösung zu jedem Well hinzugegeben (6). Die entstandenen gefärbten Lösungen wurden bei 450 nm fluorimetrisch mit einem Mikrotiterplattenleser (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) vermessen.

4.4.3. *In vitro* Degradationsmodell

Die *in vitro* Degradation wurde unter Berücksichtigung der ISO-Normen ISO 15814:1999(E) [131] und ISO 13781:1997(E) [132] und den Arbeiten von T. Freier et al. [133] durchgeführt, sowie den Bedingungen in der humanen Cochlea angenähert.

Nach der ISO 15814:1999(E) [131] wurden die Entnahmezeiträume 0, 2, 4, 8, 26 Wochen für Polymere mit kürzerer Degradationszeit gewählt und durch die Entnahmezeiträume 12, 39 und 52 Wochen für Polymere mit längerer Degradationszeit ergänzt. Nach der ISO 13781:1997(E) [132] wurden die analytischen Methoden zur Beobachtung der Degradation ausgewählt. Neben dem Masseverlust der degradierten Proben wurde mit Hilfe der Gelpermeationschromatografie (GPC), einer Größenausschlusschromatografie, die Änderung der molaren Masse verfolgt. Mit der dynamische Differenzkalorimetrie (engl. differential scanning calorimetry (DSC)) wurde der Kristallinitätsgrad und der Schmelzpunkt, mit der Environmental scanning electron microscopy (ESEM) die Veränderungen der morphologischen Struktur der Proben sowie über Kontaktwinkelmessungen die Änderung der Hydrophobizität untersucht. Für all diese analytischen Methoden wurden je 6 Proben pro Polymer zu den gewählten Entnahmezeiträumen (0, 2, 4, 8, 12, 26, 39, 52 Wochen) aus dem Degradationsmedium entfernt, viermal mit je 2 mL Wasser gewaschen und anschließend im Vakuumtrockenschrank (40 mbar) für 7 Tage bei 40 °C getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Proben mit den oben genannten analytischen Methoden untersucht (bis auf DSC-Untersuchungen). Danach wurden die 4 schwersten Proben ausgewählt und diese jeweils für 1 Minute bei 50 °C mit Zitronensäure (1 mM, 1 mL) behandelt, um wasserunlösliche Ablagerungen des Degradationsmediums zu entfernen. Anschließend wurden die Proben dreimal mit je 2 mL Wasser gewaschen und getrocknet (Vakuumtrockenschrank, 40 mbar, 7 Tage, 40 °C), um danach mit allen analytischen Methoden (inklusive DSC der übrigen 2 leichtesten Proben) untersucht zu werden.

In Anlehnung an publizierte Degradationsstudien [133] wurden die Probengeometrie (10 mm x 5 mm) und das Volumen des Degradationsmediums gewählt. Um den Bedingungen in der humanen Cochlea möglichst nahe zu kommen, wurde als Degradationsmedium künstliche Perilymphe (8 g NaCl, 0,37 g KCl, 1,8 g Glucose, 0,14 g Na₂HPO₄, 0,22 g CaCl₂, 0,2 g MgCl₂, 1 g NaHCO₃, auffüllen auf 1 L mit Wasser [130], pH-Wert 7,3 (eingestellt mit 1:50 verdünnter Phosphorsäure)) gewählt und das System wie bereits bei den *in vitro* Freisetzungsmodellen (Kapitel 4.4.1) beschrieben bei 37 °C, ruhend und unter Lichtausschluss gelagert. Einmal täglich erfolgte eine Durchmischung des Degradationssystems, sowie jeweils nach 7 Tagen ein vollständiger Wechsel des Degradationsmediums.

Untersucht wurden zwei verschiedene Degradationsmedien. Zur Verfolgung der Degradation über hydrolytische Esterspaltung (im Folgenden hydrolytische Degradation genannt) wurde die künstliche Perilymphe ohne weitere Zusätze verwendet. Da es sich bei PLLA und P(4HB) um biodegradierbare Polymere handelt, wurden für eine zweite Degradationsstudie (im Folgenden enzymatische Degradation genannt) der künstlichen Perilymphe Enzyme zugesetzt, die in der humanen Cochlea vorkommen und bei denen einerseits bekannt war, dass unter Anwesenheit von PLLA die Aktivität erhöht ist (Lactatdehydrogenase (LDH) [134]) und andererseits die Esterspaltung bei anderen Substraten nachgewiesen werden konnte (Butyrylcholinesterase (But) [124], [135]). Aufgrund der schlechten kommerziellen Verfügbarkeit der Enzyme musste bei der enzymatischen Degradation das Volumen des Degradationsmediums reduziert werden. Außerdem ist zu beachten, dass das Enzym LDH für die Reaktion immer einen Co-Faktor zum Elektronentransfer benötigt. Dafür wurde β -Nicotinamidadeninucleotidphosphat Dinatriumsalz (β -NADP- Na_2) verwendet, welches einmalig zum frischen Degradationsmedium hinzugefügt wurde. Wie in Kapitel 3.5 erwähnt, gibt es fünf Isoformen der LDH. Dabei ist nach Lotz et al. die Isoform 4 die am häufigsten in der Perilymphe vorkommende [122]. Darüber hinaus wurde bei Entzündungsreaktionen, wie sie nach dem Einsatz eines Implantats entstehen können, eine erhöhte LDH-5-Aktivität in der Perilymphe nachgewiesen [122]. Deshalb wurden diese beiden Isoformen der LDH bei der enzymatischen Degradation dem Degradationsmedium zugesetzt. Eine Übersicht der Degradationsparameter der hydrolytischen und enzymatischen Degradation ist der Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Übersicht der Parameter der hydrolytischen und enzymatischen Degradationsuntersuchungen

	Hydrolytisch	Enzymatisch
Temperatur	37 °C	37 °C
Licht	Lichtausschluss	Lichtausschluss
Bewegung	ruhend, 1x täglich durchmischen	ruhend, 1x täglich durchmischen
Probengeometrie	10 mm x 5 mm	10 mm x 5 mm
Volumen des Degradationsmediums	4 mL	1 mL
Zusammensetzung des Degradationsmediums	Künstliche Perilymphe	Künstliche Perilymphe + 8 U mL ⁻¹ But [136] + 45 mU mL ⁻¹ LDH-4 [122], [137] + 39 mU mL ⁻¹ LDH-5 [122], [137] + 0,5 mM β -NADP- Na_2

Enzymaktivitätsbestimmung

Für die Herstellung des Degradationsmediums wurde vor jedem Medienwechsel zunächst die Aktivität der verwendeten Enzyme bestimmt, um das Medium frisch mit jeweils leicht veränderter Zusammensetzung herzustellen und so das Degradationsmedium an die chargenabhängige Aktivität, sowie die begrenzte Stabilität und damit einhergehend die Aktivitätsabnahme über die Zeit, anzupassen. Dazu wurde zunächst eine Stammlösung in Wasser hergestellt, deren volumenspezifische Enzymaktivität bestimmt wurde. Abhängig von der ermittelten Enzymaktivität wurden die entsprechenden Volumina der Stammlösung zur künstlichen Perilymphe hinzugefügt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Volumina zur Herstellung des Degradationsmediums der enzymatischen Degradation

Enzym	Zusammensetzung Stammlösung	Stammlösung pro mL künstliche Perilymphe
Lactatdehydrogenase Isoform-4 (LDH-4)	1 µL + 79 µL Wasser	5-30 µL
Lactatdehydrogenase Isoform-5 (LDH-5)	1 µL + 499 µL Wasser	15-30 µL
Butyrylcholinesterase	0,1 mg + 300 µL Wasser	8-14 µL

Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe eines photometrischen Assays und eines temperierbaren Spektralphotometers (BioMate 3S, Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland) bestimmt. Die Messungen erfolgten über einen Standard-Assay, der bei vorgegebenen Bedingungen die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit einer durch das Enzym katalysierten Reaktion verfolgt. Es wurde die Änderung der Absorption über die Zeit beobachtet und die aufgenommenen Messwerte durch lineare Regression ausgewertet. Über den ermittelten Anstieg der Absorptionsänderung pro Zeiteinheit konnte die volumenspezifische Enzymaktivität berechnet werden (Gleichung [4-1]).

$$Aktivität = \frac{\frac{\Delta Absorption}{t} \cdot V_R}{\varepsilon \cdot d \cdot V_E} \quad [4-1]$$

$$\frac{\Delta Absorption}{t} \quad \text{Änderung der Absorption pro Minute, min}^{-1}$$

$$V_R \quad \text{Reaktionsvolumen, } \mu\text{L}$$

$$\varepsilon \quad \text{substratspezifischer Extinktionskoeffizient, M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$d \quad \text{Schichtdicke der Küvette, cm}$$

$$V_E \quad \text{Volumen der zugesetzten Enzymlösung, } \mu\text{L}$$

Die Reaktionsgleichung der dem Standard-Assays zugrundeliegenden Reaktion für die Umsetzung von Natriumpyruvat mit Lactatdehydrogenase und dem Co-Faktor, der reduzierten Form des β -Nicotinamadenindinukleotid (NADH) [138], sowie die Esterspaltung von S-Butyrylthiocholiniodid (S-But) [139] katalysiert durch Butyrylcholinesterase ist in Abbildung 24 dargestellt.

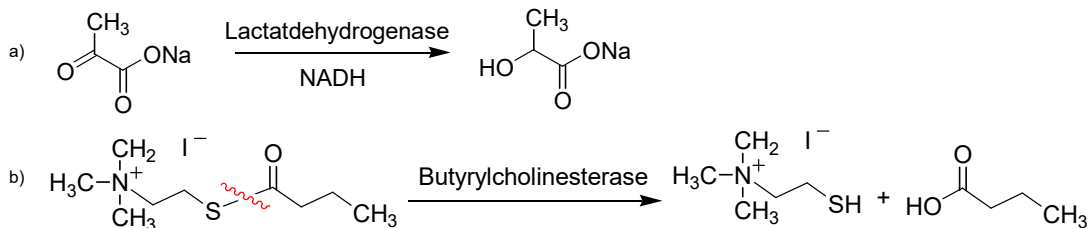


Abbildung 24: Reaktionsgleichung der Standard-Assays zur Bestimmung der Enzymaktivität von Lactatdehydrogenase (LDH) und Butyrylcholinesterase a) Umsetzung von Natriumpyruvat zu Lactat durch LDH unter Nutzung des Co-Faktors β -Nicotinamadenindinukleotid, reduzierte Form (NADH) b) Esterspaltung von S-Butyrylthiocholiniodid (S-But) katalysiert durch Butyrylcholinesterase

Es wurde für die Enzyme jeweils die Intensitätsabnahme der gemessenen Adsorption der Reaktionslösung bei einer substratspezifischen Wellenlänge beobachtet. In der folgenden Tabelle 10 sind die Testparameter für die verwendeten Standard-Assays aufgeführt.

Tabelle 10: Parameter der Standard-Assays für Lactatdehydrogenase und Butyrylcholinesterase

Enzym	Lactatdehydrogenase	Butyrylcholinesterase
Temperatur, T	25 °C	25 °C
Schichtdicke der Küvette, d	1 cm	1 cm
Wellenlänge, λ	340 nm	226 nm
c(PBS-Puffer)	0,08 mM, pH-Wert 7,6	0,08 mM, pH-Wert 7,6
c(Substrat)	10 mM	1 mM
c(Co-Faktor)	10 mM	
c(Enzymlösung)	LDH-4: 45 mU mL ⁻¹ LDH-5: 39 mU mL ⁻¹	8 U mL ⁻¹

Lactatdehydrogenase-Assay

Die volumenspezifische Enzymaktivität von LDH-4 und LDH-5 wurde zunächst für jedes Enzym einzeln und ebenso die Gesamtaktivität beider LDH zusammen im Degradationsmedium bestimmt. Für die Einzelbestimmungen wurde je ein Reaktionsgemisch aus 242,5 μL PBS-Puffer, 50 μL Natriumpyruvatlösung (Substratlösung) und 200 μL Enzymlösung in einer Quarzküvette hergestellt und durch manuelles kräftiges Schütteln vermischt. Anschließend wurde diese Lösung für ca. 15 Minuten auf 25 °C temperiert und die Reaktion durch Zugabe von 7,5 μL NADH-Lösung (Co-Faktoriösung) gestartet. Als Refe-

renz diente eine Reaktionsmischung, in der die Substrat- und Co-Substrat-Menge durch Wasser, sowie das Volumen der Enzymlösung durch künstliche Perilymphe ersetzt war. Für die Bestimmung der Gesamtaktivität im Degradationsmedium wurde ein Reaktionsgemisch aus 342,5 μL PBS-Puffer, 50 μL Substratlösung und 100 μL Degradationsmedium in einer Quarzküvette hergestellt, dieses wie oben beschrieben vermischt, temperiert und die Reaktion durch Zugabe von 7,5 μL Co-Faktorlösung gestartet. Als Referenz diente die zuvor beschriebene Lösung.

Butyrylcholinesterase-Assay

Für die volumenspezifische Enzymaktivität von Butyrylcholinesterase wurde ein Reaktionsgemisch aus 350 μL PBS-Puffer und 100 μL Enzymlösung in einer Quarzküvette hergestellt und durch kräftiges Schütteln vermischt. Anschließend wurde diese Lösung für ca. 15 Minuten auf 25 $^{\circ}\text{C}$ temperiert und die Reaktion durch Zugabe von 50 μL S-But-Lösung (Substratlösung) gestartet. Als Referenz wurde eine Reaktionsmischung, in der die Substrat-Menge durch Wasser, sowie das Volumen der Enzymlösung durch künstliche Perilymphe ersetzt war, genutzt.

Extinktionskoeffizient

Zur Berechnung der volumenspezifischen Enzymaktivität musste außerdem jeweils der substratspezifische Extinktionskoeffizient bestimmt werden. Dazu wurden unterschiedlich konzentrierte wässrige Lösungen der Substrate NADH und S-But hergestellt und bei einem zuvor ermittelten Wellenlängenmaximum die jeweiligen Absorptionen bestimmt. Die UV-VIS-Spektren der Substratlösungen ($c = 0,05 \text{ mM}$) gegen Wasser als Referenz sind in der Abbildung 25 gezeigt.

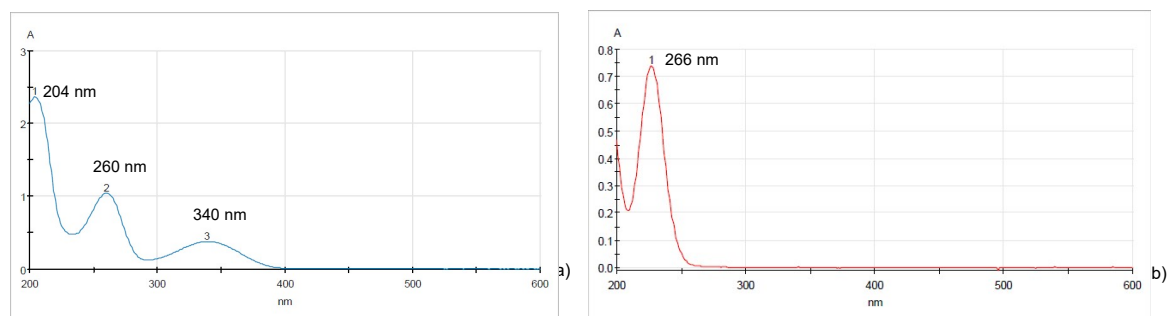


Abbildung 25: UV-VIS-Spektren von a) 0,05 mM NADH und b) 0,05 mM S-But gegen Wasser als Referenz

Die NADH-Lösung (Abbildung 25a)) wies im aufgezeichneten Wellenlängenbereich insgesamt 3 Absorptionsmaxima bei den Wellenlängen 204 nm, 260 nm und 340 nm auf.

Hingegen zeigte sich bei der S-But-Lösung (Abbildung 25b)) nur ein Absorptionsmaximum bei 266 nm.

Um den Extinktionskoeffizienten zu ermitteln, wurde für NADH eine Konzentrationsreihe mit vier Werten zwischen 0,01 mM und 0,2 mM und für S-But eine Konzentrationsreihe mit Werten von 0,01 mM bis 0,05 mM verwendet. Die bei den in Tabelle 11 aufgeführten Wellenlängen gemessenen Extinktionen (Referenz Wasser) wurden gegen die Konzentration aufgetragen.

Mit Hilfe des 1729 durch Pierre Bouguer formulierten und 1852 durch August Beer erweiterten Lambert Beer'sche Gesetz [140] (Gleichung [4-2]) wurden aus den ermittelten Werten die Extinktionskoeffizienten berechnet, die der Tabelle 11 zu entnehmen sind.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad [4-2]$$

E	Extinktion, dimensionslos
ε	Extinktionskoeffizient, $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$
c	Substratkonzentration, M
d	Schichtdicke, cm

Tabelle 11: Ermittelte Extinktionskoeffizienten von NADH und S-Butyrylcholinthioiodid

Substanz	Wellenlänge, λ [nm]	Extinktionskoeffizient, ε [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
NADH	340	5.430
S-Butyrylcholinthioiodid	266	17.666

4.4.4. Methoden zur Verfolgung der Degradation

Masseverlust

Zur Verfolgung der Degradation wurde der Masseverlust als Differenz der einzelnen Trockenmassen der Polymer-Proben vor und nach der Lagerung im Degradationsmedium ermittelt. Dazu wurden zunächst alle trockenen Polymerproben bis zur Konstanz gewogen ($n = 3$ Wiederholungen je Probe; UMX 5 Ultra-micro Balance, Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland). Nach der Lagerung im Degradationsmedium wurden die Proben wie in Kapitel 4.4.3 beschrieben gewaschen, getrocknet und dann erneut gewogen. Als Masseverlust wurde die Differenz zwischen der Trockenmasse vor der Lagerung im Degradationsmedium und der Trockenmasse nach dem Waschschrift mit Zitronensäure (1 mL, 1 Minute, 50 °C, 1 mM Zitronensäure, siehe Kapitel 4.4.3) bestimmt.

Kontaktwinkelmessungen

Eine Möglichkeit zur Charakterisierung der degradationsbedingten Oberflächenveränderungen stellen Kontaktwinkelmessungen dar (vergleiche Kapitel 4.3.2). Auch bei den

Degradationsproben erfolgte die Ermittlung des Kontaktwinkels über die Sessile-Drop-Methode. Dazu wurde auf den sich auf einem Probetisch zwischen einer diffusen Lichtquelle und einer Digitalkamera befindlichen Probekörper ein 10 μL -Tropfen Wasser bei Raumtemperatur aufgebracht. Ausgehend von der Tropfenkontur wurde mit Hilfe der Young-Laplace-Methode der Kontaktwinkel ermittelt [129]. Für weitere Untersuchungen wurden die Probekörper für 24 Stunden im Vakuumtrockenschrank (40 mbar) bei 40 °C getrocknet.

Environmental Scanning Electron Microscopy

Auch bei den Untersuchungen der Oberflächenmorphologie der Degradationsproben wurde wie bereits in Kapitel 4.3.3 beschrieben vorgegangen. Pro Entnahmezeitraum wurde je eine Probe pro Polymer und Waschvorgang untersucht, so dass pro Zeitraum vier Polymerproben jeweils beidseitig betrachtet wurden. Die Proben wurden leicht mit einem doppelseitig klebenden leitfähigen Tab auf einem Aluminium-Träger fixiert und bei 1,2 mbar Druck in einer befeuchteten Atmosphäre, einer Beschleunigungshochspannung von 10 kV und einem Detektorabstand von 10 mm mit einem Elektronenmikroskop (ESEM, Typ XL30, Fa. Philips, Eindhoven, Niederlande) begutachtet.

Gelpermeationschromatografie

Bei der Synthese von Polymeren entstehen in der Regel Polymerketten mit unterschiedlichen Kettenlängen. Es entsteht keine einheitliche molare Masse, sondern eine Molmassenverteilung [32]. Zur Bestimmung dieser kann die Gelpermeationschromatografie genutzt werden. Die Analyse der molaren Masse der Degradationsproben erfolgte unter Nutzung einer PSS SECcurity SEC-Anlage mit integriertem Brechungsindexdetektor (Polymer Standard Services GmbH, Mainz, Deutschland) kombiniert mit einem Viskositätsdetektor (ETA 2010, WGE Dr. Bures GmbH, Dallgow, Deutschland). Die Molekülgrößen-trennung erfolgte über 3 PSS SDV Säulen (10^3 , 10^5 , 10^6 Å) bei 30 °C. Als Eluent diente Chloroform mit einer Flussrate von 1 mL min^{-1} . Die trockenen Degradationsproben wurden mit einer Konzentration von 1,5 mg mL^{-1} in Chloroform mit Hexylbenzen ($c = 0,2 \mu\text{L mL}^{-1}$) als internen Standard hergestellt. Das Injektionsvolumen betrug 0,1 mL [141].

Dynamische Differenzkalorimetrie

Die dynamische Differenzkalorimetrie (engl. differential scanning calorimetry (DSC)) wurde zur Bestimmung der Kristallinität und des Schmelzpunktes der verschiedenen Degradationsproben genutzt. Dazu wurde 2-4 mg der Polymerproben in Aluminiumtiegel gegeben und diese dann mit Hilfe eines Thermosystems (FP900, Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Schweiz) in 5 °C min^{-1} -Schritten von 45 °C auf 225 °C erwärmt.

5. Ergebnisse

5.1. Charakterisierung der chemischen Oberflächenfunktionalisierung von PDMS-Probekörpern

Die schnellste Möglichkeit der Erzeugung von funktionellen Gruppen auf der PDMS-Oberfläche ist die Nutzung des Plasma-Prozesses. Abbildung 26 zeigt die Kontaktwinkel von unterschiedlich Plasma-behandelten PDMS-Scheiben. Dabei wurden das Prozessgas, die Prozessdauer und die Reaktorleistung variiert (siehe Kapitel 4.2.1).

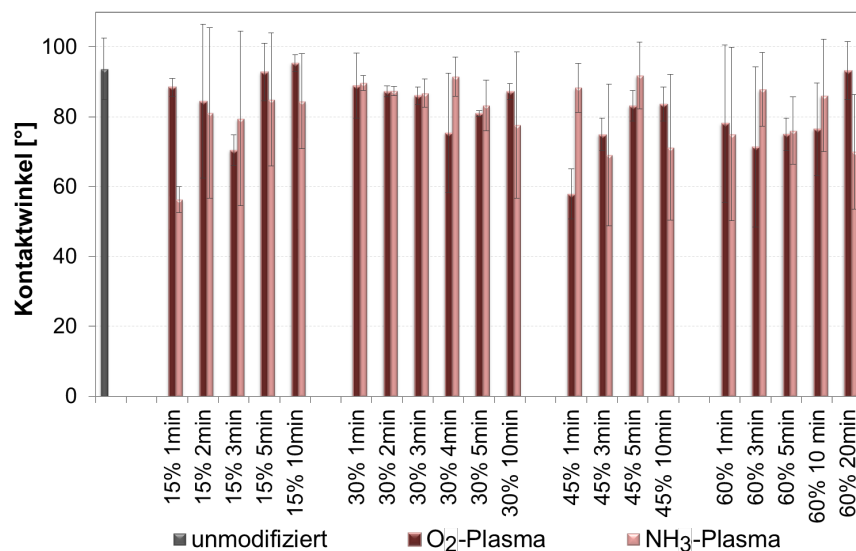


Abbildung 26: Kontaktwinkelmessungen zur Parameter-Studie von Plasma-funktionalisierten PDMS-Scheiben (d = 6 mm), n = 2, unmodifizierte PDMS-Scheibe, n = 10

Die Abbildung zeigt links den Kontaktwinkel von unmodifizierten PDMS-Scheiben ($\Theta = 93,7^\circ$) und rechts daneben sind die Kontaktwinkel der Plasma-funktionalisierten PDMS-Scheiben zu erkennen. Es sind zum Teil deutliche Schwankungen zwischen den einzelnen Kontaktwinkeln sichtbar. Eine Tendenz ist dabei nicht erkennbar. Für Sauerstoff-Plasma ist der geringste Kontaktwinkel bei einer Reaktorleistung von 45 % und einer Prozessdauer von 1 Minute ($\Theta = 57,9^\circ$) und bei Ammoniak-Plasma bei einer Reaktorleistung von 15 % und einer Prozessdauer von 1 Minute ($\Theta = 56,3^\circ$). Den größten Kontaktwinkel lieferte beim Sauerstoff-Plasma eine Reaktorleistung von 15 % mit einer Prozessdauer von 10 Minuten ($\Theta = 95,4^\circ$) und beim Ammoniak-Plasma eine Reaktorleistung von 45 % und einer Prozessdauer von 5 Minuten ($\Theta = 91,8^\circ$), welche sich beide damit nicht deutlich von dem Kontaktwinkel der unmodifizierten PDMS-Scheiben unterscheiden.

5.1.1. Aminogruppenfunktionalisierung von PDMS-Probekörpern

Die Erzeugung von Aminogruppen auf der PDMS-Oberfläche wurde auf zwei verschiedenen Wegen realisiert und die Kontaktwinkel der unmodifizierten, sowie der unterschiedlich funktionalisierten PDMS-Oberflächen wurden bestimmt (siehe Kapitel 4.2.1). Die gemittelten Kontaktwinkel der PDMS-Scheiben sind der Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Ermittelte Kontaktwinkel von unmodifizierten und funktionalisierten PDMS-Scheiben, n = 10

	Kontaktwinkel Θ [°]
unmodifiziert	93,7 ± 8,9
NH ₃ -Plasma	69,8 ± 10,5
O ₂ -Plasma	72,5 ± 5,3
O ₂ -Plasma + APTES	85,2 ± 3,2

Durch die Plasma-Behandlung konnte eine Reduzierung des Kontaktwinkels erreicht werden. Somit liegt eine hydrophilere Oberfläche im Vergleich zur unbehandelten PDMS-Oberfläche vor. Nach der nasschemischen Behandlung der Sauerstoff-Plasma-funktionalisierten PDMS-Scheiben mit APTES kam es zu einer Vergrößerung des Kontaktwinkels, also zu einer Hydrophobisierung der PDMS-Oberfläche im Vergleich zu den Plasma-behandelten Proben. Bei allen drei Oberflächen-Funktionalisierungen war bereits nach 24 Stunden keine Reduzierung des Kontaktwinkels mehr zu messen und die bestimmten Kontaktwinkel hatten sich dem Kontaktwinkel von unmodifizierten PDMS-Oberflächen wieder angenähert (Daten nicht gezeigt).

5.1.2. Polymerlayer auf PDMS-Probekörpern

Zur Charakterisierung der PDMS-Oberfläche mit Polymerlayer kamen verschiedene Verfahren zum Einsatz. Es wurden IR-Spektren von unmodifizierten PDMS-Scheiben mit IR-Spektren von PDMS-Scheiben, die einer Behandlung zur Erzeugung einer Polymerlayer unterlagen, verglichen. Außerdem wurden die Kontaktwinkel bestimmt und die Oberflächen im ESEM begutachtet.

IR-Spektroskopie

Für jede mit der IR-Spektroskopie untersuchte Probe, wurde die Intensitätsänderung der IR-Strahlung, also die Transmission in Abhängigkeit von der Wellenzahl aufgetragen. Die

Abbildung 27 zeigt die IR-Spektren von unmodifizierten PDMS-, PLLA- und P(4HB)-Scheiben, sowie die IR-Spektren von aminofunktionalisierten PDMS-Scheiben mit Polymerlayer.

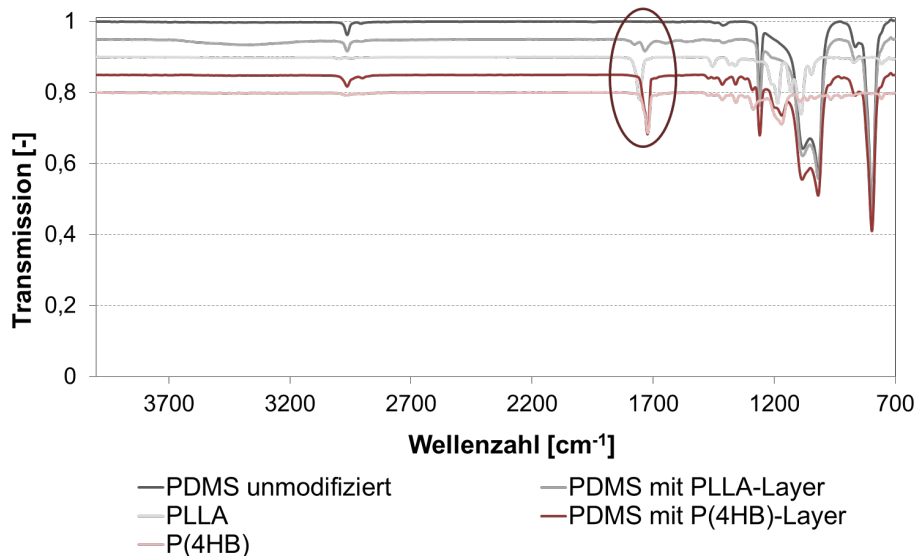


Abbildung 27: IR-Spektren von PDMS-, PLLA- und P(4HB)-Scheiben sowie PDMS-Scheiben mit PLLA- bzw. P(4HB)-Layer (je $d = 6$ mm), hervorgehoben ist das Signal der $-C=O$ -Schwingung von PLLA und P(4HB)

Die aufgezeichneten IR-Spektren unterscheiden sich voneinander gut sichtbar in 2 Signalen. Alle IR-Spektren von PDMS-Scheiben (PDMS unmodifiziert, PDMS mit PLLA-Layer und PDMS mit P(4HB)-Layer) zeigen ein deutliches Signal bei ~ 2950 cm^{-1} , das den $-CH_3$ -Gruppen des PDMS-Netzwerkes zuzuordnen ist [127]. Die Polymer-Scheiben PLLA und P(4HB) sowie die PDMS-Scheiben mit Polymer-Layer zeigen ein klares Signal einer $-C=O$ -Streckschwingung bei ~ 1750 cm^{-1} . Bei der unmodifizierten PDMS-Scheibe fehlt diese Gruppe und damit auch das Signal bei ~ 1750 cm^{-1} nicht auf.

Da das Existenz eines Signals bei ~ 1750 cm^{-1} als Indikator für das Vorhandensein einer P(4HB)-Layer auf der PDMS-Oberfläche dienen kann, wurden die Versuche zur Ankopplung einer P(4HB)-Layer an PDMS-Scheiben (Versuch 1 bis 5, Kapitel 4.2.1) entsprechend ausgewertet (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: IR-Spektren-Auswertung der Versuche zur Ankopplung einer P(4HB)-Layer an aminofunktionalisierte PDMS-Scheiben (d = 6 mm) im Hinblick auf das Vorhandensein eines Signals bei $\sim 1750 \text{ cm}^{-1}$

	Variation		Signal bei $\sim 1750 \text{ cm}^{-1}$
Versuch 1	CHCl ₃		ja
Lösungsmittelabhängigkeit	EtCl ₂		ja
	Aceton		nein
	Dimethylformamid (DMF)		ja
	DMSO		nein
	30 °C		nein
Temperaturabhängigkeit	55 °C		ja
	100 °C		ja
Versuch 3 Konzentrationsabhängigkeit	c (P(4HB)) [g L ⁻¹]	c (EDC/NHS) [g L ⁻¹]	
	1,82	0,45	ja
	18,82	0,45	ja
	18,82	1,82	ja
	18,82	4,55	ja
Versuch 4 Zeitabhängigkeit	0,5 Stunden		ja
	2 Stunden		ja
	8 Stunden		ja
	16 Stunden		ja
Versuch 5 Oberflächenfunktionalisierung	unmodifiziert		nein
	NH ₃ -Plasma		ja
	O ₂ -Plasma + APTES		ja

Die Versuche der P(4HB)-Layer-Anbindung an aminofunktionalisierten PDMS-Scheiben zeigten, dass von den fünf gewählten Lösungsmitteln (Versuch 1) nur bei drei Lösungsmitteln (CHCl₃, EtCl₂, DMF) ein Signal bei $\sim 1750 \text{ cm}^{-1}$ detektierbar war. Alle drei Lösungsmittel führten zu einer Quellung der PDMS-Scheibe, wobei CHCl₃ bereits bei Raumtemperatur zu einer starken Quellung führte, hingegen DMF und EtCl₂ erst bei höheren Temperaturen ($T > 55 \text{ °C}$, Daten nicht gezeigt). Die Untersuchung des Einflusses der Temperatur (Versuch 2) zeigte, dass die Reaktion in EtCl₂ nur bei den Temperaturen $T = 55 \text{ °C}$ und $T = 100 \text{ °C}$ zu einem Signal bei $\sim 1750 \text{ cm}^{-1}$ führten. Sowohl die Änderung der Konzentration der Reaktionspartner (Versuch 3), als auch die Dauer der Reaktion (Versuch 4) hatten keinen Einfluss auf das Vorhandensein des Signals bei ca. 1750 cm^{-1} . Bei der Beobachtung des Einflusses der Reaktionsdauer war allerdings das Signal nach einer Reaktionsdauer von 8 Stunden am stärksten ausgeprägt. Mit dem Versuch 5 wurde untersucht, ob auch ohne vorherige Aminogruppen-Funktionalisierung das für das Polymer P(4HB) typische Signal bei 1750 cm^{-1} entstand (Abbildung 28).

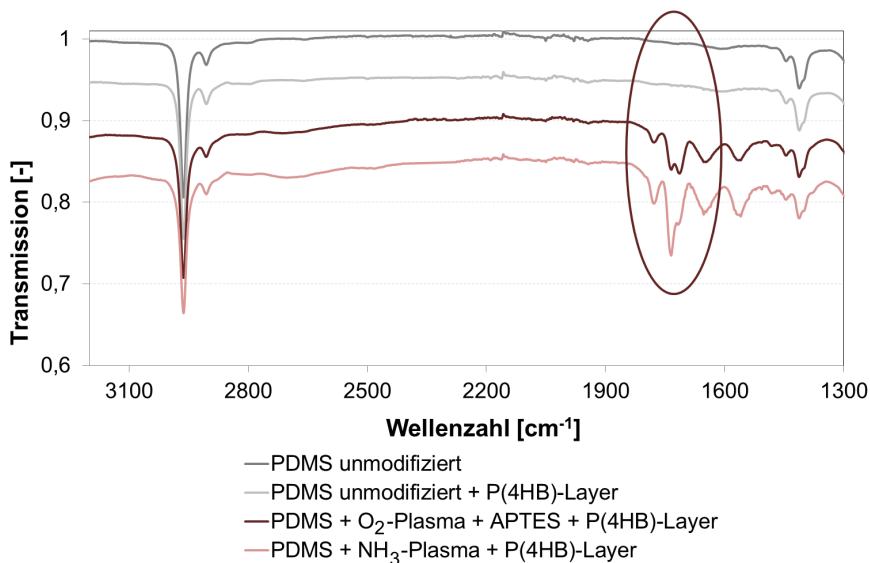


Abbildung 28: IR-Spektren von PDMS-Scheiben (modifiziert und unmodifiziert), mit P(4HB)-Layer (je d = 6 mm), hervorgehoben ist das Signal der -C=O-Schwingung von P(4HB)

Bei allen IR-Spektren ist die für die -CH₃-Gruppe des PDMS typische Schwingung bei ~2950 cm⁻¹ zu erkennen. Dagegen ist das Signal der -C=O-Gruppe bei ~1750 cm⁻¹, nur bei den zuvor aminofunktionalisierten PDMS-Scheiben (O₂-Plasma + APTES bzw. NH₃-Plasma) zu erkennen, nicht aber bei den PDMS-Proben, die eine Behandlung zur Erzeugung einer P(4HB)-Layer durchlaufen hatten, zuvor aber nicht modifiziert worden sind.

Kontaktwinkel und ESEM

Zur weiteren Charakterisierung der PDMS-Oberfläche mit Polymerlayer wurden die Kontaktwinkel der unmodifizierten und der zunächst aminofunktionalisierten und dann mit einer Polymerlayer versehenen PDMS-Scheiben bestimmt. Darüber hinaus wurden die Oberflächen der Proben im ESEM begutachtet.

Mit Polymerlayer stieg der Kontaktwinkel von $\Theta = 69,8^\circ \pm 10,5^\circ$ (nach Aminogruppenfunktionalisierung, n = 4) auf $\Theta = 89,9^\circ \pm 4,3^\circ$ (P(4HB)-Layer, n = 4) und $\Theta = 92,6^\circ \pm 16,6^\circ$ (PLLA-Layer, n = 4).

Die ESEM-Aufnahmen der unmodifizierten und modifizierten PDMS-Scheiben sind in der Abbildung 29 dargestellt.

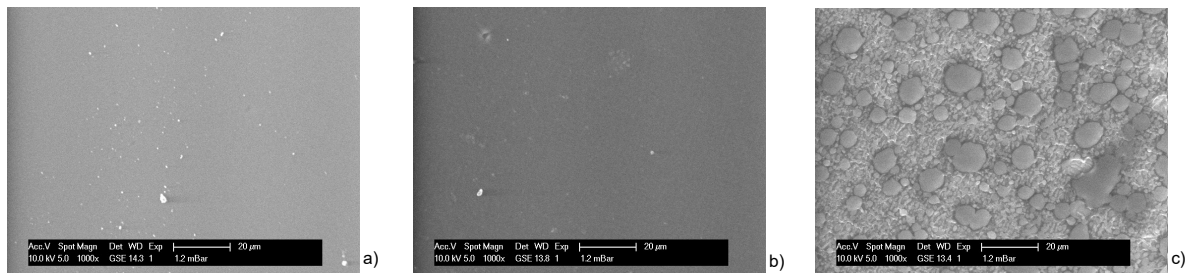


Abbildung 29: ESEM-Bilder von PDMS-Scheiben (1000-fach vergrößert); a) unmodifiziert, b) O₂-Plasma + APTES + P(4HB)-Layer, c) O₂-Plasma + APTES + PLLA-Layer

Die unmodifizierte PDMS-Scheibe (Abbildung 29a)) zeigte eine ebene, glatte Oberfläche. Bei den sichtbaren Partikeln handelte es sich lediglich um Staubpartikel auf der Oberfläche. Die mit Sauerstoff-Plasma, APTES und anschließend P(4HB)-Layer-Lösung modifizierte PDMS-Oberfläche (Abbildung 29b)) zeigte eine ebenso glatte, ebene Oberfläche und war damit von der unmodifizierten PDMS-Scheibe morphologisch nicht zu unterscheiden. Dagegen ist bei Abbildung 29c), welche die Oberfläche einer mit O₂-Plasma, APTES und anschließender PLLA-Layer-Behandlung zeigt, sehr gut die unebene Oberfläche, die aussieht, als würden kleine Halbkugeln auf der Oberfläche liegen, erkennbar. Diese Oberfläche unterscheidet sich deutlich von den beiden vorher beschriebenen.

5.2. Charakterisierung der Schichtmorphologie und Untersuchung der Schichthaftung von Polymer-Sprühschichten auf PDMS-Probekörpern

5.2.1. Begutachtung der Schichtmorphologie

Zur Begutachtung der Oberflächenmorphologie wurden ESEM-Aufnahmen beschichteter und unbeschichteter PDMS-Proben angefertigt und diese untereinander vergleichend betrachtet. Dabei wurden polymerbasierte Sprühbeschichtungen mit und ohne Dexamethason (DMS) auf PDMS-Scheiben und -Fäden, sowie auf dem Elektrodenträger eines Cochlea-Implantats untersucht.

Die folgende Abbildung 30 zeigt unmodifizierte PDMS-Proben (Abbildung 30a) und d)) und mit P(4HB) (Abbildung 30b) und e)) sowie PLLA (Abbildung 30c) und d)) beschichtete PDMS-Fäden (Abbildung 30a) bis c)) und PDMS-Scheiben (Abbildung 30d) bis f)).

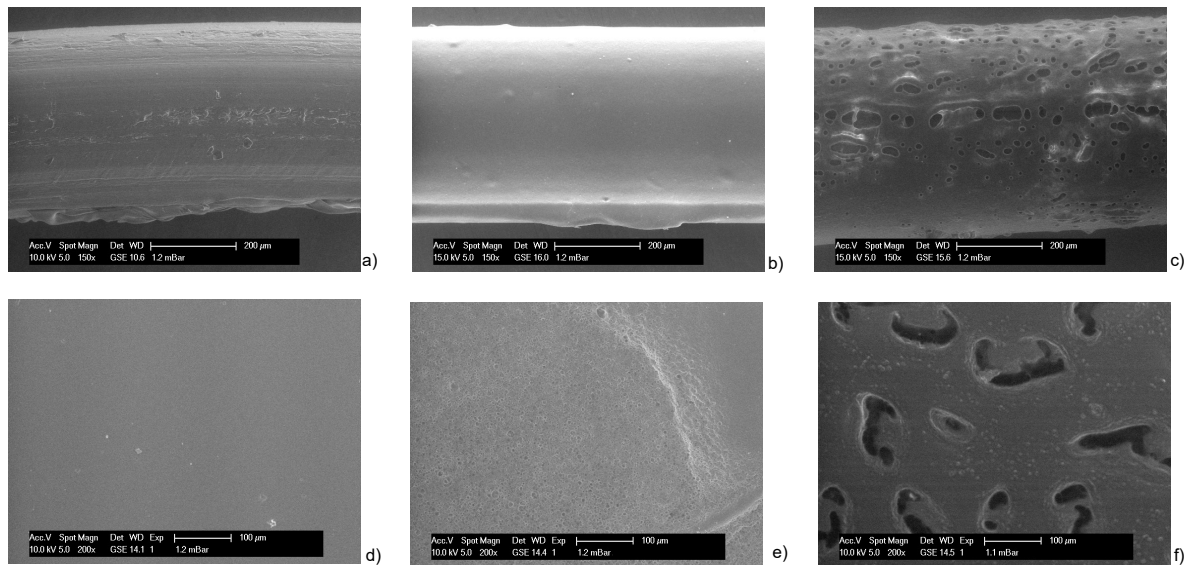


Abbildung 30: ESEM-Aufnahmen von unmodifizierten und beschichteten PDMS-Fäden (150-fache Vergrößerung) und -Scheiben (200-fache Vergrößerung), a) PDMS-Faden unmodifiziert, b) PDMS-Faden mit P(4HB)-Beschichtung, c) PDMS-Faden mit PLLA-Beschichtung, d) PDMS-Scheibe unmodifiziert, e) PDMS-Scheibe mit P(4HB)-Beschichtung, f) PDMS-Scheibe mit PLLA-Beschichtung

Die unmodifizierten PDMS-Probekörper zeigten eine glatte Oberfläche. Bei dem PDMS-Faden (Abbildung 30a)) waren Unebenheiten und Strukturen zu erkennen, die auf die Gussform, mit der dieser hergestellt wurde, zurückzuführen waren. Die Oberfläche des mit P(4HB) beschichteten PDMS-Fadens (Abbildung 30b)) war glatt und wies deutlich weniger Unebenheiten auf. Die entsprechend beschichtete PDMS-Scheibe (Abbildung 30e)) zeigte eine Aufwerfung am rechten Bildrand und eine gleichmäßige, feinstrukturierte Oberfläche. Dagegen wiesen die mit PLLA beschichteten Probekörper eine raue, unebene, löchrige Oberfläche auf (Abbildung 30c) und f)).

Neben den oben vorgestellten mit reinem Polymer beschichteten PDMS-Scheiben wurden für Freisetzungsversuche DMS enthaltende Polymerbeschichtungen hergestellt. Die Abbildung 31 zeigt im Vergleich ESEM-Aufnahmen von reinen Polymerbeschichtungen (Abbildung 31a) und d)), von Polymerbeschichtungen mit einem DMS-Gehalt von 15 % (Abbildung 31b) und e)) sowie einem DMS-Gehalt von 30 % (Abbildung 31c) und f)).

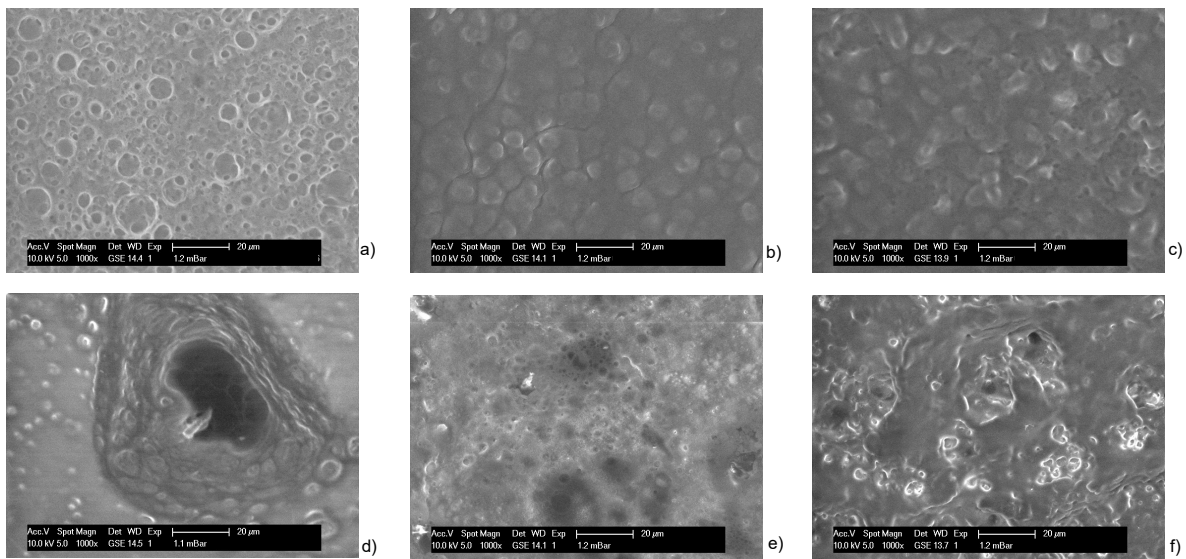


Abbildung 31: ESEM-Aufnahmen von beschichteten PDMS-Scheiben (1000-fache Vergrößerung)
a) P(4HB), b) P(4HB)/DMS 85/15 % (w/w), c) P(4HB)/DMS 70/30 % (w/w), d) PLLA,
e) PLLA/DMS 85/15 % (w/w), f) PLLA/DMS 70/30 % (w/w)

Bei der hier dargestellten, starken Vergrößerung (1000-fach) ist erkennbar, dass die reine P(4HB)-Beschichtung auf der PDMS-Scheibe (Abbildung 31a)) gleichmäßig strukturiert war. Ebenso waren auch bei den mit P(4HB)/DMS beschichteten PDMS-Scheiben (Abbildung 31b) und c)) gleichmäßige, wenn auch anders beschaffene als bei reiner P(4HB)-Beschichtung, Strukturen erkennbar. Mit höherem DMS-Gehalt wurde die Oberfläche zunehmend ungleichmäßig.

Die Oberfläche PLLA-beschichteter PDMS-Scheiben (Abbildung 31d)) wies kleine Ungleichmäßigkeiten und große Löcher mit kraterartigen Aufwölbungen um das Loch herum auf. Diese großen Löcher waren bei Beschichtungen von PLLA mit DMS nicht vorhanden. Die Oberfläche der PLLA/DMS 85/15 % (w/w)-Beschichtung (Abbildung 31e)) war uneben, ungleichmäßig und wies eine Vielzahl kleiner Löcher auf. Ähnlich ist auch die PLLA/DMS 70/30 % (w/w)-Beschichtung (Abbildung 31f)). Auch diese war sehr ungleichmäßig und uneben.

Neben den vorgestellten beschichteten PDMS-Scheiben wurde auch der Elektrodenträger eines Cochlea-Implantats mit P(4HB)/DMS 85/15 % (w/w) beschichtet. Die Oberflächenbeschaffenheit dieser Probe ist in Abbildung 32 dargestellt. Die Abbildung 32a) zeigt den Elektrodenträgerschaft, die Abbildung 32b) die Elektrodenträgerspitze und die Abbildung 32c) eine Detailaufnahme einer Elektrodenfläche im Elektrodenträger.

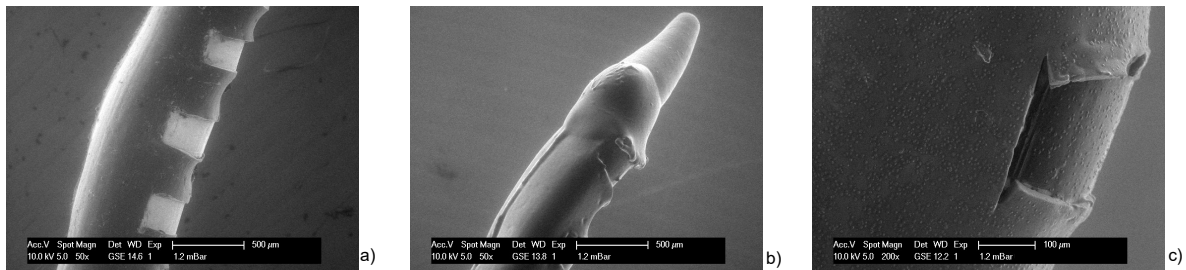


Abbildung 32: ESEM-Aufnahme eines mit P(4HB)/DMS 85/15 % (w/w)-beschichteten Cochlea-Implantat-Elektroenträgers; a) Elektroenträgerschaft (50-fach vergrößert), b) Elektroenträgerspitze (50-fach vergrößert), c) Elektrodenfläche im Elektroenträger (200-fach vergrößert)

Bei der Abbildung des Elektroenträgerschaftes (Abbildung 32a)) war deutlich der Unterschied zwischen dem eigentlichen Elektroenträger (dunkel) und den Elektrodenflächen (hell) erkennbar. Die Oberfläche der aufgetragenen Polymer-Beschichtung ist eben und glatt. Dieses ist auch bei der Abbildung der Elektroden spitze (Abbildung 32b)) zu erkennen. Auch dort ist eine Elektrodenfläche zu sehen, die sich allerdings nicht so deutlich abhebt. Bei der vergrößerten Ansicht einer Elektrodenfläche ist sehr gut die feine Strukturierung der Oberfläche der Polymer-Beschichtung erkennbar. Die Beschichtung ist gleichmäßig und sowohl auf dem Elektroenträger, als auch auf der Elektrodenfläche vorhanden.

5.2.2. Untersuchungen zur Schichthftung

Zur Untersuchung der Schichthftung wurden zwei verschiedene Versuche durchgeführt. Einerseits wurden unmodifizierte und beschichtete PDMS-Scheiben mit Hilfe des ESEM auf Ablöseerscheinungen im Grenzbereich zwischen PDMS-Oberfläche und P(4HB)-Beschichtung untersucht. Andererseits wurden mit P(4HB)/DMS 85/15 % (w/w) beschichtete Cochlea-Implantat-Elektroenträger in ein humanes Felsenbeinexplantat eingeschoben und die Schichtbeschaffenheit vor und nach der simulierten Implantation mit Hilfe des ESEM begutachtet.

Die Abbildung 33 zeigt mit P(4HB) beschichtete PDMS-Scheiben, wobei Abbildung 33a) eine PDMS-Scheibe zeigt, an die vor der Beschichtung eine P(4HB)-Layer zur Haftvermittlung angebunden wurde, während die in Abbildung 33b) gezeigte, PDMS-Scheibe vor der Beschichtung mit P(4HB) nicht modifiziert wurde.

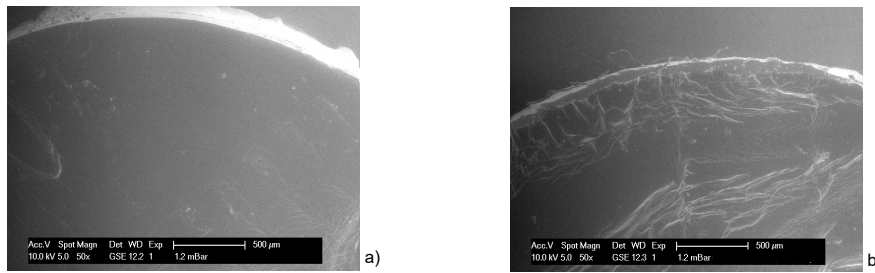


Abbildung 33: ESEM-Aufnahmen von P(4HB)-beschichteten PDMS-Scheiben (50-fache Vergrößerung), a) mit P(4HB)-Layer, b) ohne P(4HB)-Layer

Bei den beiden hier gezeigten beschichteten PDMS-Scheiben kann man sehr gut die Unterschiede im Haftverhalten der P(4HB)-Beschichtung erkennen. Die in Abbildung 33a) gezeigte vor der P(4HB)-Beschichtung mit einer P(4HB)-Layer modifizierte PDMS-Scheibe weist eine glatte, ebene Oberfläche auf, die sich offensichtlich an keiner Stelle von der PDMS-Scheibe abgelöst hat. Anders ist es bei der in Abbildung 33b) gezeigten unmodifizierten PDMS-Scheibe. Dort ist sehr gut erkennbar, dass die P(4HB)-Beschichtung nicht fest mit der PDMS-Oberfläche verbunden ist und sich im Randbereich der PDMS-Scheibe komplett abgelöst hat und über die gesamte PDMS-Scheibe verteilt eine Art Faltenbildung der Beschichtung zu erkennen ist.

Neben der gezeigten Beobachtung der Schichthaftung auf PDMS-Scheiben wurde außerdem die Haftung einer P(4HB)/DMS 85/15 % (w/w)-Beschichtung auf dem Elektroden-träger eines Cochlea-Implantats bei einer simulierten Implantation untersucht. Die dazu erstellten ESEM-Bilder sind der Abbildung 34 zu entnehmen, wobei die Abbildung 34a) und b) den beschichteten Elektroden-träger vor der simulierten Implantation in die Scala tympani eines humanen Felsenbeinexplantats zeigt und die Abbildung 34c) und d) den beschichteten Elektroden-träger nach der simulierten Implantation. Abbildung 34a) und c) zeigen dabei den vor der Beschichtung mit P(4HB)-Layer modifizierten Elektroden-träger und Abbildung 34b) und d) den unmodifiziert beschichteten Elektroden-träger.

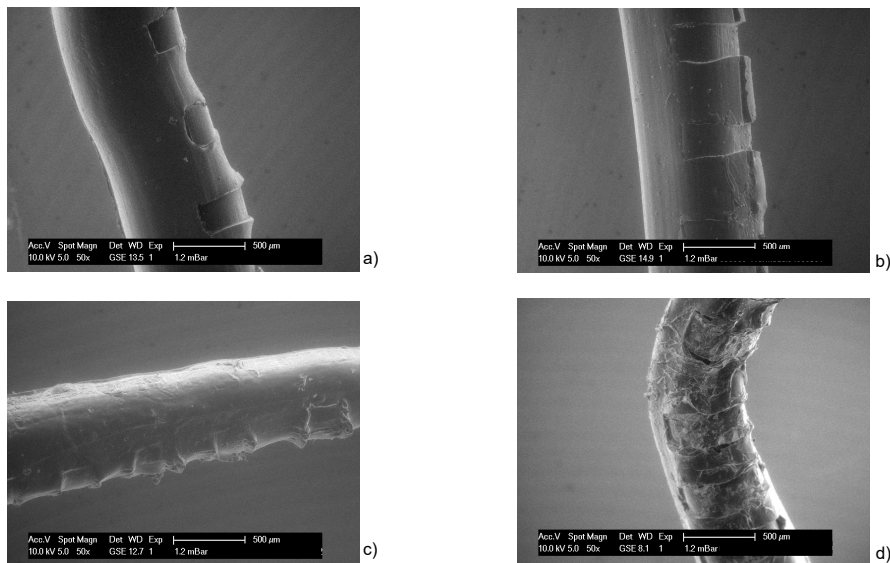


Abbildung 34: ESEM-Aufnahmen von P(4HB)/DMS 85/15 % (w/w)-beschichteten Cochlea-Implantat-Elektrodenträgern (50-fache Vergrößerung), a) mit P(4HB)-Layer vor der simulierten Implantation, b) ohne P(4HB)-Layer vor der simulierten Implantation, c) mit P(4HB)-Layer nach der simulierten Implantation, d) ohne P(4HB)-Layer nach der simulierten Implantation

Sowohl der vor der P(4HB)/DMS 85/15 % (w/w)-Beschichtung mit P(4HB)-Layer modifizierte (Abbildung 34a)), als auch der unmodifizierte Cochlea-Implantat-Elektrodenträger (Abbildung 34b)) weisen eine glatte, ebene Oberfläche auf. Ein Unterschied der Schichthaftung zwischen den beiden verschiedenen modifizierten Elektrodenträgern ist nicht erkennbar. Nach der simulierten Implantation in die Scala tympani eines humanen Felsenbeinexplantats, ist ein deutlicher Unterschied zwischen dem modifizierten und dem unmodifizierten Elektrodenträgern zu erkennen. Bei dem vor der Beschichtung modifizierten Elektrodenträger (Abbildung 34c)) ist nach der simulierten Implantation weiterhin eine intakte, ebene, gleichmäßige Beschichtung erkennbar. Lediglich Ablagerungen organischen Materials wie z.B. Zell- und Gewebereste sind vorhanden, die auch bei dem unmodifiziert beschichteten Elektrodenträger (Abbildung 34d)) erkennbar sind. Allerdings ist beim Elektrodenträger, der vor der Beschichtung mit P(4HB)/DMS 85/15 % (w/w) keine haftvermittelnde P(4HB)-Layer erhalten hat, deutlich die Ablösung der Beschichtung, vor allem an den Rändern zu den Elektrodenflächen erkennbar. Ebenso ist die bereits bei der unmodifizierten beschichteten PDMS-Scheiben (Abbildung 33b)) beobachtete Faltung der Beschichtung gut zu sehen.

5.2.3. Bestimmung der Schichtdicke

Zur weiteren Charakterisierung der P(4HB)-Beschichtung wurde ein in Harz eingegossener, beschichteter PDMS-Faden mit mehreren Schnitten zerteilt (quer

(Abbildung 35a) bis c)) und längs (Abbildung 35d) bis f))), plan geschliffen und bei diesen so erhaltenen Proben im ESEM die Schichtdicke gemessen. Es wurden bei insgesamt 13 Querschnittsbildern und 20 Längsbildern mit jeweils 2 bis 3 Messungen die Schichtdicken bestimmt und diese anschließend gemittelt.

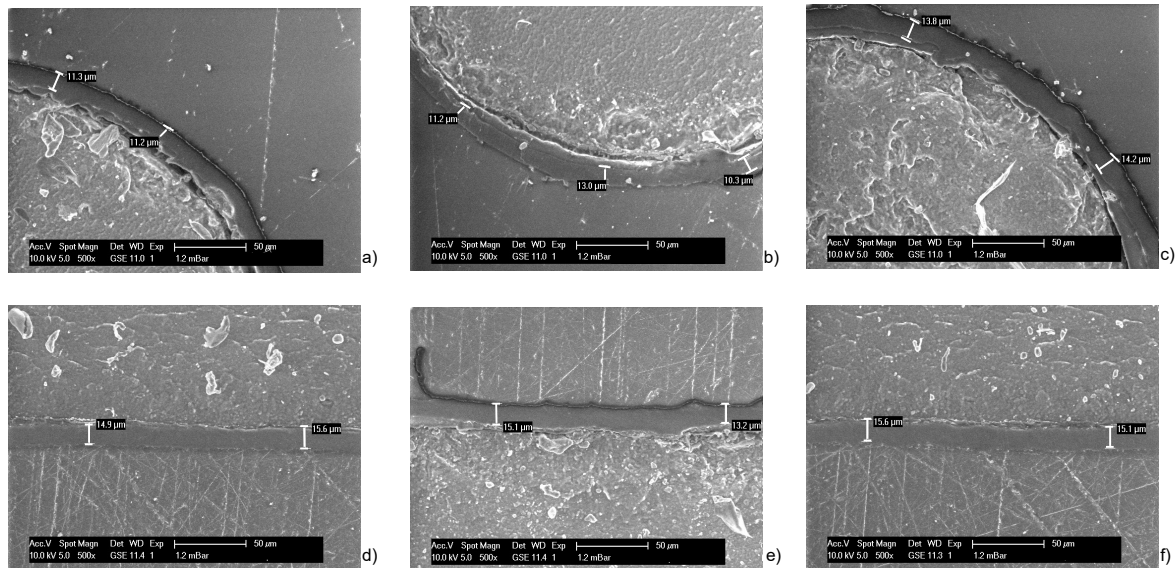


Abbildung 35: ESEM-Aufnahmen von in Harz eingegossenen mit P(4HB)-beschichteten PDMS-Fäden, a) bis c) Querschnittsbilder, d) bis f) Längsschnittbilder

Bei den hier repräsentativ dargestellten Bildern ist sehr gut die Abgrenzung zwischen dem PDMS (ungleichmäßig strukturiert mit vereinzelt Partikeln auf der Oberfläche), der P(4HB)-Beschichtung (dunkelgraue, dünne, nicht strukturierte Schicht) und dem Harz (gleichmäßig strukturiert) zu erkennen. Bei den ausgewerteten Querschnittsbildern ergab sich eine gemittelte Schichtdicke von $d = 11,9 \mu\text{m} \pm 0,8 \mu\text{m}$ ($n = 22$) und bei den Längsschnittbildern eine gemittelte Schichtdicke von $d = 12,7 \mu\text{m} \pm 0,7 \mu\text{m}$ ($n = 34$).

5.3. *In vitro* Freisetzung von Dexamethason

Mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssig-Chromatografie wurde zunächst die Stabilität von Dexamethason (DMS) im Freisetzungsmedium untersucht und anschließend die Freisetzung, über den Gehalt an DMS im Medium der zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Proben, charakterisiert. Neben der Verfolgung der *in vitro* Freisetzung von DMS aus polymeren Beschichtungen auf PDMS-Probekörpern, wurde auch die *in vitro* Freisetzungskinetik von DMS, das direkt in das PDMS inkorporiert war, verfolgt und abschließend kombinierte Probekörper, die sowohl DMS im PDMS, als auch DMS in einer P(4HB)-Beschichtung enthielten, untersucht.

5.3.1. Stabilitätsuntersuchungen von DMS

Vor dem Beginn der Freisetzungsstudien wurde die Stabilität von DMS in zwei verschiedenen Medien bei 37°C untersucht. Das waren einerseits 0,9 %-ige NaCl-Lösung, die häufig für die Simulation physiologischer Bedingungen eingesetzt wird, und andererseits künstliche Perilymphe, die dem humanen Cochlea-System nachempfunden ist. Der DMS-Gehalt der jeweiligen Lösungen wurde über ca. 700 Stunden verfolgt. Die Ergebnisse sind der Abbildung 36 zu entnehmen.

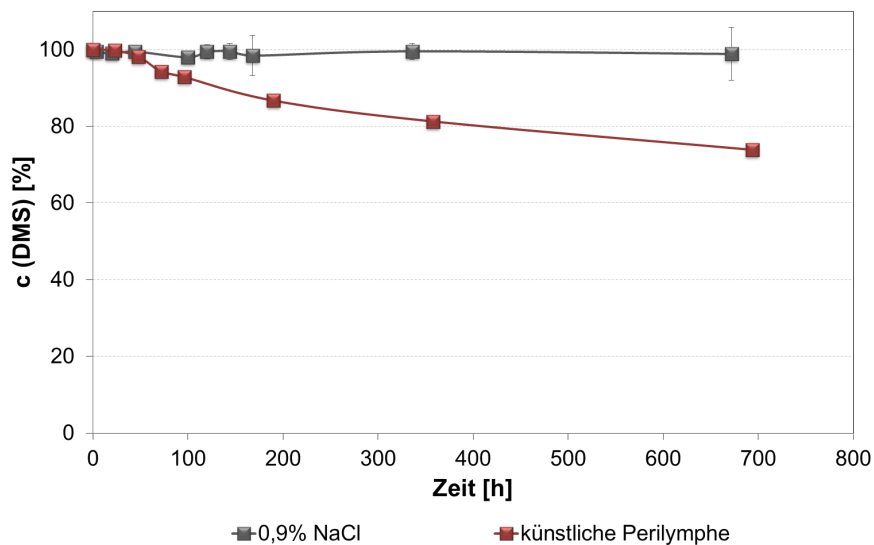


Abbildung 36: DMS-Stabilität in 0,9 %-iger NaCl-Lösung und künstlicher Perilymphe; 37°C (n = 2)

In 0,9 %-iger NaCl-Lösung konnte über den beobachteten Zeitraum keine Verringerung der DMS-Konzentration (in %) festgestellt werden. Auch nach 672 Stunden (28 Tage) lag die gemessene Konzentration bei nahezu 100 % der Ausgangskonzentration. Anders verhält sich DMS in künstlicher Perilymphe. Der DMS-Gehalt nahm stetig ab und nach 694 Stunden war die Konzentration bereits auf 74 % gesunken. Allerdings konnten mit Hilfe der HPLC über die Zeit zwei neu entstandene Signale festgestellt werden. Die Summe der beobachtbaren Peakflächen blieb über die Zeit etwa gleich groß.

5.3.2. Beobachtungen der Freisetzungskinetik von DMS aus Polymer-Beschichtungen

Die *in vitro* DMS-Freisetzung aus Polymer-Beschichtungen auf PDMS-Scheiben wurde über einen Zeitraum von etwa 400 Stunden verfolgt. Die freigesetzte DMS-Menge von jeweils 5 gleichartigen Polymer-beschichteten PDMS-Scheiben wurde gemittelt und anschließend kumulativ in der Abbildung 37 gegen die Zeit aufgetragen.

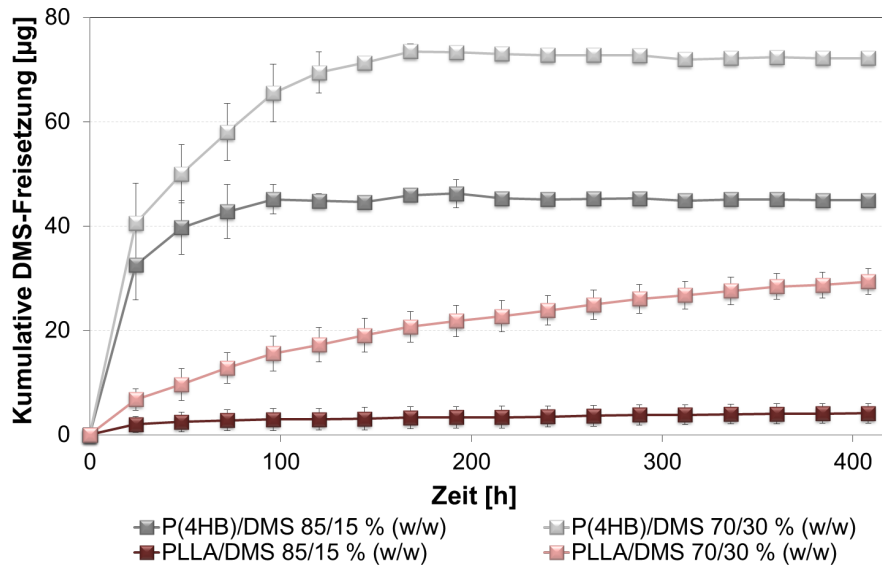


Abbildung 37: *In vitro* DMS-Freisetzung von DMS-haltigen Polymer-Beschichtungen auf PDMS-Scheiben ($d = 6$ mm) in 0,9 %iger NaCl-Lösung bei 37 °C unter quasi-stationären Bedingungen ($n = 5$)

Die in dieser Abbildung dargestellten *in vitro* Freisetzungsergebnisse zeigen sehr deutlich den Unterschied zwischen den Polymeren P(4HB) und PLLA. Innerhalb der ersten 24 Stunden wurden aus den P(4HB)/DMS-Beschichtungen bereits 33 µg (P(4HB)/DMS 85/15 % (w/w)) bzw. 41 µg (P(4HB)/DMS 70/30 % (w/w)) freigesetzt. Dieses entsprach 61 % (P(4HB)/DMS 85/15 % (w/w)) bzw. 46 % (P(4HB)/DMS 70/30 % (w/w)) der gesamten in der Polymer-Beschichtung enthaltenen DMS-Menge. Die deutlich mehr DMS-enthaltende P(4HB)/DMS-Beschichtung (P(4HB)/DMS 70/30 % (w/w)) zeigte diesen starken Burst-Release noch über weitere Tage. Es wurde eine maximale DMS-Freisetzung von 44 µg (P(4HB)/DMS 85/15 % (w/w)) erreicht, was 85 % der gesamten in der Polymer-Beschichtung enthaltenen DMS-Menge entsprach. Aus der P(4HB)/DMS 70/30 % (w/w)-Beschichtung konnten sogar 72 µg was 82 % des gesamten DMS-Gehalts entsprach, freigesetzt werden. Danach war keine weitere Wirkstoff-freisetzung mehr nachweisbar.

Die Freisetzung aus PLLA erfolgte hingegen sehr viel langsamer. Nach 24 Stunden waren bei diesem Polymer 2 µg (PLLA/DMS 85/15 % (w/w)) und 7 µg (PLLA/DMS 70/30 % (w/w)) freigesetzt worden. Es erfolgte über die nächsten Tage nur ein sehr langsamer, aber stetiger, fast linearer Anstieg der freigesetzten DMS-Menge. Nach dem Beobachtungszeitraum von 408 Stunden waren 6 µg (PLLA/DMS 85/15 % (w/w)) bzw. 29 µg (PLLA/DMS 70/30 % (w/w)) freigesetzt. Dieses entsprach lediglich 10 % (PLLA/DMS 85/15 % (w/w)) bzw. 37 % (PLLA/DMS 70/30 % (w/w)) der in der Beschichtung enthaltenen DMS-Menge. Der

Kurvenverlauf deutet darauf hin, dass die Freisetzung auch über den beobachteten Zeitraum von 408 Stunden hinaus anhalten würde.

5.3.3. Freisetzungverlauf von Dexamethason aus PDMS

Neben den DMS-enthaltenden polymeren Beschichtungen auf PDMS-Scheiben, wurde DMS direkt in das PDMS inkorporiert. Es wurden DMS-haltige Scheiben und Fäden hergestellt, über einen Zeitraum von etwa 1000 Stunden die Wirkstofffreisetzung beobachtet und die ermittelten kumulativ freigesetzten DMS-Mengen in der Abbildung 38 gegen die Zeit aufgetragen.

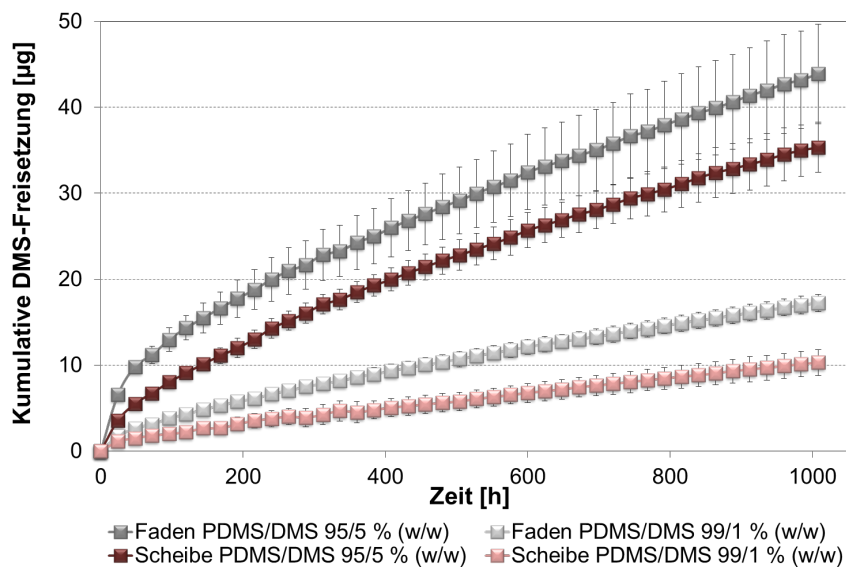


Abbildung 38: *In vitro* DMS-Freisetzung von DMS-haltigen PDMS-Probekörpern (Scheiben ($d = 6 \text{ mm}$) und Fäden ($l = 40 \text{ mm}$, $d = 0,3 \text{ mm}$)) in 0,9 %-iger NaCl-Lösung bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ unter quasi-stationären Bedingungen ($n = 5$)

Die hier dargestellte kumulative DMS-Freisetzung aus PDMS-Scheiben und PDMS-Fäden zeigt bei den Probekörpern mit höherem DMS-Gehalt (PDMS/DMS 95/5 % (w/w)) einen im Vergleich zu den Probekörpern mit geringerem DMS-Gehalt (PDMS/DMS 99/1 % (w/w)) starken Burst-Release. Es konnte bei allen Probekörpern eine kontinuierliche Freisetzung von DMS im beobachteten Zeitraum festgestellt werden. Die bis zum Ende des Beobachtungszeitraums freigesetzte prozentuale DMS-Menge ist der Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 14: Prozentual nach 1008 Stunden freigesetzte DMS-Menge aus DMS-haltigen PDMS-Probekörpern (n = 5)

Probekörper	Kumulativ freigesetzte DMS-Menge [%]
Faden PDMS/DMS 95/5 % (w/w)	9,5 ± 1,3
Faden PDMS/DMS 99/1 % (w/w)	18,6 ± 1,0
Scheibe PDMS/DMS 95/5 % (w/w)	1,9 ± 0,4
Scheibe PDMS/DMS 99/1 % (w/w)	5,3 ± 1,5

Anhand dieser Werte ist sehr gut erkennbar, dass im Beobachtungszeitraum von 1008 Stunden nur eine sehr geringe Menge des in den Probekörpern inkorporierten DMS freigesetzt wurde. Bei den DMS-beladenen PDMS-Fäden konnten bis zu etwa 20 % (PDMS/DMS 99/1 % (w/w)) des enthaltenen DMS freigesetzt werden. Aus den PDMS-Scheiben wurden nur maximal ca. 5 % (PDMS/DMS 99/1 % (w/w)) freigesetzt.

5.3.4. Verfolgung der kombinierten Dexamethason-Freisetzung aus PDMS und P(4HB)-Beschichtungen

Die einzeln untersuchten Freisetzungskonzepte (Freisetzung von DMS aus einer polymeren Beschichtung und Freisetzung aus dem PDMS-Grundkörper) wurden darüber hinaus in einem Probekörper vereint. Dazu wurde auf eine DMS-enthaltende PDMS-Scheibe eine P(4HB)/DMS-Beschichtung aufgebracht. In Abbildung 39 sind exemplarisch die Freisetzungprofile von einzelnen DMS-beladenen Probekörpern als kumulative DMS-Menge in dem beobachteten Freisetzungszeitraum von über ca. 400 Stunden dargestellt.

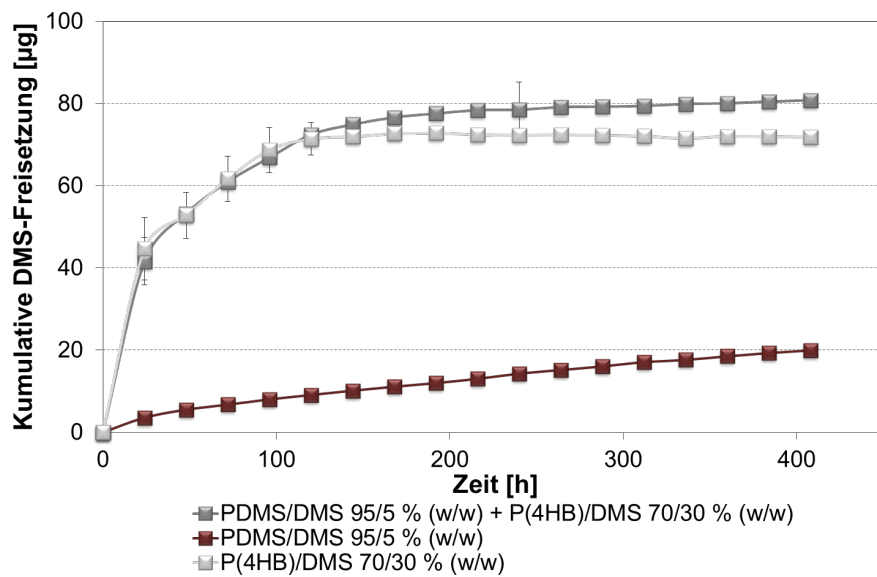


Abbildung 39: *In vitro* DMS-Freisetzung von DMS-haltigen und zusätzlich beschichteten PDMS-Scheiben ($d = 6$ mm), von DMS-haltigen PDMS-Scheiben (95/5 %) und DMS-enthaltenen P(4HB)-Beschichtungen (70/30 %) in 0,9 %-iger NaCl-Lösung bei 37 °C unter quasi-stationären Bedingungen ($n = 5$)

Bei der hier gezeigten Abbildung sind die beiden bereits vorgestellten Freisetzungsprofile von PDMS/DMS 95/5 % (w/w) und PDMS mit P(4HB)/DMS 70/30 % (w/w)-Beschichtung erkennbar. PDMS/DMS 95/5 % (w/w) setzte das DMS langsam aber stetig frei und bei der P(4HB)/DMS 70/30 % (w/w)-Beschichtung fand ein starker Burst-Release innerhalb der ersten Tage statt. Das dritte dargestellte Freisetzungsprofil gehört zu den Probekörpern, bei denen sowohl DMS im PDMS inkorporiert als auch eine P(4HB)/DMS-Beschichtung aufgebracht war. Bei diesem Freisetzungsprofil war ein starker Burst-Release erkennbar und der Kurvenverlauf zeigte sich bis 120 Stunden identisch mit dem Kurvenverlauf der P(4HB)/DMS-Beschichtung. Danach war ein weiterer stetiger, langsamer Anstieg der freigesetzten DMS-Menge erkennbar und ab ca. 264 Stunden verlief das Freisetzungsprofil der kombinierten Proben nahezu parallel zu dem Freisetzungsprofil der PDMS/DMS-Proben.

Die kombinierten Proben, bei denen sowohl DMS im PDMS-Grundkörper als auch in einer P(4HB)-Beschichtung enthalten waren, wurden im Folgenden im Hinblick auf eine Langzeitfreisetzung über etwa 42 Wochen untersucht. Dazu wurden unterschiedlich beladene PDMS/DMS-Scheiben (95/5 % und 99/1 % (w/w)) mit den unterschiedlichen P(4HB)/DMS-Beschichtungen kombiniert (70/30 % und 85/15 % (w/w)). Die erhaltenen Freisetzungsprofile dieser insgesamt vier verschiedenen Probekörper sind in der Abbildung 40 dargestellt.

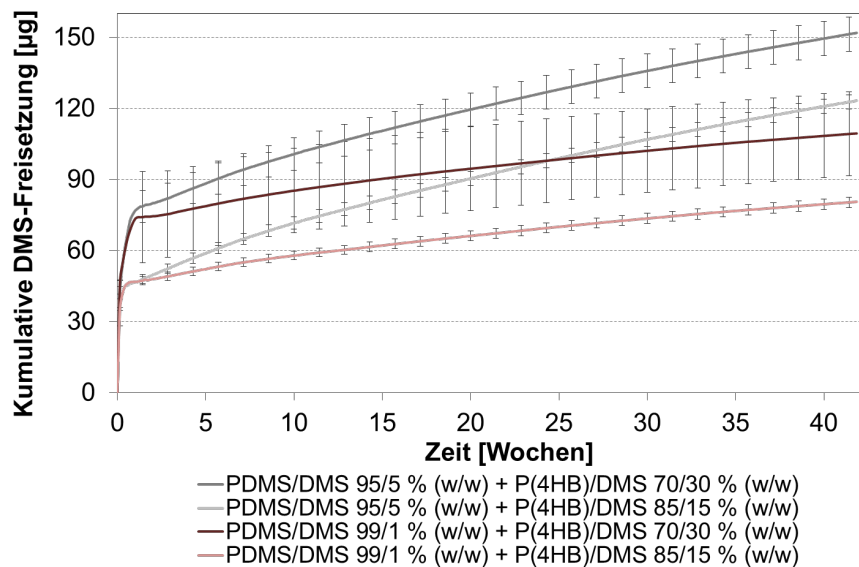


Abbildung 40: *In vitro* DMS-Freisetzung von DMS-haltigen und zusätzlich beschichteten PDMS-Scheiben ($d = 6 \text{ mm}$, $n = 5$) in 0,9 %-iger NaCl-Lösung bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ unter quasi-stationären Bedingungen

Bei allen hier dargestellten Freisetzungprofilen war der starke Burst-Release innerhalb der ersten Tage gut erkennbar. Innerhalb der ersten 4 Tage verliefen die Proben mit gleicher P(4HB)/DMS-Beschichtung identisch. Danach wurde jeweils aus den Probekörpern, die im PDMS eine höhere DMS-Beladung hatten (PDMS/DMS 95/5 % (w/w)), deutlich mehr DMS freigesetzt als aus den Probekörpern mit geringerem DMS-Gehalt (PDMS/DMS 99/1 % (w/w)). Nach einem Freisetzungszeitraum von 2 Wochen verlief das Freisetzungprofil der jeweils gleich beladenen PDMS/DMS-Probekörper parallel zueinander. Der Beobachtungszeitraum endete nach etwa 42 Wochen, wobei der Kurvenverlauf vermuten lässt, dass die Freisetzung des inkorporierten DMS sich noch deutlich länger fortsetzen ließe. Daher wurde aus den aufgenommenen Daten der Zeitpunkt extrapoliert nach dem das DMS-Depot erschöpft wäre (Zeitpunkt der Freisetzung von 100 % DMS). Dieses sowie die tatsächlich zum Ende der 42 Wochen freigesetzte Menge von DMS sind der Tabelle 15 zu entnehmen.

Tabelle 15: Freisetzung von beschichteten, DMS-haltigen PDMS-Scheiben (d = 6 mm, n = 5) nach 42 Wochen und extrapolierter Zeitpunkt der Depoterschöpfung

Probekörper	Kumulativ freigesetzte DMS-Menge nach 42 Wochen [µg]	Kumulativ freigesetzte DMS-Menge nach 42 Wochen [%]	Theoretisch nötiger Zeitraum für die Freisetzung von 100 % der inkorporierten DMS-Menge [Monate]
A: PDMS/DMS 95/5 % (w/w) P(4HB)/DMS 70/30 % (w/w)	151,8 ± 7,2	18,5 ± 1,5	35,5
B: PDMS/DMS 95/5 % (w/w) P(4HB)/DMS 85/15 % (w/w)	123,2 ± 3,1	15,0 ± 1,7	35,9
C: PDMS/DMS 99/1 % (w/w) P(4HB)/DMS 70/30 % (w/w)	109,3 ± 17,7	48,9 ± 7,1	14,8
D: PDMS/DMS 99/1 % (w/w) P(4HB)/DMS 85/15 % (w/w)	80,5 ± 2,2	40,7 ± 2,8	16,1

Die in dieser Tabelle dargestellten Werte zeigen sehr deutlich, dass mit sinkendem DMS-Gehalt der Probekörper (A < B < C < D) auch die kumulativ freigesetzte DMS-Menge nach 42 Wochen sinkt. Wird dieses prozentual betrachtet, ist zu erkennen, dass dies nur ca. 15 % - 50 % der in den Probekörpern enthaltenen DMS-Menge entspricht. Die auf Basis dieser Werte durchgeführte Extrapolation zur Bestimmung des Zeitpunktes der Erschöpfung des DMS-Depots zeigte, dass sich mit Hilfe der gewählten Probenmatrix ein DMS-freisetzendes Depot erzeugen lässt, dass bis zu maximal etwa 36 Monate DMS freisetzt.

5.4. *In vitro* Freisetzung des Wachstumsfaktors Brain-derived neurotrophic factor

Sämtliche Nachweise des Wachstumsfaktor Brain-derived neurotrophic factor wurden mit Hilfe eines Enzyme-linked Immunosorbent Assays geführt. Zunächst wurde die Stabilität von BDNF in verschiedenen Medien untersucht, anschließend die Oberflächenbeladung von PDMS- und Polymer-Scheiben mit BDNF bestimmt und zum Schluss die Freisetzungsscharakteristik ermittelt.

5.4.1. Stabilitätsuntersuchungen von BDNF

Zur Stabilitätsuntersuchung von BDNF wurden Lösungen mit einer Konzentration von jeweils 1 µg mL⁻¹ in verschiedenen Medien hergestellt und dieses sofort nach Zugabe

sowie nach 24 Stunden bei Raumtemperatur bzw. 37 °C gelagert und dann mit Hilfe eines ELISA vermessen. Als Medien kamen die während der Ankopplung und dem Nachweis von BDNF mit ELISA genutzten Medien zum Einsatz (Wasser, NaAc-Puffer, Diluenten des ELISA-Kit). Außerdem wurde die Stabilität in den zur Simulation einer Freisetzung unter physiologischen Bedingungen häufig genutzten Lösungen wässrige NaCl, PBS und künstliche Perilymphe untersucht. Die Ergebnisse in der Tabelle 16 zeigen jeweils die nach 24 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur bzw. 37 °C gemessenen, prozentual zur Ausgangskonzentration angegebenen BDNF-Mengen.

Tabelle 16: Stabilitätsuntersuchungen von BDNF (je 1 µg mL⁻¹) nach jeweils 24 Stunden bei Raumtemperatur (RT) und 37 °C

	BDNF-Konzentration nach 24 Stunden Lagerung bei RT [%]	BDNF-Konzentration nach 24 Stunden Lagerung bei 37 °C [%]
Künstliche Perilymphe	72,4 ± 2,2	1,7 ± 0,7
0,08 mM PBS	79,4 ± 10,6	22,6 ± 8,5
0,9 %-ige NaCl	86,9 ± 5,2	19,4 ± 1,5
100 mM NaAc	23,5 ± 13,7	n.b.
Wasser	15,3 ± 1,0	1,4 ± 0,3
Diluent B aus dem ELISA-Kit	16,1 ± 0,4	1,9 ± 0,2
Diluent A aus dem ELISA-Kit	11,9 ± 1,2	6,5 ± 0,6

n.b. nicht bestimmt

Aus dieser Tabelle ist sehr gut erkennbar, dass bei einer Lagerung von BDNF bei 37 °C nach 24 Stunden bei allen Medien eine geringere Konzentration vorhanden war als bei der Lagerung bei Raumtemperatur. Die nach 24 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur nachzuweisenden BDNF-Konzentrationen waren stark vom Medium abhängig. So konnten bei der Lagerung in Wasser sowie in den Diluenten A und B aus dem ELISA-Kit nur ca. 10 % bis 15 % der Ausgangskonzentration des BDNF nachgewiesen werden. Eine etwas höhere BDNF-Konzentration nach 24 Stunden konnte bei der Lagerung in 100 mM NaAc festgestellt werden. Eine deutlich höhere Konzentration wurde bei der künstlichen Perilymphe und PBS festgestellt (> 70 %). Die höchste Konzentration nach 24 Stunden von ca. 85 % der Ausgangskonzentration wurde bei der Lagerung von BDNF in 0,9 %-iger NaCl-Lösung bei Raumtemperatur nachgewiesen.

Die drei bereits untersuchten, häufig für Freisetzungsversuche genutzten Medien wässrige NaCl, PBS und künstliche Perilymphe wurden für eine weitere Versuchsreihe mit den stabilisierend wirkenden Substanzen BSA und Tween 80 versetzt und die Stabilität von

BDNF nach 24 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur überprüft. Die mit Hilfe des ELISA ermittelten prozentual zur Ausgangskonzentration angegebenen Konzentrationen nach 24-stündiger Lagerung sind in der Abbildung 41 dargestellt.

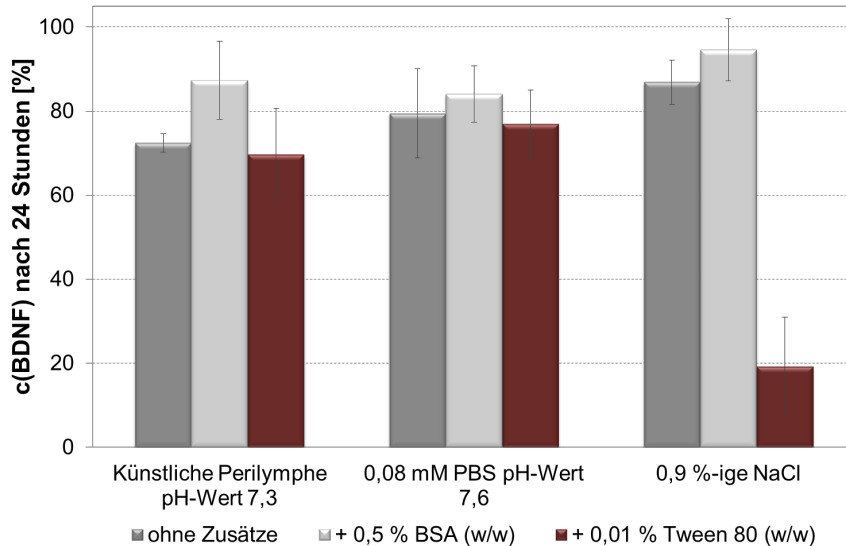


Abbildung 41: Stabilität von BDNF ($c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$) in verschiedenen Medien mit und ohne Zusatz von stabilisierenden Substanzen nach 24 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur ($n = 3$)

Aus den hier dargestellten Werten lässt sich sehr gut erkennen, dass bei den untersuchten Medien die Zugabe von Tween 80 nicht zu einer höheren Konzentration von BDNF nach Lagerung bei Raumtemperatur im Vergleich zu der Lagerung in den Medien ohne Zusätze führte. Die Werte waren ähnlich und bei 0,9 %-iger NaCl-Lösung sogar deutlich geringer als die Werte der Lagerung des BDNF in den Medien ohne Zusätze. Anders verhielt es sich mit dem Zusatz von BSA. Bei den untersuchten Medien mit BSA war nach Lagerung bei Raumtemperatur eine höhere BDNF-Konzentration im Vergleich zu den Medien ohne Zusätze erkennbar. Die höchste verbliebene Konzentration, bei der nach 24-stündiger Lagerung noch etwa 95 % des zu Beginn der Untersuchungen vorhandenen BDNF nachgewiesen werden konnten, zeigte die 0,9 %-ige NaCl-Lösung mit dem Zusatz von 0,5 % BSA.

5.4.2. Beladung von PDMS- und Polymer-Scheiben mit BDNF

Adsorption von BDNF

Für die Adsorption von BDNF wurden unmodifizierte und oberflächenaktivierte PDMS- und Polymer-Scheiben wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben in einer $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ BDNF-Lösung inkubiert und das oberflächlich adsorbierte BDNF mit Hilfe eines

ELISA (Kapitel 4.3.7) nachgewiesen. Die erhaltenen Werte sind in der Abbildung 42 dargestellt.

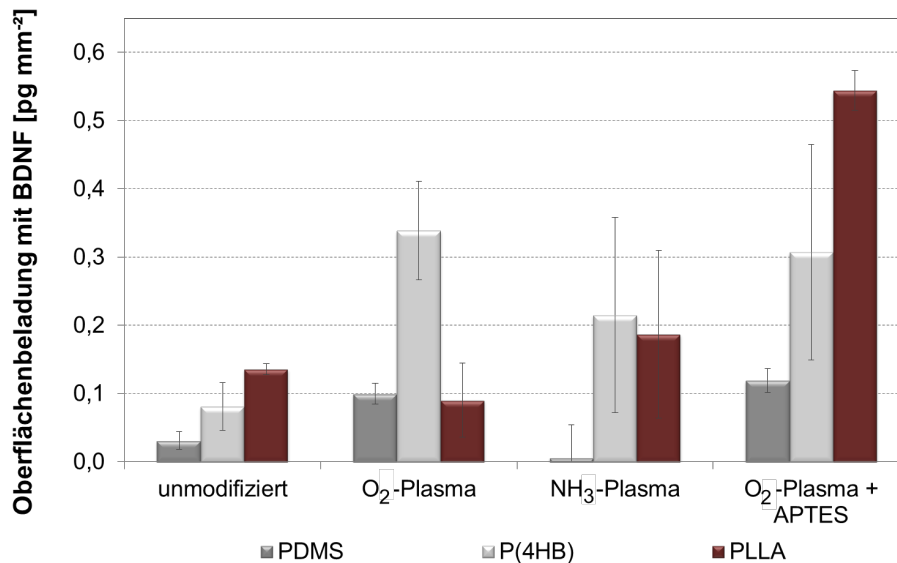


Abbildung 42: Beladung von unmodifizierten und oberflächenaktivierten PDMS- und Polymer-Scheiben (d = 6 mm) mit BDNF (n = 3)

Es ist sehr gut erkennbar, dass sowohl die Art der Polymere, als auch die unterschiedlichen Aktivierungen der Oberflächen einen Einfluss auf die Beladung mit BDNF hatten. Die unmodifizierten PDMS-, P(4HB)- und PLLA-Oberflächen zeigten eine Erhöhung der Beladung beginnend bei PDMS (0,03 pg mm⁻²) über P(4HB) (0,08 pg mm⁻²) bis zu PLLA (0,14 pg mm⁻²). Die geringste Oberflächenbeladung lag bei PDMS-Oberflächen vor. Dieses zeigte sich auch bei den Aktivierungen. Nach der Aktivierung der PDMS-Oberfläche mit NH₃-Plasma zeigte sich eine geringere Beladung mit BDNF (0,01 pg mm⁻²) als bei der unmodifizierten PDMS-Oberfläche. Dagegen bewirkte die Aktivierungen der PDMS-Oberfläche mit O₂-Plasma und O₂-Plasma + APTES jeweils eine höhere Beladung (ca. 0,10 pg mm⁻²) als bei der unmodifizierten PDMS-Oberfläche. Die P(4HB)-Oberfläche zeigte bei allen Aktivierungen eine Erhöhung der Oberflächenbeladung mit BDNF im Vergleich zum unmodifizierten Material. Die Aktivierung mit O₂-Plasma ergab die größte BDNF-Beladung (0,34 pg mm⁻²) der P(4HB)-Oberfläche. Dagegen zeigte gerade diese Aktivierung bei PLLA-Oberflächen die geringste Beladung, die mit 0,09 pg mm⁻² sogar geringer war als bei der unmodifizierten PLLA-Oberfläche. Bei diesem Polymer war die größte Oberflächenbeladung mit BDNF bei den mit O₂-Plasma + APTES aktivierten Proben (0,54 pg mm⁻²) festzustellen. Dieses war auch die größte Oberflächenbeladung, die im Vergleich aller untersuchten Proben festgestellt werden konnte.

BDNF-Beladung von DSS-modifizierten P(4HB)-Scheiben

Im Hinblick auf die Oberflächenmodifizierung mit Crosslinkern wurde untersucht, wie sich die Beladung mit BDNF ändert, wenn der exemplarisch ausgewählte Crosslinker DSS an verschiedenen oberflächenaktivierten P(4HB)-Scheiben angekoppelt wird und diese mit BDNF inkubiert werden. Untersucht wurden sowohl plasmachemisch als auch nasschemisch aktivierte P(4HB)-Oberflächen, wobei jeweils stickstoff- bzw. sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen auf der Oberfläche zur Anbindung des DSS erzeugt wurden. Die über einen ELISA ermittelten Oberflächenbeladungen dieser DSS-modifizierten P(4HB)-Scheiben ist in der Abbildung 43 dargestellt. Dabei ist jeweils die BDNF-Beladung von Proben ohne DSS den entsprechenden Proben mit DSS-Modifikation gegenübergestellt.

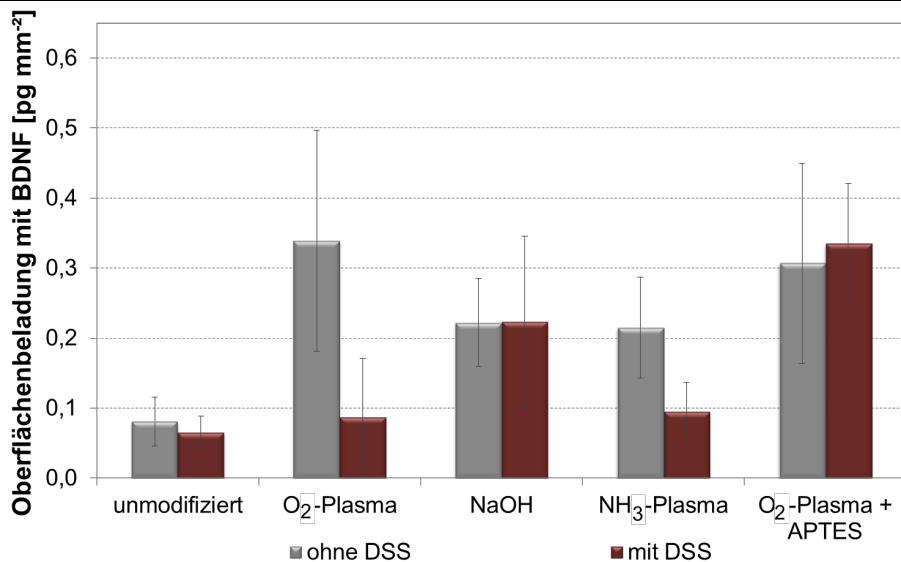


Abbildung 43: Beladung von unmodifizierten, oberflächenaktivierten und DSS-modifizierten P(4HB)-Scheiben (d = 6 mm) mit BDNF (n = 3)

Die hier dargestellten nicht mit DSS modifizierten P(4HB)-Scheiben zeigten erneut (vergleiche auch Abbildung 42), dass die oberflächenaktivierten P(4HB)-Scheiben eine höhere BDNF-Beladung aufwiesen als die unmodifizierte Oberfläche. Die zusätzlich mit DSS modifizierten P(4HB)-Scheiben zeigten für die unmodifizierten, mit NaOH und mit O₂-Plasma + APTES aktivierten Proben praktisch keinen Unterschied in der BDNF-Beladung der Oberfläche im Vergleich zu den entsprechenden Proben ohne DSS. Dagegen wiesen die mit O₂-Plasma und NH₃-Plasma aktivierten und anschließend mit DSS modifizierten Proben eine geringere BDNF-Beladung auf als die entsprechenden Proben ohne DSS.

BDNF-Beladung von Crosslinker-modifizierten Polymer-Scheiben

Eine für die spätere Freisetzung von BDNF nutzbare, hydrolytisch spaltbare Bindung kann unter anderem durch eine Crosslinkermodifizierung O₂-Plasma-aktivierter Oberflächen

generiert werden. Vor der Freisetzung wurde die BDNF-Beladung der O₂-Plasma-aktivierten P(4HB)- und PLLA-Scheiben mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Die BDNF-Beladungen von P(4HB)- und PLLA-Oberflächen, die mit verschiedenen Crosslinkern modifiziert wurden, sind in der Abbildung 44 dargestellt.

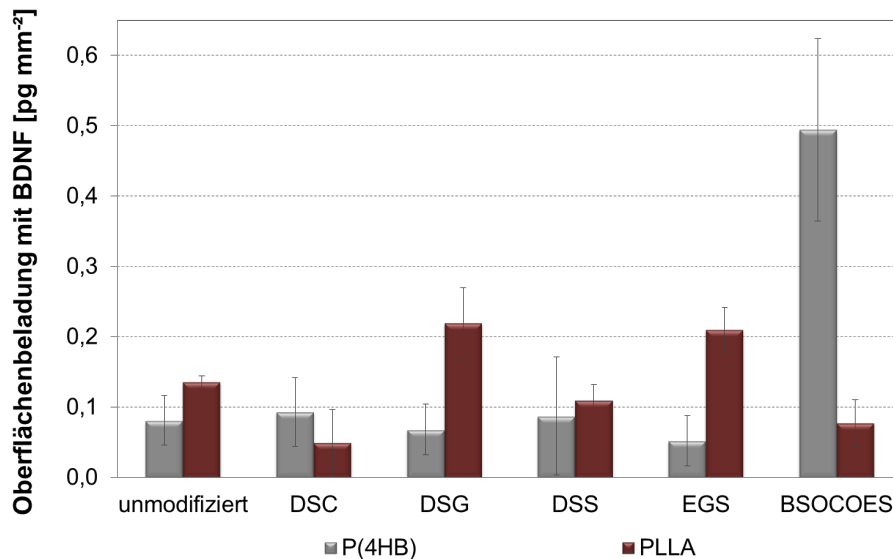


Abbildung 44: BDNF-Beladung von unmodifizierten und Crosslinker-modifizierten P(4HB)- und PLLA-Scheiben (d = 6 mm) (n = 3)

Bei P(4HB)-Oberflächen, die mit den Crosslinkern DSC, DSG, DSS bzw. EGS modifiziert wurden, war im Vergleich zu der unmodifizierten P(4HB)-Oberfläche kein Unterschied erkennbar. Die mit BSOEES modifizierte Oberfläche hingegen wies eine 5-fach höhere Beladung mit BDNF auf (0,5 pg mm⁻²) als die zuvor benannten. Bei den untersuchten PLLA-Oberflächen gab es keine so extremen Änderungen der Oberflächenbeladung mit BDNF. Die mit den Crosslinkern DSC und BSOEES modifizierten Oberflächen wiesen eine verringerte Beladung (ca. 0,06 pg mm⁻²) im Vergleich zur unmodifizierten PLLA-Oberfläche (0,14 pg mm⁻²) auf. Die DSS-modifizierte Oberfläche zeigte einen etwa gleich großen Wert der Beladung mit BDNF wie die unmodifizierte Oberfläche. Nach der Modifizierungen mit DSG und ESG konnten im Vergleich zur unmodifizierten PLLA-Oberfläche erhöhte BDNF-Beladungen (ca. 0,21 pg mm⁻²) festgestellt werden.

Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) zum Nachweis von Crosslinkern auf PLLA-Oberflächen

Zur weiteren Charakterisierung von Crosslinker-modifizierten Polymer-Oberflächen wurden modifizierte und unmodifizierte PLLA-Oberflächen mit Hilfe der EDX-Einheit des ESEM untersucht. Dabei wurde die Änderung der Intensität in Abhängigkeit von der Energie verfolgt und ist in Abbildung 45 dargestellt.

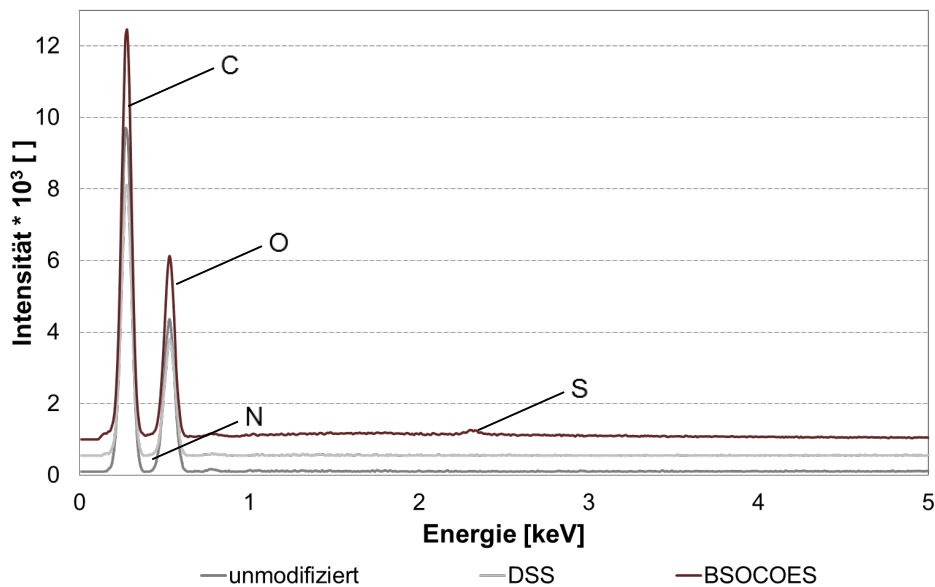


Abbildung 45: EDX-Spektrum von unmodifizierten, DSS- und BSOE-modifizierten PLLA-Scheiben

Das EDX-Spektrum der unmodifizierten PLLA-Oberfläche zeigte zwei Signale, die den Elementen Kohlenstoff (C) und Sauerstoff (O) zugeordnet werden konnten. Das EDX-Spektrum der mit DSS-modifizierten PLLA-Oberfläche wies ebenso die beiden Signale für Kohlenstoff und Sauerstoff auf. Ein weiteres Signal wie das für NHS-Ester typische Stickstoff-Signal (N) konnte nicht beobachtet werden. Auch bei dem EDX-Spektrum der BSOE-modifizierten PLLA-Oberfläche konnte dieses Signal nicht beobachtet werden. Das Spektrum zeigte deutlich die beiden Signale von Kohlenstoff und Sauerstoff sowie ein weiteres Signal, das dem Element Schwefel (S) zugeordnet werden konnte.

5.4.3. *In vitro* BDNF-Freisetzung

Zur *in vitro* Charakterisierung des BDNF-Freisetzungssystems wurden neben verschiedenen oberflächenmodifizierten Proben auch durch das Layer-by-Layer-Verfahren hergestellte BDNF-enhaltende Beschichtungen (Kapitel 4.2.2) untersucht.

***In vitro* BDNF-Freisetzung von DSS-modifizierten Polymer-Scheiben**

Für eine erste Einschätzung der *in vitro* Freisetzung von BDNF wurde die Freisetzung von an unmodifizierten P(4HB)- bzw. unmodifizierten PLLA-Scheiben adsorbiertem BDNF mit der Freisetzung von BDNF, das über den Crosslinker DSS an die Polymer-Oberflächen gebunden war, verglichen. Die kumulativ freigesetzten BDNF-Mengen über den Beobachtungszeitraum von 96 Stunden sind in der Abbildung 46 dargestellt.

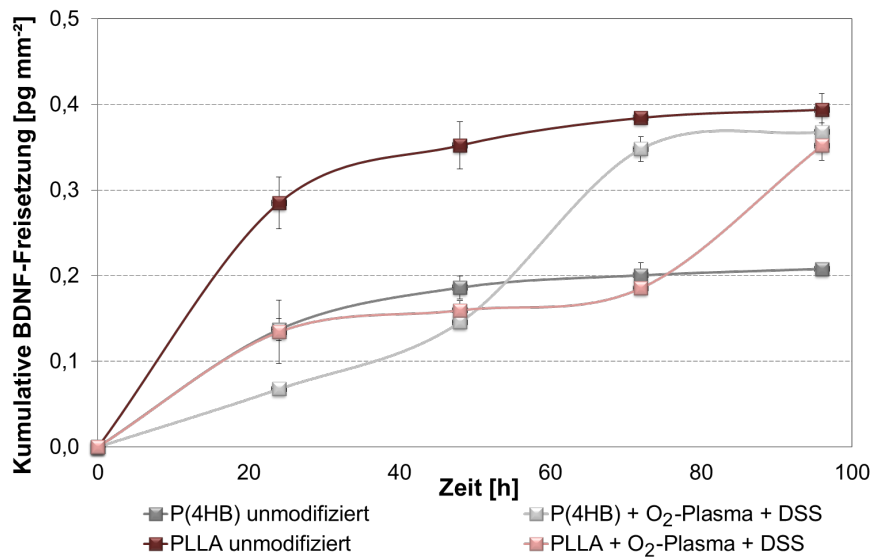


Abbildung 46: *In vitro* BDNF-Freisetzung von unmodifizierten und DSS-modifizierten BDNF-beladenen P(4HB)- und PLLA-Scheiben (d = 6 mm) in künstlicher Perilymphe bei Raumtemperatur unter quasi-stationären Bedingungen (n = 3)

Die beiden unmodifizierten Polymer-Oberflächen wiesen ein ähnliches BDNF-Freisetzungprofil auf. Innerhalb der ersten 24 Stunden wurden mehr als 70 % der insgesamt nachweisbaren BDNF-Menge freigesetzt, danach verlangsamte sich die BDNF-Freisetzung deutlich. Bei unmodifizierten PLLA-Proben wurde eine größere Menge des adsorptiv angelagerten BDNF freigesetzt als bei unmodifizierten P(4HB)-Proben. Die BDNF-Freisetzungprofile, bei denen das BDNF über den Crosslinker DSS an die Polymer-Oberflächen gebunden war, zeigten ebenso einen ähnlichen Verlauf für die beiden unterschiedlichen Polymere. Bei den modifizierten P(4HB)-Proben zeigte sich innerhalb der ersten 48 Stunden ein nahezu linearer Verlauf der BDNF-Freisetzung. Danach erfolgte ein sprunghafter Anstieg der freigesetzten BDNF-Menge. Die BDNF-Freisetzung von DSS-modifizierten PLLA-Oberflächen wies ebenso wie die entsprechenden P(4HB)-Proben einen sprunghaften Anstieg der freigesetzten BDNF-Menge auf. Bei diesem Polymer begann dieser Sprung nach 62 Stunden.

Ein Nachweis der freigesetzten BDNF-Mengen zu späteren Freisetzungszeiträumen war nicht möglich, da die Nachweisgrenze des ELISA erreicht war.

***In vitro* BDNF-Freisetzung von Crosslinker-modifizierten PLLA-Scheiben**

In den folgenden Untersuchungen wurde ein Blick auf die Freisetzung von BDNF, welches mit Hilfe von verschiedenen homobifunktionalen Crosslinkern hydrolytisch spaltbar an die PLLA-Oberflächen angebunden war, geworfen. Die kumulativ freigesetzten BDNF-Mengen über den Beobachtungszeitraum von 96 Stunden sind in der Abbildung 47 dargestellt.

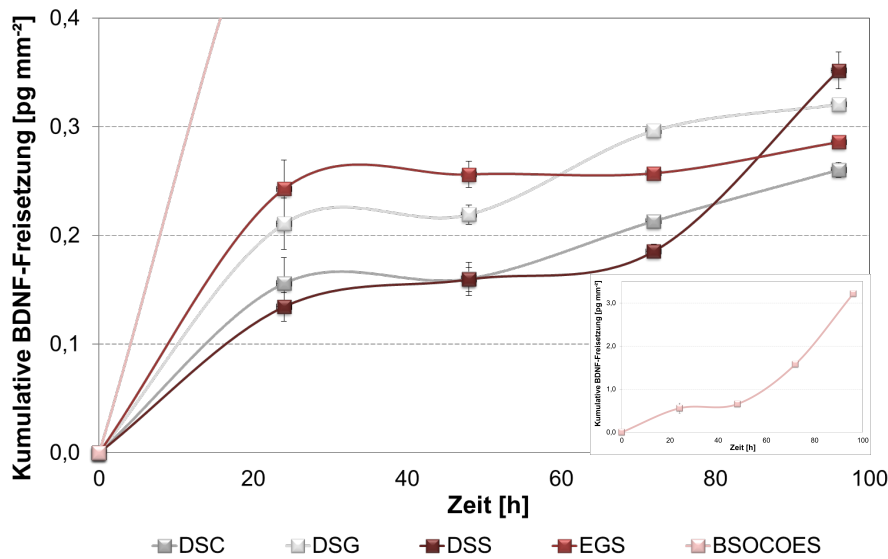


Abbildung 47: *In vitro* BDNF-Freisetzung von Crosslinker-modifizierten BDNF-beladenen PLLA-Scheiben ($d = 6 \text{ mm}$) in künstlicher Perilymphe bei Raumtemperatur unter quasi-stationären Bedingungen ($n = 3$)

Die dargestellten BDNF-Freisetzungprofile der Crosslinker-modifizierten PLLA-Scheiben zeigten alle eine anfängliche BDNF-Freisetzung, die anschließend in ein Plateau überging, bei dem kein weiteres BDNF freigesetzt wurde. Ab einem Freisetzungszeitraum von etwa 48 Stunden konnte eine weitere schnell steigende BDNF-Konzentration beobachtet werden. Bei dem Crosslinker EGS war dieser Effekt der weiter steigenden BDNF-Konzentration am geringsten ausgeprägt und bei dem Crosslinker BSOCOES am stärksten. Die mit Abstand größte freigesetzte BDNF-Menge von $3,2 \text{ pg mm}^{-2}$ nach 96 Stunden wurde bei der Freisetzung von BDNF von BSOCOES-modifizierten PLLA-Oberflächen beobachtet. Bei den anderen Crosslinker-modifizierten PLLA-Oberflächen wurden maximal bis zu $0,3 \text{ pg mm}^{-2}$ BDNF nach 96 Stunden freigesetzt. Eine weiterführende Beobachtung der Freisetzung von BDNF konnte nicht durchgeführt werden, da bei fast allen Proben die Nachweisgrenze des ELISA erreicht war.

***In vitro* Freisetzung von BDNF aus Beschichtungen auf P(4HB)**

Zum Abschluss der *in vitro* Freisetzungsforschungen von BDNF wurden komplexe Polyelektrolyt-Beschichtungen (PECML), die mit Hilfe des Layer-by-Layer-Verfahrens auf P(4HB)-Scheiben hergestellt wurden, untersucht. Es wurden sowohl unterschiedlich starke PECML-Beschichtungen (5 Tetralayer (TL5) und 15 Tetralayer (TL15)), bei denen BDNF beim Quellvorgang in die Schicht inkorporiert wurde, als auch eine PECML-Beschichtung, bei der bereits im PECML-Schichtaufbau BDNF enthalten war (TL5), untersucht. Als Vergleich diente die Freisetzung von adsorptiv an unmodifizierte

P(4HB)-Oberflächen angelagertem BDNF. Die kumulativ freigesetzten BDNF-Mengen sind in der Abbildung 48 dargestellt.

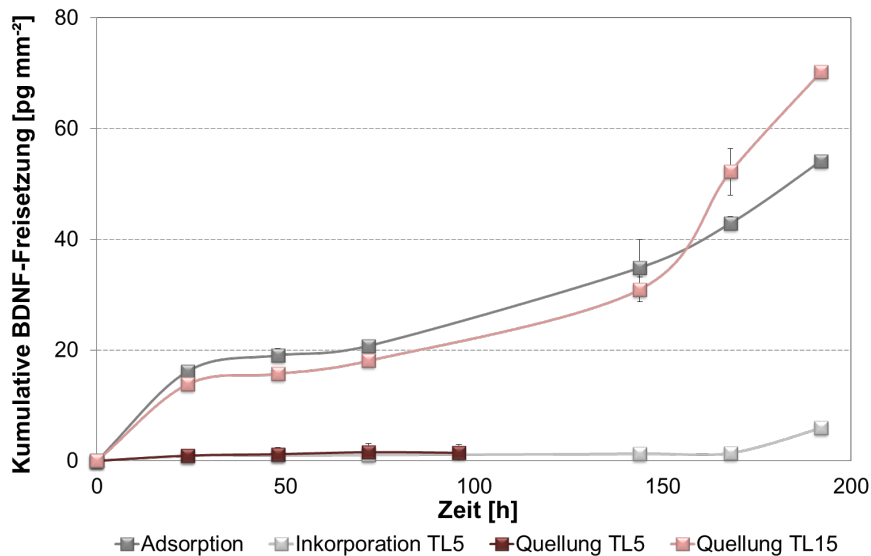


Abbildung 48: *In vitro* BDNF-Freisetzung von PECML-beschichteten P(4HB)-Scheiben ($d = 6$ mm) in 0,9 %-iger NaCl + 0,5 % BSA-Lösung bei Raumtemperatur unter quasi-stationären Bedingungen ($n = 3$)

Die in dieser Abbildung dargestellten BDNF-Freisetzungskurven zeigten eine hohe Menge an freigesetztem BDNF im Vergleich zu den zuvor gezeigten BDNF-Freisetzungskurven. Die höchsten Freisetzungen von BDNF konnten mit dem adsorptiv an die P(4HB)-Oberfläche angelagertem BDNF und mit dem durch Quellung bei TL15 inkorporiertem BDNF erreicht werden. Bei beiden Freisetzungskurven waren nach 24 Stunden bereits etwa 15 pg mm^{-2} BDNF freigesetzt, wobei die Proben mit adsorptiv angelagertem BDNF eine etwas größere Menge freigesetzt hatten. An den beiden folgenden Tagen stieg die freigesetzte BDNF-Menge nur gering an. Nach 144 Stunden wurde die freigesetzte BDNF-Menge erneut bestimmt und ein Zuwachs von ca. 10 pg mm^{-2} konnte beobachtet werden. Ab 144 Stunden war die Freisetzung des durch Quellung aufgenommenen BDNF (TL15) beschleunigt gegenüber der Freisetzung des adsorptiv angelagertem BDNF. Am Ende des Beobachtungszeitraums waren BDNF-Mengen von $\sim 70 \text{ pg mm}^{-2}$ (Quellung TL15) und $\sim 55 \text{ pg mm}^{-2}$ (Adsorption) freigesetzt. Die Freisetzungsprofile der TL5-Proben (Inkorporation und Quellung) wiesen dagegen nur eine sehr geringe Freisetzung auf und hatten am Ende des Beobachtungszeitraums auch maximal $\sim 6 \text{ pg mm}^{-2}$ freigesetzt.

5.5. *In vitro* Degradation der Polymere P(4HB) und PLLA

Bei den beiden zur Beschichtung des Cochlea-Implantat-Elektrodensträgers genutzten Polymeren handelte es sich um unter physiologischen Bedingungen degradierbare

Poly(hydroxycarbonsäuren). Für P(4HB) wird eine beschleunigte *in vivo* Degradation beschrieben, was auf einen großen Einfluss von Enzymen auf die Degradation hinweist [32]. Bei PLLA wird der Einfluss der Enzyme bei der Degradation gegensätzlich diskutiert [32, 38, 39]. Die Degradation der beiden Polymere soll im Folgenden speziell im Hinblick auf die in der Cochlea vorkommenden Enzyme Butyrylcholinesterase und Lactatdehydrogenase (im Folgenden enzymatische Degradation genannt) überprüft, die untereinander verglichen werden, aber auch jeweils im Vergleich zur Degradation im wässrigen Medium, bei der keine Enzyme anwesend sind (folgend als hydrolytische Degradation bezeichnet) betrachtet werden.

5.5.1. Charakterisierung der Oberflächen von degradierten Polymer-Proben

Beobachtungen der Veränderung der Oberflächenmorphologie

Zur ersten Oberflächencharakterisierungsmöglichkeit bei der *in vitro* Degradation mit und ohne Enzymzusatz von PLLA- und P(4HB)-Proben wurden die degradierten Proben unter dem ESEM betrachtet. Eine Auswahl der erstellten ESEM-Aufnahmen ist in der Abbildung 49 zusammengestellt. Es sind ausschließlich enzymatisch degradierte P(4HB)-Proben zu den Entnahmezeitpunkten 0, 2, 4, 12, 39 und 52 Wochen gezeigt. Dabei sind pro Entnahmezeitpunkt jeweils die Aufnahmen in 1000-facher (links) und 100-facher (rechts) Vergrößerung dargestellt.

5. Ergebnisse

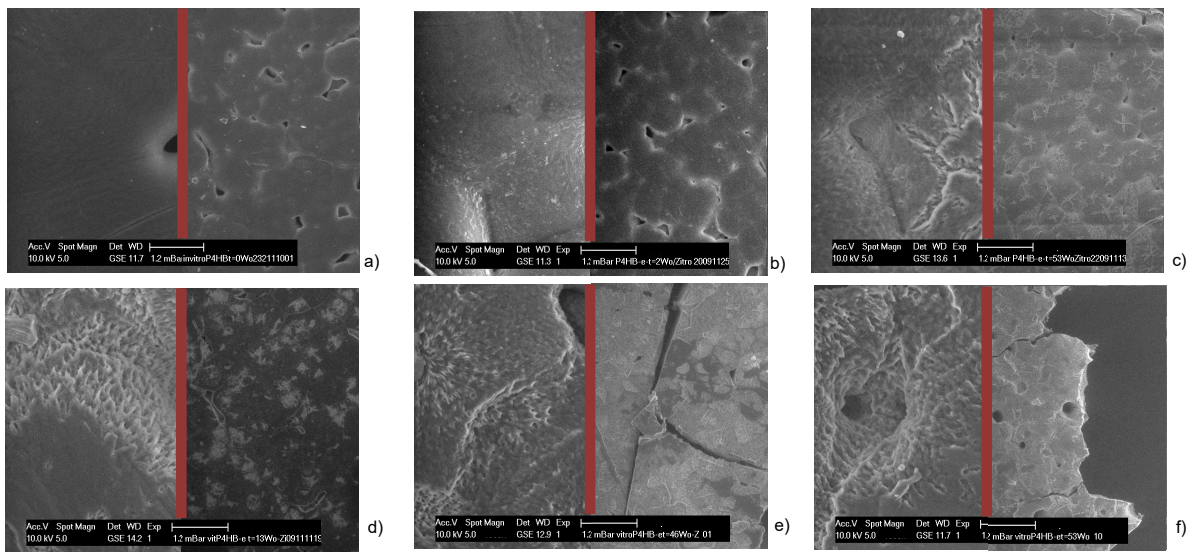


Abbildung 49: ESEM-Aufnahmen von P(4HB)-Proben der enzymatischen Degradation (jeweils links: 1000-fache und rechts: 100-fache Vergrößerung) a) 0 Wochen, b) 2 Wochen c) 4 Wochen, d) 12 Wochen, e) 39 Wochen, f) 52 Wochen

Bei den in Abbildung 49a) dargestellten ESEM-Aufnahmen einer nicht degradierten P(4HB)-Oberfläche war sehr gut die Oberflächenbeschaffenheit dieser Probe zu erkennen. Die P(4HB)-Oberfläche war strukturiert und zeigte kleine Vertiefungen, die dunkler als die restliche Oberfläche wirkten. Bei einer starken Vergrößerung der Oberfläche konnte eine Feinstruktur erkannt werden. Bereits nach 2 Wochen Degradationszeit (Abbildung 49b)) traten diese Strukturierungen deutlicher hervor und ein Blick auf die gesamte Oberfläche zeigte einen größeren Kontrast bis hin zu deutlich hell dargestellten Verbindungen zwischen den Vertiefungen. Nach 4 Wochen Degradationszeit (Abbildung 49c)) waren viele kleine, sternförmige Risse auf der Oberfläche erkennbar. Bei höherer Vergrößerung konnten in diesen oberflächlichen Rissen deutlich gröbere Strukturen von tiefer liegendem Material erkannt werden. Nach 12 Wochen (Abbildung 49d)) war diese grobe Struktur über weite Bereiche der degradierten P(4HB)-Oberfläche erkennbar und die zuvor sternförmigen Risse waren durch größere hell erscheinende Bereiche ersetzt. Diese Bereiche prägten nach 39 Wochen Degradationszeit (Abbildung 49e)) die Oberfläche und den Probekörper durchtrennende Risse waren zu beobachten. Weiterhin war auch bei der größeren Darstellung der Oberfläche die grobe Struktur erkennbar. Auch am Ende der enzymatischen Degradationsstudie (Abbildung 49f)) war diese grobe Struktur der Oberfläche zu sehen und eine deutliche Fragmentierung der Probekörper war zu beobachten.

Auch für die hydrolytische Degradation von P(4HB) Abbildung 50a) und d)) sowie für die hydrolytische (b) und e)) und enzymatische Degradation (Abbildung 50c) und f)) von PLLA

wurden ESEM-Aufnahmen angefertigt. Für die genannten Probekörper ist in der folgenden Abbildung 50 jeweils nur die Oberfläche zum Startzeitpunkt der Degradation (0 Wochen; Abbildung 50a), b) und c)) und die Oberfläche am Ende der Degradationsuntersuchungen nach 52 Wochen (Abbildung 50d), e) und f)) dargestellt. Auch dabei ist links die Oberfläche in 1000-facher Vergrößerung und rechts die Oberfläche in 100-facher Vergrößerung gezeigt.

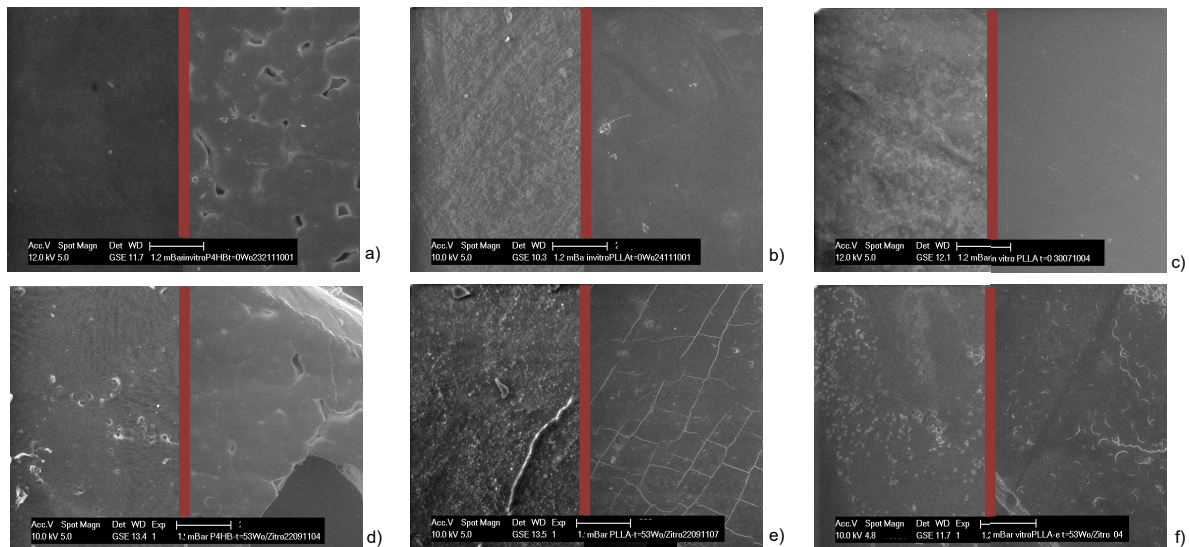


Abbildung 50: ESEM-Aufnahmen von P(4HB)- und PLLA-Proben zu den Degradationszeiträumen 0 Wochen und 52 Wochen (jeweils links: 1000-fache und rechts: 100-fache Vergrößerung) a) P(4HB); hydrolytische Degradation; 0 Wochen, b) PLLA; hydrolytische Degradation; 0 Wochen, c) PLLA; enzymatische Degradation; 0 Wochen, d) P(4HB); hydrolytische Degradation; 52 Wochen e) PLLA; hydrolytische Degradation; 52 Wochen, f) PLLA; enzymatische Degradation; 52 Wochen,

Bei der nicht degradierten P(4HB)-Oberfläche (Abbildung 50a)) waren kleine Vertiefungen, die dunkler als die restliche Oberfläche wirkten erkennbar und bei starker Vergrößerung konnte eine feine Strukturierung der Oberfläche erkannt werden. Nach 52 Wochen hydrolytischer Degradation (Abbildung 50d)) war diese bei starker Vergrößerungen sichtbare Struktur deutlicher ausgeprägt. Die Betrachtung der gesamten Oberfläche zeigte auch hier wieder die kleinen, dunkler erscheinenden Vertiefungen. Eine deutliche Änderung zur nicht degradierten P(4HB)-Oberfläche war nicht zu erkennen. PLLA hingegen (Abbildung 50b)) wies eine glatte, im Detail jedoch gleichmäßig strukturierte Oberfläche auf, die nach 52 Wochen hydrolytischer Degradation (Abbildung 50e)) deutlicher zu erkennen war. Relativ gerade, geometrisch angeordnete helle Linien (Rechtecke), waren auf der Oberfläche zu sehen. Bei der enzymatischen Degradation von PLLA (Abbildung 50f)) waren die hellen Linien nicht gerade angeordnet, sondern waren eher in unregelmäßigen Abständen als Bogen über die Oberfläche verteilt. Auch die Detailansicht

der enzymatisch degradierten PLLA-Proben zeigte keine regelmäßige Struktur mehr, vielmehr waren unregelmäßig über die Oberfläche verteilte kleine, hell erscheinende Bereiche erkennbar.

Kontaktwinkelmessungen bei Degradationsproben

Eine weitere Methode zur Charakterisierung der Oberflächen der hydrolytischen und enzymatischen *in vitro* Degradation von PLLA- und P(4HB)-Proben bot die Messung des Kontaktwinkels. Die zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten ermittelten Kontaktwinkel sind aufgeschlüsselt nach den jeweiligen Polymeren und Degradationsarten (hydrolytisch oder enzymatisch) in der Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Kontaktwinkelmessungen an P(4HB)- und PLLA-Scheiben (10 x 5 mm, n = 5) zu verschiedenen Degradationszeiträumen

Zeit [Wochen]	Kontaktwinkel Θ [°]			
	P(4HB)		PLLA	
	Hydrolytisch	Enzymatisch	Hydrolytisch	Enzymatisch
0	72,4 ± 12,5	72,4 ± 12,5	81,2 ± 7,0	81,2 ± 7,0
2	67,9 ± 13,0	75,2 ± 4,3	78,3 ± 5,8	68,7 ± 6,2
4	69,8 ± 12,9	78,0 ± 8,7	77,1 ± 8,8	70,5 ± 8,0
8	71,1 ± 23,6	65,0 ± 5,6	77,1 ± 19,6	74,2 ± 2,6
12	67,7 ± 20,6	65,4 ± 4,6	76,4 ± 15,2	65,5 ± 4,5
26	70,9 ± 2,1	56,5 ± 4,2	71,5 ± 3,2	38,9 ± 4,3
39	69,8 ± 14,0	61,2 ± 5,5	66,8 ± 7,2	62,4 ± 6,3
52	60,7 ± 1,7	65,9 ± 1,3	63,2 ± 3,5	58,5 ± 5,1

Anhand der ermittelten Werte ist zu erkennen, dass es über den Degradationszeitraum hinweg bei allen Polymeren zu einer Reduzierung des Kontaktwinkels kam. Bei den hydrolytisch degradierten P(4HB)-Proben war bis zu einem Degradationszeitraum von 39 Wochen keine messbare Änderung des Kontaktwinkels erkennbar (von $\Theta = 72,4^\circ \pm 12,5^\circ$ (t = 0 Wochen) bis hin zu $\Theta = 69,8^\circ \pm 14,0^\circ$ (t = 39 Wochen)). Eine deutliche Reduzierung des Kontaktwinkels war erst beim letzten Degradationszeitpunkt von 52 Wochen messbar ($\Theta = 60,7^\circ \pm 1,7^\circ$). Bei den enzymatisch degradierten P(4HB)-Proben war bereits nach 8 Wochen ein deutlicher Abfall des Kontaktwinkels erkennbar, der zum Ende des Untersuchungszeitraumes der Degradation wieder leicht anstieg, um bei 52 Wochen einen Kontaktwinkel von $\Theta = 65,9^\circ \pm 1,3^\circ$ zu erreichen. Bei den hydrolytisch degradierten PLLA-Proben war eine kontinuierliche, geringe Abnahme des Kontaktwinkels zu beobachten. Die Reduzierung erfolgte von $\Theta = 81,2^\circ \pm 7,0^\circ$

(t = 0 Wochen) bis hin zu $\Theta = 63,2^\circ \pm 3,5^\circ$ (t = 52 Wochen). Bei den enzymatisch degradierten PLLA-Proben verringerte sich der Kontaktwinkel nach 52 Wochen auf $\Theta = 58,5^\circ \pm 5,1^\circ$. Bei allen untersuchten Degradationszeiträumen waren die Kontaktwinkel der enzymatisch degradierten PLLA-Proben leicht geringer als die Kontaktwinkel der hydrolytisch degradierten Proben.

5.5.2. Molmassen- und Massenverlust von degradierten Polymerproben

Verfolgung des Abbaus der mittleren molaren Masse während der in vitro Degradation

Die Verfolgung der Änderung der mittleren molaren Masse mittels GPC bietet die Möglichkeit, das Degradationsverhalten der Polymere zu Charakterisieren und Schlussfolgerungen auf das Vorliegen einer Bulk- oder Oberflächendegradation zu ziehen. Die zeitliche Änderung der mittleren molaren Masse M_w von hydrolytisch und enzymatisch degradiertes P(4HB) und PLLA sind in der Abbildung 51 dargestellt. Jeweils ein Chromatogramm der GPC-Messungen, die hydrolytische und enzymatische Degradation von P(4HB) und PLLA nach t = 52 Wochen im Vergleich zum Startzeitpunkt t = 0 Wochen zeigend, sind im Anhang dargestellt.

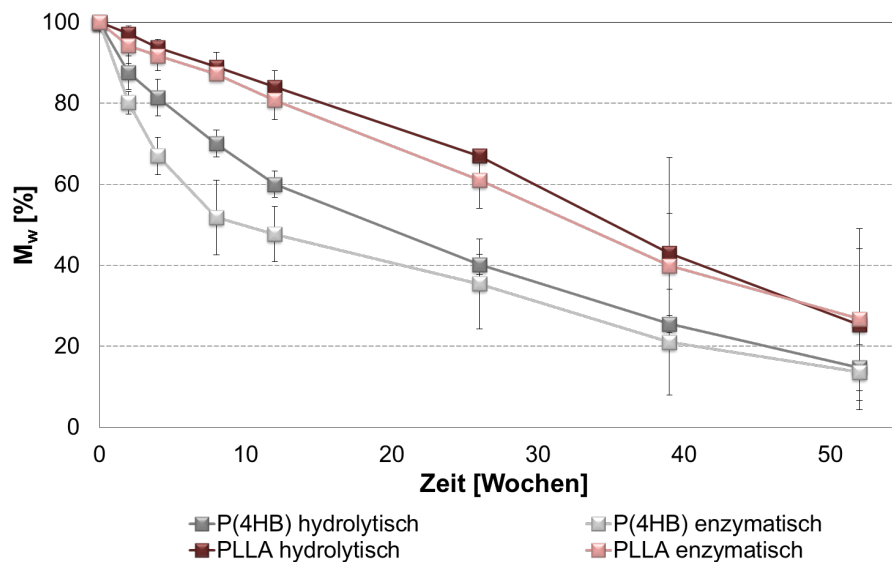


Abbildung 51: Änderung der molaren Masse im Verlauf der *in vitro* Degradation über 52 Wochen bei hydrolytisch und enzymatisch degradiertes P(4HB) und PLLA (n = 5)

Bei dieser Abbildung (Abbildung 51) war bei allen Polymeren und Degradationsarten eine Reduktion der molaren Masse innerhalb von 52 Wochen erkennbar. Die Degradation von

PLLA zeigte einen annähernd linearen Abbau der molaren Masse, der sowohl für die hydrolytische als auch enzymatische Degradation nahezu identisch verlief. Nach 52 Wochen Degradationszeit war die molare Masse von PLLA von $M_w = 717.000 \text{ g mol}^{-1}$ auf etwa $M_w = 180.000 \text{ g mol}^{-1}$ reduziert, was einer Reduktion der molaren Masse um ca. 75 % entsprach. Die für PLLA bekannte kritische Molmasse von ca. $10.000 - 15.000 \text{ g mol}^{-1}$ wurde damit nicht unterschritten. Die hydrolytisch und enzymatisch degradierten P(4HB)-Probekörper wiesen nach 52 Wochen Degradationszeit sogar nur noch ca. 14 % der Ausgangsmolmasse ($M_w = 160.000 \text{ g mol}^{-1}$) auf, was einer molaren Masse von $M_w = 22.000 \text{ g mol}^{-1}$ entsprach. Der Verlauf der hydrolytischen Degradation von P(4HB) war nahezu linear, allerdings war die prozentuale Reduzierung der molaren Masse über die Zeit gegenüber PLLA beschleunigt. Bei der enzymatischen Degradation war im Anfangsbereich der Abbau der molaren Masse im Vergleich zur hydrolytischen Degradation beschleunigt und ein eher exponentieller Kurvenverlauf lag vor.

Gravimetrische Messungen während der *in vitro* Degradation

Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung der *in vitro* Degradation von Polymeren ist die gravimetrische Bestimmung der Trockenmasse der Probekörper zu verschiedenen Degradationszeiträumen. Die Ergebnisse der Bestimmung der Trockenmasse über die Zeit von hydrolytisch und enzymatisch degradierten P(4HB)-Probekörpern ist in der Abbildung 52 dargestellt.

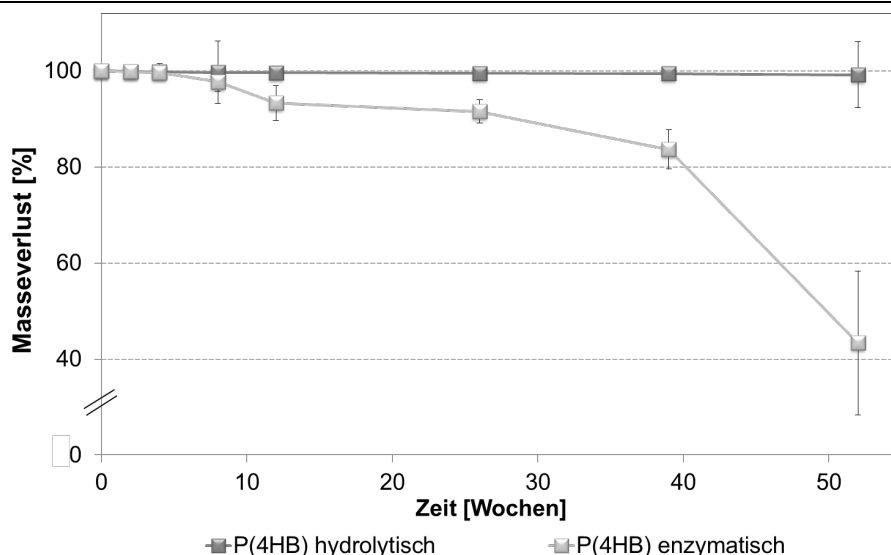


Abbildung 52: Beobachtung der Trockenmasse im Verlauf der *in vitro* Degradation über 52 Wochen bei hydrolytisch und enzymatisch degradiertem P(4HB) (n = 5)

Die hydrolytische Degradation zeigte im Degradationsverlauf keinen Verlust der Trockenmasse. Dagegen war bei enzymatisch degradierten P(4HB)-Probekörpern bereits ab 8 Wochen Degradationszeit eine deutliche Minimierung der Trockenmasse erkennbar. Nach 52 Wochen Degradationszeit waren bei enzymatisch degradiertes P(4HB) sogar nur noch ca. 40% der Ausgangstrockenmasse vorhanden.

5.5.3. Thermoanalysen degradierter Polymerproben

Kristallinität von hydrolytisch und enzymatisch degradierten Polymeren

Über die mit Hilfe der DSC aufgenommenen Schmelzkurven (Beispiel für PLLA und P(4HB) zeigt die Abbildung im Anhang) können aus den daraus ermittelten Schmelzenthalpien und der aus Röntgenbeugungsexperimenten theoretisch errechneten Enthalpie des zu 100% kristallinem Materials die Kristallinität α der untersuchten Proben berechnet werden. Die bei der hydrolytischen und enzymatischen Degradation von P(4HB) und PLLA ermittelten Kristallinitäten zu verschiedenen Degradationszeitpunkten sind in der Abbildung 53 dargestellt.

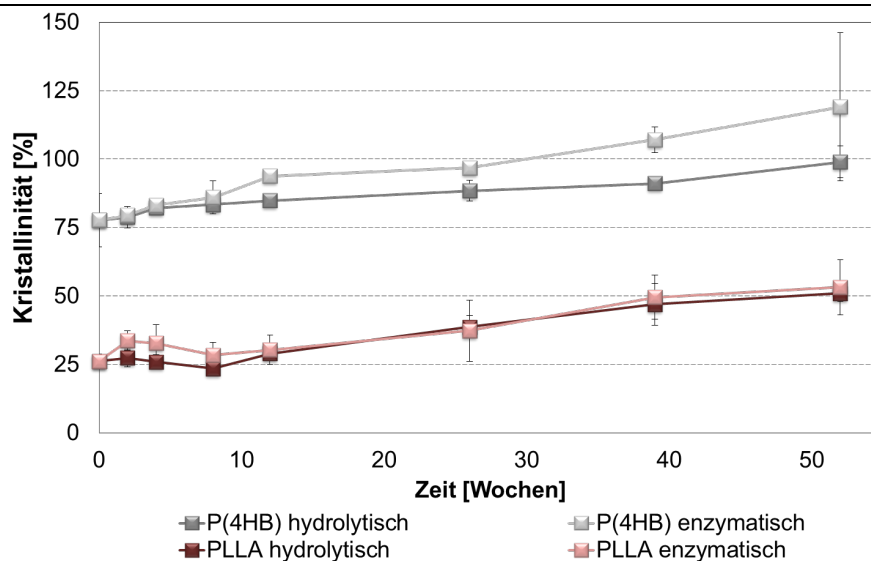


Abbildung 53: Verfolgung der Kristallinität im Verlauf der *in vitro* Degradation über 52 Wochen bei hydrolytisch und enzymatisch degradierter P(4HB) und PLLA (n = 5)

Für beide Polymere war ein Anstieg der Kristallinität im Verlauf der Degradation zu erkennen. Die Kristallinität von PLLA stieg von $\alpha = \sim 25\%$ zum Zeitpunkt $t = 0$ Wochen auf $\alpha = \sim 50\%$ nach 52 Wochen Degradation. Dabei verliefen die Kurven der Kristallinität von hydrolytisch degradiertem und enzymatisch degradiertem PLLA nahezu identisch. P(4HB) zeigte zum Beginn der Degradationsuntersuchungen bereits einen Kristallinitätsgrad von $\alpha = \sim 75\%$. Bei der hydrolytischen Degradation wurde eine Erhöhung der Kristallinität auf

$\alpha = \sim 100\%$ und bei der enzymatischen Degradation sogar eine Erhöhung auf $\alpha = \sim 120\%$ beobachtet. Hierbei ist zu beachten, dass bei der Berechnung der Kristallinität neben der gemessenen Schmelzenthalpie auch Literaturwerte für die Schmelzenthalpie einer 100%-ig kristallinen Probe eingesetzt werden.

Bestimmung des Schmelzpunktes bei der *in vitro* Degradation von Polymeren

Die letzte dargestellte Möglichkeit zur Charakterisierung der Degradation der Polymere P(4HB) und PLLA ist die aus den mit Hilfe der DSC aufgenommenen Schmelzkurven bestimmte Schmelztemperatur T_m . Exemplarisch für P(4HB) ist die Änderung der Schmelztemperatur im Verlauf der hydrolytischen und enzymatischen Degradation in Abbildung 54 dargestellt.

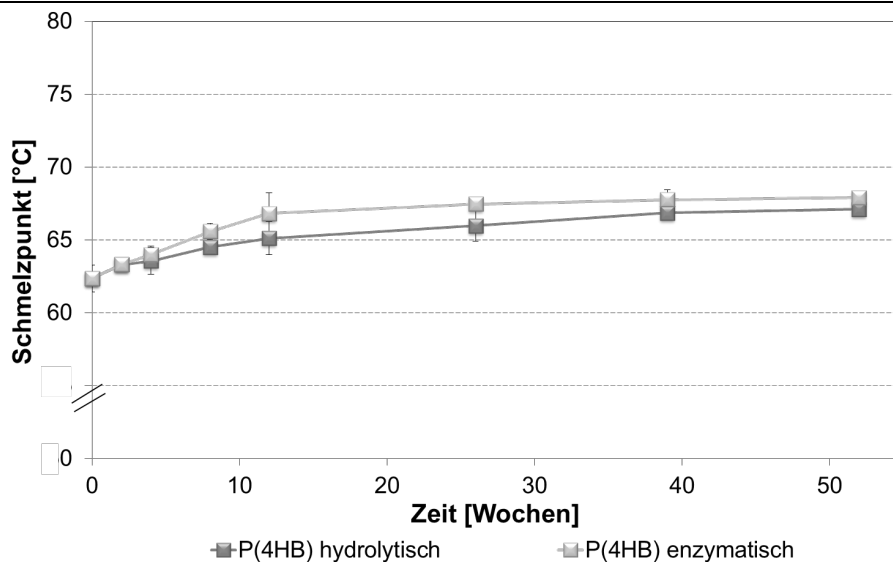


Abbildung 54: Veränderung des Schmelzpunktes im Verlauf der *in vitro* Degradation über 52 Wochen bei hydrolytisch und enzymatisch degradiertem P(4HB) (n = 5)

Sowohl bei der hydrolytisch, als auch bei der enzymatisch degradierten P(4HB) fand bei fortschreitender Degradation ein Anstieg der Schmelztemperatur statt. Die Schmelztemperatur stieg von $T_m = \sim 62\text{ °C}$ zum Zeitpunkt $t = 0$ Wochen auf $T_m = \sim 67,5\text{ °C}$ nach 52 Wochen Degradationszeit. Ab 4 Wochen Degradationszeit lag die Schmelztemperatur der enzymatisch degradierten Proben immer etwa $0,5 - 1,5\text{ °C}$ über der Schmelztemperatur der hydrolytisch degradierten P(4HB)-Proben. Die Schmelztemperatur von PLLA zeigte hingegen keine Änderung. Der Schmelzpunkt lag am Anfang und am Ende der hydrolytischen und enzymatischen Degradation bei $T_m = \sim 178\text{ °C}$ (Daten siehe Anhang).

6. Zusammenfassung und Diskussion

Zur Verbesserung der Langzeitfunktionalität von Cochlea-Implantaten wurden PDMS-Oberflächen als Grundlage für antiproliferativ bzw. neurotroph wirkende Local Drug Delivery Systeme auf Basis der Polymere P(4HB) und PLLA untersucht.

Oberflächenmodifizierungen von PDMS

Das Augenmerk lag hierbei auf Dexamethason (DMS) freisetzenden Systemen, wobei DMS sowohl im PDMS-Probekörper (PDMS/DMS) als auch im polymeren Aufbau (P(4HB)/DMS bzw. PLLA/DMS) untersucht wurde. Dafür wurden zunächst PDMS-Probekörper ohne DMS chemisch oberflächenfunktionalisiert und mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen, der IR-Spektroskopie und elektronenmikroskopischen Aufnahmen charakterisiert. Es war zu beobachten, dass eine Aminogruppenfunktionalisierung der PDMS-Oberflächen erforderlich war (Abbildung 28), um eine Polymerlayer zu erzeugen, die für einen haftfesten Local Drug Delivery Aufbau benötigt wurde (Abbildung 33). Dabei war sowohl eine nasschemische Aminogruppenfunktionalisierung der Oberfläche, bei der eine Sauerstoffplasma-behandelte PDMS-Oberfläche (15 % Reaktorleistung mit einer Prozessdauer von 10 Minuten, Abbildung 26) mit einer 10 %-igen ethanolischen APTES-Lösung behandelt wurde, als auch eine rein plasmachemische Aminogruppenfunktionalisierung der Oberfläche (Ammoniakplasma, Reaktorleistung 15 %, Prozessdauer 1 Minute, Abbildung 26) möglich. Die rein plasmachemische Funktionalisierung hat dabei den Vorteil, dass nur ein Prozessschritt und damit verbunden eine deutlich kürzere Gesamtprozesszeit, und kein zusätzliches Lösungsmittel, das zur Quellung des PDMS und damit eventueller verstärkter Auswaschung von im PDMS eingelagertem Wirkstoff führen könnte, notwendig war und wurde damit der nasschemischen Aminogruppenfunktionalisierung vorgezogen. An diese aminogruppenfunktionalisierte PDMS-Oberfläche konnte eine Polymerlayer angekoppelt werden (Abbildung 27). Umfassende Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Lösungs- und Temperaturabhängigkeit bei der Polymerlayererzeugung auftrat (Tabelle 13). Es wurde das Lösungsmittel 1,2-Dichlorethan, eine Temperatur von 55 °C, eine Reaktionszeit von 8 Stunden sowie ein Konzentrationsverhältnis des gelösten Polymers P(4HB) zu dem Crosslinkersystem EDC/NHS von ca. 10:1 zur Erzeugung einer P(4HB)-Layer als am Besten geeignet bewertet.

Oberflächenbeschichtung von PDMS-Probekörpern

Die PDMS-Oberflächen mit Polymerlayer wurden mit Hilfe eines Sprühverfahrens mit den Polymeren P(4HB) bzw. PLLA beschichtet und die entstandenen Oberflächen elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei zeigten sich bei den P(4HB)-Beschichtungen glattere, gleichmäßigere Oberflächen als bei den PLLA-Beschichtungen (Abbildung 30), weshalb P(4HB) für die spätere Anwendung als Basis eines Local Drug Delivery Systems zu bevorzugen ist. Eine glattere Oberfläche verringert die Möglichkeit der Anlagerung von nach der Implantation möglicherweise vorhandenen Viren und Bakterien, die einen Entzündungsprozess hervorrufen könnten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Beladung der Polymerbeschichtung mit der antiproliferativ wirkenden Substanz Dexamethason möglich war. Die Haftfestigkeit dieser Beschichtungen konnte mit Hilfe einer simulierten Implantation gezeigt werden (Abbildung 34).

Freisetzung von Dexamethason

Zur Freisetzung des DMS kamen zwei unterschiedliche Local Drug Delivery Systeme zum Einsatz, die in einem dritten System miteinander verbunden werden konnten. Es wurde einerseits die Freisetzung von DMS aus P(4HB)/DMS- bzw. PLLA/DMS-Beschichtungen untersucht. Andererseits wurde die Freisetzung von DMS aus dem PDMS-Grundkörper verfolgt und es wurde die DMS-Freisetzung von Probekörpern, bei denen DMS sowohl in der P(4HB)-Beschichtung, als auch im PDMS-Grundkörper vorhanden war, beobachtet. Die Freisetzungsuntersuchungen von DMS wurden in 0,9 %-iger NaCl-Lösung durchgeführt, da in diesem Medium unter Freisetzungsbedingungen (37 °C, quasi stationär) eine gute Stabilität des Wirkstoffes DMS gegeben war (Abbildung 36). Für eine initial hohe Anfangsfreisetzung hat sich als geeignetes Polymer P(4HB) mit einer DMS-Beladung von 30 % als beste Polymer/DMS-Beschichtung erwiesen (Abbildung 37). Eine sehr viel langsamere Freisetzung war bei DMS-beladenen PDMS/DMS-Proben zu beobachten (Abbildung 38), welche auch von anderen Arbeitsgruppen bereits diskutiert wurde [142]. Bei einer Kombination der initial schnell freisetzenden 30 % DMS-enthaltenden P(4HB)/DMS-Beschichtung mit dem langsam, aber kontinuierlich freisetzenden, mit 5 % DMS beladenem PDMS-Grundkörper konnte ein Local Drug Delivery System geschaffen werden, bei dem initial eine große Menge DMS freigesetzt werden konnte, und anschließend kontinuierlich über 9 Monate, sowie theoretischen Berechnungen zufolge sogar bis zu 3 Jahre (Tabelle 15) DMS freigesetzt werden könnte. In Voruntersuchungen wurde eine Sättigungskonzentration von $\sim 126 \text{ mg L}^{-1}$ ($3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) von DMS in 0,9 %-iger NaCl-Lösung ($T = 37 \text{ °C}$) mit Hilfe von HPLC-Messungen festgestellt. Bei den untersuchten Local Drug Delivery Systemen konnte in der Initial-Phase bis

ca. 120 Stunden eine DMS-Menge von $\sim 90 \text{ mg L}^{-1}$ ($2,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) festgestellt werden, was unterhalb der Sättigungskonzentration von DMS im FreisetzungsmEDIUM lag. Außerdem binden im Organismus bis zu 80 % des DMS am Plasmaeiweiß (Halbwertszeit beträgt 3 - 4,5 Stunden) [86], weshalb von den dargestellten Local Drug Delivery Systemen kein negativer Effekt auf die für einen funktionierenden Hörvorgang notwendigen Spiralganglienzellen zu erwarten ist (*in vitro* Untersuchungen zeigten keinen negativen Effekt im Bereich von 10^{-12} - $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ [127]).

Untersuchungen mit neurotroph wirkenden Faktoren

Als neurotroph wirkendes Local Drug Delivery System wurde der Wachstumsfaktor BDNF auf P(4HB) und PLLA-Oberflächen untersucht. Auch bei diesem System wurde als erstes die Stabilität in verschiedenen Medien zur Bestimmung des optimalen FreisetzungsmEDIUMS untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die größte Stabilität in 0,9 %-iger NaCl-Lösung unter Zusatz von 0,5 % BSA zu erreichen war (Tabelle 16 und Abbildung 41). Umfassende Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten von BDNF an oberflächenaktivierten und Crosslinker-modifizierten PDMS-, P(4HB)- bzw. PLLA-Scheiben ergaben, dass die größte Menge BDNF bei der Modifizierung von PLLA-Proben mit Sauerstoffplasma und APTES erreicht werden konnte (Abbildung 42). Aber auch die P(4HB)-Oberflächen (vor allem die sauerstoffaktivierten Proben) wiesen stark erhöhte BDNF-Beladungen bei Oberflächenaktivierungen im Vergleich zu PDMS- und nicht aktivierten P(4HB)-Proben auf (Abbildung 42). Bezüglich der Oberflächenmodifizierung mit Crosslinkern zur besseren Haftung des BDNF an der Polymeroberfläche wurden P(4HB)-Scheiben unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen unterworfen und DSS als exemplarischer Crosslinker zur Ankopplung des BDNF verwendet. Die Ergebnisse (Abbildung 42) zeigten deutlich, dass kein Unterschied zwischen der Menge des absorbierten und des über DSS angekoppelten BDNF bestand. Lediglich die Variante der Oberflächenmodifizierung schien hier von Bedeutung für die BDNF-Beladung zu sein. Da sich diese im Falle der Modifizierung mit Sauerstoff-Plasma am effektivsten erwies, wurde der Versuch sowohl mit P(4HB)-, als auch PLLA-Proben wiederholt und verschiedene Crosslinkersysteme (Abbildung 42) zur Kopplung des BDNF an den über Sauerstoffplasma aktivierten Oberflächen getestet. Hierbei erwies sich vor allem die Kombination P(4HB)/BSOCOES als effektiv. Die Oberflächenbeladung mit BDNF lag hier mit $0,5 \text{ pg mm}^{-2}$ um ein 5-Faches über dem Wert der anderen Modifizierungsvarianten (Abbildung 42). Im Falle der PLLA-Proben gab es keine so auffälligen Unterschiede. Um zu belegen, dass es sich tatsächlich um einen Effekt auf Basis des BSOCOES handelte, wurden EDX-Untersuchungen durchgeführt. Die Analyse ergab lediglich im Falle der BSOCOES-modifizierten Oberfläche Signale,

welche dem Schwefel zugeordnet werden konnten, während unmodifizierte und mit DSS modifizierte Oberflächen dieses nicht aufwiesen (Abbildung 42). Um die Vergleichbarkeit von PLLA- zu P(4HB)-Oberflächen zu gewährleisten, wurde in der Folge eine Kopplung des BDNF über DSS genutzt. Es zeigte sich, dass die Unterschiede zwischen der Beladung der DSS-modifizierten PLLA-Scheiben und P(4HB)-Scheiben nur geringfügig waren. Hierbei zeigten sowohl die Freisetzungen von nicht modifizierten als auch modifizierten Proben ähnliche Freisetzungsverläufe (Abbildung 42). Bezüglich der nicht modifizierten Proben bleibt jedoch festzuhalten, dass von den PLLA-Proben mehr BDNF freigesetzt werden konnte als von den P(4HB)-Proben. Beide wiesen jedoch einen burst release in den ersten 20 Stunden auf. Auffällig war, dass die mittels DSS modifizierten Proben sowohl im Falle des PLLA als auch des P(4HB) nach 48 Stunden (P(4HB)) bzw. 62 Stunden (PLLA) einen signifikanten Anstieg des kumulativ freigesetzten BDNF verzeichneten. Betrachtet man weiterführend die Freisetzung von über unterschiedliche Crosslinker an PLLA gekoppelten BDNF so konnte man feststellen, dass auch hier eine gesteigerte Freisetzung im Falle des BSOCOES gekoppelten BDNF stattfand (Abbildung 42). Auch dieses System zeigte im Bereich von 48 Stunden Freisetzung einen charakteristischen Sprung der Konzentration an freigesetztem BDNF. Zum Abschluss wurden noch Beschichtungskonzepte mit BDNF umgesetzt, bei welchen über ein Polyelektrolytverfahren versucht wurde, BDNF in unterschiedlichen Konzentrationen an der Oberfläche anzulagern bzw. über Quellung einzulagern. Hierbei zeigte sich, dass über quellungsvermittelte Aufnahme in ein möglichst mit vielen Schichten versehenes System (TL 15) die höchste Menge an BDNF aus dem System freigesetzt werden konnte (Abbildung 42).

Enzymatische und hydrolytische Degradation von PLLA und P(4HB)

Mit zunehmenden Implantationsverlauf ist ein Freisetzungssystem auf der Basis der degradierbaren Polymere PLLA bzw. P(4HB) nicht nur einer Degradation durch Wasser, sondern auch zusätzlich durch die in der Cochlea vorliegenden Enzyme (z.B. Butyrylcholinesterase und Lactatdehydrogenase) ausgesetzt. Hierzu erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine vergleichende Degradation der Polymere PLLA und P(4HB) hinsichtlich ihrer enzymatischen Degradation und ihrer Degradation im wässrigen Medium. Diese wurde über ESEM-Aufnahmen, Kontaktwinkel-, GPC- und DSC-Messungen der Proben zu definierten Entnahmezeiträumen verfolgt. So wird in Abbildung 42 beispielhaft die Degradation der enzymatisch degradierten P(4HB)-Proben zu den Entnahmezeitpunkten 0, 2, 4, 12, 39 und 52 Wochen über ESEM-Aufnahmen dargestellt. Diese wiesen mit zunehmender Dauer der Degradation immer stärkere Oberflächenstrukturen und

Rissbildungen auf. Korrelierend verhielten sich die Kontaktwinkel, welche im Rahmen der enzymatischen Degradation der P(4HB)-Proben eine Abnahme des Kontaktwinkels von $72,4 \pm 12,5^\circ$ auf $65,9 \pm 1,3^\circ$ (vgl. Tabelle 17) aufwiesen. Die Molmasse nahm von $160.000 \text{ g mol}^{-1}$ auf etwa 14% ihres Wertes von $22.000 \text{ g mol}^{-1}$ (Abbildung 42) ab, die Trockenmasse sank auf 40% des ursprünglichen Wertes (Abbildung 42) und eine Zunahme der Kristallinität von 75% auf 120% (Abbildung 42) wurde ermittelt. Dieses zeigte zusätzlich zu den mikroskopischen Beobachtungen (ESEM) den enzymatischen Abbau von P(4HB), welcher mit zunehmender Polymerkettenspaltung und hierauf folgender Zunahme der Kristallinität infolge des zuerst ablaufenden Abbaus der amorphen Bereiche einherging. Im Vergleich dazu schien die oberflächliche Veränderung des P(4HB) über den rein hydrolytischen Abbau (ohne Enzym) nicht so deutlich (Abbildung 42a und d). Dieses wurde gestützt durch eine langsamere Zunahme der Kristallinität über 52 Wochen Versuchsdauer auf 100% (Abbildung 42). Der Grund war, dass im Falle der enzymatischen Degradation die Zunahme ab der 8. Woche stärker ausfiel. Ein Effekt, welcher sich auch im Schmelzpunkt (Abbildung 42) niederschlug. Im Unterschied hierzu war allerdings der Masseabbau äquivalent zu beurteilen (Abbildung 42), wobei sich allerdings auch hier in den ersten Wochen ein verstärkter Abbau im Falle der enzymatischen Degradation ergab. Außerdem fiel die Änderung des Kontaktwinkels stärker aus als im Fall von enzymatisch degradiertem P(4HB) ($72,4 \pm 12,6^\circ$ auf $60,72 \pm 1,70^\circ$ im Vergleich zu $72,4 \pm 12,5^\circ$ auf $65,0 \pm 1,3^\circ$). Da die Trockenmasse im Falle des hydrolytisch degradierten Polymers sich allerdings nach 52 Wochen immer noch bei 100% des Startgewichtes befand, lies sich der Schluss ziehen, dass im Falle des enzymatisch degradierten Polymers eine Diffusion der Polymerbruchstücke aus dem Verbund stattgefunden hat, während dies im hydrolytisch degradierten Fall nicht so zu sein schien. Dies bedeutete, dass der Polymerkörper im Falle enzymatisch kontrollierter Degradation schneller degradierte und die Bruchstücke ins Medium aufgenommen wurden. Vergleicht man hierzu die Degradation des PLLA, so waren die ähnlichen Werte der hydrolytischen zur enzymatischen Degradation auffällig. Ließen die ESEM-Aufnahmen noch den Schluss einer beschleunigten Degradation im Falle der hydrolytischen Variante zu (Abbildung 42), so sind die Unterschiede im Fall der Kontaktwinkeländerung eher gering ($81,2 \pm 7,0^\circ$ auf $63,2 \pm 3,5^\circ$ (hydrolytisch) zu $81,2 \pm 7,0^\circ$ auf $58,6 \pm 5,1^\circ$ (enzymatisch)) (Tabelle 17). Diese geringen Unterschiede spiegelten sich ebenso im Falle der Änderung der molaren Masse auf etwa 25 % der Ausgangsmolmasse (Abbildung 42) wie auch der Zunahme der Kristallinität von 25 % auf ca. 50 % (Abbildung 53) wieder. Die hier nicht gezeigten Änderungen der

Schmelztemperatur lagen bei PLLA sowohl im Falle der hydrolytischen als auch der enzymatischen Degradation am Ende beim Ausgangswert von $T_m = 178 \text{ °C}$. Im Vergleich der zwei Polymere war der Molmassenabbau im Falle des P(4HB) stärker ausgeprägt. Außerdem wies dieses Polymer gerade zu Beginn der Zeit eine beschleunigte Degradation auf. Diese war im Falle der enzymatischen Degradation wesentlich stärker ausgeprägt. Nach einer Verlangsamung der enzymatischen Degradation schlug jedoch in beiden Fällen (enzymatisch und hydrolytisch) eine Abnahme auf 14 % der Ausgangsmolmasse im Gegensatz zu den 25 % des PLLA zu Buche (Abbildung 42). Betrachtete man die Kristallinität, so war P(4HB) von Anfang an wesentlich kristalliner. Die Zunahme der Kristallinität über die 52 Wochen war jedoch sowohl im Falle von P(4HB) als auch von PLLA die gleiche. Neben der Änderung der Kontaktwinkel und dem Molmasseverlust sprach dieses in beiden Fällen für einen Abbau der Polymere im Bulk.

Schlussfolgerung

Das Ziel dieser Arbeit stellt die Grundlage zur Entwicklung eines Local Drug Delivery System zur Freisetzung von DMS und BDNF als Weiterentwicklung von PDMS basierten Cochlea-Implantaten dar. Um das System etablieren zu können, wurden die oben genannten Untersuchungen durchgeführt. Letztlich konnten sowohl bezüglich der chemischen Oberflächenmodifizierung der PDMS-Probekörper, der Schichtmorphologie sowie Schichthftung, der Wirkstofffreisetzung und auch der Polymerdegradation Erkenntnisse gesammelt werden. So konnte bezüglich der Oberflächenmodifizierung gezeigt werden, dass eine plasmachemische Modifizierung mittels Ammoniak-Plasma sowohl Vorteile im Rahmen der Verarbeitung mit sich bringt (keine Quellung der PDMS-Oberfläche) als auch die Modifizierung in einer Einzugsynthese möglich ist. Belegt werden konnte außerdem, dass diese Variante gegenüber den weiteren getesteten Varianten keinen wirklichen Nachteil aufwies. Für die folgende Kopplung der Polymerschicht erwies sich das Lösungsmittel 1,2-Dichlorethan gemischt mit dem Crosslinkersystem EDC/NHS (10:1) zur Erzeugung der P(4HB)-Schicht als am besten geeignet. Dieses System stellte die Grundlage für ein mögliches System auf P(4HB)-Basis dar, welches sich in Folge der wesentlich glatteren Beschichtung im Vergleich zu PLLA als zu bevorzugen erwies. Dass ein solches System (PDMS/P(4HB)) auch als Wirkstofffreisetzungssystem fungieren kann, konnte ebenso erfolgreich die Haftung der Polymerschicht auf dem Grundkörper gezeigt werden. Etabliert wurde hier hinsichtlich der Wirkstofffreisetzung eine 30%-ige DMS-Beladung der P(4HB)-Schicht auf einem mit 5 % DMS beladenem PDMS-Grundkörper, welche theoretische Freisetzungszeiträume von bis zu 3 Jahren erreichen könnte. Die BDNF-Modifizierung

funktionierte hingegen bei PLLA-Komponenten am Besten. Jedoch konnte auch für ein plasmaaktiviertes System auf P(4HB)-Basis gezeigt werden, dass erhöhte BDNF-Beladungen erreicht werden konnten. Um das BDNF auf dem System zu etablieren, wurden neben der Adsorption mehrere Modifizierungsvarianten getestet. Hierbei erwies sich P(4HB)/BSOCOES als die effektivste Variante und sollte daher als potentieller Kandidat für den Aufbau des Local Drug Delivery Systems herangezogen werden. Über die wesentliche Komponente, die Art des Polymers, konnte mittels *in vitro*-Degradation sowie Degradationsmessungen keine endgültige Entscheidung getroffen werden. Die enzymatisch unterstützte Änderung der molaren Massen belegt möglicherweise einen verstärkten Abbau von P(4HB). Entscheidend für die Gestaltung des DMS-basierten Local Drug Delivery Systems ist daher die Wechselwirkung der Polymermatrix mit dem Dexamethason, die dazu führt, dass die verstärkte Burst Release Phase im Falle von P(4HB) die gewünschte erhöhte Konzentration an Dexamethason gerade in den Anfangsstunden vorteilhaft zur Verfügung stellt. Daher ist für ein funktionelles Local Drug Delivery System, mit Dexamethason und BDNF als freizusetzende Komponenten auf P(4HB) als Matrix für die Anwendung im Kontext mit Cochlea-Implantaten zurückzugreifen.

7. Ausblick

Die dargestellten Ergebnisse sind vielversprechend für die Entwicklung eines speziell zugeschnittenen Cochlea-Implantat-assoziierten Local-Drug-Delivery-Systems zur Vermeidung von Fibrose nach der Cochlea-Implantat-Insertion ins Innenohr. Die Plasmaaktivierung und die anschließende Aufbringung einer polymeren Grundierung ermöglicht es, dass das Cochlea-Implantat mit Arzneimittel enthaltenden polymeren Beschichtungen ausgestattet ist, die eine hohe Dosis liefern können.

Abgesehen von der Kombination der Arzneimittelabgabekonzepte (aus Polymerbeschichtung und PDMS-Grundmaterial) beschäftigt sich die zukünftige Arbeit mit der Abgabe von weiteren Nervenwachstumsfaktoren wie GDNF an das Innenohr, da diese Wachstumsfaktoren den Vorteil tragen, die restlichen Hörzellen des Innenohrs zu schützen und zu unterstützen. Hierbei scheint die Kombination mehrerer Wachstumsfaktoren teilweise erfolgreicher als der Einsatz nur eines [107].

Das Implantat der Zukunft sollte eine Verbesserung der Biomaterialeigenschaften im Hinblick auf die Biokompatibilität aufweisen, sowie eine Optimierung des Implantates selbst, wie zum Beispiel eine Verkleinerung des intracochlären Elektrodenträgers oder die Erhöhung der Zahl unanhängig voneinander stimulierbarer Kanäle. Um eine Verhinderung der Ausbildung des sich um den Elektrodenträger formierenden Bindegewebes zu gewährleisten, sollten neuere Implantatmaterialien oder die Funktionalisierung des etablierten Silikons erprobt werden. Dazu gehören die Oberflächenstrukturierung (physikalische Funktionalisierung), die Anbindung und Freisetzung von Pharmaka direkt am Elektrodenträger (Drug-Delivery-Funktionalisierung), die Freisetzung biologischer Substanzen aus aufgetragenen Zellschichten (biologische Funktionalisierung) oder eine Beschichtung mit Signalproteinen (biochemische Funktionalisierung) [14].

Sowohl die Minimierung des Bindegewebewachstums, als auch die Applizierung von Nervenwachstumsfaktoren wurde bereits erfolgreich unabhängig voneinander dargestellt. Deshalb wäre eine Kombination dieser beiden Methoden eine Möglichkeit die Anwendung des Cochlea-Implantates zu optimieren. Diese Kombination kann mit Hilfe der Funktionalisierung des Elektrodenträgers realisiert werden, wobei verschiedene Oberflächenmodifizierungen, wie auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten, zum Einsatz kommen könnten.

8. Anhang

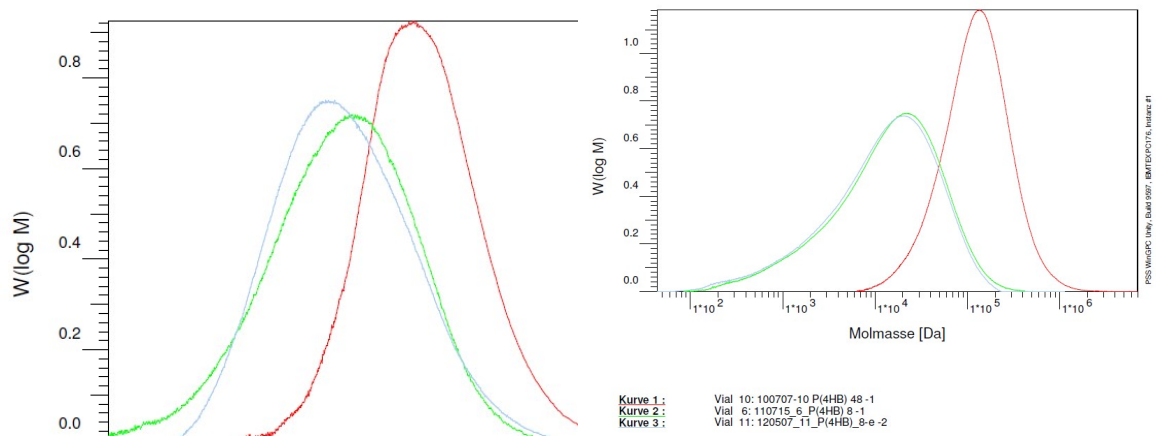


Abbildung 55: GPC-Chromatogramm von PLLA und P(4HB) nach 0, 5 und 48 Wochen enzymatisch degradierter Proben (n = 1)

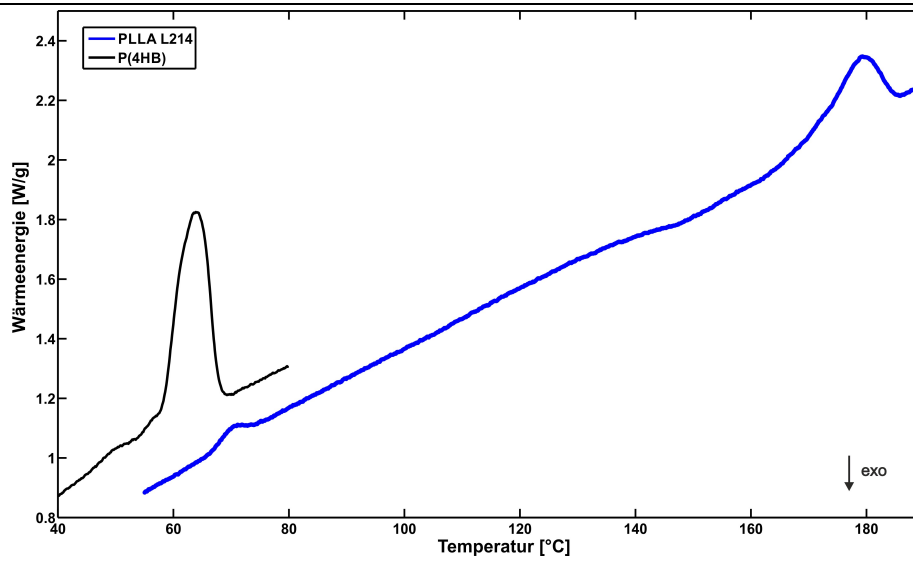


Abbildung 56: Schmelzkurven für PLLA und P(4HB)

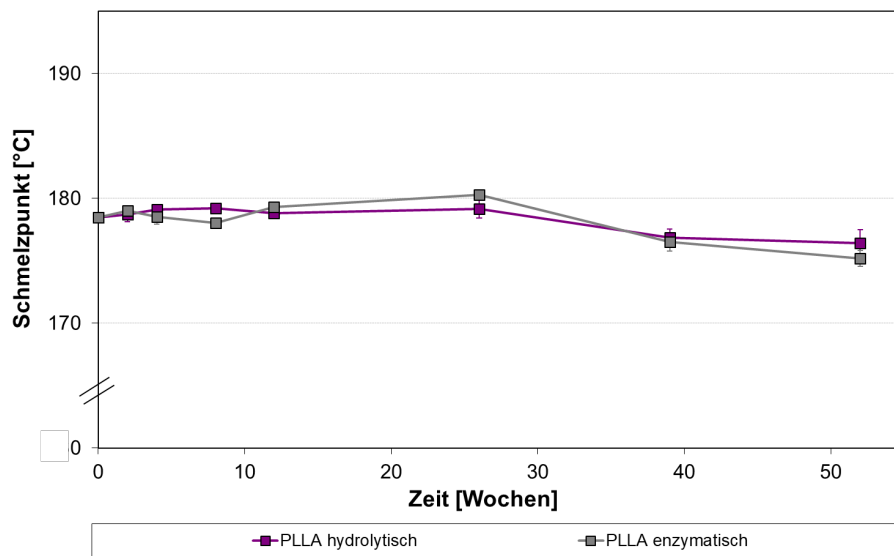


Abbildung 57: Veränderung des Schmelzpunktes im Verlauf der *in vitro* Degradation über 52 Wochen bei hydrolytisch und enzymatisch degradiertem PLLA (n = 5)

9. Literaturverzeichnis

- [1] Hoth S, Plinkert P, Pröschel U, Strate B
 „Das Cochlea Implantat - Eine Informationsschrift für Patienten“
<http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/fileadmin/hno/pdf/CInfoPat.pdf>
 letzter Zugriff: 28.11.2018
- [2] Stoll W
 „Klinik der menschlichen Sinne“
 1. Auflage, Springer Verlag, **2008**, Wien, 19 - 22
- [3] Mühler R, Ziese M
 „Technischer Leitfaden cochlea implantat“
 Universität HNO Klinik Magdeburg Universitäts-HNO-Klinik Magdeburg, **2010**
https://www.med.uni-magdeburg.de/unimagdeburg_mm/Bilder/Kliniken/KHNO/cochlear+implant/technik_leitfaden+cochlear+implant-p-8859.pdf
 letzter Zugriff: 28.11.2018
- [4] Marangos N, Laszig R
 „Cochlear Implants Die prothetische Versorgung bei Taubheit um die Jahrtausendwende“
 HNO, **46**, **1998**, 12 - 26
- [5] Cochlea Implantat
<http://www.schnecke-online.de/informieren/behandlung-und-reha/cochlea-implantat.html>
 Letzter Zugriff: 20.09.2010
- [6] Cochlear Implant Selbsthilfegruppe Dresden
 „Was ist ein CI?“
<https://www.ci-dresden.de/was-ist-ein-ci/>
 letzter Zugriff: 30.11.2018
- [7] Cochlear Ltd.
<http://www.cochlear.com/de/hoerverlust-im-hochtonbereich>
 letzter Zugriff: 29.10.2013
- [8] Bergische Universität Wuppertal, Lehrstuhl für Nachrichtentechnik/Audiosignalverarbeitung und für incar Noise Control
http://www.dasp.uni-wuppertal.de/ars_auditus/physiologie/innenohr1.htm
 letzter Zugriff: 30.10.2014
- [9] Psyhyrembel Klinisches Wörterbuch online
<https://www.psyhyrembel.de/cochlea/K053G/doc/>
 Letzter Zugriff: 30.11.2018
 Stichwort „Cochlea“
- [10] Chan H, Cheng K, Chu C, Lam K, Lam S, Lee W, Tang M, Wong G, Yip K
 „Cross section of ear: consisting of the outer ear, middle ear and inner“
<http://www.wong.ro/oto/>
 Letzter Zugriff: 30.11.2018
- [11] University of California, San Francisco
<http://ohns.ucsf.edu/?q=node/110>
 letzter Zugriff: 24.07.2013
- [12] Tinnituszentrum Wien
 „Wie funktioniert das hören?“
<https://www.hno-doctors.at/de/tinnitus/wie-funktioniert-das-h%C3%B6ren/>
 Letzter Zugriff: 30.11.2018

-
- [13] Wintermantel E, Ha S
„*Medizintechnik Life Science Engineering*“
5. Auflage, Springer Verlag Berlin, **2009**, Heidelberg, 1401-1417
- [14] Stöver T, Lennarz T
“*Biomaterials for Cochlear Implants*”
Laryngorhinootologie, 88, **2009**, 12-31
- [15] Borenstein J
“*Intracochlear drug delivery systems*”
Expert Opin Drug Deliv, 8(9), **2011**, 1161-1174
- [16] Chikar J
“*Novel Methods to Promote Survival and Regeneration of the Auditory Nerve and Improve Cochlear Implant Function*”
Dissertation, The University of Michigan, **2009**
- [17] Staecker H, Jolly C, Garnham C
“*Cochlear implantation: an opportunity for drug development*”
Drug Discov Today, 15(7-8), **2010**, 314-321
- [18] Wise A, Richardson R, Hardman J, Clark G, O'Leary S
“*Resprouting and survival of guinea pig cochlear neurons in response to the administration of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3*”
J Comp Neurol, 487, **2005**, 147-165
- [19] Rajan G, Kuthubutheen J, Hedne N, Krishnaswamy J.
“*The role of preoperative, intratympanic glucocorticoids for hearing preservation in cochlear implantation: a prospective clinical study*”
Laryngoscope, 122, **2012**, 190–195.
- [20] Plontke S, Siedow N, Wegener R, Zenner H, Salt A
“*Cochlear Pharmacokinetics with Local Inner Ear Drug Delivery Using a Three-Dimensional Finite-Element Computer Model*”
Audiol Neurootol, 12 (1), **2007**, 37-48
- [21] Salt A, Plontke S
“*Local inner-ear drug delivery and pharmacokinetics*”
Drug Discov Today, 10, **2005**, 1299-1306
- [22] “*Das normale Spiralganglion*”
Acta Otolaryngol, 64 (226), **1967**, 6-33
- [23] Euteneuer S, Hansen S, Ryan A
„*The role of the spiral ganglion neurons in cochlear implants. Today and in future regenerative inner ear treatment*“
HNO, 56, **2008**, 457-460
- [24] Richardson R, Wise A, Andrew J, O'Leary S
“*Novel drug delivery systems for inner ear protection and regeneration after hearing loss*”
Expert Opin Drug Deliv, 5(10), **2008**, 1059-1076
- [25] Plontke S, Salt A
„*Simulation of application strategies for local drug delivery to the inner ear*“
Otorhinolaryngol Relat Spec., 68(6), **2006**, 386-392
- [26] Staecker H, Garnham C
“*Neurotrophin therapy and cochlear implantation: Translating animal models to human therapy*”
Exp Neurol, 226 (1), **2010**, 1–5

- [27] Evans A, Thompson B, Wallace G, Millard R, O'Leary S, Clark G, Shepherd R, Richardson R
"Promoting neurite outgrowth from spiral ganglion neuron explants using polypyrrole/BDNF-coated electrodes"
J Biomed Mater Res A, 91(1), **2009**, 241-50
- [28] Williams D, de Putter C, de Lange K, de Groot K, Lee A
"Consensus and definitions in biomaterials, in *Advances in biomaterials*"
8. Auflage, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, **1988**
- [29] Wintermantel E, Ha S
„Medizintechnik Life Science Engineering“
5. Auflage, Springer Verlag Berlin, **2009**, Heidelberg, 63-66
- [30] Wintermantel E, Ha S
„Medizintechnik Life Science Engineering“
5. Auflage, Springer Verlag Berlin, **2009**, Heidelberg, 189-190
- [31] Wintermantel E, Ha S
„Medizintechnik Life Science Engineering“
5. Auflage, Springer Verlag Berlin, **2009**, Heidelberg, 67-104
- [32] Wintermantel E, Ha S
„Medizintechnik Life Science Engineering“
5. Auflage, Springer Verlag Berlin, **2009**, Heidelberg, 219-276
- [33] Jenkins A, Kratochvíl P, Stepto R, Suter U
"Glossary of basic terms in polymer science (IUPAC Recommendations 1996)"
Pure Appl Chem, Vol. 68, No.12, **1996**, 2287-2311
- [34] Dominginghaus H, Elsner P, Eyerer P, Hirth T
„Einführung in Polymer Engineering, aus *Kunststoffe Eigenschaften und Anwendungen*"
6. Auflage, Springer Verlag Berlin, **2012**, Heidelberg, 1-114
- [35] Falbe J, Regitz M
Römpp, Chemie Lexikon, Band 5
10. Auflage, G. Thieme Verlag, **1999**, Stuttgart, 3441-3442
Stichwort: Polyester
- [36] William L, Luria M
"The Role of Medical Grade Silicones in Surgery and its Topical Applications"
Operat Techn Plast Reconstr Surg, 9 (2), **2002**, 67-74
- [37] Sternberg K, Petersen S, Grabow N, Senz V, Meyer zu Schwabedissen H, Kroemer H, Schmitz K
„Implant-associated local drug delivery systems based on biodegradable polymers: customized designs for different medical applications"
Biomed Tech, 58(5), **2013**, 417-427
- [38] Schakenraad, Hardonk, Feijen, Molenaar, Nieuwenhuis,
"Enzymatic activity towards poly(L-lactic acid) implants"
J Biomed Mater Res, 24, **1990**, 529-545
- [39] Thelen H
„Bewertung der Biokompatibilität von Poly(L-lactid) als Wirkstoffmatrix in Stent-Beschichtungen“
Abschlussarbeit Postgradualstudium Toxikologie der Universität Leipzig, **2005**
- [40] Vert M, Li S, Spenlehauer G, Guerin P
"Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters"
J Mater Sci Mater Med, 3, **1992**, 432-446
- [41] Chawla A, Chang T
"In vivo degradation of poly(lactid acid) of different molecular weights"
Biomater Med Devices Artif Organs, 13, **1985**, 153-162.

- [42] Martin D, Skraly F, Williams S
"Polyhydroxyalkanoate composition having controlled degradation rates"
Patent: WO 99/32536, **1999**
- [43] Teske M
„Nass- und plasmachemische Oberflächenmodifizierung biodegradierbarer, polymerer Implantatwerkstoffe unter Immobilisierung von Wirkstoffen zur Optimierung der ZelleImplantat-Interaktion“
Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizinwissenschaften der Universitätsmedizin Rostock, **2013**
- [44] Martin D, Williams S
"Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial"
Biochem Eng J, 16 (2), **2003**, 97–105
- [45] Mukai K, Doi Y, Sema Y, Tom K
"Substrate specificities in hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by microbial esterases"
Biotechnol Lett, 15 (6), **1993**, 601-604
- [46] Brandi H, Bachofen R, Mayer J, Wintermantel E
„Degradation and applications of polyhydroxyalkanoates“
Can J Microbiol, 41(13), **1995**, 143-153
- [47] Philip S, Keshavarz T, Roy I
"Review Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications"
J Chem Technol Biotechnol, 82, **2007**, 233-247
- [48] König B, Taufig A
„Hyaluronsäure“
J Ästh Chirurg, 3 (1), **2010**, 6-11
- [49] Laurent T, Fraser J
„Hyaluronan“
FASEB J, 6, **1992**, 2397-2404
- [50] Wohlrab W, Neubert R, Wohlrab J
„Trends in Clinical and Experimental Dermatology Volume 3 - HYALURONSÄURE UND HAUT“
1. Auflage, Shaker Verlag, **2004**, Aachen, 1-54
- [51] Lapcık LJr, Lapcık L, De Smedt S, Demeester J, Chabreck P
„Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications“
Chem Rev, 98 (8), **1998**, 2663-2684
- [53] Falbe J, Regitz M
Römpp, Chemie Lexikon, Band 3
10. Auflage, G. Thieme Verlag, **1997**, Stuttgart, 1835
Stichwort: Hydrogele
- [54] Luo Y, Kirker K, Prestwich G
"Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery"
J Control Release, 69, **2000**, 169-184
- [55] Monica Florina Sallai
„Poly-L-Lysin als bioabbaubares Flockungshilfsmittel und als Baustein für stimuli-responsive Porenmembranen“
Dissertation, Essen, **2010**
- [56] Picart C, Mütterer J, Richert L, Luo Y, Prestwich G, Schaaf P, Voegel J, Lavallo P
"Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers"
Proc Natl Acad Sci, 99 (20), **2002**, 12531-12535

- [57] Ebert C, Ebert G
„Ordnungsumwandlungen von basischen Poly- α -Aminosäuren“
Colloid & Polymer Sci, 255, **1977**, 1041-1053
- [58] Hahn S, Hoffman A
„Characterization of Biocompatible Polyelectrolyte Complex Multilayer of Hyaluronic Acid an Poly-L-Lysine“
Biotechnol Bioprocess Eng, 9 (3), **2004**, 179-183
- [59] Wilmer G. Miller
“Degradation of Synthetic Polypeptides. III. Degradation of Poly- α ,L-lysine by, Proteolytic Enzymes in 0.20 M Sodium Chloride”
J Am Chem Soc, 86 (19), **1964**, 3918-3922
- [60] Burke S, Barrett C
“pH-Responsive Properties of Multilayered Poly(L-lysine)/Hyaluronic Acid Surfaces”
Biomacromolecules, 4, **2003**, 1773-1783,
- [61] Hoffman A
“Hydrogels for biomedical applications”
Adv Drug Deliv Rev, 64, **2012**, 18-23
- [62] Hahna S, Hoffman A
“Preparation and characterization of biocompatible polyelectrolyte complex multilayer of hyaluronic acid and poly-l-lysine”
Int J Biol Macromol, 37, **2005**, 227-231
- [63] Silikone in der Medizin
<http://www.dowcorning.com/content/publishedlit/MMV0396-03.pdf>
letzter Zugriff: 29.11.2013
- [64] Domininghaus H, Elsner P, Eyerer P, Hirth T
“Kunststoffe, Eigenschaften und Anwendungen”
8. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2012**
- [65] Zietlow J,
„Biokompatibilitätserhöhung von Silikonimplantatoberflächen durch plasmagestützte Beschichtungsverfahren“
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, **2011**
- [66] Hartmann H, Schlosshauer B
„Fremdkörper-Reaktion auf Biomaterialien und Strategien zum Funktionserhalt von Implantaten“
Biomaterialien, 11, **2010**, 15-23
- [67] Habal M
“The Biologic Basis for the Clinical Application of the Silicones A Correlate to Their Biocompatibility”
Arch Surg, 119 (7), **1984**, 843-848
- [68] Burmeister J, Vraný J, Reichert W, Truskey G
“Effect of fibronectin amount and conformation on the strength of endothelial cell adhesion to HEMA/EMcAo polymers“
J Biomed Mater Res, 30, **1996**, 13-22
- [69] Groth T
„Die Bedeutung der Volumen- und Oberflächeneigenschaften von Biomaterialien für die Adsorption von Proteinen und nachfolgende zelluläre Reaktionen“
Habilitationsschrift, Universität Potsdam, **2002**
- [70] Böhme T, Krautz H, Thielsch R
„Vakuumbeschichtung von PET - Folie mit Solar - Control - Schichten“
Vakuum in Forschung und Praxis, 15 (1), **2003**, 15

- [71] Harwardt M
„*Funktionalisierung von Polydimethylsiloxan-Oberflächen zur Steuerung molekularer Zell-Substrat Wechselwirkungen*“
Dissertation, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, **2007**
- [72] Falbe J, Regitz M
Römpp, Chemie Lexikon, Band 5
10. Auflage, G. Thieme Verlag, **1999**, Stuttgart, 3373-3374
Stichwort: Plasma
- [73] Meyer-Plath A
“*Grafting of Amino and Nitrogen Groups on Polymers by Means of Plasma Functionalisation*”
Dissertation, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, **2002**
- [74] Klee D, Breuers W, Bilo-Jung M, Mittermayer C, Höcker H
„*Modifizierung von Polymeroberflächen zur Erhöhung der Zelladhäsion*“
Angew Makromol Chem, 166/167, **1989**, 179
- [75] Rieß K
„*Plasmamodifizierung von Polyethylen*“
Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, **2001**
- [76] Roth J
„*Funktionalisierung von Silikonoberflächen*“
Dissertation, Technische Universität Dresden, **2008**
- [77] Ullmann R
„*Oberflächenfunktionalisierung von Poly(dimethyl)siloxan*“
Dissertation, Technischen Universität Chemnitz, **2012**
- [78] Choi S, Newby B
„*Suppress polystyrene thin film dewetting by modifying substrate surface with aminopropyltriethoxysilane*“
Surface Science, 600, **2006**, 1391-1404
- [79] Strobl M
„*Analytische Beiträge zur Entwicklung von neuartigen Implantatoberflächen*“
Masterarbeit, Universität Wien, **2012**
- [80] Sternberg K
„*Funktionalisierte, degradierbare Polymerbeschichtungen zur lokalen Freisetzung von Wirkstoffen – Entwicklung und Charakterisierung von Drug-Eluting Stents für verschiedene medizinische Indikationen*“
Habilitation, Universität Rostock, **2008**
- [81] Steinhilber D, Schubert-Zsilavecz M, Roth H
„*Medizinische Chemie – Targets und Arzneistoffe*“
2. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag, **2005**, Stuttgart
- [82] Ratner B, Hoffman A, Schoen F, Lemons J.
“*Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*”
3. Auflage, Academic Press, **2008**, Canada
- [83] Xu J, Shepherd R, Millard R, Clark G
“*Chronic electrical stimulation of the auditory nerve at high stimulus rates: a physiological and histopathological study*”
Hear Res, 105 (1-2), **1997**, 1
- [84] Falbe J, Regitz M
Römpp, Chemie Lexikon, Band 2,
10. Auflage, G. Thieme Verlag, **1997**, Stuttgart, 812-813
Stichwort: Corticosteroide

- [85] Saßmann V
„*Klinische Anwendungsbeobachtung bezüglich des Effekts von 8 mg Dexamethason i.v. auf den postoperativen Piriramidbedarf nach endoprothetischem Hüftgelenkersatz*“
Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, **2012**
- [86] Lipp H
„*Arzneistoff-Profile – Basisinformationen über Arzneiliche Wirkstoffe*“, Band 4,
19. Ergänzungslieferung, GOVI-Verlag GmbH, Pharmazeutischer Verlag Frankfurt
am Main, **2004**
Stichwort: Dexamethason
- [87] Falbe J, Regitz M
Römpp, *Chemie Lexikon*, Band 2,
10. Auflage, G. Thieme Verlag, **1997**, Stuttgart, 926-927
Stichwort: Dexamethason
- [88] Niedermeier K
„*Etablierung eines Meningitis-Modells für das Meerschweinchen und
Untersuchung Dexamethason-freisetzender Cochlea-Implantate*“
Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität München, **2011**
- [89] Jolly C
„*Implantable neuro-stimulation electrode with drug elution material*“
Patent US 2008/0033520 A1, **2008**
- [90] Farahmand Ghavi F, Mirzadeh H, Imani M, Jolly C, Farhadi M
„*Corticosteroid-releasing cochlear implant: a novel hybrid of biomaterial and drug
delivery system*“
J Biomed Mater Res B Appl Biomater, **94**, **2010**, 388-398
- [91] Planck H
„*Kunststoffe und Elastomere in der Medizin*“
1. Auflage, Kohlhammer, **1993**
- [92] Wintermantel E, Ha S
„*Medizintechnik Life Science Engineering*“
5. Auflage, Springer Verlag Berlin, **2009**, Heidelberg, 897-906
- [93] Wintermantel E, Ha S
„*Medizintechnik Life Science Engineering*“
5. Auflage, Springer Verlag Berlin, **2009**, Heidelberg, 1297-1312
- [94] www.chempedia.de
<http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/9/mac/netzwerke/vernetzung/hauptvalenz.vlu/Page/vsc/de/ch/9/mac/andere/acrylsaeure/quellung.vscml.html>,
letzter Zugriff: 29.04.2014
Stichwort: Quellung von Netzwerken
- [95] Paz R
„*Studie zur kontrollierten Freisetzung biologisch aktiver Substanzen aus
resorbierbaren Nano- und Mikrosphären*“
Dissertation, Technischen Hochschule Aachen, **2004**
- [96] Huang B, Wu H, Kim S, Zare R
„*Coating of poly(dimethylsiloxane) with n-dodecyl-beta-D-maltoside to minimize
nonspecific protein adsorption*“
Lab Chip, **5** (10), **2005**, 1005-1007
- [97] Schliephake H, Aref A, Scharnweber D, Bierbaum S, Roessler S, Sewing A
„*Effect of immobilized bone morphogenic protein 2 coating of titanium implants on
peri-implant bone formation*“
Clin Oral Implants Res, **16** (5), **2005**, 563-569

- [98] Nahar P, Naqvi A, Basir S
„Sunlight-mediated activation of an inert polymer surface for covalent immobilization of a protein“
Anal Biochem, 327 (2), **2004**, 162-164
- [99] Nahar P, Wali N, Gandhi R
„Light-induced activation of an inert surface for covalent immobilization of a protein ligand“
Anal Biochem, 294 (2), **2001**, 148-153
- [100] Chemistry of Crosslinking
<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=CE4D6C5C-5946-4814-9904-C46E01232683>
letzter Zugriff: 02.03.2019
- [101] DSG Crosslinker
<http://www.proteochem.com/dsgcrosslinker100mg-p-45.html>
letzter Zugriff: 23.03.2019
- [102] DSS Crosslinker
<http://www.proteochem.com/dsscroslinker1gram-p-75.html>
letzter Zugriff: 23.03.2019
- [103] Protein Crosslinkers & Protein Crosslinking Reagents
<http://www.proteochem.com/proteincrosslinkers-c-1.html>
letzter Zugriff: 03.06.2014
- [104] EGS Crosslinker
<http://www.proteochem.com/egscrosslinker100mg-p-153.html>
letzter Zugriff: 16.10.2014
- [105] BSO COES
https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0011283_BSO COES_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogIEJTT0NPRVM=
letzter Zugriff: 23.03.2019
- [106] Hermanson GT.
„Bioconjugate Techniques“
2. Auflage, Academic Press, Elsevier, **2008**
- [107] Guntinas-lichius O
„Wachstumsfaktoren in der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde“
Laryngo-Rhino-Otol, 81 (1), **2002**, 39-60
- [108] Barde Y, Edgar D, Thoenen H
„Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain“
EMBO J, 1 (5), **1982**, 549-553
- [109] Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H, Barde Y
„Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor“
Nature, 341, **1989**, 149-152
- [110] human BDNF
<https://www.novoprotein.com/product/c076>
Letzter Zugriff: 22.06.2014
- [111] recombinant human BDNF
<https://www.peprotech.com/de/recombinant-humanmurinerat-bdnf>
Letzter Zugriff: 23.03.2019

- [112] Amine-Reactive Crosslinker Chemistry
<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/amine-reactive-crosslinker-chemistry.html>
Letzter Zugriff: 23.03.2019
- [113] „Definitions of terms relating to reactions of polymers and to functional polymeric materials (IUPAC Recommendations 2003)“
PAC, 76, **2004**, 889 -893
Letzter Zugriff: 22.06.2014
- [114] Göpferich A
„Mechanisms of polymer degradation and erosion“
Biomaterials, 17 (2), **1996**, 103-114
- [115] Lendlein A
„Polymere als Implantatwerkstoffe“
Chemie in unserer Zeit, 5, **1999**, 279-295
- [116] Burkensroda F
„Untersuchung der homogenen und heterogenen Erosion bioabbaubarer Polymere“
Dissertation, Fakultät Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg, **2002**
- [117] Grizzi I, Garreau H, Li S, Vert M
„Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependenc“,
Biomaterials, 16, **1995**, 305-311
- [118] „Glossary for chemists of terms used in toxicology (IUPAC Recommendations 1993)“
PAC, 65, **1993**, 2020
<http://goldbook.iupac.org/B00656.html>,
Letzter Zugriff: 24.06.2014
- [119] Enzymklassen
<http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/4/cm/kinetik/enzymklassen.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/biokatalyse/ldh.vscml.html>
Letzter zugriff 24.06.2014
- [120] Lactatdehydrogenase
<http://flexikon.doccheck.com/de/Lactatdehydrogenase>
Letzter Zugriff: 23.06.2014
- [121] Juhn S, Ward W
„Alteration of Oxidative Enzymes (LDH ans MDH) in Perilymph after noise Exposure“
Arch Otorhinolaryngol, 222, **1979**, 103-108
- [122] Lotz P, Kuhl K
„Die Lactatdehydrogenase des Innenohres“
Arch Klin Exp Ohren Nasen Kehlkopfheilkd, 192, **1968**, 237-248
- [123] Trela F
„Die Bedeutung der Innenohrflüssigkeit für die Gerichtliche Medizin“
Z Rechtsmed, 77, **1975**, 17-23
- [124] Neşe Çokuğraş A,
„Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance“
Turk J Biochem, 28 (2), **2003**, 54-61
- [125] Cochlea-Implantat-Systeme
http://www.kestner.de/n/verschiedenes/presse/2005/ImplKat_Cochlea_2005.pdf
letzter Zugriff: 01.07.2014
- [126] Shah N, Macdonald M, Beben Y, Padera R, Samuel R, Hammond P
„Tunable dual growth factor delivery from polyelectrolyte multilayer films“
Biomaterials, 32, **2011**, 6183-6193

- [127] Bohl A, Rohm H, Ceschi P, Paasche G, Hahn A, Barcikowski S, Lenarz T, Stöver T, Pau H, Schmitz K, Sternberg K
„Development of a specially tailored local drug delivery system for the prevention of fibrosis after insertion of cochlear implants into the inner ear“
J Mater Sci Mater Med, 23 (9), **2012**, 2151-2162
- [128] Teske M
„Nass- und plasmachemische Oberflächenmodifizierung biodegradierbarer, polymerer Implantatwerkstoffe unter Immobilisierung von Wirkstoffen zur Optimierung der ZelleImplantat-Interaktion“
Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizinwissenschaften der Universitätsmedizin Rostock, **2013**
- [129] Kui-Xiang M, Chee-Hin H, Furong Z, Tai-Shung C.
„Investigation of surface energy for organic light emitting polymers and indium tin oxide“
Thin Solid Films, 371(1-2), **2000**, 140–147
- [130] Zhang S, Robertson D, Yates G, Everett A
“Role of L-Type Ca²⁺ Channels in Transmitter release from mammalian inner hair cells I. Gross sound-evokes potentials”
J Neurophysiol, 82, **1999**, 3307-3315
- [131] ISO 15814:1999(E)
„Implants for surgery - Copolymers and blends based on polylactide - In vitro degradation testing“
1999
- [132] ISO 13781:1997(E)
„Poly(L-lactide) resins and fabricated forms for surgical implants - In vitro degradation testing“
1997
- [133] Freier T, Kunze C, Nischan C, Kramer S, Sternberg K, Sass M, Hopt U, Schmitz K
„In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patchbased on poly(3-hydroxybutyrate)“
Biomaterials, 23, **2002**, 2649–2657
- [134] Schakenraad J, Hardonk M, Feijen J, Molenaar I, Nieuwenhuis P
„Enzymatic activity toward poly(L-lactic acid) implants“
J Biomed Mater Res, 24 (5), **1990**, 529-545
- [135] butyrylcholinesterase overview
<http://de.slideshare.net/lukelightning/butyrylcholinesterase-overview-substrates-inhibitors-structure-mechanism-therapeutic-indications>
Letzter Zugriff 02.03.2019
- [136] Calderon-Margalit R, Adler B, Abramson J, Gofin J, Kark J
„Butyrylcholinesterase Activity, Cardiovascular Risk Factors, and Mortality in Middle-Aged and Elderly Men and Women in Jerusalem“
Clin Chem, 52 (5), **2006**, 845-852
- [137] Schindler K, Schnieder E, Wullstein H
„Vergleichende Bestimmung einiger Elektrolyte und organischer Substanzen in der Perilymphe Otosklerosekranker Patienten“
Acta Otolaryngol, 59 (2-6), **1965**, 309-319
- [138] Enzymatic Assay of L-Lactic Dehydrogenase
http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/l6508enz.pdf
Letzter Zugriff: 14.08.2014

-
- [139] Zech R, Franke K, Domagk G
„A micromethod for the simultaneous determination of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in mammalian blood“
Z Klin Chem Klin Biochem, 7 (5), **1970**, 547-550
- [140] M. Otto
„Analytische Chemie“,
2. Auflage, Wiley-VCH, **2000**, Weinheim
- [141] Petersen S, Hussner J, Reske T, Grabow N, Senz V, Begunk R, Arbeiter D, Kroemer H, Schmitz K, Meyer zu Schwabedissen H, Sternberg K.
“In vitro study of dual drug-eluting stents with locally focused sirolimus and atorvastatin release”
J Mater Sci Mater Med, 24, **2013**, 2589–2600
- [142] Jolly C, Garnham C, Mirzadeh H, Truy E, Martini A, Kiefer J, Braun S.
“Electrode features for hearing preservation and drug delivery strategies”
Adv Otorhinolaryngol, 67, **2010**, 28-42
- [143] new technology help people hearing loss
<https://techmoran.com/new-technology-help-people-hearing-loss/cochlear-implant-internal-and-external-components-1/>
Zugriff: 16.09.2014
- [144] Cochlea-Implantat (Einfache Sprache)
<https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/index.php?id=115164&L=9>
Zugriff: 16.09.2014
- [145] DSG Crosslinker
<http://www.proteochem.com/dsgcrosslinker100mg-p-45.html>
letzter Zugriff: 16.10.2014
- [146] DSS Crosslinker
<http://www.proteochem.com/dsscroslinker100mg-p-74.html>
letzter Zugriff: 16.10.2014
- [147] DSSeb Crosslinker
<http://www.proteochem.com/dssebcrosslinker100mg-p-259.html>
letzter Zugriff: 16.10.2014
- [148] N,N-disuccinimidyl carbonate
<http://www.scbio.de/datasheet-253161-n-n-disuccinimidyl-carbonate.html>
letzter Zugriff: 16.10.2014
- [149] Voigt R
„Pharmazeutische Technologie“
11. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag, **2000**, Stuttgart

10. Chemikalienliste

Tabelle 18: Chemikalienliste

Chemikalie	CAS-Nr.	Reinheit	Hersteller
NuSil MED-4234		Medical grade	NuSil Technology Europe, Mougins, France
Poly(L-lactid) (PLLA, Resomer L214)		n.b.	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim, Germany
Chloroform	67-66-3	99,8 %	J. T. Baker, Inc., Deventer, The Netherlands
Poly(4-hydroxybuttersäure) (P(4HB) TephafLEX®)		n.b.	Tepha, Inc., Boston MA, USA
1,2-Dichlorethan	107-06-2	99,8 %	Sigma-Aldrich, Munich, Germany
Hyaluronsäure (Hyaluronic acid sodium salt from Streptococcus equi sp.)	9067-32-7	n.b.	Fluka, Munich, Germany
Poly(L-lysin) (Poly(L-lysin) hydrochloride)	26124-78-7	n.b.	Sigma-Aldrich, Munich, Germany
NaAc: Natriumacetat	127-09-3	99 %	Sigma-Aldrich, Munich, Germany
Wasser		Reinstwasser SG r = 0.05 IS/cm at 25 °C,	Ultra clear, Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel, Germany
Zitronensäure	77-92-9	99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Methanol	67-56-1	99,9 %	LiChrosolv, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Tetrahydrofuran	109-99-9	99,9 %	Fluka, Munich,

			Germany
NHS: N-Hydroxysuccinimid	6066-82-6	99 %	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
EDC: N-(3-Dimethylaminopropyl)- N'-ethylcarbodiimidehydrochloride	25952-53-8	n.b.	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
BDNF: Recombinant human Brain derived neurotrophic factor		n.b.	RayBiotech, Inc., Norcross, USA
NaCl: Natriumchlorid	7647-14-5	99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O: Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	10049-21-5	p.A.	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O: Di- Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	10028-24-7	98 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Na ₂ HPO ₄ : Di- Natriumhydrogenphosphat	7558-79-4	99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
DMSO: Dimethylsulfoxid	67-68-5	99,5 %	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
DSC: N,N'-Disuccinimidylcarbonat	74124-79-1	99 %	Fluka, Munich, Germany
DSG: Disuccinimidylglutarate	79642-50-5	97 %	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
DSS: Disuccinimidylseberate	68528-80-3	n.b.	Thermo Scientific Inc., Bremen, Germany
DSSeb: Disuccinimidylsebacate	23024-29-5	97 %	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
EGS: Ethyleneglycol bis(succinimidyl succinate)	70539-42-3	n.b.	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
BSOCOES: Bis[2-(N-succinimidyl- oxycarbonyloxy)ethyl] sulfone	57683-72-4	97 %	Merck KGaA, Darmstadt,

			Germany
Ethanol	64-17-5	abs.	Sigma-Aldrich, Munich, Germany
Ammoniakgas	7664-41-7	99,995 %	n.b.
Sauerstoffgas	7782-44-7	99,995 %	n.b.
APTES: (3-Aminopropyl)triethoxysilane	919-30-2	99 %	Sigma-Aldrich, Munich, Germany
1,2-dichloroethane	107-06-2	99,8 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
N,N-Dimethylformamide	68-12-2	99,8 %	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Aceton	67-64-1	99,9 %	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Natriumhydroxyd	1310-73-2	98 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Aluminium-Oxid-Suspension		n.b.	Buehler GmbH
Natriumpyruvat	113-24-6	99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
BDNF-ELISA-Kit			RayBiotech Inc., Norcross GA, USA
Kaliumchlorid	7447-40-7	99,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Glucose	50-99-7	99,5 %	Sigma-Aldrich, Munich, Germany
CaCl ₂ : Calciumchlorid	10043-52-4	98 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
MgCl ₂ : Magnesiumchlorid	7786-30-3	98,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
NaHCO ₃ : Natriumhydrogencarbonat	144-55-8	99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,

8. Anhang

			Germany
LDH-4: Lactatdehydrogenase Isoenzym-4		100 U	RayBiotech, Inc., Norcross GA, USA
LDH-5: Lactatdehydrogenase Isoenzym-5	9001-60-9	100 U	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
But: Butyrylcholinesterase from human serum	9001-08-5	100 U	Sigma-Aldrich, Munich, Germany
β -NADP- Na_2 : β -Nicotinamidadeninukleotidphosphat Dinatriumsalz	24292-60-2	97 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
PBS: Dulbecco`s Phosphate buffered saline ohne Ca und Mg		n.b.	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Milchpulver	68514-61-4	n.b.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany

n.b. – nicht bekannt

11. Geräteliste

Tabelle 19: Geräteliste

Gerät	Hersteller	Typ/Spezifikation
Sprühprozess-Anlage	Institut für Implantattechnologie und Biomaterialien e.V. (IIB e.V., Rostock, Deutschland)	
Waage	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Germany	Mettler Toledo UMX 5 Ultra-micro Balance
Plasmaanlage	Diener electronic GmbH & Co. KG, Ebhausen, Deutschland	Femto
Vakuumtrockenschrank		
Dickenmessgerät	Mitutoyo, Europe GmbH, Neuss, Germany	2109 Mitutoyo
Tauchroboter	KSV Nima, Espoo, Finland	
FTIR-ATR Spektroskopie	Bruker Optics, Ettlingen, Germany	Equinox 55 FTIR spectrometer
Software		OPUS
Kontaktwinkelmessgerät	DataPhysics Instruments GmbH, Flindern, Germany	OCA 20
Software		SCA 20
Elektronenmikroskop	Philips, Eindhoven, Niederlande	XL30 ESEM
Software		
Fluoreszenzmessgerät	BMG Labtech, Offenburg, Deutschland	FLUOstar OPTIMA,
Software		
HPLC	Knauer Wissenschaftlicher Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH, Berlin, Germany	
HPLC-Pumpe	Knauer	Wellchrom, K1001
Degasser	Knauer	n.b.
Autosampler	Knauer	Modell: 816
UV-Detektor	Knauer	Variable Wavelength Monitor
Säulenofen	Knauer	Advanced Scientific Instruments

8. Anhang

Säule	Merck KGaA, Darmstadt, Germany	Chromolith FastGradient RP-18e 50-2
Vorsäule	Supelco	Supelguard™ Discovery C18 2 cm x 2,1 mm x 5 µm
Software		
Software	Analytik Jena	WinAspect
Photometer	Analytik Jena	Specord 50
Thermostat	Huber	n.b.
Software	Analytik Jena	WinAspect
pH-Meter	WTW Weilsheim	pH 340i
pH-Elektrode	Mettler Toledo	InLab 423
Thermomixer	Eppendorf	Comfort
Thermoschüttler	Memmet	n.b.

n.b. – nicht bekannt

Lebenslauf

- **Persönliche Daten**

Geburtsdatum: 29.08.1983

Geburtsort: Rostock

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: geschieden

3 Kinder (2, 6 und 9 Jahre)

- **Wissenschaftlicher Werdegang**

seit 07/2009 Promotionsarbeit am Institut für Biomedizinische Technik, Universität Rostock, Arbeitsgruppe Biomaterialien und Polymerchemie unter der Leitung von Prof. Dr. Katrin Sternberg „Entwicklung von antiproliferativ und neurotroph wirkenden Poly(dimethylsiloxan)-Oberflächen zur Verbesserung der Langzeitfunktionalität von Cochlea-Implantaten“

01/2009 – 11/2014 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biomedizinische Technik, Universität Rostock

02/2008 – 11/2008 Diplomarbeit am Lehrstuhl der Technischen Chemie, Universität Rostock unter der Leitung von Prof. Dr. Udo Kragl „Oxidationsreaktionen und Halogenierungen katalysiert durch eine neuartige Haloperoxidase aus *Agrocybe aegerita*“

10/2003 – 11/2008 Studium der Chemie (Diplom) an der Universität Rostock

Abschluss: Diplom (Note: 2,1)

Schwerpunkt: Umweltchemie

- **Schulbildung**

09/1994 – 07/2003 Abitur am Goethe Gymnasium, Stralsund (Note: 2,3)

08/1990 – 08/1994 Grundschule Friedrich Fröbel, Stralsund

- **Praktische Tätigkeiten und außeruniversitäre Aktivitäten**

Seit 05/2015	Geschäftsführerin des "Bildungscentrums der überbetrieblichen Aus- und Weiterbildung für Umweltschutz und Wasserwirtschaft GmbH"
Seit 11/2014	Ausbilderin für praktische Tätigkeiten im Chemielabor für Chemikanten, Biologielaboranten und Fachkräfte für Umwelttechnische Berufe, sowie Ausbildung von Wasser- und Abwassermeistern
10/2004 – 10/2008	Studentische Hilfskraft am Institut für Biomedizinische Technik, Universität Rostock