

Aus dem Institut für Biomedizinische Technik

Direktor: Prof. Dr.-Ing. habil. K.-P. Schmitz

**Nass- und plasmachemische Oberflächenmodifizierung
biodegradierbarer, polymerer Implantatwerkstoffe unter
Immobilisierung von Wirkstoffen zur Optimierung der Zelle-
Implantat-Interaktion**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizinwissenschaften
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von
Michael Teske

Rostock, 17. Oktober 2013

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. Katrin Sternberg
Institut für Biomedizinische Technik, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Jöckenhövel
Institut für Angewandte Medizintechnik, RWTH Aachen

3. Gutachter: Prof. Dr. Simone Erika Baltrusch
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie,
Universitätsmedizin Rostock

Datum der Einreichung: 18.10.2013

Datum der Verteidigung: 07.01.2014

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 10 |
| 1.1 | Polymere Biomaterialien und deren Oberflächenmodifizierung | 11 |
| 1.1.1 | Biostabile Polymere | 12 |
| 1.1.2 | Biodegradierbare Polymere | 13 |
| 1.1.3 | Oberflächenmodifizierungen zur Optimierung der Interaktion zwischen Biomaterial und Zelle | 14 |
| 1.2 | Polymere Biomaterialien für Implantate des Blutkreislaufes | 18 |
| 1.2.1 | Allgemeine Anforderungen | 18 |
| 1.2.2 | Artifizielle Gefäßprothesen zum Ersatz natürlicher Blutgefäße | 19 |
| 1.2.3 | Stents zur Behandlung der Arteriosklerose | 20 |
| 1.3 | Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit | 22 |
| 2 | Chemische Oberflächenmodifizierung von Polymeren unter Immobilisierung von Modellwirkstoffen | 24 |
| 2.1 | Untersuchte Polymere | 24 |
| 2.1.1 | Poly(ϵ -caprolacton) | 25 |
| 2.1.2 | Poly(3-hydroxybuttersäure) | 25 |
| 2.1.3 | Polyetherurethan Pellethane® | 27 |
| 2.2 | Untersuchte Modellwirkstoffe | 28 |
| 2.2.1 | Acetylsalicylsäure | 28 |
| 2.2.2 | Vascular Endothelial Growth Factor | 29 |
| 2.3 | Chemische Oberflächenaktivierungen von Polymeren zur Generierung terminaler, funktioneller Gruppen | 30 |
| 2.3.1 | Synthese von Aminogruppen | 31 |
| 2.3.2 | Synthese von Hydroxylgruppen | 34 |
| 2.3.3 | Synthese von Carboxylgruppen | 35 |
| 2.4 | Immobilisierung von Modellwirkstoffen auf den chemisch aktivierten Polymeroberflächen | 36 |
| 2.4.1 | Immobilisierung über hydrolytisch stabile, kovalente Bindungen | 37 |
| 2.4.2 | Immobilisierung über hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen | 40 |
| 3 | Nachweis der chemischen Oberflächenaktivierung | 46 |
| 3.1 | Nachweis der chemischen Oberflächenveränderungen nach plasma- bzw. nass-chemischer Aktivierung mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen | 46 |
| 3.2 | Nachweis der chemischen Oberflächenveränderungen mit Hilfe der FTIR-ATR-Spektroskopie | 48 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.3 | Qualitative Untersuchung der Aminogruppenbeladung durch Fluoreszenzfärbung mit 4-Chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol | 50 |
| 3.4 | Quantitative Bestimmung der Aminogruppenbeladung mit Hilfe des Ninhydrin-Tests | 52 |
| 3.5 | Untersuchung der Aminogruppenbeladung mit Hilfe der Röntgenfotoelektronenspektroskopie | 53 |
| 4 | Nachweis der chemischen Oberflächenmodifizierung unter Immobilisierung von Acetylsalicylsäure | 56 |
| 4.1 | Nachweis der chemischen Oberflächenveränderungen nach Immobilisierung von Acetylsalicylsäure mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen | 56 |
| 4.2 | Untersuchungen mit Hilfe der Röntgenfotoelektronenspektroskopie | 57 |
| 4.3 | Charakterisierung des <i>in vitro</i> Freisetzungsverhaltens der immobilisierten Acetylsalicylsäure mit Hilfe chromatografischer Verfahren | 58 |
| 5 | Nachweis der chemischen Oberflächenmodifizierung unter Immobilisierung des Vascular Endothelial Growth Factor | 61 |
| 5.1 | Bestimmung der Vascular Endothelial Growth Factor-Beladung mit Hilfe von PAP- und ABC- Enzyme-linked Immunosorbent Assays | 62 |
| 5.2 | Charakterisierung des <i>in vitro</i> Freisetzungsverhaltens des immobilisierten Vascular Endothelial Growth Factor mit Hilfe eines Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assays | 69 |
| 6 | Untersuchung der <i>in vitro</i> Biokompatibilität der Polymere nach Oberflächenmodifizierung | 72 |
| 6.1 | Biokompatibilität der oberflächenaktivierten Polymere | 72 |
| 6.1.1 | Vitalität von L929 Mausfibroblasten im Direktkontakt mit den oberflächenaktivierten Polymeren | 73 |
| 6.1.2 | Hämokompatibilität - Nachweis der Thrombozytenaktivierung | 75 |
| 6.1.3 | Hämokompatibilität - Nachweis der plasmatischen Gerinnung | 77 |
| 6.2 | Vitalität humaner koronarer arterieller Endothelzellen auf mit Vascular Endothelial Growth Factor beladenen Polymeroberflächen | 79 |
| 7 | Diskussion | 82 |
| 8 | Zusammenfassung und Ausblick | 89 |
| | Abkürzungsverzeichnis | 93 |
| | Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen | 95 |
| | Abbildungen | 95 |
| | Tabellen | 99 |

| | |
|---|------------|
| Literaturverzeichnis | 101 |
| Veröffentlichungen und Fachvorträge..... | 112 |
| Danksagung..... | 114 |
| Anhang..... | 115 |

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.“

„Wenige sind imstande, von den Vorurteilen der Umgebung abweichende Meinungen gelassen auszusprechen; die meisten sind sogar unfähig, überhaupt zu solchen Meinungen zu gelangen.“

Albert Einstein (*1879, † 1955)

***Diese Arbeit widme ich meinem Engel Evelyn Teske,
geb. Weiher (†).***

1. Einleitung

Erste Anwendungen von künstlichen Materialien als Prothesenersatz finden sich bereits in der Antike. Wurden anfangs noch Biomaterialien aus Holz, Knochen, Leder und Keramiken verwendet, wurden später auch Metalle und Glas genutzt [1]. Mit fortschreitender Materialentwicklung hat sich das Spektrum der Anwendungen erweitert. Die Fortschritte in der Herstellung und Verarbeitung von Polymeren förderten diesen Prozess immens. Die mit dem Einsatz des Biomaterials im menschlichen Körper einhergehenden Reaktionen des Organismus auf den Fremdkörper sind bis heute Gegenstand der Forschung, da diese entscheidend von der Beschaffenheit des Biomaterials bzw. Implantats abhängen.

In diesem Zusammenhang sind die Art und das Ausmaß der lokalen Gewebereaktion auch von den physikochemischen Eigenschaften der Biomaterial- bzw. Implantatoberfläche abhängig, die wiederum durch Oberflächenmodifizierungen und Biofunktionalisierungen beeinflussbar sind. Durch gezielte Modifizierungen der Oberfläche in Form von Mikro- und Nanostrukturierungen [2], wirkstofffreisetzenden Beschichtungen [3] und Biofunktionalisierungen [4] konnte eine deutliche Verbesserung der Zelle/Gewebe-Implantat-Interaktion und somit der Implantatfunktion in medizinischen Anwendungen gezeigt werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der Oberflächenmodifizierung polymerer Biomaterialien, die als Werkstoffe für vaskuläre Implantate zur Anwendung kommen. Dazu sollen sowohl verschiedene Methoden der chemischen Oberflächenaktivierung von Polymeren als auch unterschiedliche Verfahren zur Immobilisierung von Wirkstoffen etabliert werden, die es erlauben, ein breit einsetzbares Spektrum von Oberflächenmodifizierungsstrategien für in der Kardiologie und Gefäßchirurgie etablierte polymere Implantatwerkstoffe anzubieten. Untersucht werden sowohl biostabile Polymere, die für eine Langzeitanwendung im Blutkreislauf vorgesehen sind, als auch biodegradierbare Polymere, die als temporäre Stützgerüste (Scaffolds) zur Förderung der Geweberegeneration beabsichtigt sind. Mit den Oberflächenmodifizierungen wird das Ziel verfolgt, die Einheilung des Implantats zu beschleunigen, durch das Implantat induzierte Fremdkörperreaktionen zu minimieren sowie eine hohe Offenheitsrate der vaskulären Implantate mit einem geringen Restenoserisiko zu erreichen, da diese immer noch die limitierenden Faktoren für Langzeitanwendungen im Blutkreislauf darstellen [3].

Im Folgenden werden wichtige Polymerklassen, die als Biomaterialien zur Anwendung kommen, und Methoden zur Oberflächenmodifizierung mit Schwerpunkt für vaskuläre Implantatanwendungen wie Stents und Gefäßprothesen vorgestellt (Kap. 1.2). Danach werden die untersuchten Polymere und Modellwirkstoffe, die durchgeführten chemischen Oberflächenaktivierungen sowie die Kopplungsreaktionen zur Immobilisierung der vorgestellten Wirkstoffe erläutert (Kap. 2). Aufgrund der Vielzahl an Untersuchungen wird zur Wahrung der

Übersichtlichkeit auf ein separates Kapitel zur Durchführung der Untersuchungen verzichtet und vielmehr im jeweiligen Ergebnisteil (Kap. 3-6) die verwendete Methode und das damit einhergehende experimentelle Vorgehen einleitend beschrieben. Im abschließenden Kapitel 7 werden die Ergebnisse diskutiert und die verschiedenen Oberflächenaktivierungen in ihrem Einfluss auf die Oberflächenbeladung, die Freisetzung von Wirkstoffen und somit auf ihre *in vitro* Wirksamkeit sowie ihren Einfluss auf die Biokompatibilität gegenübergestellt.

1.1 Polymere Biomaterialien und deren Oberflächenmodifizierung

„Ein Biomaterial ist eine Substanz, die technisch hergestellt wurde, um alleine oder als Teil eines komplexen Systems die Kontrolle von Interaktionen mit Komponenten des lebenden Systems, den Verlauf einer therapeutischen oder diagnostischen Anwendung, in der Human- oder Tiermedizin, zu leiten“ [1]. Im medizinischen Bereich finden sie eine breite Anwendung, wobei das Spektrum von der Wundauflage, über Intraokularlinsen, Zahnersatz- und Zahnfüllungsmaterialien, Nahtmaterialien, Gefäßprothesen, Stents und Endoprothesen bis zum Ersatz ganzer Organe reicht. Als Biomaterialien werden Metalle/Metalllegierungen, Keramiken, Komposite und Polymere verwendet. Der Schwerpunkt der durchgeführten Arbeiten lag auf polymeren Biomaterialien für die Anwendung als Implantatwerkstoffe im Blutkontakt, weshalb im Folgenden nur die Klasse der Polymere näher betrachtet wird.

Polymere sind aus verknüpften Wiederholeinheiten (Monomere) aufgebaute Makromoleküle [5]. Handelt es sich um kurze Ketten mit einer kleinen Anzahl von Monomereinheiten (n bis ca. 10), so nennt man diese Oligomere. Längerkettige Moleküle werden als Polymere bezeichnet [5]. Dabei können die Ketten linear, verzweigt, sternförmig und quervernetzt sein. Die Anordnung der Polymerketten führt zu einer kristallinen (geordneten) oder amorphen (ungeordneten) Struktur. Kettenlänge und Ordnung beeinflussen die Materialeigenschaften. Die Mischung verschiedener Monomere (Copolymere) und Polymere (Blends) ermöglicht die Variierung von Materialeigenschaften, was eine gute Anpassung der polymeren Werkstoffe an die jeweiligen Anforderungen des Implantationsortes ermöglicht. In der Medizin verwendete Polymere können in unter physiologischen Bedingungen nicht-degradierbare (biostabile) und biodegradierbare Polymere unterteilt werden. Im Folgenden werden einige wichtige Polymere dieser Klassen vorgestellt.

Die durch ein Implantat im Empfängergewebe hervorgerufene Reaktion ist Folge der Interaktion von Biomaterial und Gewebe an der Grenzfläche. Dabei werden toxische Materialien, die umliegendes Gewebe absterben lassen können, inerte Materialien, die als Fremdkörper erkannt werden und in einer Bindegewebskapsel isoliert werden, bioaktive Materialien, die ein festes Verwachsen mit dem umgebenden Gewebe ermöglichen, und degradierbare Materialien, die einen Ersatz durch Gewebe und somit eine ungehinderte Geweberegeneration ermöglichen sollen, unterschieden [6].

Für die Verbesserung der Zelle/Gewebe-Biomaterial-Interaktion ist die Modifizierung der Materialoberfläche bei Polymeren eine häufig angewandte Methode. Vorteil dabei ist, dass lediglich die Polymeroberfläche verändert wird und somit die Eigenschaften des polymeren Grundmaterials (Polymerbulk) im Wesentlichen erhalten bleiben. So werden z.B. die Oberflächenenergie, Hydrophilie, Lipophilie, die Porosität, die Leitfähigkeit und die Vernetzung an der Oberfläche beeinflusst, sowie Kontaminationen entfernt. Voraussetzung zur Ankopplung von Biomolekülen für die Oberflächenmodifikation polymerer Biomaterialien ist die Anwesenheit geeigneter funktioneller Gruppen, die, wenn nicht durch den chemischen Aufbau der Monomere bereits vorhanden, meist durch nasschemische, plasmachemische und fotochemische Methoden erzeugt werden. Ein weiteres häufig genutztes Konzept zur Steuerung biologischer Vorgänge ist die lokale Freisetzung von Wirkstoffen, welche überwiegend in polymere Trägerschichten inkorporiert werden [7, 8].

1.1.1 Biostabile Polymere

Biostabile Polymere werden als weitgehend inert betrachtet und vom Körper nicht abgebaut. Dennoch ist in zahlreichen Studien eine langfristige Materialermüdung (Alterung) biostabiler Biomaterialien durch physikalische und chemische Abbauprozesse beschrieben worden, wobei meist oxidativer Abbau, Hydrolyse, Quellung, Versprödung, Auswaschungen und Abrieb die häufigsten Ursachen darstellen. Neben der Alterung stellt das Kriechen, eine temperaturabhängige Verformung bei mechanischer Belastung, ein weiteres Problem der biostabilen Polymere dar [8, 9].

Biostabile Polymere werden beispielsweise für Implantate, die für den permanenten Einsatz vorgesehen sind, benötigt. Die Anforderungen an die Implantate variieren dabei in Abhängigkeit von ihrer Funktion und dem Implantationsort. So ist die Gestaltung der Oberfläche von Blutgefäßersatzimplantaten wichtig, um eine möglichst geringe Thrombogenität zu erreichen, während bei lasttragendem Knochenersatz die mechanischen Anforderungen im Vordergrund stehen. Eine Übersicht der wichtigsten biostabilen Polymere und deren Anwendung gibt Tabelle 1.

Tab. 1: Auswahl wichtiger medizinisch eingesetzter biostabiler Polymere und deren Anwendungsgebiete [9].

| Polymer | Medizinische Anwendungsgebiete |
|---------------------------------|--|
| Polyethylen (PE) | Low-density PE für Filme, Behälter, Schläuche, Spritzen und Verpackungsmaterial; high-density PE, wenn höhere mechanische Stabilität benötigt wird; ultra-high-molecular weight PE für Hüftgelenksendoprothesen, Knie-, Fingergelenkimplantate, Sehnen- und Bänderersatz |
| Polypropylen (PP) | Komponenten für Blutoxygenatoren und Nierendialyse, Fingergelenk-Prothesen, Herzklappen, Nahtmaterial, Einwegspritzen, Verpackungsmaterial |
| Poly(ethylenterephthalat) (PET) | Künstliche Blutgefäße, Nahtmaterial, Sehnen- und Bänderersatz |

| | |
|-------------------------------------|---|
| Poly(vinylchlorid) (PVC) | Weich-PVC als Beutel für Blut und parenterale Lösungen, Schläuche und Katheter; Hart-PVC als Verpackungsmaterial für Spritzen, Nadeln, Nahtmaterial, Schläuche und Medikamente; wegen Versprödung bzw. Additiven für Langzeitanwendungen nicht geeignet |
| Polytetrafluorethylen (PTFE) | Gefäßprothesen |
| Polymethylmethacrylat (PMMA) | Knochenzement, Intraokularlinsen und harte Kontaktlinsen, künstlicher Herzklappenersatz, Zahnersatz, Zahnfüllungsmaterial |
| Polyhydroxyethylmethacrylat (PHEMA) | Kontaktlinsen, Harnblasenkatheter, Nahtmaterialbeschichtungen |
| Polyetheretherketon (PEEK) | Matrix für Verbundwerkstoffimplantate hoher mechanischer und chemischer Stabilität, z.B. für Osteosyntheseplatten und Hüftgelenksschäfte |
| Polysulfon (PSU) | Matrix für Verbundwerkstoffimplantate, z.B. für Osteosyntheseplatten und Hüftgelenksschäfte; Dialysemembranen; wieder verwendbares Verpackungsmaterial |
| Polycarbonate (PC) | Unzerbrechliche, sterile Flaschen, Schläuche und Spritzen, als Verpackungsmaterial und als Komponenten für Dialysegeräte |
| Polyamide (PA) | Nahtmaterial, Katheterschläuche, Spritzen, Komponenten für Dialysegeräte, Herzmitralklappen, künstliche Sehnen oder Bänder |
| Polyurethane (PUR) | Wegen guter blutverträglicher Eigenschaften (speziell Polyetherurethane) für Blutgefäßersatz, Implantatbeschichtungen, künstliche Herzklappen, Herzpumpen, Katheter und Dialysemembranen verwendet; ferner für Hautimplantate, Infusionsschläuche, Schlauchpumpen |
| Polysiloxane | Brustimplantate, künstliche Sehnen und Gelenke, Beatmungsbälge, Bluttransfusionsschläuche, Dialyseschläuche, Dichtungen in medizinischen Geräten, Katheter, Schlauchsonden, künstliche Haut, Harnblasenprothesen, Intraokularlinsen |

1.1.2 Biodegradierbare Polymere

Biodegradierbare Werkstoffe für Implantate zielen auf den graduellen Ersatz des Implantats durch das umliegende Gewebe ab. So kann die vollständige Auflösung des Implantats die notwendige Zweitoperation zur Entfernung des Implantats verhindern. Zudem werden Langzeitfremdkörperreaktionen wie z.B. chronische Entzündungen verhindert und bei der Anwendung im kindlichen Organismus können Wachstumsprozesse ungehindert erfolgen. In der Medizin finden sie Anwendung in Nahtmaterial, Klebstoffen, Stützgerüsten (Scaffolds) für das Tissue Engineering, Osteosyntheseplatten und als Träger für kontrollierte Wirkstofffreisetzungssysteme. Der erste Einsatz eines biodegradierbaren Polymers erfolgte in Form eines Nahtmaterials auf der Basis von Polyglycolid (PGA, Dexon[®], B. Braun) [6]. Heute kommen verschiedene synthetische Polymere, wie aliphatische Polyester, Polyesterurethane, Polyorthoester, Polyanhydride und abbaubare Polycarbonate in der Medizin zur Anwendung. Darüber hinaus werden Biopolymere, d.h. Polymere natürlichen Ursprungs, genutzt, zu denen beispielsweise Polypeptide (Proteine) wie Kollagen sowie Polysaccharide wie Hyaluronsäure, Chitosan und Alginat zählen.

Biodegradierbare Polymere enthalten chemische Bindungen, die unter *in vivo* Bedingungen spaltbar sind. Dabei erfolgt die Spaltung der Bindungen häufig durch (enzymatisch katalysierte) Hydrolyse, während auch unspezifische Enzyme, z.B. Lipasen, den Abbau bedingen können. Die Degradationsprodukte der biodegradierbaren Polymere sollten dabei für die Anwendung als Biomaterial in den biologischen Kreislauf des menschlichen Körpers aufge-

nommen werden. Zudem sollte das Molekulargewicht der Degradationsprodukte geringer als 50.000 g/mol sein, um eine Elimination aus dem Körper über die normalen Ausscheidungswege zu ermöglichen [6]. Eine Einteilung der enzymatisch und nicht-enzymatisch abbaubaren aliphatischen Polyester und deren bekanntesten Vertreter ist in der Tabelle 2 zu finden [9–13].

Tab. 2: Überblick über biodegradierbare aliphatische Polyester und deren bekannteste Vertreter, eingeteilt nach deren chemischen Struktur.

| Polymerklasse | Chemische Struktur | Vertreter | Abbau im Organismus |
|--------------------------------------|--------------------|---|--|
| Poly(α -hydroxycarbonsäuren) | | R = H: Polyglycolid (PGA) R = CH ₃ : Polylactid (PLA) | Hydrolyse durch Zutritt von Wasser; unspezifische Enzyme |
| Poly(β -hydroxycarbonsäuren) | | R = CH ₃ : Poly(3-hydroxybuttersäure) (P(3HB)) | bevorzugt enzymatisch katalysierte Hydrolyse |
| Poly(γ -hydroxycarbonsäuren) | | X = 3: Poly(4-hydroxybuttersäure) (P(4HB)) | bevorzugt enzymatisch katalysierte Hydrolyse |
| Poly(ω -hydroxycarbonsäuren) | | X = 5: Poly(ϵ -caprolacton) (PCL) | Hydrolyse durch Zutritt von Wasser; unspezifische Enzyme |

1.1.3 Oberflächenmodifizierungen zur Optimierung der Interaktion zwischen Biomaterial und Zelle

Die durch ein implantiertes Biomaterial im Gewebe hervorgerufene Reaktion ist Folge der Interaktion zwischen Gewebe und Biomaterial bzw. Implantat. Die lokale Reaktion des biologischen Systems, d.h. im Speziellen des menschlichen Organismus, wurde nach Ratner et al. [14] folgendermaßen beschrieben:

Da alle Implantationen mit einer Verletzung von gesundem Gewebe verbunden sind, kommt das Implantat zunächst mit Blut in Kontakt, was eine unspezifische Adsorption von Proteinen wie Fibrinogen auf der Biomaterialoberfläche zur Folge hat. In einem weiteren Schritt werden neutrophile Granulozyten aus dem Blut in die vernetzte Fibrinmatrix unter Ausbildung einer provisorischen Matrix eingebaut, wo sie zu Makrophagen ausdifferenzieren. Die Makrophagen bedingen im Folgenden die Entzündung und den Beginn der Phagozytose des Fremdkörpers Biomaterial, wobei sie wiederum zu Riesenzellen fusionieren, die durch die Ausschüttung von Proteinsignalstoffen (Cytokinen) weitere Zellen (Fibroblasten) anlocken. Die eingewanderten Fibroblasten bilden extrazelluläres Kollagen, welches die Einkapselung (Fibrose) des Biomaterials bewirkt. Diese nach etwa 3 Wochen abgeschlossene bindegewe-

bige Umhüllung führt zwar zum Abklingen der Entzündung, aber auch zur Isolierung des Biomaterials, was bis zum Verlust der Funktion des Biomaterials führen kann (Abb. 1).

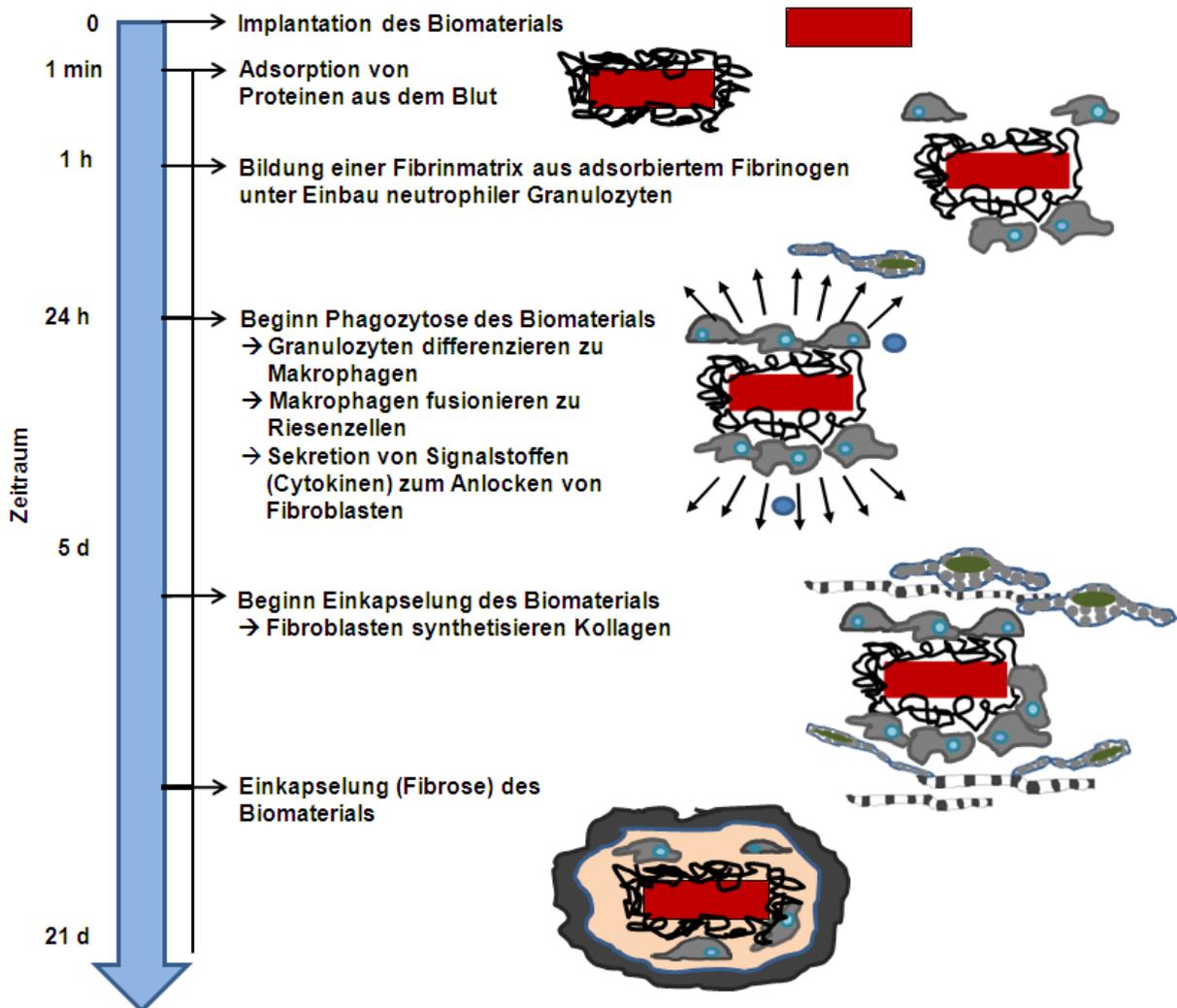


Abb. 1: Lokale Reaktion des biologischen Systems auf Biomaterialien (Fremdkörperreaktion) nach Ratner et al. [14].

In diesem Zusammenhang haben gerade die physikochemischen Oberflächeneigenschaften des Biomaterials einen starken Einfluss auf die initiale Adsorption von Proteinen, die dessen weitere Interaktion mit den Zellen des umgebenden Gewebes bedingen. Um dies steuern zu können, wurde eine Vielzahl von Methoden zur Modifizierung polymerer Biomaterialoberflächen, entwickelt. Dazu gehören beispielsweise selbstorganisierte Monolagen auf der Basis amphiphiler Verbindungen, die Layer-by-layer-Deposition als alternierende Adsorption von positiv und negativ geladenen Polymeren, das Dip-, Spin- und Spray-coating als auch die physikalische und chemische Gasphasenabscheidung sowie plasmachemische Verfahren. In Studien konnte eine verbesserte Zelladhäsion bei verbesserter Benetzbarkeit der Biomaterialoberfläche mit Wasser beobachtet werden, weshalb als Beschichtungsträger häufig hydrophile Polymere wie Dextrane, Hyaluronsäure, Polyacrylate und Polyvinylalkohol einge-

setzt werden [9]. Zur Minimierung der unspezifischen Proteinadsorption haben sich Beschichtungen auf der Basis von Polyethylenglycol bewährt [15]. In weiteren Studien konnten aber auch, je nach Abhängigkeit des untersuchten Zelltyps, der Art der Beschichtung und des Substrates, für hydrophobe und mäßig benetzbare Oberflächen adhäsions- und proliferationsfördernde Eigenschaften beobachtet werden [1], womit nicht nur allein die Benetzbarkeit einen entscheidenden Einfluss hat, sondern die Gesamtheit der physikochemischen Eigenschaften und die Oberflächentopographie.

Zur Verbesserung der Biokompatibilität werden auch biomimetische Beschichtungen, die die Umgebung der Zellen des umgebenden Gewebes nachahmen, untersucht [16]. Dabei werden bevorzugt Beschichtungen auf der Basis von Proteinen der extrazellulären Matrix verwendet. Häufig genutzt werden Proteine mit RGD (R: Arginin, G: Glycin, D: Asparaginsäure)-Motiv, die an Integrine binden, wie Kollagene, Laminin und Fibronectin, die durch Aktivierung der Integrinrezeptoren die Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten unterstützen [9].

Zunehmender Schwerpunkt aktueller Studien ist die Immobilisierung der Biomaterialien mit bioaktiven Substanzen, wie Wachstumsfaktoren, antiinflammatorischen und antiproliferativen Wirkstoffen, um Entzündungsreaktionen zu minimieren und die zelluläre Proliferation zu inhibieren oder zu fördern [8]. Die Immobilisierung bioaktiver Substanzen unter Erhalt ihrer biologischen Funktion hängt von der Anwendung und dem verwendeten Trägermaterial ab. So sind adsorptive Wirkstoffbeschichtungen wenig stabil, aber leicht durchführbar, während kovalente Anbindungen stabil sind und eine gerichtete Molekülausrichtung ermöglichen, aber aufwendiger sind. Dabei werden stabile kovalente bzw. unter physiologischen Bedingungen spaltbare kovalente Bindungen generiert, je nachdem wie die Wirkung des Biomoleküls vermittelt wird: über Zellrezeptoren (z.B. RGD-Motive) oder Zellaufnahme (z.B. Medikamente). Bei der kovalenten Bindung sind zudem Einschränkungen der biologischen Wirkung zu beachten, wenn funktionelle Gruppen des Wirkstoffs verändert und in die Bindung mit einbezogen werden. So sind Veränderungen von kleinen Molekülen, wie den meisten Medikamenten nicht tolerierbar, während bei großen Molekülen wie Proteinen weniger Probleme resultieren solange die Proteinstruktur und das bioaktive Motiv nicht verändert werden.

Polymere Biomaterialien, die lediglich ein aliphatisches CH-Grundgerüst ohne reaktive funktionelle Gruppen besitzen, sind vergleichsweise inert. Deshalb müssen sie für eine Oberflächenfunktionalisierung zusätzlich chemisch aktiviert werden, um die notwendigen Bindungsstellen zu schaffen. Voraussetzung für eine Fixierung bioaktiver Substanzen über kovalente Bindungen ist somit die Generierung funktioneller Gruppen auf der Oberfläche der polymeren Biomaterialien, wobei nass-, plasma- und fotochemische Methoden zur Verfügung stehen [8]. Nach der Oberflächenaktivierung können Spacermoleküle und die gewünschten Wirkstoffmoleküle angekoppelt werden.

Bei der nasschemischen Oberflächenaktivierung der Polymere sind nur die funktionellen Gruppen an der Oberfläche zugänglich, da es sich um einen heterogenen Prozess handelt. Nachteil ist, dass keine absolute Umsetzung erfolgt und ein Gemisch aus modifizierten und nicht modifizierten Gruppen vorliegt. Die Wahl der Reaktionsbedingungen hat großen Einfluss auf die Modifizierung, da z.B. Lösungsmittel, die das Polymer quellen lassen, auch Modifizierungen im Polymerbulk verursachen. Ebenso hat das Molekulargewicht der Polymere einen entscheidenden Einfluss. So weisen hochmolekulare Polyhydroxycarbonsäuren weniger freie Hydroxyl- (-OH) und Carboxyl-Gruppen (-COOH) auf als niedermolekulare, da diese nur an den Kettenenden vorliegen. Deshalb werden zur Spaltung von Esterbindungen und zur Erhöhung der Anzahl reaktiver Gruppen beispielsweise nasschemische Oberflächenreaktionen mit wässriger Natronlauge durchgeführt.

Bei der Aktivierung mit Plasmen, d.h. Gasen, die aus Elektronen und Ionen bestehen, werden vorrangig nichtthermische Niederdruckplasmen angewandt. Dabei können Gase und Gasgemische verwendet werden, die abtragend oder beschichtend wirken. So werden Sauerstoff-Plasmen häufig zum Reinigen verwendet, da organische Reste zu CO_2 und H_2O umgesetzt werden, die sich als Gase verflüchtigen. Außerdem werden OH-Gruppen (-OH) auf der Polymeroberfläche erzeugt, während mit Ammoniakgas Aminogruppen (- NH_2) entstehen. In beiden Fällen erfolgt auch eine physikalische Abtragung der Oberfläche durch den Beschuss der Oberfläche mit Gasteilchen. Die Modifizierungen haben dabei eine Tiefe von etwa bis zu 5 nm. Bei Plasmapolymerisationen hingegen werden Schichtdicken von bis zu einigen hundert μm erzielt. Dabei werden häufig Monomere wie Ethylen oder Allylalkohole verwendet, die durch die hohe Energie der Teilchen im Plasma polymerisieren, wobei eine hohe Dichte und starke Vernetzung erreicht werden kann. Vorteile der Plasmabehandlung bestehen in einer einfachen und kostengünstigen Durchführung, da nahezu jedes Polymer und jede Form modifizierbar ist, die Art der Modifizierung durch die Wahl des Gases variabel ist und große Oberflächen einheitlich modifiziert werden können. Nachteilig sind gerade bei den Niederdruckplasmen der hohe apparative Aufwand und die Vielzahl der einstellbaren Parameter, die das Modifizierungsergebnis beeinflussen und somit dessen Reproduzierbarkeit bedingen [17].

Unter fotochemischer Modifizierung sind Veränderungen der chemischen Zusammensetzung der Oberfläche durch Einwirkung von Photonen zu verstehen. Somit ist auch das Altern von Polymeren unter Sonnenlicht ein fotochemischer, aber unerwünschter Prozess. Häufig wird das fotoinduzierte Pflöpfen von Polymeroberflächen zur Immobilisierung von Biomolekülen, Crosslinkern oder Spacern genutzt [7]. Fotolithographische Verfahren finden häufig Anwendung in der Chipherstellung [7]. Durch energiereiche UV-Strahlung (durch UV-, Excimerlampen und UV-Laser) können chemische Bindungen aufgebrochen werden und die entstehenden Radikale mit der Umgebung reagieren, was zu einer Funktionalisierung führt oder sie

rekombinieren, was in einer Vernetzung resultiert. Die Bestrahlung unter Luft oder Sauerstoffatmosphäre ergibt zudem die Bildung von Ozon, welches die Polymeroberfläche oxidativ angreift und ebenfalls funktionelle Gruppen erzeugt. Die Reaktionen sind dabei von einigen Polymerparametern wie der Polarität, Kristallinität, Viskosität und Glasübergangstemperatur abhängig. Vorteil fotochemischer Methoden ist die gezielte lokale Modifizierung, wodurch auf Oberflächen ein gerichtetes Wachstum von Zellen ermöglicht werden kann, was z.B. bei der Regenerierung von Nerven bedeutsam ist [7].

1.2 Polymere Biomaterialien für Implantate des Blutkreislaufes

Die ersten Versuche zur Schaffung eines Blutgefäßersatzes gehen bereits auf das 16. Jahrhundert zurück, in denen Strohhalme zur Überbrückung stark geschädigter Gefäßabschnitte verwendet wurden [18]. Diese Bestrebungen als auch Versuche unter Anwendung von Röhren aus Elfenbein oder Metall schlugen fehl, da die Fremdmaterialien vom Körper abgestoßen wurden [18]. Wesentlicher Antrieb für die Entwicklung einer modernen Gefäßchirurgie war die therapeutische Behandlung der Blutgefäße von Kriegsverletzten (Erster und Zweiter Weltkrieg, Korea-Krieg, Vietnam-Krieg), die viele neue Verfahren induzierte. Da ein anfänglich erprobter Gefäßersatz mit allogenen Gefäßabschnitten (Homografts) immer noch zu einer Vielzahl von Komplikationen wie Infekte und Aneurysmen führte, war erst durch die Entwicklung geeigneter Biomaterialien eine moderne Gefäßchirurgie möglich. Mitte der 1950er Jahre wurde die erste Implantation einer künstlichen Polyester-Gefäßprothese im Menschen erfolgreich durchgeführt [9]. Mit der Erreichung der technischen Voraussetzungen zur standardisierten Herstellung werden Kunststoffprothesen seit Mitte der 1960er Jahre routinemäßig in der Gefäßchirurgie eingesetzt [14].

Außerdem kommen zur Behandlung von Gefäßverengungen Gefäßstützen, so genannte Stents, zum Einsatz. Mit der Einführung von Drug-Eluting Stents (DES) im Jahre 2002 (Zulassung des ersten DES in Europa – Cypher®-Stent) und von abbaubaren Stents im Jahre 2011 (Zulassung des ersten koronaren abbaubaren DES in Europa – BVS®-Stent) wird deutlich, dass auch in diesem Bereich polymere Biomaterialien immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt sind, da sowohl die Beschichtungsträger zur lokalen Freisetzung von Medikamenten als auch die Stentgrundkörper an sich aus Polymeren bestehen können [19].

1.2.1 Allgemeine Anforderungen

Aus der Anwendung von Biomaterialien, die als Implantatwerkstoffe im Blutkontakt zur Anwendung kommen sollen, ergeben sich hohe Ansprüche an deren Funktionsfähigkeit, Biokompatibilität und Verarbeitbarkeit. So müssen die mechanischen Eigenschaften des Biomaterials dem Einsatzort angepasst werden, um als Implantat Körperfunktionen unterstützen oder ersetzen und beispielsweise der pulsatilen Belastung als Gefäßersatzmaterial stand-

halten zu können. Außerdem muss das Material ausreichend stabil gegenüber physiologischen Medien des Einsatzortes sein, um eine langfristige Funktionalität zu gewährleisten. Darüber hinaus müssen eine rückstandsfreie Metabolisierung bei abbaubaren Materialien, eine ausreichende Lagerfähigkeit sowie die Sterilisierbarkeit gegeben sein.

Neben der Funktionalität des Biomaterials ist seine Biokompatibilität (Zyto- und Hämokompatibilität) von entscheidender Bedeutung. So soll es nicht zur Schädigung des umgebenden Gewebes kommen, während das Biomaterial seine Funktion ausübt. Hierbei spielen auch aus dem Biomaterial freigesetzte Abbauprodukte oder Verunreinigungen eine Rolle, da diese toxisch wirken können.

Das breite Spektrum an Anforderungen erfüllt kein Biomaterial, weshalb jedes verwendete Material einen Kompromiss darstellt [9].

1.2.2 Künstliche Gefäßprothesen zum Ersatz natürlicher Blutgefäße

Die Anwendung von Gefäßprothesen erfolgt bei schweren Schädigungen durch Gefäßverschluss, Aneurysma (Gefäßerweiterungen) oder Dissektion (Verletzung der Intima und Media) von Arterien und Venen, bei denen durch andere Methoden der Blutfluss nicht wieder hergestellt werden kann. Therapieansatz ist dabei die Verhinderung der Ruptur, Beseitigung der krankhaften Erweiterung bzw. die Wiederherstellung des Blutflusses durch einen Bypass mit Hilfe einer Gefäßprothese. Als Ersatzmaterial werden dazu heutzutage meist venöse Autografts (Eigenvene) und alloplastische Materialien verwendet. In Ausnahmefällen auch heterologe oder homologe Arterien.

Der Durchbruch der alloplastischen Gefäßprothesen gelang 1952 Voorhees, der eine Gefäßprothese aus Polyvinylchlorid (Vinyon N) entwickelte [9, 20]. Auf der Suche nach einem geeigneten Material für den Gefäßersatz wurden folgende Anforderungen an die Gefäßprothesen gestellt: biokompatibel, blutundurchlässig, nicht thrombogen, antikanzerogen, dauerhaft, infektionsunempfindlich, knickstabil, reißfest, sterilisierbar, lagerfähig, handhabbar sowie technisch einfach und reproduzierbar herstellbar. Als besonders geeignet haben sich Prothesen aus Polyethylenterephthalat (PET, Dacron®) und expandiertem Polytetrafluorethylen (ePTFE, Goretex®) erwiesen.

Der Verlauf der Einheilung von Gefäßprothesen erfolgt in verschiedenen Phasen, wobei zahlreiche Faktoren den Verlauf beeinflussen können. Die alloplastische Gefäßprothese wird zunächst durch die Ausbildung einer thrombogenen Matrix abgedichtet. In der zweiten Phase, bis zu 3 Wochen nach Implantation, wachsen neue Blutgefäße und Bindegewebszellen vom Transplantatlager in das Prothesengerüst, während die Lumeninnenseite durch eine Fibrinschicht bedeckt ist. Nach ca. 3 bis 4 Wochen kommt es zur Ausbildung einer bindegewebsartigen Schicht im Prothesengerüst. Zudem wachsen Myofibroblasten ein und differenzieren zu Myofibrozyten. Der Organisationsphase folgt nach 8 bis 12 Wochen die Phase der Degeneration. Dabei wird die Durchblutung durch die Schrumpfung des Bindegewe-

webes verschlechtert und in Folge dessen werden vermehrt Nekrosen und Verkalkungen beobachtet. Nachteile der Gefäßprothesen sind die Undichtigkeit, Thrombogenität der Oberfläche, Restenose durch Intimahyperplasie, mangelnde Neoendothelialisierung sowie Inflammation durch Immunabwehr und Degradation mit Verlust der elastischen Eigenschaften. Durch die Weiterentwicklung der herkömmlichen Gefäßprothesen und die Beschichtung mit Albumin, Gelatine, Kollagen und Heparin konnte die Porosität und Koagulabilität weiter vermindert und die Bildung einer Neoendothelzellschicht auf der alloplastischen Gefäßprothese gefördert werden [18]. Dies bewirkte eine Senkung der Verschlussrate, da durch Neoendothelzellen sowohl die Hyperplasie der Neointima als auch thrombotische Komplikationen vermindert werden [18]. Auch wurden mehrschichtige Prothesen konstruiert, die dem Aufbau der Blutgefäßwand nachempfunden sind, um nahezu physiologische Strömungsprofile zu erhalten. Aktuell erfolgt die Weiterentwicklung vor allem im Bereich des Tissue Engineering, wobei Gefäßprothesenscaffolds mit körpereigenen Zellen beschichtet werden, um die Biokompatibilität zu verbessern, und biodegradierbare Materialien verwendet werden, um langfristig ein regeneriertes natürliches Blutgefäß zu erhalten.

Aktuell werden alloplastische Gefäßprothesen erfolgreich bei großlumigen Blutgefäßen über 5 mm Innendurchmesser angewandt [18]. Bei kleinelumigen Gefäßen sind alloplastische Materialien wegen den schlechten Offenheitsraten durch Thrombose weniger gut geeignet, weshalb hier immer noch venöse Autografts als Gefäßprothesen der ersten Wahl gelten [18]. Durch die Einführung endovaskulärer Stentprothesen ergeben sich Alternativen zur Behandlung und Reduzierung des operativen Risikos [9, 18, 20].

1.2.3 Stents zur Behandlung der Arteriosklerose

Die Arteriosklerose ist eine Kombination von Veränderungen der Arterienintima und -media, wobei es zu Ablagerungen durch Lipide, Kohlenhydrate, Blutbestandteile, Kalziumverbindungen und Bindegewebe kommt, die das Lumen verstopfen können und die Blutversorgung gefährden [9]. Die medizinische Behandlung der Arteriosklerose wird bei ischämischen Komplikationen wie dem koronaren Syndrom und bei Schlaganfall, den Haupttodesursachen in der westlichen Welt, aufgrund von Stenosen notwendig. Dabei spielen Thrombozyten sowohl bei der Entstehung der Arteriosklerose als auch bei der Entwicklung ischämischer Komplikationen eine Rolle, da eine atherosklerotische Plaqueruptur mit nachfolgender Thrombozytenaggregation und Thrombusbildung einhergeht. So reichen bei Früherkennung medikamentöse Therapien zur Thrombozytenhemmung aus, während bei akuten Fällen invasive Eingriffe zur Stenosebeseitigung nötig sind. Neben der klassischen Bypassoperation wurden minimalinvasive chirurgische Eingriffe zur Beseitigung von Stenosen 1964 durch Charles Dotter ermöglicht, der Katheter mit zunehmenden Durchmessern zur endoluminalen Gefäßerweiterung nutzte. Andreas Grüntzig führte 1977 die erste perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA) durch, bei der durch einen kathetermontierten Ballon die Auf-

weitung erfolgt. Die elastische Rückstellkraft der Blutgefäße führte häufig zu deren Wiederverengung bzw. Wiederverschluss (Restenose), weshalb metallische Stents (Bare metal stents) als zusätzliche mechanische Stützen entwickelt wurden. Dabei wurden sowohl selbstexpandierende Stents (1986 Erstanwendung) als auch ballonexpandierbare Stents entwickelt (1989 Erstanwendung) [9]. Das Hauptproblem des erhöhten Thromboserisikos, weswegen Bypassoperationen gegenüber der Implantation von Stents zunächst weiter bevorzugt wurden, konnte durch eine systemische postoperative Antikoagulationstherapie, verbesserte Biomaterialien, Stentdesigns und Applikationssysteme minimiert werden. Nachteil der Stentimplantation ist die lokale Schädigung der Gefäßwand, die durch die Zerstörung des Endothels und den Einriss der Media bis hin zur Einblutung zwischen Intima und Media führen kann. In Folge einer komplexen Wundheilung kann es zu einem Wiederverschluss des Stentlumens, der In-Stent-Restenose, kommen. Dabei erfolgt der Heilungsverlauf in drei Phasen [21]. Nach Stentimplantation kommt es innerhalb weniger Minuten zur Adsorption von Thrombozyten und zum Einwandern von Entzündungszellen wie Granulozyten, wobei verschiedene Wachstumsfaktoren wie Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Epidermal Growth Factor und Transforming Growth Factor freigesetzt werden. Zudem werden Thrombine freigesetzt, die die Expression von PDGF und Adhäsionsmolekülen steigern sowie die Proliferation glatter Muskelzellen fördern und chemotaktisch auf Monozyten wirken. In der zweiten Phase wandern daraufhin glatte Muskelzellen aus der Media in die Intima ein, ändern ihren Phänotyp von kontraktile zu sekretorisch und sezernieren Matrixproteine, während eine Reendothelialisierung des Stents beobachtet werden kann. In der dritten Phase wird die Einheilung durch eine vollständige Reendothelialisierung beendet. Etwa vier Monaten nach Stentimplantation ist die maximale Dicke der Neointima erreicht [21].

Zur Verringerung der In-Stent-Restenose wurden Polymerbeschichtungen mit inkorporierten antiproliferativ wirkenden, immunsuppressiven und zytostatischen Wirkstoffen für Drug-Eluting Stents (DES) der ersten Generation entwickelt, die die In-Stent-Restenose deutlich senken [19]. Nachteil dieser DES ist jedoch eine verzögerte Reendothelialisierung, wodurch das Thromboserisiko zunimmt [19]. Alternative Ansätze zur Förderung der Reendothelialisierung und somit Integration der Stentstruktur in die Gefäßwand sind Modifizierungen mit AntiCD34-Antikörpern zum Fangen zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen (EPC) aus dem Blut und mit die Proliferation von Endothelzellen fördernden Biomolekülen wie Vascular Endothelial Growth Factor [22–24]. Neben permanenten, dauerhaft implantierten Stents, die zu Irritationen, Endotheldysfunktionen, chronischen Inflammationen und Intimahyperplasien führen können, werden bioabbaubare Stents auf der Basis von biodegradierbaren Polymeren wie Poly(L-lactid) (PLLA) und korrodierbaren Metalllegierungen wie Magnesiumlegierungen entwickelt [19]. Dabei soll der Stent nur bis zum Abschluss des Gefäß-Remodeling stützend wirken und sich dann auflösen, womit eine Vielzahl der Fremdkörperreaktionen durch Dau-

erkontakt vermieden wird. Zudem kann im späteren Verlauf ein neuer Stent an die gleiche Stelle implantiert werden, was einen bedeutenden Vorteil für die Anwendung in noch wachsenden Blutgefäßen von Kindern darstellt.

1.3 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten Methoden zur Oberflächenmodifizierung von polymeren Biomaterialien für Implantate des Blutgefäßsystems entwickelt werden. Mit dem Ziel der Förderung der Geweberegeneration sollten bevorzugt biodegradierbare Polymere wie Poly(ϵ -caprolacton) und Poly(3-hydroxybuttersäure) untersucht werden. Da beide Polyester jedoch lediglich ein aliphatisches CH-Grundgerüst ohne reaktive funktionelle Gruppen besitzen, sollten hier zusätzliche chemische Oberflächenaktivierungen etabliert werden. Um den Erfolg dieser Aktivierungen beurteilen zu können, sollte als Referenz ein in der Medizintechnik häufig verwendetes und kommerziell verfügbares Polyurethan mitgeführt werden, das durch die Urethangruppe bereits im Monomerbaustein über eine funktionelle Gruppe verfügt und somit ein sehr geeignetes Polymer für chemische Oberflächenmodifizierungen darstellt.

Im Rahmen der Arbeit sollten Ankopplungen zur dauerhaften Immobilisierung von Wirkstoffen als auch deren Freisetzung von der Oberfläche als Ergänzung zur Freisetzung aus dem Polymerbulk selbst untersucht werden. Dafür wurden zunächst verschiedene Methoden zur Generierung funktioneller Gruppen und zur anschließenden Immobilisierung von Wirkstoffen vorgestellt, die später anhand der Modellwirkstoffe Acetylsalicylsäure (ASS) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und der bereits genannten Polymere für vaskuläre Implantate wie Gefäßprothesen und Stents erprobt werden sollen.

Ein Schwerpunkt der Arbeit war die Generierung funktioneller Amino ($-NH_2$ -), Hydroxyl ($-OH$ -) und Carboxyl ($-COOH$ -) Gruppen, die als Ankergruppen für die Ankopplung der Wirkstoffe dienen sollen. Der Nachweis der Oberflächenreaktionen zur chemischen Aktivierung der Polymere wurde mit Hilfe der Fourier-Transformations-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie, der Röntgenfotoelektronenspektroskopie (XPS), durch die Bestimmung des Kontaktwinkels, den fotometrischen Nachweis der generierten endständigen NH_2 -Gruppen mit Ninhydrin und den Fluoreszenznachweis durch 4-Chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl) vorgenommen. Die chemischen Veränderungen der Polymeroberfläche unter Immobilisierung von ASS wurden wiederum mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen, der FTIR-ATR-Spektroskopie und XPS nachgewiesen. Das *in vitro* ASS-Freisetzungverhalten wurde mittels chromatografischer Verfahren charakterisiert. Die VEGF-Beladung bzw. -Freisetzung wurde mit Hilfe von Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) ermittelt. Darüber hinaus wird auch der Einfluss der verschiedenen Oberflächenaktivierungen und -modifizierungen auf die *in vitro* Biokompatibilität, d.h. die Zellvitalität und Hämokompatibilität, untersucht.

Die Arbeit soll durch die Gegenüberstellung verschiedener Techniken zur Oberflächenaktivierung und Immobilisierung von Wirkstoffen somit einen wichtigen Beitrag leisten, um die Eignung der jeweiligen Verfahren zur Modifizierung polymerer Implantate für den Blutkreislauf, wie z.B. Gefäßprothesen und Stents, anhand von PCL und P(3HB) beurteilen zu können.

2. Chemische Oberflächenmodifizierung von Polymeren unter Immobilisierung von Modellwirkstoffen

Wünschenswert sind polymere Implantatwerkstoffe, die durch gezielte Oberflächenmodifizierungen, zum Beispiel durch die Ausrüstung mit bioaktiven Substanzen, eine spezifische biologische Antwort auslösen und somit eine kontrollierte Wechselwirkung mit dem umgebenden Gewebe ermöglichen. So wird für kardiovaskuläre Implantate wie Stents und Gefäßprothesen eine schnelle Reendothelialisierung zur Minimierung des Stenoserisikos sowie thrombotischer und inflammatorischer Prozesse angestrebt.

Voraussetzung für die Modifizierbarkeit von Polymeroberflächen ist das Vorhandensein funktioneller Gruppen, die für die kovalente Anbindung bioaktiver Substanzen genutzt werden können. Deshalb wurden im ersten Schritt die untersuchten Polymeroberflächen (Kap. 2.1) mit Hilfe verschiedener nasschemischer und plasmachemischer Prozesse aktiviert, um die entsprechenden funktionellen Gruppen auf der Oberfläche zu generieren (Kap. 2.3). Für die anschließende Beladung der Oberflächen mit ASS bzw. dem VEGF (Kap. 2.2) wurden sowohl unter physiologischen Bedingungen stabile, kovalente als auch hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen (Kap. 2.4) unter Nutzung verschiedener Crosslinker zur Freisetzung der Modellwirkstoffe betrachtet.

2.1 Untersuchte Polymere

Für die Modifizierung der Oberflächen wurden als Vertreter der biodegradierbaren Polymere die aliphatischen Polyester Poly(ϵ -caprolacton) (PCL, $M_w = 65.000$ g/mol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) und Poly(3-hydroxybuttersäure) (P(3HB), $M_w = 640.000$ g/mol, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung UFZ, Halle-Leipzig, Deutschland) gewählt, da diese Materialien vielfach für medizinische Applikationen im vaskulären Bereich verwendet werden (Kap. 2.1.1 – 2.1.2). Dabei verfügen die Ester nur an den Polymerkettenenden über funktionelle OH- und COOH-Gruppen, die für chemische Modifizierungen genutzt werden können.

Als Referenzmaterial wurde ein Polyetherurethan (PUR, Pellethane[®], Dow Chemical Co., Midland, USA) gewählt. Es wird aufgrund seiner ausgezeichneten Hämokompatibilität häufig als Implantatmaterial im Blutkontakt eingesetzt (Kap. 2.1.3). Dabei verfügt das PUR aufgrund seiner Urethangruppe bereits über eine funktionelle Gruppe in der Monomereinheit, die für chemische Oberflächenmodifizierungen genutzt werden kann.

2.1.1 Poly(ϵ -caprolacton)

PCL ist ein synthetisches, hydrophobes, semikristallines, biodegradierbares Polymer und gehört zu der Gruppe der Polyester (Abb. 2).

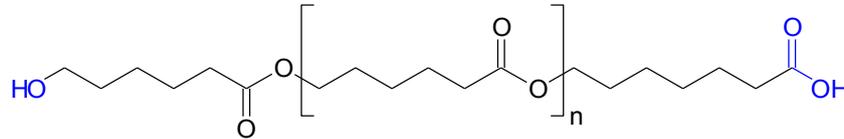


Abb. 2: Strukturformel des Polyesters PCL.

Es besitzt einen im Vergleich beispielsweise zu Poly(L-lactid) niedrigen Schmelzpunkt von $T_m = 59-64\text{ }^\circ\text{C}$, eine niedrige Glasübergangstemperatur von $T_g = -60\text{ }^\circ\text{C}$ sowie ausreichende rheologische und viskoelastische Eigenschaften ($\sigma = 20,7-42\text{ MPa}$; $E = 0,21-0,44\text{ GPa}$; $\epsilon = 300-1000\text{ }%$; $\eta = 0,9\text{ cm}^3/\text{g}$; $\eta_{inh} = 100-130\text{ cm}^3/\text{g}$) [25, 26]. Weiterhin lässt es sich gut als Blendmaterial einsetzen, weshalb es eine breite Anwendung für Implantate und Wirkstofffreisetzungssysteme findet [27]. So können durch Verblendung die mechanischen Eigenschaften, die Degradations- und Freisetzungskinetiken gezielt an die medizinischen Anforderungen angepasst werden [27]. Die Sterilisation von, auf PCL basierenden Implantaten ist mit Ethylenoxid und γ -Strahlung durchführbar [27]. Die Synthese von PCL erfolgt durch ringöffnende Polymerisation aus ϵ -Caprolacton unter Verwendung von anionischen, kationischen bzw. Koordinationskatalysatoren und in Anwesenheit von Hitze.

Die *in vivo* Degradation erfolgt zu 6-Hydroxyhexansäure, welche weiter oxidiert und im Citratzyklus verstoffwechselt wird. Aufgrund der langen *in vivo* Degradationszeit von 2 bis 4 Jahren, in Abhängigkeit von der Molmasse, und aufgrund der sehr guten Biokompatibilität sind Implantate auf der Basis von PCL für Langzeitapplikationen geeignet [27].

Zur Herstellung der für die Oberflächenmodifizierung verwendeten Filme wurde 1 g PCL ($M_w = 65.000\text{ g/mol}$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) in 25 ml Chloroform gelöst und in eine Petrischale mit 9 cm Innendurchmesser gegossen. Nach Abdampfen des Chloroforms wurden die Filme 2 Tage mit Methanol und danach 2 Tage mit Reinstwasser gewaschen. Abschließend wurden die Filme im Vakuumtrockenschrank (Modell UM200, Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland) für 7 Tage getrocknet.

2.1.2 Poly(3-hydroxybuttersäure)

Hochmolekulare P(3HB) (Abb. 3) ist ein Biopolymer und gehört als Polyester zur Gruppe der Polyhydroxyalkanoate (PHA), der in Mikroorganismen als Stoff- und Energiespeicher bei Überschuss einer verwertbaren Kohlenstoffquelle und bei Limitation eines essentiellen Nährstoffs angelegt wird [28, 29]. Für die industrielle Produktion durch Biosynthese kommen bevorzugt Bakterienstämme, wie *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter*

vinelandi und rekombinante *Escheria coli*, zur Anwendung, da diese eine hohe PHA-Ausbeute in kurzer Zeit realisieren können [30, 31]. Die Steuerung der Enzyme zur Biosynthese von P(3HB) durch die Gene PhbA, PhbB und PhbC befinden sich auf einem Operon, weshalb die gentechnische Produktion in *Escheria coli* durch die einfache Steuerung aller Gene erleichtert ist [32]. Ein weiterer Vorteil der rekombinanten *Escheria coli* ist das Fehlen der PHA-Depolymerase, die P(3HB) abbauen kann, weshalb hochmolekulare Verbindungen gewonnen werden können [33]. Weiterhin ist eine einfache Adaptation zur Synthese weiterer PHA möglich. Neben der Biosynthese von P(3HB) durch Mikroorganismen ist die klassische ringöffnende Polymerisation aus β -Butyrolacton eine weitere Möglichkeit zur Herstellung von P(3HB) [34], wobei neben der nicht-stereoselektiven chemischen Katalyse über verschiedene Anionen, Kationen und Koordinationskomplexe auch die stereoselektive enzymatische Katalyse durch Lipasen genutzt wird [35].

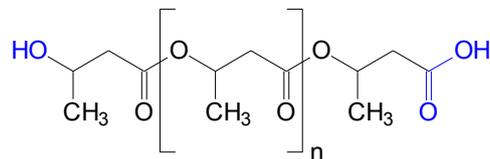


Abb. 3: Strukturformel des Polyesters P(3HB).

Im menschlichen Körper wird P(3HB) enzymatisch und hydrolytisch zu D-3-Hydroxybuttersäure abgebaut [36], das als natürlicher Metabolit in einer Konzentration von 30-100 mg/l im menschlichen Blut vorhanden ist [37]. Außerdem wurden im menschlichen Organismus auch Oligomere von P(3HB) (0,6 bis 18,2 mg/l) im Komplex mit Lipoproteinen, Albumin und Polyphosphaten gefunden [38–40].

P(3HB) ist ein Polyester mit einem asymmetrischen C-Atom und ist somit optisch aktiv. Der hohe Schmelzpunkt von etwa 157-189 °C und die Dichte von etwa 1,23-1,25 g/cm³ resultieren aus dem isotaktischen, kompakten, kristallinen und helicalen Aufbau [41]. Das Material ist hart und fest und weist eine geringe Reißfestigkeit ähnlich dem isotaktischen Polypropylen auf [8]. Nachteilig ist die Sprödigkeit, wobei die mechanischen Eigenschaften von P(3HB) zur Anwendung als Biomaterial durch verschiedene Modifizierungen, z.B. Weichmacher und Blendpartner, an die jeweiligen benötigten medizinischen Anforderungen angepasst werden [29]. Hochmolekulare P(3HB) ist alkoholresistent [42] und somit mit Ethanol desinfizierbar. Die Sterilisation mit Ethylenoxid (ETO), sowie mit β - und γ -Strahlung bei etwa 25-40 kGy ist möglich, wobei jedoch eine strahlungsbedingte Degradation von P(3HB) unter starker Molmassenreduktion und damit einhergehender Nachkristallisation nicht auszuschließen ist, die zu einer starken Beeinträchtigung der mechanischen Eigenschaften nach β - und γ -Sterilisation führen [43, 44].

P(3HB) zeigt eine gute Biokompatibilität und wird in einem Zeitraum von 24 bis 30 Monaten im Körper abgebaut [45]. Kleine kristalline niedermolekulare P(3HB)-Partikel, die infolge Fragmentation zu erwarten sind, werden in niedrigen Konzentrationen von Makrophagen, Fibroblasten, Kupferzellen und Hepatozyten toleriert, wobei die Aufnahme von 1-20 µm großen Partikeln durch Phagozytose erfolgt. Bei höheren Partikelkonzentrationen konnten Zellschäden und eine Makrophagenaktivierung beobachtet werden [46–49].

Aufgrund der guten Bioverträglichkeit, der Biodegradierbarkeit und der Sterilisierbarkeit findet P(3HB) eine breite Anwendung in der Medizin [45]. Von Vorteil ist dabei auch die Verarbeitung zu Medizinprodukten ohne hohen Aufwand und bei fermentativ gewonnener P(3HB) die Reinheit des Materials ohne Katalysator- oder Synthesereste. So wird P(3HB) als chirurgisches Nahtmaterial, für biodegradierbare Osteosynthese-Schrauben und -Platten, als Ersatz und Fixierung von Knorpel, für biodegradierbare Filme zur periodontalen Behandlung, zur Beschichtung von Herniennetzen, als Wundauflage, für Nervenleitschienen sowie als Patch zur Behandlung von Defekten des Darms und Perikards verwendet [45]. Auch die Eignung als Material für Koronarstents wurde untersucht, wobei Beschichtungen von Tantalstents mit dem Copolymer Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat) in porcinen Koronararterien eine ähnlich gute Biokompatibilität wie synthetische Polyester zeigten, während in anderen *in vivo* Studien Entzündungsreaktionen dokumentiert sind [8]. Außerdem wurden P(3HB) und Copolymere hinsichtlich ihres Potentials als Matrices für Wirkstofffreisetzungssysteme untersucht [45].

Zur Herstellung der innerhalb der Arbeit verwendeten P(3HB)-Filme wurde ein Tauchverfahren eingesetzt, bei dem eine Lösung aus 4 g P(3HB) in 100 ml Chloroform verwendet wurde. Ein zylindrischer Metallkörper wurde dafür zehnmal in die Polymerlösung eingetaucht bis eine etwa 100 µm dicke Schicht auf dem Tauchkörper resultierte. Danach wurden die Filme vom Metallkörper abgetrennt und gepresst. Anschließend wurden die Filme 2 Tage mit Methanol und danach 2 Tage mit Reinstwasser gewaschen, um die Chloroformrückstände zu entfernen. Abschließend wurden die P(3HB)-Filme wie die PCL-Filme im Vakuumtrockenschrank für 7 Tage getrocknet.

2.1.3 Polyetherurethan Pellethane®

Polyurethane sind Polymere, die sich durch das Vorhandensein der Urethangruppe (-NH-CO-O-) auszeichnen (Abb. 4). Polyurethane werden durch Polyaddition von Isocyanaten mit Diolen, Aminen oder Wasser gewonnen. Da unterschiedliche Gruppen substituiert werden können, entsteht eine riesige Vielfalt unterschiedlicher Verbindungen mit einem breiten Spektrum an Eigenschaften. Elastomere Polyurethane werden meist über lineare oder verzweigte Polyester und Polyether mit einem Überschuss Diisocyanat hergestellt, wobei die gebildeten kettenförmigen Polyurethane quervernetzen. Das für die Untersuchungen betrachtete Polyurethan (PUR, Pellethane®, Dow Chemical Co., Midland, USA) ist ein

lineares, segmentiertes, aromatisches Polyetherurethan. Die gummielastische Eigenschaft resultiert aus dem segmentartigen Aufbau, wobei das Hartsegment aus dem Diisocyanat 4,4'-Methylen-bis(phenylisocyanat) (MDI) und einem Kettenverlängerer und das Weichsegment aus dem langkettigen Polyether Polytetramethylenetherglycol (Polytetrahydrofuran, PTHF) besteht [6].

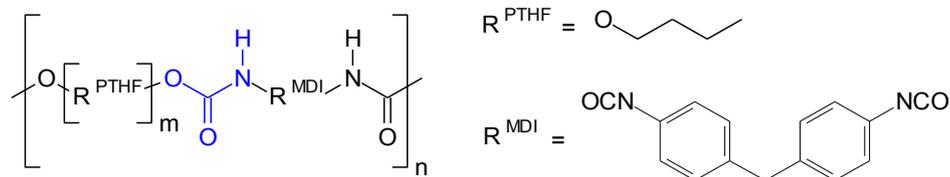


Abb. 4: Strukturformel von Pellethane®.

Auch wenn Polyetherurethane als biostabil betrachtet werden, so ist teilweise auch die *in vivo* Degradation von Polyetherurethanen beschrieben worden [50, 51]. So zeigen Langzeitstudien an Pellethane® durch prozessbedingte Eigenspannungen und dem Kontakt mit dem physiologischen aggressiven Milieu Rissbildungen, die zum Versagen des Implantates führen können. Gerade oxidative Zwischenprodukte wie Hypochlorigsäure und Enzyme, wie Esterase, Papain und Trypsin, des Körpers zeigen einen Einfluss auf die Degradation. Auch die Komplexbildung durch Metalle kann die Degradation beschleunigen [6, 50, 52].

Polyetherurethane sind sehr biokompatibel und werden aufgrund ihrer Hämokompatibilität bevorzugt im Blutkontakt eingesetzt [9]. Sie werden beispielsweise bei künstlichen Herzklappen, Herzschrittmachersonden, Kathetern, Gefäßprothesen und Stents angewandt [6]. Auch die Herstellung von polyurethanbasierten Gefäßprothesen mit Hilfe des Electrospinning wurde untersucht [53]. Wegen des Erfolgs als Gefäßersatzmaterial finden Polyurethane auch Anwendung als Scaffold für das Tissue Engineering [54]. Weitere medizinische Anwendungen für Polyurethane sind Wirkstofffreisetzungssysteme [55] und polymere Aortenpflaster [56].

Die Herstellung der für die Untersuchung der Oberflächenmodifikationen verwendeten Pellethane®-Filme erfolgte durch Extrusion mit nachgeschaltetem Blasformen. Die Filme wurden vor der Benutzung 2 Tage mit Methanol und danach 2 Tage mit Reinstwasser gewaschen. Abschließend wurden die PUR-Filme wie die PCL- und P(3HB)-Filme im Vakuumtrockenschrank für 7 Tage getrocknet.

2.2 Untersuchte Modellwirkstoffe

2.2.1 Acetylsalicylsäure

Acetylsalicylsäure (ASS, Abb. 5) findet aufgrund ihrer analgetischen, antipyretischen und antiinflammatorischen Eigenschaften unter dem Namen Aspirin weltweite Anwendung. ASS

wird zur Therapie atherothrombotischer Krankheitsbilder und nach Implantation von Stents verwendet [57, 58]. Auch nach Implantation künstlicher Bypassprothesen wird ASS systemisch zur Minimierung des Thromboserisikos und somit zur Realisierung längerer Offenerheitsraten verabreicht [59, 60].

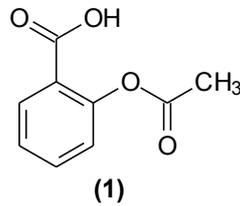


Abb. 5: Strukturformel von Acetylsalicylsäure (1).

Dabei beruht die Wirkung auf der unselektiven Hemmung der beiden Isoformen COX-1 und COX-2 der Cyclooxygenase durch irreversible Acetylierung [61]. Dadurch wird die Synthese des Prostaglandins Thromboxan A2 gehemmt, das die Plättchenaggregation stimuliert und vasokonstriktiv wirkt. Neben der Hemmung der Synthese von Thromboxan A2 werden für ASS weitere Wirkmechanismen zur Hemmung der Thrombozytenaggregation diskutiert, zu denen die Hochregulierung der Stickstoffmonoxidproduktion in neutrophilen Granulozyten [62], die Inhibierung der Oxidation von Fibrinogen [63] als auch die reduzierte Monozytenadhäsion an low density Lipoprotein aktivierte Endothelzellen durch Inhibierung der Synthese von NF-kappa B in Endothelzellen zählen [64].

ASS wurde als Modellpharmakon gewählt, da es unter den Bedingungen der nasschemischen Oberflächenmodifizierung eine ausreichende Stabilität aufweist. Außerdem sind ASS und die nach Hydrolyse resultierende Salicylsäure analytisch einfach detektierbar, so dass bei Erfolg die durchgeführten Oberflächenmodifizierungen unter Immobilisierung von ASS hinreichend exakt nachgewiesen werden können.

2.2.2 Vascular Endothelial Growth Factor

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF, Abb. 6) ist ein endothelspezifischer Angiogenesefaktor. Zur VEGF-Familie gehören VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und VEGF-F sowie der Placental Growth Factor (PGF). Bei VEGF-A handelt es sich um ein dimeres Peptid mit einem Molekulargewicht von ca. 46 kDa, wobei die Untereinheiten über Disulfidbrücken verbunden sind. Die im Menschen beschriebenen Varianten des Proteins VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₃₈, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₆₂, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A_{165b}, VEGF-A₁₈₉ und VEGF-A₂₀₆, die durch alternatives posttranskriptionelles Exon-Spleißen entstehen, werden nach der unterschiedlichen Anzahl der Aminosäuren im Protein benannt. Diese werden von den Zellen sezerniert, wobei aber die beiden längsten Formen zellmembrangebunden vorliegen [65].

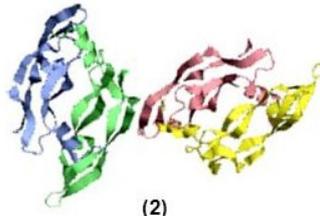


Abb. 6: Darstellung der VEGF (2) rezeptorbindernden Domäne, 8. – 109. Aminosäure. Abbildung aus der Protein Datenbank (PDB ID: 2VPF) [66].

Es konnte eine essentielle Rolle von VEGF in der Embryonalentwicklung und in den physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen der Angiogenese nachgewiesen werden, wobei jedoch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Wachstumsfaktoren zu verzeichnen ist [65]. VEGF ist ein spezifisches Mitogen für Gefäßendothelzellen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Isoformen VEGF-A₁₂₁ und VEGF-A₁₆₅ die Vermehrung von Endothelzellen stimulieren, da sie aufgrund ihrer kürzeren Kettenlänge von den Zellen sezerniert werden [65]. VEGF-A, VEGF-B und PGF werden für die Blutgefäßneubildung benötigt, während VEGF-C und VEGF-D essentiell für die Bildung von Lymphgefäßen sind [65]. Vor allem durch Zellhypoxie wird die Expression von VEGF gesteigert [65]. Ein bekannter Transkriptionsfaktor zur Regulation des Wachstumsfaktors ist NF-kappa B [65]. Weiterhin erhöht VEGF die Gefäßpermeabilität, erhöht die Zahl der im Blut zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen und deren Differenzierung zu Endothelzellen [67]. Es konnte für verschiedene Methoden zur Immobilisierung von VEGF auf Implantaten im Blutkreislauf eine schnellere Reendothelialisierung und die Ausbildung geringerer Neointimadicken nachgewiesen werden [68–71]. Außerdem wird eine verbesserte Vaskularisierung von Implantaten durch die Kombination mehrerer Wachstumsfaktoren, die an der Angiogenese beteiligt sind, beschrieben [72–74]. Aktuelle *in vitro* und *in vivo* Studien zeigen dabei eine höhere Wirkung von VEGF, wenn dieses an das Scaffold gebunden ist, im Gegensatz zu freiem VEGF, das schnell freigesetzt werden kann, wobei die Vermutung zur besseren Wirksamkeit auf der längeren Bioverfügbarkeit des VEGF beruht [75–79]. Aktuell geht die Entwicklung in Richtung gesteuerter und langfristiger Freisetzung von VEGF.

VEGF-A₁₆₅ ist die am besten untersuchte Isoform. Sie ist nahezu ubiquitär im menschlichen Organismus vorhanden, da sie durch eine Vielzahl von Zellen, wie Endothelzellen, Myofibroblasten und Leukozyten, produziert wird. VEGF-A₁₆₅ wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Modifikation der Polymeroberflächen als Modellbiomolekül verwendet.

2.3 Chemische Oberflächenaktivierungen von Polymeren zur Generierung terminaler, funktioneller Gruppen

Im Zusammenhang mit der Entwicklung wirkstoffbeladener, biodegradierbarer Implantatoberflächen wurde untersucht, ob bei PCL und P(3HB) sowie PUR als Referenz durch ver-

schiedene nass- und plasmachemische Techniken die Anzahl an NH_2 -, OH - und COOH -Gruppen auf den Oberflächen erhöht werden kann. Diese erzeugten funktionellen Gruppen dienen als Ankergruppen für die Crosslinker zur Ankopplung des Modellpharmakons ASS und des Modellbiomoleküls VEGF (Kap. 2.2).

2.3.1 Synthese von Aminogruppen

Zur Erzeugung terminaler NH_2 -Gruppen auf den Polymeroberflächen wurden drei verschiedene Methoden genutzt. Mit Hilfe von NH_3 -Niederdruckplasma und durch Silanisierung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) nach vorheriger Aktivierung der Oberflächen mit O_2 -Niederdruckplasma wurden NH_2 -Gruppen auf den Oberflächen geschaffen. Zum anderen durch Reaktion mit MDI, welches mit den vorhandenen OH -Gruppen von PCL und P(3HB) bzw. Urethangruppen des PUR reagiert und dessen endständige Isocyanatgruppe ($-\text{NCO}$) im Anschluss in eine NH_2 -Gruppe überführt wird. Zur Erhöhung der Anzahl der OH - und COOH -Gruppen wurde für PCL und P(3HB) dazu vorher eine basische Oberflächendegradation durchgeführt. Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM, Philips XL30 ESEM, 10 kV bei 10^{-7} mbar) wurde die Morphologie der Oberflächen betrachtet. Die Aufnahmen wurden im Vergleich zu den anderen Aminofunktionalisierungen in Tabelle 14 dargestellt. Auf eine Darstellung der O_2 - und CO_2 -Plasma aktivierten Proben wurde verzichtet, da es sich um eine materialschonende Behandlung handelt die keine Veränderung der Oberfläche zeigte [81].

Oberflächenaktivierung mit NH_3 -Plasma

Als Alternative zu den nasschemischen Oberflächenaktivierungen wurden plasmachemische Verfahren genutzt. Bei diesen Verfahren führt man Gasen kontinuierlich Energie zu (z.B. thermische Anregung, Anregung durch Strahlung, Anregung durch elektrostatische oder elektromagnetische Felder), wodurch aus den Atomen bzw. Molekülen Ionen und Elektronen entstehen [80]. Dieses Gemisch aus neutralen, positiv und negativ geladenen Teilchen wird als Plasma bezeichnet. Wegen des hohen Energiegehaltes eines Plasmas bei gleichzeitig niedriger Temperatur ermöglicht die Plasmatechnik Oberflächenaktivierungen, die sonst nicht, oder nur sehr langsam und ineffizient ablaufen. Vorteile der Niederdruck-Plasmatechnik sind die niedrige Temperatur während des Prozesses und dass nur die Oberflächen der Polymerfilme aktiviert werden. Durch die Verwendung von Gasen kann auf Lösungsmittel verzichtet werden, wodurch eine sofortige Weiterverarbeitung der aktivierten Polymere ohne Wasch- oder Trocknungsprozesse möglich ist. Neben den vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten der Plasmatechnik sind die kurzen Prozesszeiten von wenigen Minuten zur Aktivierung der Polymere ein weiterer Vorteil [80]. Nachteile der Plasmaaktivierung sind neben der Bildung der beabsichtigten funktionellen Gruppen die unspezifische Entstehung weiterer Gruppen, die für eine spätere Ankopplungsreaktion nicht zur Verfügung stehen. So werden

für die Aktivierung von Polymeren mit Ammoniak-Plasma neben den gewünschten Aminen zusätzlich Amide, Imine oder Nitrile generiert (Abb. 7) [80–82]. Für die Aktivierung der Oberflächen mit reaktiven Gruppen wurden neben Ammoniak auch Sauerstoff (Kap. 2.3.2) und Kohlenstoffdioxid (Kap. 2.3.3) als Prozessgase genutzt.

Für die Plasmaaktivierung (Plasmaanlage Typ Femto, Diener electronic GmbH & Co. KG, Ebhausen, Deutschland) mit Ammoniakgas (99,998 % Reinheit) zur Generierung von NH_2 -Gruppen und anderen stickstoffhaltigen Gruppen (**3**) wurden zur Ermittlung der optimalen Parameter verschiedene Plasmabedingungen in umfangreichen Vorarbeiten untersucht. Die entwickelten optimierten Plasmabedingungen sind in der Tabelle 4 dargestellt.

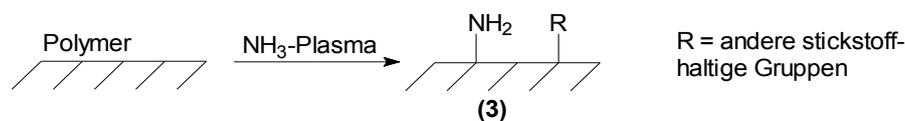


Abb. 7: Schema zur plasmachemischen Oberflächenaktivierung von Polymeren durch NH_3 -Plasma unter Bildung terminaler NH_2 -Gruppen (**3**).

Silanisierung mit O_2 -Plasma/APTES

Zur Generierung einer hohen Anzahl terminaler primärer NH_2 -Gruppen wurde die nasschemische Ankopplung des Spacers APTES an mit Sauerstoff-Plasma (Kap. 2.3.2) aktivierten Filmen durchgeführt (Abb. 8). Die Ethoxygruppen reagieren dabei mit den erzeugten OH-Gruppen (**4**) unter Bildung eines aminofunktionalisierten Silylethers (**5**). Der Vorteil der Aktivierung mit O_2 -Plasma/APTES liegt in der Erzeugung einer hohen Anzahl an NH_2 -Gruppen durch die Vernetzung der APTES-Moleküle durch stabile Silyletherbindungen untereinander, womit bereits wenige OH-Gruppen auf der Polymeroberfläche als Ankergruppen ausreichen, um eine großflächige Generierung von NH_2 -Gruppen zu erreichen.

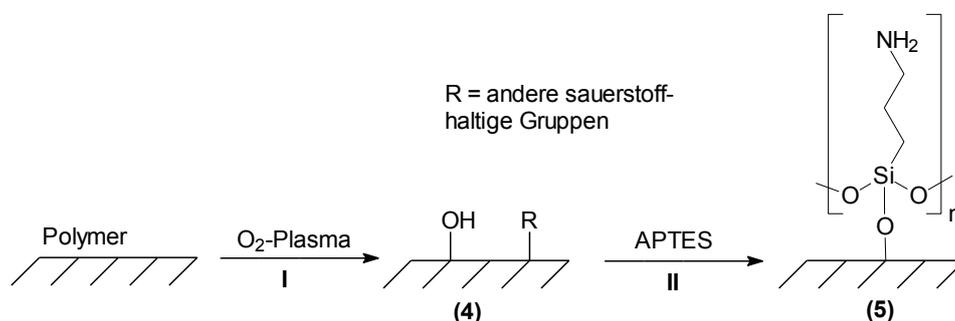


Abb. 8: Schema zur Oberflächenaktivierung von Polymeren mit O_2 -Plasma/APTES: I. Generierung terminaler OH-Gruppen (**4**) durch O_2 -Plasma, II. Reaktion mit APTES unter Bildung eines aminofunktionalisierten Silylethers (**5**).

Für die Ankopplung von APTES wurde zuerst eine materialschonende Aktivierung der Polymerfilme mit O_2 -Plasma zur Generierung von OH-Gruppen durchgeführt. Die entwickelten

optimierten Plasmabedingungen sind ebenfalls in der Tabelle 4 dargestellt. Die Ankopplung erfolgte in 5 %iger APTES-Lösung (w) für 24 Stunden bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die Filme dreimal 1 Stunde in Reinstwasser mit 0,05 % Tween 20 (w) und dreimal für 1 Stunde mit Wasser gewaschen.

Oberflächenaktivierung mit MDI/NH₃

Um die Anzahl an reaktiven OH-Gruppen und COOH-Gruppen auf den PCL- und P(3HB)-Oberflächen zu erhöhen, wurden diese zunächst in einer heterogenen Oberflächenreaktion einer basischen Hydrolyse (Verseifung) mit Natronlauge (NaOH) unterzogen, welche zu einer Esterspaltung der Polymerkette führt. Die dabei erzeugten OH- und COOH-Gruppen wurden zur Anbindung von MDI genutzt, welches die anschließende Generierung terminaler NH₂-Gruppen erlaubt. Als Referenz diente das im Kapitel 2.1.3 beschriebene PUR.

Die Ankopplung von MDI an die terminalen OH- und COOH-Gruppen der Polyester (**6**) ist schematisch in der Abbildung 9 gezeigt.

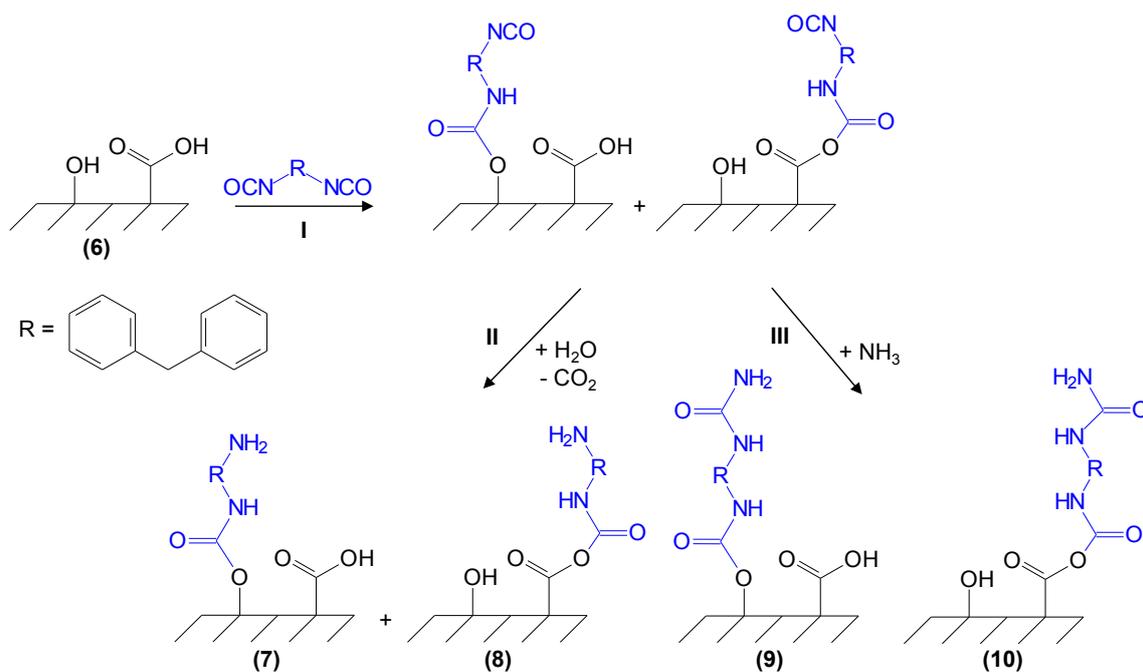


Abb. 9: Reaktionsschema der nasschemischen Oberflächenaktivierung von P(3HB) und PCL mit MDI/NH₃: I. Reaktion der Polyester nach basischer Oberflächenhydrolyse (**6**) mit MDI, II. Hydrolyse unter Abspaltung von Kohlenstoffdioxid zu den primären Aminen (**7**) und (**8**), III. Ammonolyse zu den Harnstoffderivaten (**9**) und (**10**).

Die Umsetzung der endständigen NCO-Gruppen erfolgte hydrolytisch unter Abspaltung von CO₂ (**7** und **8**) bzw. durch Ammonolyse unter Bildung eines Harnstoffderivates (**9** und **10**) in wässriger 25 %iger (w) NH₃-Lösung. Die Reaktion von MDI mit der Urethangruppe des PUR (**11**) unter Bildung eines N-substituierten Harnstoffderivates (Allophanat) ist in der Abbildung 10 dargestellt.

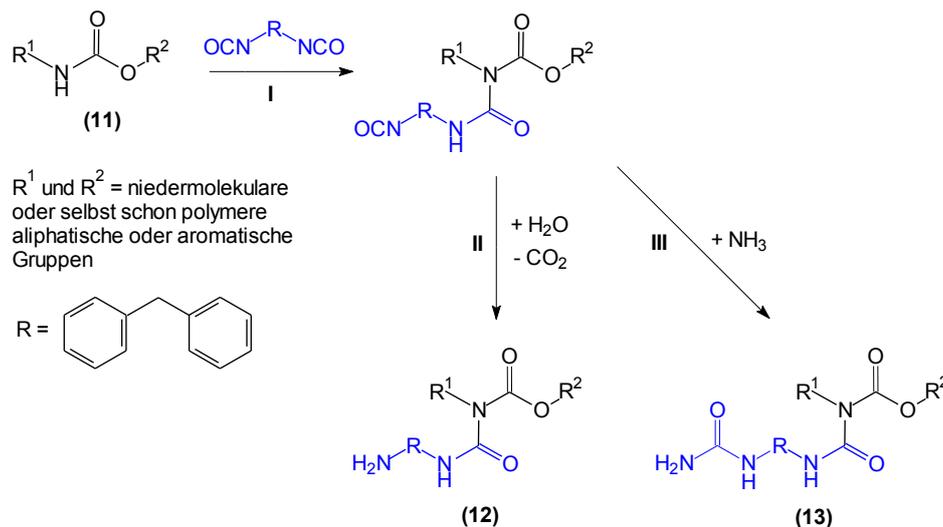


Abb. 10: Reaktionsschema der nasschemischen Oberflächenaktivierung von PUR **(11)** mit MDI/NH₃:
 I. Reaktion mit MDI unter Bildung eines Allophanat, II. Hydrolyse unter Abspaltung von Kohlenstoffdioxid zu dem primären Amin **(12)**, III. Ammonolyse zum Harnstoffderivat **(13)**.

Die endständige NCO-Gruppe wurde auch hier hydrolytisch unter Abspaltung von CO₂ **(12)** bzw. durch Ammonolyse unter Bildung eines Harnstoffderivates **(13)** in wässriger 25 %iger (w) NH₃-Lösung umgesetzt.

Für die Spaltung der Polymerketten (Oberflächendegradation) wurden die PCL- und P(3HB)-Filme in 2 M NaOH-Lösung gegeben, anschließend mit Wasser gewaschen und über Nacht getrocknet (T = 40 °C, p = 40 mbar). Die Umsetzung mit MDI erfolgte in einer gesättigten n-Heptan-Lösung. Die Filme wurden im Anschluss mit n-Heptan gewaschen und über Nacht wiederum bei den bereits angegebenen Bedingungen getrocknet. Die Umwandlung der NCO-Gruppen zu NH₂-Gruppen erfolgte in wässriger 25 %iger (w) NH₃-Lösung. Um toxische Effekte auf Zellkulturen oder ungewünschte Nebenreaktionen für die anschließenden Koppelungsreaktionen durch Freisetzung von Nebenprodukten oder Lösungsmittelresten zu vermeiden, wurden die Filme abschließend dreimal für 1 Stunde in Reinstwasser mit 0,05 % Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat (Tween 20) (w) und dreimal für 1 Stunde mit Reinstwasser gewaschen. Anschließend wurden die modifizierten Polymerfilme wiederum getrocknet (T = 40 °C, p = 40 mbar). Eine Übersicht über die an PCL-, P(3HB)- und PUR-Filmen (Ø = 6 mm, Ø = 100 µm, Gesamtoberfläche von 56,5 mm²) durchgeführten Reaktionsbedingungen gibt Tabelle 3.

Die gewählten Reaktionsbedingungen für die nasschemischen Oberflächenreaktionen wurden in diesem Zusammenhang dahingehend entwickelt, dass Lösungsmittel gewählt wurden, in denen die Polymere nicht quellen und die Oberflächendegradation somit keine tiefgehende Modifizierung im Bulk hervorruft.

Tab. 3: Übersicht über die Reaktionsbedingungen der nasschemischen Oberflächenaktivierung von PCL, P(3HB) und PUR mit MDI/NH₃.

| Polymere | 1. Basische Oberflächen-degradation | 2. Reaktion zur endständigen NCO-Gruppe | 3. Reaktion zur endständigen NH ₂ -Gruppe |
|--|---|---|---|
| PCL Reaktionszeit: Reagenz/ Lösungsmittel: Temperatur: | 8 h 2 M NaOH/ H ₂ O 50 °C | 2x5 h 1.6x10 ⁻³ M MDI/ n-Heptan 50 °C | 2 h 25 %ige NH ₃ / H ₂ O Raumtemperatur |
| P(3HB) Reaktionszeit: Reagenz/ Lösungsmittel: Temperatur: | 2 h 2 M NaOH/ H ₂ O 50 °C | 2x5 h 1.6x10 ⁻³ M MDI/ n-Heptan 50 °C | 30 min 25 %ige NH ₃ / H ₂ O Raumtemperatur |
| PUR Reaktionszeit: Reagenz/ Lösungsmittel: Temperatur: | - - - - | 24 h 2.3x10 ⁻³ M MDI/ Toluol 50 °C | 30 min 25 %ige NH ₃ / H ₂ O Raumtemperatur |

2.3.2 Synthese von Hydroxylgruppen

Zur Generierung funktioneller OH-Gruppen auf den Polymeroberflächen wurde eine Niederdruckplasmaaktivierung mit Sauerstoff durchgeführt. Bei der Behandlung von Polymeren mit Sauerstoff-Plasma wird neben der Generierung von OH-Gruppen auch die Bildung von Ether-, Peroxid-, Epoxid-, Carbonyl- und COOH-Gruppen beschrieben (Abb. 8, I) [80].

Die Plasmaaktivierung (Plasmaanlage Typ Femto, Diener electronic GmbH & Co. KG, Ebhausen, Deutschland) mit Sauerstoff (99,995 % Reinheit) zur Generierung von OH-Gruppen und anderen sauerstoffhaltigen Gruppen wurde wiederum bei 0,3 mbar und der in Tabelle 4 für die jeweiligen Polymere dokumentierten Behandlungsdauer und Generatorleistung durchgeführt.

2.3.3 Synthese von Carboxylgruppen

Als Alternative zum O₂-Plasma wurde darüber hinaus die Behandlung der Polymeroberflächen mit Kohlenstoffdioxid(CO₂)-Plasma untersucht, bei der sich vor allem Carbonyl-, COOH- und andere sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen bilden (Abb. 11) [80].

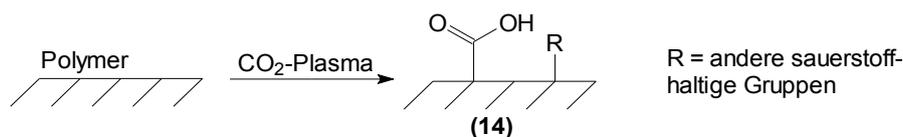


Abb. 11: Schema zur plasmachemischen Oberflächenaktivierung von Polymeren durch CO₂-Plasma unter Bildung terminaler COOH-Gruppen (14).

Die Plasmaaktivierung wurde wiederum mit der am Institut vorhandenen Femtoplasmaanlage (Diener electronic GmbH & Co. KG, Ebhausen, Deutschland) unter Zuführung des Prozessgases Kohlenstoffdioxid (99,995 % Reinheit) bei 0,3 mbar durchgeführt (Tab. 4).

Tab. 4: Übersicht über die Reaktionsbedingungen der plasmachemischen Oberflächenaktivierung von PCL und P(3HB) in der Femtoplasmaanlage (Generator: $f = 13,56$ MHz; Temperatur: < 40 °C; Druck: 0,3 mbar).

| Polymere | 1. NH ₃ -Plasma | 2. O ₂ -Plasma | 3. CO ₂ -Plasma |
|--|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| PCL Reaktionszeit: Leistung: | 2 min 30 W | 1 min 30 W | 1 min 30 W |
| P(3HB) Reaktionszeit: Leistung: | 10 min 60 W | 3 min 45 W | 5 min 45 W |

2.4 Immobilisierung von Modellwirkstoffen auf den chemisch aktivierten Polymeroberflächen

Für die Entwicklung von Oberflächenmodifizierungen polymerer Implantatwerkstoffe ist eine nasschemische Ankopplung von Wirkstoffen von großer Bedeutung. Dabei müssen jedoch die physikochemischen Eigenschaften des Polymers und die biologische Aktivität des Wirkstoffes erhalten bleiben. Die hier beschriebenen durchgeführten Methoden stellen Möglichkeiten für eine solche Modifizierung dar, wobei neben einer Immobilisierung des Wirkstoffes über hydrolytisch stabile, kovalente Bindungen auch eine Ankopplung über hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen untersucht wird, um eine Freisetzung der immobilisierten Wirkstoffe zu ermöglichen. Die chemische Wirkstoffankopplung an die Polymeroberfläche ist somit eine Ergänzung zur Wirkstoffbeladung durch Inkorporation in den Polymerbulk.

Zur besseren Übersicht der folgenden Abbildungen von Kopplungs- und Spaltungsreaktionen sind die aus den Oberflächenaktivierungen resultierenden chemisch modifizierten Oberflächen schematisch vereinfacht dargestellt worden (Abb. 12).

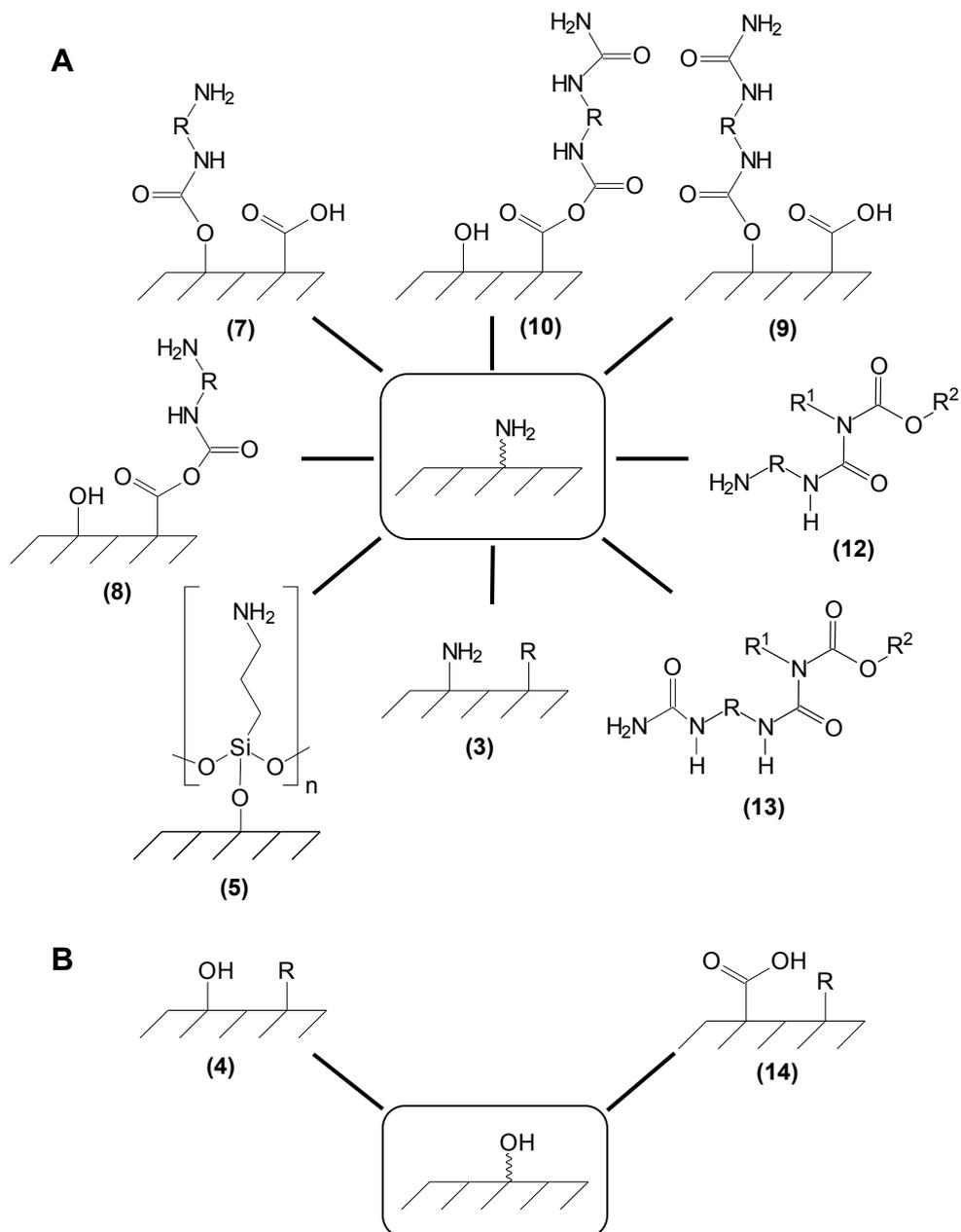


Abb. 12: Schematisch vereinfachte Darstellung von PCL-, P(3HB)- und PUR-Oberflächen mit terminal generierten NH_2 -Gruppen nach Aktivierung mit MDI/ NH_3 , NH_3 -Plasma und O_2 -Plasma/APTES (**A**) und von PCL- und P(3HB)-Oberflächen mit terminal erzeugten OH- und COOH-Gruppen nach Aktivierung mit O_2 - und CO_2 -Plasma (**B**).

2.4.1 Immobilisierung über hydrolytisch stabile, kovalente Bindungen

Die exemplarische Anbindung von VEGF wurde über die bei der Oberflächenaktivierung generierten NH_2 -Gruppen unter Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC)/N-Hydroxysuccinimid (NHS) bzw. Glutaraldehyd (GDA) als Crosslinker vorgenommen.

EDC/NHS-Kopplung

EDC ist ein Zero Crosslinker und sowohl EDC, NHS als auch der gebildete O-Acylisoharnstoff sind gut wasserlöslich, wodurch auf organische Lösungsmittel bei der Kopplung verzichtet werden kann und nach dem Waschen mit wässrigen Medien nur die aktivierte Polymeroberfläche und das gebundene VEGF zurückbleiben ohne mögliche toxische Rückstände.

Bei der Anbindung von VEGF über EDC/NHS an die NH₂-Gruppen der aktivierten Polymeroberflächen reagiert das N-substituierte Carbodiimid EDC mit einer COOH-Gruppe des VEGF zu einem reaktiven O-Acylisoharnstoff-Derivat, welches eine kurze Halbwertszeit in wässrigen Medien besitzt (Abb. 13, I). Die COOH-Gruppe des VEGF kann dabei von der C-terminalen Aminosäure oder von den Seitenketten der Asparagin- oder Glutaminsäuren stammen [66]. Das gebildete Zwischenprodukt reagiert mit NHS unter Abspaltung des Harnstoffderivats zu einem NHS-Ester, welcher eine höhere Stabilität in wässrigen Medien besitzt (Abb. 13, II). Die so aktivierte COOH-Gruppe reagiert in einem weiteren Schritt mit den NH₂-Gruppen der Polymeroberflächen unter Bildung einer Amidbindung (Abb. 13, III, 17) [83].

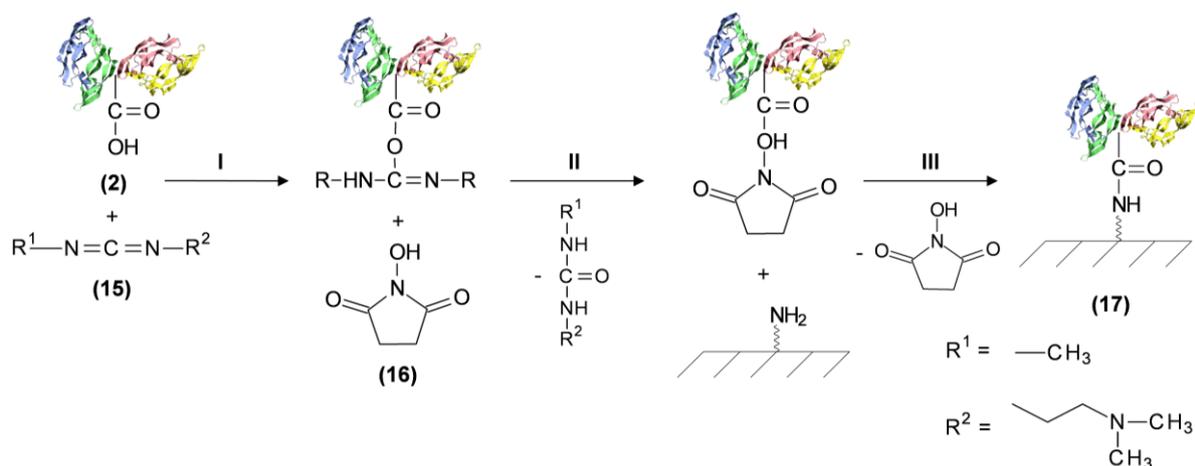


Abb. 13: Reaktionsschema zur Oberflächenmodifizierung von aminoaktivierten Polymeren mit VEGF (2) und EDC (15): I. Bildung eines O-Acylisoharnstoff-Derivats, II. Umsetzung mit NHS (16) zu einem NHS-Ester, III. Reaktion mit aminoaktivierten polymeren Oberflächen unter Bildung einer Amidbindung (17).

Die mit NH₂-Gruppen aktivierten Polymerfilme wurden in Phosphate buffered saline (PBS, 1,265 g NaH₂PO₄·xH₂O, 12,1 g Na₂HPO₄·xH₂O und 8,5 g Natriumchlorid (NaCl) auf 1 Liter Reinstwasser aufgefüllt) mit 1 mmol/l NHS, 0,05 mol/l EDC und 1 µg/ml VEGF₁₆₅ bei Raumtemperatur modifiziert. Eventuelle freie Bindungsstellen vom Crosslinker wurden durch das Waschen mit 3 M 2-Aminoethanol (Monoethanolamin, MEA, pH 9) für 5 Minuten bei Raumtemperatur abgesättigt. Die mit VEGF beladenen Proben wurden abschließend dreimal mit Waschpuffer (100 ml PBS mit 900 ml Reinstwasser und 0,05 % Tween 20) gewaschen.

Stabile kovalente GDA-Ankopplung

GDA ist ein homobifunktioneller Crosslinker, der mit den primären NH_2 -Gruppen der N-terminalen Aminosäure oder der Seitenketten von Lysin, Arginin oder Glutamin des VEGF, und der aktivierten Polymeroberfläche reagiert (Abb. 14). Der Prozess der Fixierung mit GDA ist noch nicht vollständig verstanden, aber es werden zwei wesentliche Kopplungsreaktionen beim Crosslinken mit GDA diskutiert [84]. Die Kopplung durch Bildung Schiffscher Basen (**19**) über die Aldehydgruppen (Abb. 14, I) und die Michael-Addition (Abb. 14, II) unter Spaltung der Doppelbindungen und Bildung eines sekundären Amins [85]. Durch die Aldolkondensation von GDA liegt dieses meist in einer polymeren Form (**18**) vor, wobei durch die unterschiedlichen Kettenlängen verschiedene Spacerfunktionen vorhanden sind, die eine Reaktion mit vielen der präsentierten NH_2 -Gruppen ermöglichen. Zudem zeigt die polymere Form von GDA stabilere Bindungen als die monomere Form und durch die gute Wasserlöslichkeit ist ein materialschonendes Entfernen toxischer Substanzen in wässrigen Medien möglich. Durch das Vorhandensein mehrerer NH_2 -Gruppen je VEGF-Molekül und zur Vermeidung einer dadurch möglichen Vernetzung von VEGF durch GDA, wurde die Kopplungsreaktion in zwei Schritten durchgeführt, wobei GDA zunächst an die Oberfläche gebunden und danach das VEGF angekoppelt wurde [83].

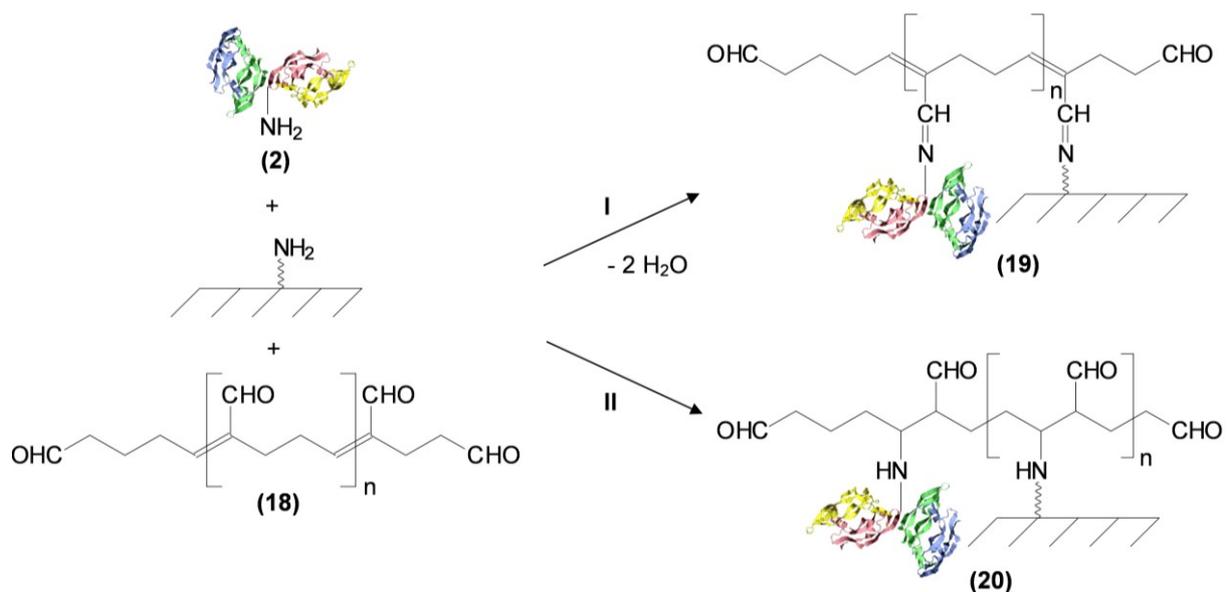


Abb. 14: Reaktionsschema zur Oberflächenmodifizierung von aminoaktivierten Polymeren mit VEGF (**2**) unter Verwendung von Glutaraldehyd (**18**) als Crosslinker: I: Kopplung über Bildung von Azomethin (Schiffsche Base) (**19**) II: Kopplung durch Michael-Addition unter Bildung eines sekundären Amins (**20**).

Die Ankopplung von GDA an die aminoaktivierten Oberflächen erfolgte in PBS (pH 6,8) mit 1,25 % GDA (w) über 16 Stunden bei Raumtemperatur. Nachdem die Proben dreimal mit Waschpuffer gewaschen wurden erfolgte die Ankopplung von VEGF über GDA in Carbonat-

puffer (1,7 g Na_2CO_3 und 2,86 g NaHCO_3 in 1000 ml Reinstwasser, pH 9,6) mit 1 $\mu\text{g/ml}$ VEGF über 16 Stunden bei 4 °C. Noch freie Bindungsstellen vom GDA wurden durch das Waschen mit 3 M MEA (pH 9) für 1 Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Abschließend wurden die modifizierten Filme dreimal mit Waschpuffer (100 ml PBS mit 900 ml Reinstwasser und 0,05 % Tween 20) gewaschen.

2.4.2 Immobilisierung über hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen

Die Ankopplung von Wirkstoffen und Biomolekülen, wie ASS und VEGF, über hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen an die Oberfläche von polymeren Implantatwerkstoffen stellt eine ergänzende Strategie zur Inkorporation in den Polymerbulk dar [8]. Zudem ermöglicht die chemische Ankopplung eine Freisetzung von Wirkstoffen unabhängig von der Stärke der Physisorption des Wirkstoffs und eine Freisetzung in Abhängigkeit von der Hydrolyse der Bindungen, die eine verzögerte Freisetzung von Wirkstoffen ermöglichen kann.

Die Kopplung von VEGF über hydrolytisch spaltbare kovalente Bindungen erfolgte an die mit OH- und COOH-Gruppen aktivierten Oberflächen (Kap. 2.3) über die Crosslinker N,N'-Disuccinimidylcarbonat (DSC) und Disuccinimidylsuberat (DSS). Für ASS erfolgte die Anbindung an die mit NH_2 -, OH- und COOH-Gruppen aktivierten Polymeroberflächen über den Crosslinker DSC. Die Kopplung von ASS über DSS wurde nicht untersucht, da durch den Spacer des Crosslinkers bei ASS-Freisetzung der organische Rest $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_6\text{-CO-O-}$ gebunden bleiben kann, der die therapeutische Wirkung von ASS verändern könnte bzw. auch dessen Nachweis.

DSC-Kopplung

N,N'-Disuccinimidylcarbonat (DSC) ist ein Carbonat-NHS-Ester der stark mit Nucleophilen wie OH- oder NH_2 -Gruppen reagiert, wobei NH_2 -Gruppen als Reaktionspartner aufgrund der höheren Nucleophilie bevorzugt werden [86]. In den folgenden Reaktionsschemata wurden zur Ankopplung und Freisetzung von VEGF deshalb nur die NH_2 -Gruppen des VEGF betrachtet (Abb. 16 und Abb. 18). Die Kopplungsreaktionen fanden dabei in getrockneten Lösungsmitteln statt, da der verwendete Crosslinker und die gebildeten Produkte hydrolyseempfindlich sind. Verwendet wurden Lösungsmittel, in denen kein Quellen oder Lösen des Polymers stattfindet, eine ausreichende Stabilität von ASS und VEGF gegeben ist und die in die dargestellten Reaktionen nicht einbezogen werden (Tab. 5).

Die Ankopplung von ASS und VEGF erfolgte in einer zweistufigen Reaktion, wobei zuerst eine Succinimidylgruppe des Crosslinkers DSC (**21**) mit den auf den Oberflächen generierten NH_2 - oder OH-Gruppen der Polymere unter Abspaltung von NHS reagiert (Abb. 15, **A I**, **B I** und Abb. 16, **I**). Dabei wurde die Ankopplung von VEGF mit NH_2 -aktivierten Polymeroberflächen nicht untersucht, da sich durch das Crosslinking mit DSC hydrolytisch stabile Harn-

stoffderivate bilden. Im folgenden Schritt wurde die zweite freie funktionelle Succinimidylgruppe des Crosslinkers mit der COOH-Gruppe der ASS (**1**) (Abb. 15, **A II** und **B II**) unter Bildung eines Carbamat- (**22**) oder Carbonatesters (**23**) bzw. mit einer NH₂-Gruppe des VEGF (Abb. 16, **II**) unter Abspaltung von NHS und unter Bildung eines Carbamatesters (**24**) umgesetzt [83, 87]. Primäre NH₂-Gruppen des VEGF können von der N-terminalen Aminosäure oder den Seitenketten von Lysin, Arginin und Glutamin stammen, während die OH-Gruppen von der C-terminalen Aminosäure und den Seitenketten von Serin, Tyrosin, Glutamin- und Asparaginsäure zur Reaktion herangezogen werden können. Im Anschluss wurden die Proben kurz mit trockenem Methanol und dann mit Waschpuffer (100 ml PBS mit 900 ml Reinstwasser und 0,05 % Tween 20) gespült.

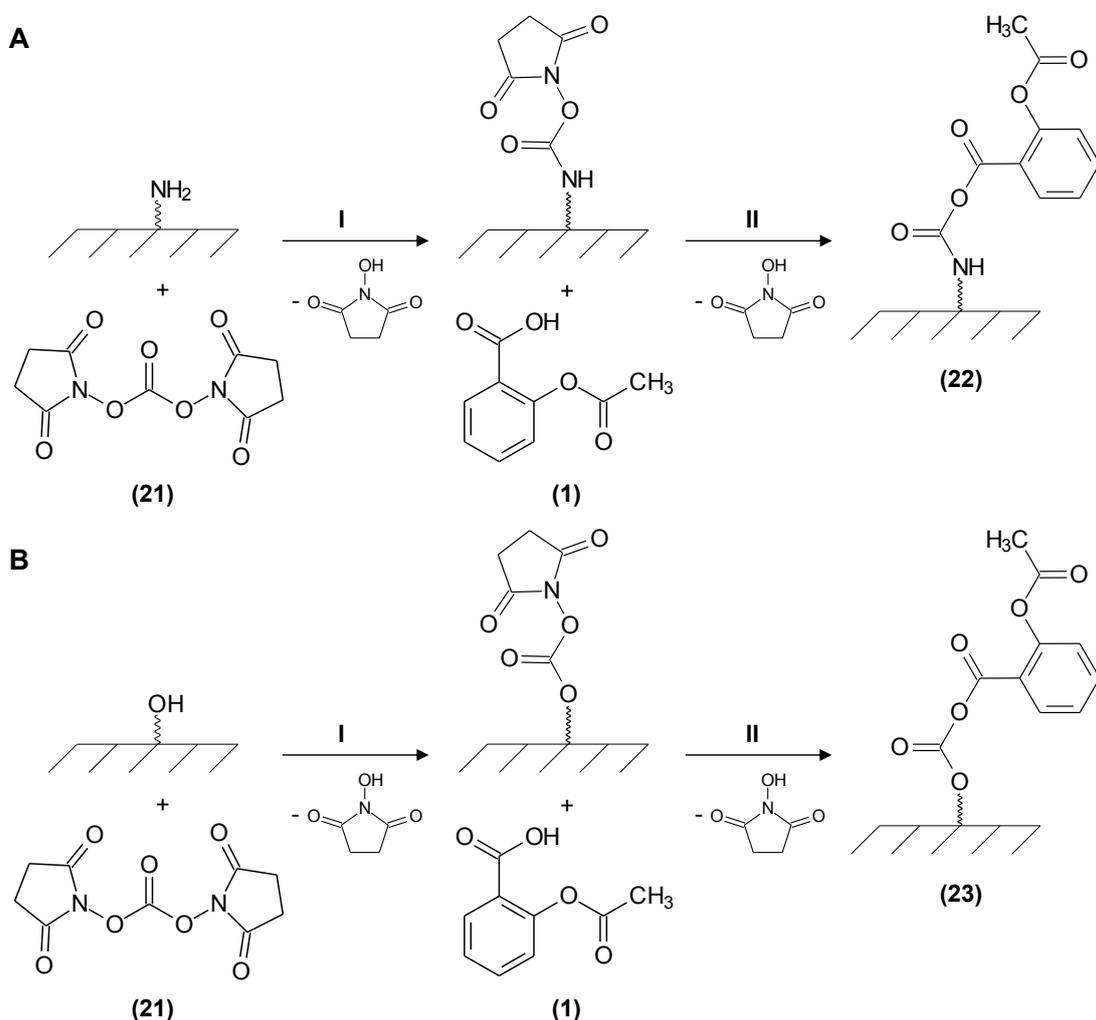


Abb. 15: Reaktionsschema zur Oberflächenmodifizierung von mit NH₂-Gruppen (**A**) und OH-Gruppen (**B**) aktivierten Polymeren mit ASS mit Hilfe von DSC (**21**) als Crosslinker: I. Ankopplung funktioneller Succinimidylgruppe an die NH₂- bzw. OH-Gruppen der aktivierten Polymeroberfläche über einen Carbamat- (**A I**) bzw. Carbonatester (**B I**) unter Abspaltung von NHS, II. Ankopplung von ASS unter Bildung eines Carbamat- (**A II**) bzw. Carbonatesters (**B II**) und unter Abspaltung von NHS.

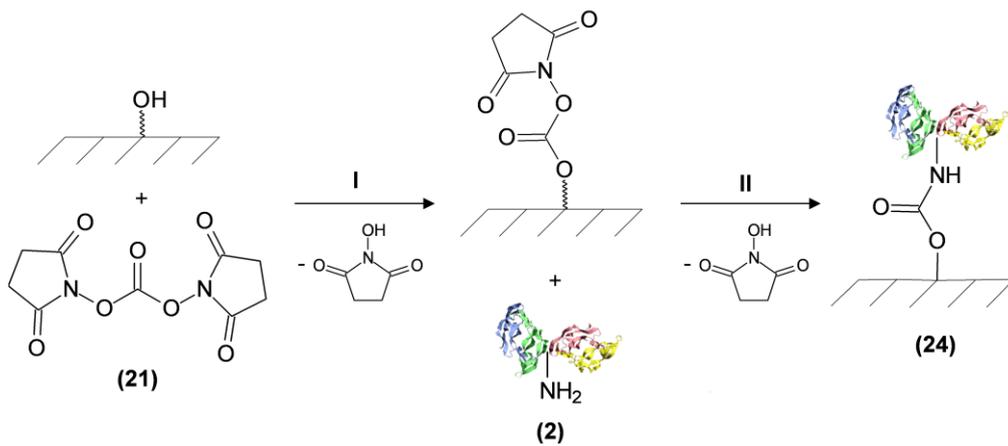


Abb. 16: Reaktionsschema zur Oberflächenmodifizierung von mit OH-Gruppen aktivierten Polymeren mit VEGF (2) unter Verwendung von DSC (21) als Crosslinker: I. Ankopplung funktioneller Succinimidylgruppen auf den durch OH-Gruppen aktivierten Polymeroberflächen über einen Carbonatester unter Abspaltung von NHS, II. Ankopplung von VEGF (2) über einen Carbamatester (24) unter Abspaltung von NHS. Aufgrund der höheren Nucleophilie der NH_2 -Gruppen gegenüber den OH-Gruppen wurden nur diese bei VEGF im Reaktionsschema betrachtet.

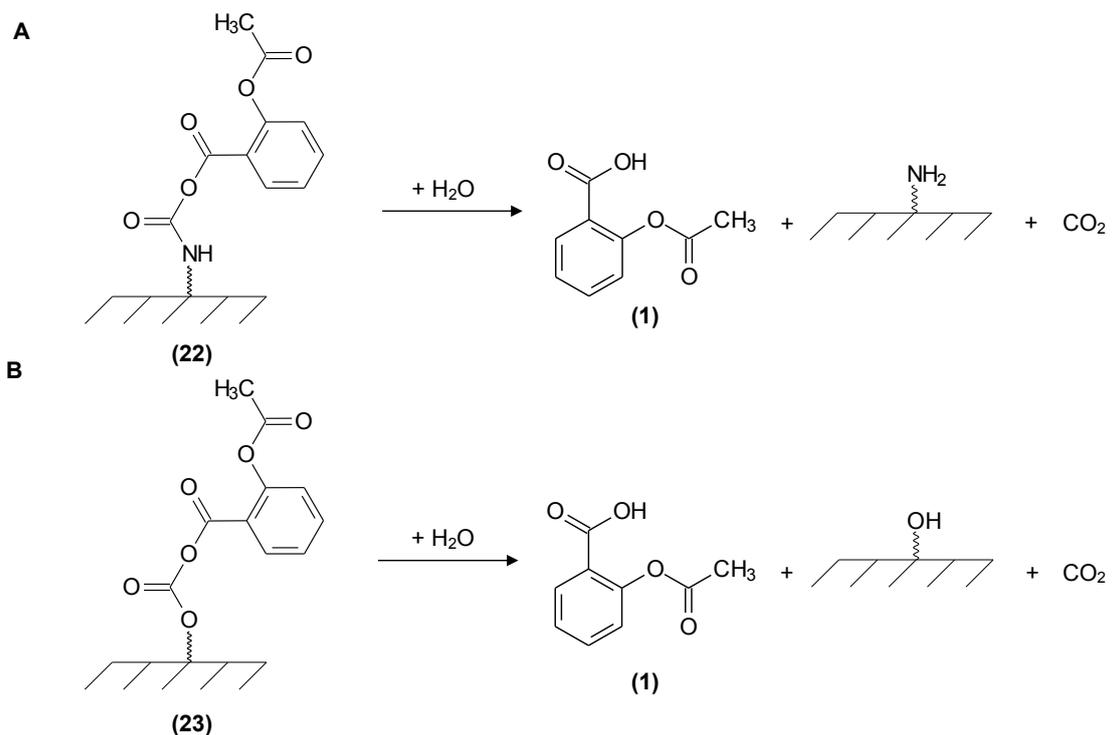


Abb. 17: Reaktionsschema der Hydrolyse der gebildeten Carbamat- (A 22) und Carbonatester (B 23) unter Freisetzung von ASS (1), CO_2 und den jeweiligen mit NH_2 - bzw. OH-Gruppen aktivierten polymeren Oberflächen. Die Hydrolyse von ASS zur Salicylsäure wurde nicht dargestellt, bei der Detektion der Freisetzung aber berücksichtigt.

Die dabei gebildeten Carbamat- (**22**, **24**) und Carbonatester (**23**) sind hydrolyseempfindlich und werden unter physiologischen Bedingungen mit der Zeit gespalten (Abb. 17 und Abb. 18) [88]. Bei der Hydrolyse der Esterbindungen wird der Wirkstoff ASS bzw. Wachstumsfaktor VEGF und Kohlenstoffdioxid (CO_2) von den aktivierten Polymeroberflächen freigesetzt. Die ebenfalls stattfindende Hydrolyse von ASS (**1**) zur Salicylsäure ist im Reaktionsschema nicht dargestellt (Abb. 17), wurde jedoch in den HPLC-Messungen (Kap. 4.3) mit berücksichtigt. CO_2 , ein natürliches Stoffwechselendprodukt des menschlichen Körpers, ist für die geplante Anwendung der Polymere im vaskulären System unproblematisch, da es natürlich im Blut vorkommt, lediglich in sehr geringen Massen von den Oberflächen freigesetzt wird und zudem von den Erythrozyten im Blut zur Lunge transportiert wird, wo es abgeatmet werden kann.

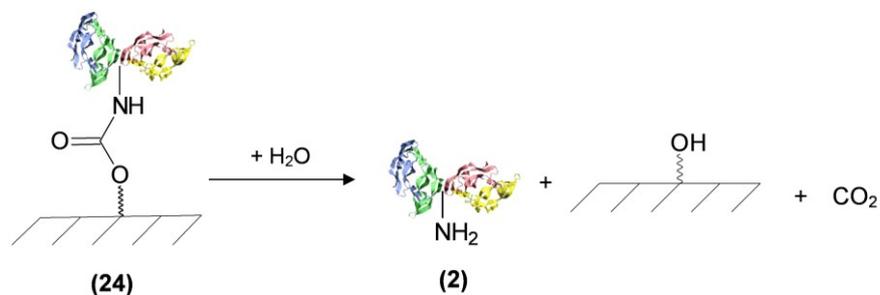


Abb. 18: Reaktionsschema der Hydrolyse des Carbamatesters (**24**) zu VEGF (**2**), CO_2 und den mit OH-Gruppen aktivierten polymeren Oberflächen.

DSS-Ankopplung

Der Crosslinker Disuccinimidylsuberat (DSS) wurde ebenfalls zum Ankoppeln der nukleophilen NH_2 -Gruppen von VEGF an die nukleophilen OH-Gruppen aktivierter Polymeroberflächen genutzt (Abb. 19). DSS ist ein homobifunktionaler NHS-Ester, ähnlich wie DSC, dessen beiden funktionellen Succinimidylgruppen ebenfalls mit nukleophilen NH_2 - und OH-Gruppen reagieren können. In den folgenden Reaktionsschemata wurden, aufgrund der höheren Nukleophilie der NH_2 -Gruppen [86], zur Ankopplung und Freisetzung von VEGF deshalb nur die NH_2 -Gruppen des VEGF betrachtet (Abb. 19 und Abb. 20). Beim DSS ist jedoch eine längere Spacerfunktion als beim DSC vorhanden, wodurch eine eventuelle sterische Hinderung bei der Ankopplung von VEGF minimiert werden kann.

Da jedoch nach der Ankopplung von ASS über DSS zu vermuten ist, dass keine einheitliche Hydrolyse der Esterbindungen (**43**) erfolgt und somit chemisch veränderte ASS durch den Verbleib von organischen Resten resultiert, wurde diese Anbindungsmöglichkeit für ASS im Rahmen der Arbeit nicht weiter verfolgt. Für die Verbindung (**42**) hingegen würde ein organischer Rest (n-Heptansäure, die über eine Amidbindung mit der Oberfläche verknüpft ist) an der Oberfläche verbleiben, der die in der Arbeit untersuchten modifizierten Oberflächen ver-

ändert, weshalb auch hier auf eine Untersuchung der Ankopplung von ASS verzichtet wurde. Die Reaktionsschemata zur Anbindung von ASS an mit NH_2 - und OH -Gruppen aktivierte Polymeroberflächen über DSS und deren hydrolytische Spaltung sind zur Veranschaulichung der Reaktionen in den Abbildungen 36 bis 38 im Anhang dargestellt.

Die Ankopplung von VEGF (**2**) an mit OH -Gruppen aktivierte polymere Oberflächen erfolgte ebenfalls in zwei Schritten (Abb. 19). Im ersten Schritt reagierten die generierten OH -Gruppen der Polymeroberfläche mit einer der beiden funktionellen Succinimidylgruppen des DSS (**25**) unter Bildung eines Esters und Abspaltung von NHS. Die an die Polymeroberfläche gekoppelte zweite funktionelle Succinimidylgruppe des DSS wurde im zweiten Schritt mit den nukleophilen NH_2 -Gruppen des VEGFs unter Abspaltung von NHS umgesetzt, wobei eine stabile kovalente Amidbindung (**26**) entstand [9]. Da die Succinimidylgruppen des DSS und die Esterbindung der Zwischen- und Endprodukte hydrolyseempfindlich sind wurden auch hier nur getrocknete Lösungsmittel für die Kopplungsreaktion verwendet (Tab. 5). Die Proben wurden im Anschluss je mit etwa 10 ml trockenem Methanol und etwa 5 ml Waschpuffer (100 ml PBS mit 900 ml Reinstwasser und 0,05 % Tween 20) gespült.

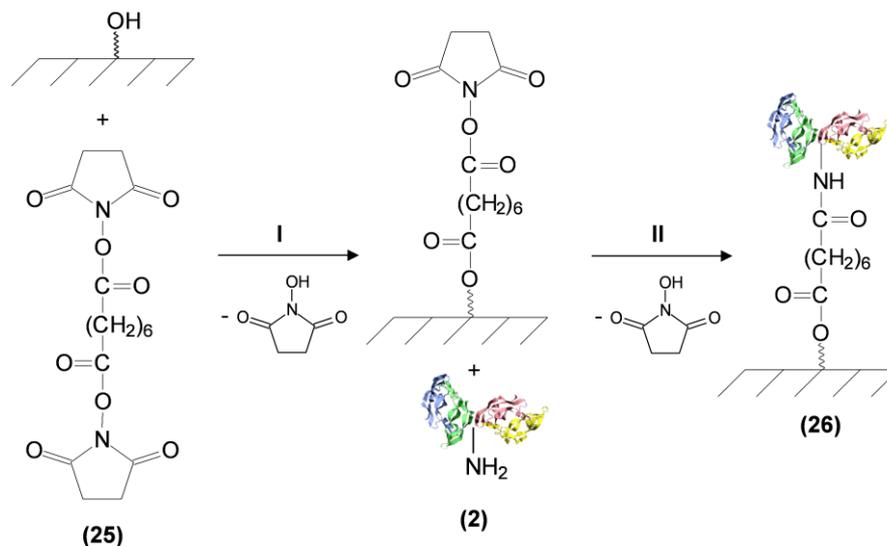


Abb. 19: Reaktionsschema zur Oberflächenmodifizierung von mit OH -Gruppen aktivierten Polymeren mit VEGF (**2**) unter Verwendung von DSS (**25**) als Crosslinker: I. Ankopplung von DSS an die OH -Gruppen der aktivierten Polymeroberfläche über eine Esterbindung unter Abspaltung von NHS, II. Ankopplung von VEGF (**2**) an die Polymeroberfläche über eine Amidbindung (**26**) unter Abspaltung von NHS. Aufgrund der höheren Nukleophilie der NH_2 -Gruppen gegenüber den OH -Gruppen wurden nur diese vom VEGF im Reaktionsschema betrachtet.

Die hierbei gebildete Esterbindung von (**26**) ist unter physiologischen Bedingungen hydrolytisch spaltbar [83]. Bei der Spaltung der Esterbindungen wird VEGF (**27**) mit einem organischem Rest freigesetzt (Abb. 20). Da kleine, biokonjugierte organische Reste die biologische Aktivität des Wachstumsfaktors erst dann beeinträchtigen, wenn die Konformation des Pro-

teins oder wichtige Bindungsmotive verändern werden [89], wurden im Rahmen der Arbeit zusätzliche *in vitro* Studien mit humanen Endothelzellen durchgeführt (Kap. 6.2), die den Erhalt der Wirksamkeit des Wachstumsfaktors nach dessen Freisetzung bestätigen sollten.

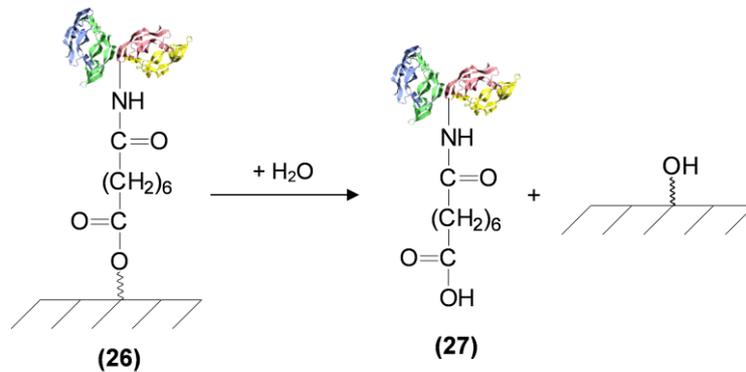


Abb. 20: Reaktionsschema zur Hydrolyse von (26) zu VEGF mit organischem Rest (27) und den mit OH-Gruppen aktivierten polymeren Oberflächen.

Tab. 5: Reaktionsbedingungen zur Kopplung von ASS und VEGF an chemisch oberflächenaktivierte PCL-, P(3HB)- und PUR-Filme mit den Crosslinkern DSC und DSS.

| Polymere | Kopplung DSC und DSS an Polymer 1. Schritt | Kopplung ASS an Polymer 2.Schritt | Kopplung VEGF an Polymer 2.Schritt |
|--|--|---|--|
| PCL Reaktionszeit: Reagenz/ Lösungsmittel: Temperatur: | 4 h 0,3 M DSC oder DSS/ DMSO (trocken) Raumtemperatur | 4 h 0,3 M ASS/ DMSO (trocken) Raumtemperatur | 1 h 1 µg/µl VEGF/ DMSO (trocken) Raumtemperatur |
| P(3HB) Reaktionszeit: Reagenz/ Lösungsmittel: Temperatur: | 4 h 0,3 M DSC oder DSS/ DMSO (trocken) Raumtemperatur | 4 h 0,3 M ASS/ DMSO (trocken) Raumtemperatur | 1 h 1 µg/µl VEGF/ DMSO (trocken) Raumtemperatur |
| PUR Reaktionszeit: Reagenz/ Lösungsmittel: Temperatur: | 4 h 0,3 M DSC/ Aceton (trocken) Raumtemperatur | 4 h 0,3 M ASS/ Aceton (trocken) Raumtemperatur | - - - - |

3. Nachweis der chemischen Oberflächenaktivierung

Die beschriebenen Oberflächenaktivierungen (Kap. 2.3) der untersuchten Polymere PCL, P(3HB) und PUR wurden chemisch charakterisiert. Dazu wurden neben den Untersuchungen der einzelnen Reaktionsschritte mit Hilfe der Kontaktwinkelmessung (Kap. 3.1) und der FTIR-ATR-Spektroskopie (Kap. 3.2) ebenfalls die Aminogruppenbeladung durch die Fluoreszenzmarkierung (Kap. 3.3), den Ninhydrin-Test (Kap. 3.4) und die Röntgenfotoelektronenspektroskopie (Kap. 3.5) geprüft.

3.1 Nachweis der chemischen Oberflächenveränderungen nach plasma- bzw. nasschemischer Aktivierung mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen

Durch die Modifizierung einer Festkörperoberfläche verändert sich deren Oberflächenenergie und damit ihre Benetzbarkeit mit Flüssigkeiten. Der Kontaktwinkel, als Maß für die Benetzbarkeit einer Oberfläche durch eine Flüssigkeit, kann somit zur Untersuchung von Oberflächenveränderungen von Festkörpern genutzt werden. Beim Kontakt zwischen einem Flüssigkeitstropfen und einer Festkörperoberfläche stellt sich an der Dreiphasengrenze zwischen Gas, Flüssigkeit und Festkörper (z. B. einer Polymerfolie) ein Kräftegleichgewicht ein. Dabei ist der Kontaktwinkel Θ der Winkel, den die Tangente an der Tropfenkontur im Drei-Phasen-Punkt mit der Oberfläche des Festkörpers bildet [90].

Je stärker die Bindung zwischen Flüssigkeit und Festkörper ist, desto kleiner werden die Kontaktwinkel. Der Grenzfall mit einem Kontaktwinkel von 0° bedeutet ideale Benetzbarkeit, da die Bindung an den Festkörper stärker ist als die Wechselwirkung der Flüssigkeitsmoleküle untereinander.

Die Messung der Kontaktwinkel erfolgte am Contact Angle System (OCA 20, Dataphysics Instruments GmbH, Filderstadt, Deutschland). Bei der Methode des liegenden Tropfens (Sessile Drop Methode) wurde auf eine ebene Fläche, der zu untersuchenden Proben, ein $12 \mu\text{l}$ Tropfen Reinstwasser, dosiert über ein elektronisches Spritzenmodul, gegeben. Die Verwendung von Wasser als Probeflüssigkeit ermöglicht Aussagen zu der Hydrophilie von Oberflächen, die insbesondere für die Wechselwirkung mit biologischen Systemen relevant ist [91, 92]. Die Kontur des liegenden Wassertropfens wurde mit Hilfe einer CCD-Kamera aufgenommen und der Kontaktwinkel durch die Auswerte-Software (SCA 20) nach der Young-Laplace-Methode [93] bestimmt. Für die Untersuchungen wurden je Oberfläche 24 Einzelmessungen durchgeführt. Die gemessenen Kontaktwinkel für die oberflächenaktivierten Polymere sind in der Tabelle 6 zusammengefasst.

Tab. 6: Statische Kontaktwinkelmessungen von Wasser, nach Methode des liegenden Tropfens, auf oberflächenaktivierten PCL-, P(3HB)- und PUR-Filme, n = 24.

| Reaktion/Polymer | θ [°] | | |
|--|-------------|------------|------------|
| | PCL | P(3HB) | PUR |
| Unaktivierte Folie | 70,9 ± 4,9 | 69,3 ± 6,9 | 83,1 ± 4,3 |
| Aktivierung mit Plasma | | | |
| NH ₃ -Plasma | 47,9 ± 5,7 | 53,4 ± 5,4 | - |
| CO ₂ -Plasma | 49,6 ± 3,6 | 43,9 ± 3,5 | - |
| O ₂ -Plasma | 51,2 ± 3,9 | 43,7 ± 3,0 | - |
| Aktivierung mit Silanen | | | |
| O ₂ -Plasma/APTES | 73,8 ± 4,0 | 94,3 ± 9,2 | - |
| Aktivierung mit MDI/NH₃ | | | |
| Basische Oberflächendegradation | 52,8 ± 9,3 | 58,6 ± 6,2 | - |
| Reaktion zu endständigen NCO-Gruppen | 80,1 ± 10,3 | 69,6 ± 8,0 | 99,0 ± 9,4 |
| Reaktion zur endständigen NH ₂ -Gruppen | 69,4 ± 6,8 | 64,5 ± 6,9 | 44,0 ± 6,2 |

Der Kontaktwinkel von 70,9° (PCL), 69,3° (P(3HB)) und 83,1° (PUR) für die unaktivierten Polymere zeigt, dass diese hydrophil sind.

Für die Aktivierung der Polymere PCL und P(3HB) mit MDI/NH₃ wurde zunächst eine Oberflächendegradation durchgeführt. Nach basischer Oberflächendegradation mit NaOH ist eine Erniedrigung des Kontaktwinkels, als Folge der Entstehung von OH- und COOH-Gruppen und morphologischer Oberflächenveränderungen, zu beobachten. Die Hydrophilie der Oberflächen nimmt damit zu. Für PUR wurde keine Oberflächendegradation durchgeführt. Als reaktive Gruppe für weitere Oberflächenreaktionen diente hier die Urethangruppe des PUR. Nach der Einführung einer hydrophoben phenylsubstituierten Alkylkette durch die kovalente Ankopplung von MDI ist eine Erhöhung der Kontaktwinkel für alle Polymere zu beobachten. Dabei nehmen die Kontaktwinkel im Vergleich zur vorherigen Reaktionsstufe zwischen 10° bis 30° zu. Aus der anschließenden Umwandlung der endständigen NCO-Gruppe zur NH₂-Gruppe resultiert bei PCL, P(3HB) und PUR eine Abnahme des Kontaktwinkels um 10,7°, 5,8° bzw. 55,0°.

Nach Aktivierung mit NH₃-, CO₂- und O₂-Plasma ist für die Polyester eine deutliche Erniedrigung des Kontaktwinkels zu verzeichnen, was für eine Zunahme des hydrophilen Charakters der Oberfläche spricht. Dabei ist für PCL und P(3HB), je nach Art des Plasmas, eine Abnahme des Kontaktwinkels zwischen 16° und 26° zu beobachten.

Die Zunahme des Kontaktwinkels nach Anbindung des Aminosilans APTES an die O₂-Plasma aktivierten Polymeroberflächen von PCL und P(3HB) resultiert aus der Ankopplung des hydrophoben Silans. Dabei nimmt der Kontaktwinkel um 22,4° bei PCL und 50,6° bei P(3HB) zu.

Zusammenfassend zeigen sich bei Betrachtung der verschiedenen Methoden zur Generierung reaktiver NH₂-Gruppen im Vergleich zu den unaktivierten Oberflächen nur für die NH₃-

Plasmaaktivierungen eine deutliche Abnahme des Kontaktwinkels und damit eine Zunahme der Hydrophilie der Polymeroberflächen. Für die weiteren Aktivierungen zur Generierung von terminalen oberflächennahen NH_2 -Gruppen ergeben sich im Vergleich zu den unaktivierten Polymeren keine Änderungen des Kontaktwinkels bzw. der Hydrophilie, mit Ausnahme der Aktivierung mit O_2 -Plasma/APTES bei P(3HB), wo der Kontaktwinkel um $25,0^\circ$ zunimmt und der Aktivierung mit MDI/ NH_3 bei PUR, wo der Kontaktwinkel um $39,1^\circ$ reduziert ist.

3.2 Nachweis der chemischen Oberflächenveränderungen mit Hilfe der FTIR-ATR-Spektroskopie

Die Fourier-Transformations-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie, im mittleren IR-Bereich, bei der elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von $2,5 - 25 \mu\text{m}$ bzw. Wellenzahlen von $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ verwendet wird, stellt eine geeignete Methode zum qualitativen Nachweis vieler funktioneller Gruppen organischer Moleküle dar. Die Bindungen der funktionellen Gruppen absorbieren Infrarotstrahlung charakteristischer Wellenlänge und werden dadurch zum Schwingen angeregt. Die Intensität der Absorption ist dabei von der Anzahl der absorbierenden Bindungen abhängig. Anders als herkömmliche Reflexions- oder Transmissions-techniken ermöglicht die ATR-Technik (*attenuated total reflection* = Abgeschwächte Totalreflexion) die direkte zerstörungsfreie Analyse von Polymeroberflächen. Bei der ATR-Technik wird ein Kristall mit hohem Brechungsindex (z. B. Diamant oder Germanium) als Lichtwellenleiter genutzt. Die IR-Strahlung passiert den Kristall unter ein- oder mehrmaliger Totalreflexion, wobei sich hinter der reflektierenden Grenzfläche evaneszente Wellen ausbilden. Wird nun eine Probe direkt an die Oberfläche des Lichtwellenleiters gepresst, kann diese mit der evaneszenten Welle wechselwirken und bewirkt eine Absorption der Strahlung bei den für die angeregten Bindungen charakteristischen Wellenlängen.

Für die Untersuchungen wurde ein FTIR-Spektrometer (Equinox 55, Fa. Bruker Optik GmbH, Leipzig, Deutschland) mit ATR-Einheit verwendet. Dabei wurde ein Germanium-Kristall als Lichtwellenleiter verwendet und die verschiedenen Polymeroberflächen mit einem Drehmoment von 80 cNm an den Kristall angepresst. Die Messungen erfolgten im Bereich von 4000 cm^{-1} bis 700 cm^{-1} mit je 20 Scans. Die detektierten Banden der unaktivierten und der einzelnen Reaktionsstufen der mit MDI/ NH_3 modifizierten Polymere, die mit Hilfe von Literaturdaten [94], chemischen Bindungen und Struktureinheiten zugeordnet worden sind, sind in Tabelle 7, während die Spektren im Anhang (Abb. 39 - Abb. 41) dargestellt sind.

Tab. 7: Zuordnung der Peaks der FTIR-Spektren des unaktivierten und der Reaktionsstufen von MDI/NH₃-aktivierten PCL-, P(3HB)- und PUR-Filmen (Tab. 3) zu den Schwingungsdaten wichtiger Molekülgruppen.

| Peak-nummer | Wellenzahl ν [cm ⁻¹] | Absorptionsbereich ν [cm ⁻¹] [94] | Zuordnung |
|------------------------------|---|---|--|
| PCL | | | |
| 1 | 3433 | 3650 - 3590 (v), 1150 - 1040 (s) | O-H |
| 2 | 2943, 2893, 2864 | 2960 - 2850 (s), 1470 - 1430 (m), 720 (w) | C-H (CH ₂) |
| 3 | 1720 | 1725 - 1700 | C=O |
| PCL-NCO | | | |
| 4 | 3305 | 3500 - 3100 | NH (Urethan) |
| 5 | 2284 | 2270 - 2100 | N=C=O |
| 6 | 1767 | 1740 - 1690 | C=O (Urethan) |
| PCL-NH₂ | | | |
| 7 | 3434 | 3509 - 3460 (as), 3416 - 3382 (s), 700 - 600 (w) | Ar-NH ₂ |
| P(3HB) | | | |
| 1 | 3435 | 3650 - 3590 (v), 1150 - 1040 (s) | O-H |
| 2 | 3007, 2997, 2975, 2933, 2871 | 2960 - 2850 (s), 1470 - 1430 (m), 720 (w) 2960 - 2850 (s), 1470 - 1430 (m), 1390 - 1370 (m) 2890 - 2880 (w), 1400 | C-H (CH ₂) CH-CH ₃ CH-CH ₃ |
| 3 | 1719 | 1725 - 1700 | C=O |
| P(3HB)-NCO | | | |
| 4 | 3328 | 3500 - 3100 | NH (Urethan) |
| 5 | 2300 | 2270 - 2100 | N=C=O |
| 6 | 1770 | 1740 - 1690 | C=O (Urethan) |
| P(3HB)-NH₂ | | | |
| 7 | 3376 | 3509 - 3460 (as), 3416 - 3382 (s), 700 - 600 (w) | Ar-NH ₂ |
| PUR | | | |
| 1 | 3318 | 3500 - 3100 | NH (Urethan) |
| 2 | 1728, 1700 | 1740 - 1690 | C=O (Urethan) |
| PUR-NCO | | | |
| 3 | 3032 | 3100 - 3000 | CH (Aryl) |
| 4 | 2266 | 2270 - 2100 | N=C=O |
| 5 | 1636 | 1660 | HN-C=O |
| PUR-NH₂ | | | |
| 6 | 3485, 3384 | 3509 - 3460 (as), 3416 - 3382 (s), 700 - 600 (w) | Ar-NH ₂ |

Die gemessenen Spektren der Polymeroberflächen nach durchgeführten Plasmaaktivierungen und der Anbindung von APTES nach vorheriger O₂-Plasma-Aktivierung unterscheiden sich nicht von den Spektren der unaktivierten Polymere. Damit ist die genutzte ATR-Technik für den Nachweis dieser Oberflächenaktivierungen nicht sensitiv genug. Grund ist wahrscheinlich die geringe Tiefe in der die funktionellen Gruppen durch diese Techniken erzeugt

werden, die auch kaum mit der evaneszenten Welle interagieren, während der restliche unmodifizierte Polymerbulk die Strahlung absorbiert [95].

Bei dem Spektrum der unaktivierten PCL-Folie (Abb. 39, Tab. 7) sind die für die konstitutionelle Einheit typischen Banden bei 2943 cm^{-1} , 2893 cm^{-1} und 2864 cm^{-1} (2) erkennbar, die den C-H-Bindungen aus den CH_2 -Gruppen zu zuordnen sind. Gleiches gilt für die Bande bei 1720 cm^{-1} (3), die zur C=O-Bindung gehört. Die Bande bei 3433 cm^{-1} (1) deutet auf die endständige O-H-Bindung hin. Nach Reaktion mit MDI (PCL-NCO) weisen die Banden bei 3305 cm^{-1} (4) und 1767 cm^{-1} (6) auf die N-H- (4) und die C=O-Bindungen (6) der Urethangruppe hin. Die Bande bei 2284 cm^{-1} (5) zeigt die terminale N=C=O-Gruppe an, die nach Konvertierung zur NH_2 -Gruppe (PCL- NH_2) verschwindet. Zusätzlich ist bei 3334 cm^{-1} (7) eine neue Bande zu erkennen, die der neu entstandenen Aryl- NH_2 -Bindung entspricht.

Das Spektrum der unaktivierten P(3HB)-Folie (Abb. 40, Tab. 7) zeigt die für die Strukturelemente des Polymers typischen Banden bei 3007 cm^{-1} , 2997 cm^{-1} , 2975 cm^{-1} , 2933 cm^{-1} und 2871 cm^{-1} (2), die den C-H-Bindungen aus den CH_2 -, CH_3 - sowie den CH- CH_3 -Gruppen zugeordnet werden können. Gleiches gilt für die C=O-Bindung deren Bande bei 1719 cm^{-1} (3) zu detektieren ist. Durch die Bande bei 3435 cm^{-1} (1) sind die endständigen OH-Gruppen nachweisbar. Nach Reaktion mit MDI (P(3HB)-NCO) sind die Banden bei 3328 cm^{-1} (4) und 1770 cm^{-1} (6) den N-H- (4) und den C=O-Bindungen (6) der Urethanbindung zu zuordnen. Die terminale N=C=O-Gruppe des gebundenen MDI bewirkt eine Bande bei 2300 cm^{-1} (5), die nach Konvertierung der N=C=O- zur NH_2 -Gruppe (P(3HB)- NH_2) verschwindet, während gleichzeitig eine neue Bande bei 3376 cm^{-1} (7) zu detektieren ist, die der Aryl- NH_2 -Bindung entspricht.

Das Spektrum der unaktivierten PUR-Folie (Abb. 41, Tab. 7) zeigt eine deutliche Bande bei 3318 cm^{-1} (1) für das sekundäre Amin der Urethangruppe und weitere bei 1728 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} (2) für die C=O-Bindung der Urethangruppe. Nach Anbindung von MDI (PUR-NCO) ist eine Bande bei 1636 cm^{-1} (5) sichtbar, die der C=O-Schwingung des gebildeten *N*-Carbamoylcarbamats zugeordnet werden kann. Weiterhin sind Banden bei 3032 cm^{-1} (3) und 2266 cm^{-1} (4) zu beobachten, die den C-H- (3) bzw. den N=C=O- (4) Schwingungen des gebundenen MDI zugeordnet werden können. Das Fehlen dieser NCO-Bande bei 2266 cm^{-1} und das Auftreten neuer schwacher Banden bei 3485 cm^{-1} und 3384 cm^{-1} (6), die den Schwingungen des Aryl- NH_2 entsprechen, zeigen die Umwandlung der terminalen NCO- zu NH_2 -Gruppen im anschließenden Modifikationsschritt (PUR- NH_2).

3.3 Qualitative Untersuchung der Amingruppenbeladung durch Fluoreszenzfärbung mit 4-Chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol

Durch Anbindung von Fluoreszenzfarbstoffen ist ein Nachweis funktioneller Gruppen an aktivierten Oberflächen möglich [96]. Der qualitative Nachweis von NH_2 -Gruppen auf funktionali-

sierten Polymeroberflächen erfolgte durch Fluoreszenzfärbung mit 4-Chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl). NBD-Cl reagiert spezifisch mit primären (Abb. 21) und sekundären Aminen sowie mit Thiolgruppen und wird häufig zur Bestimmung von Aminosäuren [97] und für dünnschichtchromatografische Analysen von Wirkstoffen [98] oder Insektiziden [99] eingesetzt.

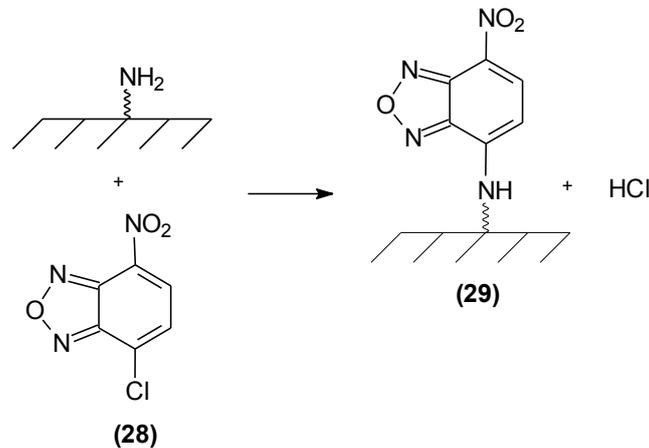


Abb. 21: Schema der Reaktion von NBD-Cl (**28**) mit terminalen NH_2 -Gruppen polymerer Oberflächen zu (**29**).

Untersucht wurden die verschiedenen Aminofunktionalisierungen der Polymere PCL, P(3HB) und PUR. Jeweils ein Probekörper ($n = 5$, $\varnothing = 5$ mm), sowohl der unaktivierten als auch der aktivierten Filme, wurden mit einer Mischung aus Phosphatpuffer (pH 8) und 0,1%iger (m) ethanolischer NBD-Cl-Lösung im Verhältnis 2:1 für fünf Minuten bei Raumtemperatur versetzt. Anschließend wurden die Proben mit Ethanol gewaschen und für 1 Stunde im Vakuumtrockenschrank (Modell UM200, Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland) bei 30°C und 40 mbar getrocknet. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte im Photometer (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) mit 10 Wiederholungsmessungen (Wellenlängen: Anregung: 485 nm, Emission: 520 nm).

Zum Vergleich der Aminogruppenbeladung für ein Polymer nach den verschiedenen Aktivierungsprozessen sind die Ergebnisse in Prozent umgerechnet, wobei die Aktivierung mit der höchsten Aminogruppenbeladung als 100 % gesetzt wurde (Tab. 8). Aufgrund der sehr unterschiedlichen Intensität der Fluoreszenzsignale (Messungen bei unterschiedlicher Empfindlichkeit des Sensors notwendig) und der unterschiedlichen Dicke der Polymere ist ein Vergleich zwischen den Polymeren nicht möglich.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen für die chemische Aktivierung mit NH_3 -Plasma den geringsten Anteil der Aminogruppenbeladung bei allen Polymeren. Die Silanisierung mit O_2 -Plasma/APTES bewirkt für die Polyester PCL und P(3HB) eine höhere Aminogruppenbeladung als die Aktivierung mit MDI/ NH_3 oder NH_3 -Plasma. Damit scheint für die Polyester die Aktivierung mit O_2 -Plasma/APTES am effektivsten zu sein.

Tab. 8: Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen der mit NBD-Cl gelabelten aminofunktionalisierten Polymeroberflächen von PCL und P(3HB) in relativen Prozent, n = 5, wobei die jeweilige effektivste Aktivierung eines Polymers als 100 % festgelegt wurde (für PUR nur MDI/NH₃ Aktivierung charakterisiert).

| Aktivierung | Relative Beladung von NH ₂ -Gruppen [%] | |
|------------------------------|--|-----|
| | P(3HB) | PCL |
| NH ₃ -Plasma | 7 | 6 |
| O ₂ -Plasma/APTES | 100 | 100 |
| MDI/NH ₃ | 12 | 45 |

3.4 Quantitative Bestimmung der Aminogruppenbeladung mit Hilfe des Ninhydrin-Tests

Ein quantitativer Nachweis terminaler NH₂-Gruppen auf den Oberflächen erfolgte fotometrisch. Dazu wurde Ninhydrin verwendet, das mit NH₂-Gruppen zum fotometrisch messbaren Ruhemanns Purpur reagiert, welches bei 570 nm ein Absorptionsmaximum aufweist (Abb. 22) [100].

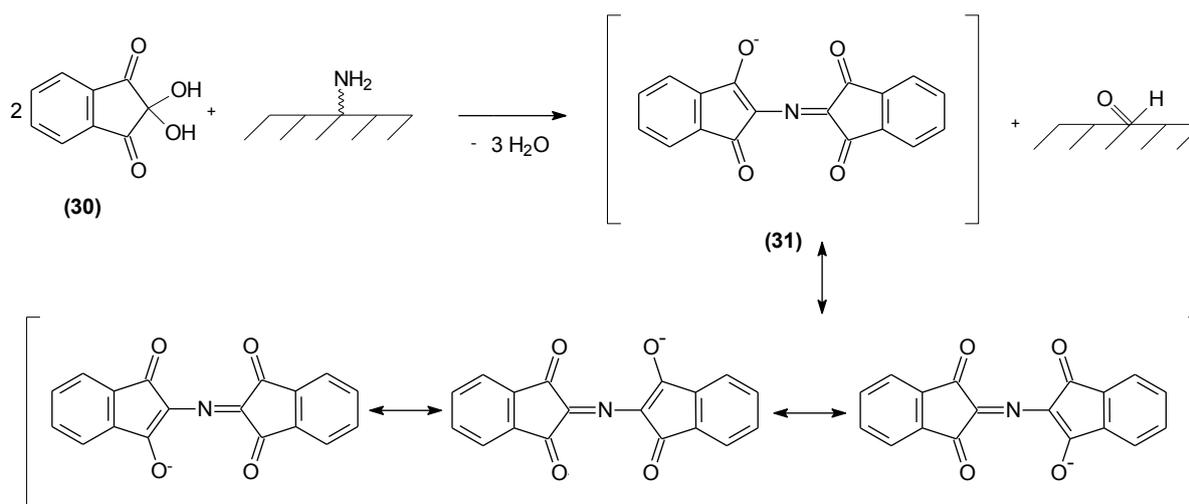


Abb. 22: Schema der Reaktion von Ninhydrin (30) mit terminalen NH₂-Gruppen polymerer Oberflächen zu dem fotometrisch messbaren Ruhemanns Purpur (31).

Zur Messung wurden Polymerfilme mit 6 mm Durchmesser verwendet. Als Kontrollen wurde die gleiche Fläche an Probekörpern ($A = 679 \text{ mm}^2$) der Vorstufen (unaktivierte Folie bei NH₃-Plasma, Folie nach O₂-Plasma bei O₂-Plasma/APTES und Filme mit terminalen NCO-Gruppen bei Aktivierung mit MDI/NH₃, Kap. 2.3.1) verwendet. Die Ninhydrinstammlösung, 0,15 mol/l Ninhydrin, wurde zunächst mit 0,01 mol/l Hydrindantin in DMSO und anschließend mit 5 mol/l Lithiumacetatpuffer (pH 5,2 mit Eisessig eingestellt) im Verhältnis 3:1 versetzt. Ein definiertes Volumen der fertigen Ninhydrinlösung wurde mit den Proben für 15 Minuten bei 100 °C umgesetzt. Nach Abkühlen wurde mit einer Ethanolösung (1:1 mit Wasser) 1:3,5

verdünnt und die Absorption bei 570 nm im UV/VIS-Spektrofotometer (Ultrospec 2000, Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) gemessen [101]. Aus den gemessenen Absorptionswerten wurde anhand einer mit definierten Konzentrationen der α -Aminosäure Glycin erstellten Kalibriergerade die Aminogruppenbeladung auf den aktivierten Oberflächen bestimmt. Es wurden jeweils die Ergebnisse aus drei Einzelmessungen gemittelt und für die untersuchten Polymere in Abbildung 23 dargestellt.

Bei der Untersuchung der mit NH_3 -Plasma oder mit O_2 -Plasma/APTES aktivierten Proben konnten fotometrisch keine NH_2 -Gruppen nachgewiesen werden.

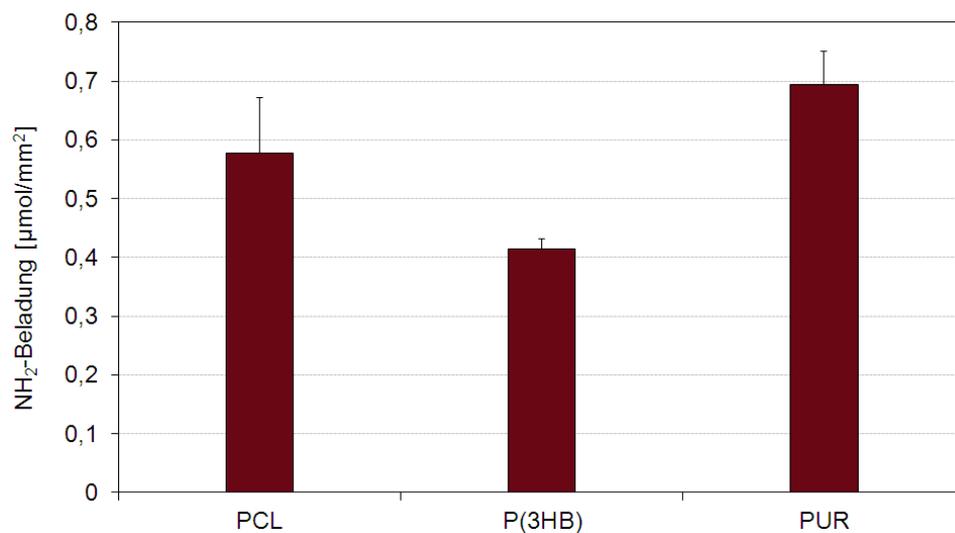


Abb. 23: Aminogruppenbeladung von PCL- und P(3HB)-Filmen ($n = 3$) nach Oberflächendegradation mit NaOH , Umsetzung mit MDI und anschließender Reaktion mit NH_3 im Vergleich mit PUR nach Umsetzung mit MDI und anschließender Reaktion mit NH_3 (Kap. 2.3.1).

Beim Vergleich der Aminogruppenbeladungen nach Aktivierung mit MDI/ NH_3 zeigt PUR eine höhere Beladung mit NH_2 -Gruppen als die Polyester. Für PUR ist im Vergleich zu P(3HB) die Beladung fast doppelt so hoch und im Vergleich zu PCL um etwa 20 % höher. Bei Betrachtung der Polyester ist für PCL eine um etwa 30 % höhere Beladung mit NH_2 -Gruppen zu beobachten als für P(3HB).

3.5 Untersuchung der Aminogruppenbeladung mit Hilfe der Röntgenfotoelektronenspektroskopie

Die Röntgenfotoelektronenspektroskopie (*X-ray photoelectron spectroscopy*, XPS, auch *Electron spectroscopy for chemical analysis*, ESCA) ist eine Methode zur zerstörungsfreien Analyse der chemischen Zusammensetzung von Materialien. Neben qualitativen Aussagen zur Elementzusammensetzung können auch Informationen zu den Bindungszuständen der Atome und damit zur chemischen Struktur gewonnen werden. Bei dem auf dem Fotoeffekt basierenden Messprinzip werden durch Einstrahlung energiereicher Röntgenstrahlung auf

eine Oberfläche kernnahe Elektronen aus den Atomen herausgeschlagen, die als Fotoelektronen aus der Materialoberfläche austreten und detektiert werden können. Die kinetische Energie der Fotoelektronen ist dabei elementspezifisch und erlaubt eine Identifizierung der beteiligten Elemente. Da die emittierten Elektronen sich nur wenige Nanometer in fester Materie bewegen, bevor sie absorbiert werden, lassen sich durch Variierung des Winkels zwischen Probe und Detektor, bei konstanter mittlerer Weglänge der Elektronen, Informationen aus unterschiedlichen Tiefen erhalten, wodurch sich XPS besonders zur Analyse von Oberflächen eignet.

Die XPS-Untersuchungen (Ultra Axis TM-Spektrometer, Kratos Analytical, Manchester, Großbritannien) wurden bei einem Kooperationspartner durchgeführt und konnten deshalb exemplarisch nur an PCL vollzogen werden. Als Anodenmaterial wurde Aluminium genutzt. Es wurde ein Winkel von 70° zwischen Probe und Detektor eingestellt, was einer Messtiefe von ungefähr 3,4 nm entspricht. Da jedoch hinsichtlich der Art der chemischen Verknüpfung der Atome miteinander in funktionellen Gruppen, wie hier in den zu untersuchenden stickstoffhaltigen Gruppen (z.B. C-NH₂ versus C-NH-C), nicht unterschieden werden kann, werden Derivatisierungsreagenzien genutzt, denen jeweils nur die zu untersuchende funktionelle Gruppe zugänglich ist. Um den Anteil von NH₂-Gruppen, die für weitere Immobilisierungsreaktionen genutzt werden können, anhand des Gesamtstickstoffgehalts der Polymeroberfläche zu bestimmen, wurden die NH₂-Gruppen durch Umsetzung mit Pentafluorbenzaldehyd (PFBA, Abb. 24) deshalb selektiv markiert. Da PFBA das Element Fluor enthält, das sonst nicht in der Polymeroberfläche enthalten ist, und Fluor eine separat auswertbare Fotolinie im Spektrum liefert, lässt sich so der Anteil an NH₂-Gruppen bestimmen [102]. Darüber hinaus wird eine erhöhte Sensitivität erreicht, da pro NH₂-Gruppe ein PFBA-Molekül mit je fünf Fluoratomen gebunden wird. Dazu wurden die zu untersuchenden Probekörper ($\varnothing = 6$ mm) mit einer 1 mol/l PFBA-Lösung in n-Heptan für 2 Stunden bei 45 °C im Wasserbad derivatisiert, anschließend dreimal 5 Minuten mit 4 ml pro Probekörper n-Heptan gewaschen und dann im Vakuumtrockenschrank (Modell UM200, Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland) bei 30 °C und 40 mbar für 24 Stunden getrocknet, um restliches adsorbiertes PFBA zu entfernen. Die Ergebnisse der Messungen sind in der Tabelle 9 zusammengefasst. Die Atomprozentage der NH₂-Gruppen wurden aus den Atomprozentagen der Fluoratome berechnet und beziehen sich auf die Gesamtatommenge. Da die NH₂-Gruppen zur Unterscheidung von den restlichen N-Atomen (bei allen Aktivierungsprozessen zur Generierung von NH₂-Gruppen finden Nebenreaktionen statt, Kap. 7) derivatisiert worden sind, stellen die ermittelten Atomprozentage der NH₂-Gruppen einen Teil des detektierten Stickstoffs dar.

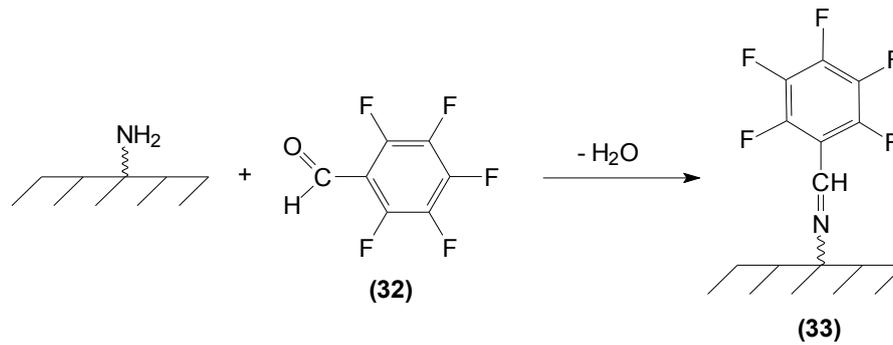


Abb. 24: Schema der Reaktion von PFBA (**32**) mit terminalen NH₂-Gruppen polymerer Oberflächen zu (**33**).

Während sich bei der unaktivierten PCL-Oberfläche kein Stickstoff nachweisen lässt, sind nach Durchführung der Aktivierung mit NH₃-Plasma, mit O₂-Plasma/APTES und MDI/NH₃ (Kap. 2.3) zur Schaffung terminaler NH₂-Gruppen deutliche Signale für Stickstoff zu finden. Die mit MDI/NH₃ aktivierte Oberfläche zeigt dabei den höchsten Stickstoffanteil. Danach folgt die mit NH₃-Plasma aktivierte und abschließend die mit O₂-Plasma/APTES umgesetzte Oberfläche. Die Bestimmung des NH₂-Gruppenanteils mit Hilfe von PFBA ergab, dass die Aktivierung mit O₂-Plasma/APTES die effektivste Methode zur Generierung von NH₂-Gruppen auf PCL-Oberflächen darstellt. Mit MDI/NH₃ wurde eine geringere und mit NH₃-Plasma wurde die geringste Beladung mit NH₂-Gruppen erreicht.

Tab. 9: Elementzusammensetzung (in Atom%) von PCL-Oberflächen bis zu einer Messtiefe von 3,4 nm im unaktivierten Zustand und nach Aktivierung mit NH₃-Plasma, MDI/NH₃ bzw. O₂-Plasma/APTES.

| Aktivierung | ∑ C1s [Atom%] | ∑ O1s [Atom%] | ∑ N1s [Atom%] | ∑ -NH ₂ [Atom%] |
|------------------------------|---------------|---------------|---------------|----------------------------|
| Unaktiviert | 80,91 | 13,54 | 0 | 0 |
| NH ₃ -Plasma | 82,14 | 10,27 | 2,24 | 0,25 |
| O ₂ -Plasma/APTES | 76,87 | 20,29 | 1,17 | 0,31 |
| MDI/NH ₃ | 76,24 | 15,16 | 5,66 | 0,28 |

4. Nachweis der chemischen Oberflächenmodifizierung unter Immobilisierung von Acetylsalicylsäure

Dieses Kapitel beinhaltet die im Rahmen der Arbeit erzielten Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (Kap. 4.1), der XPS-Spektroskopie (Kap. 4.2) und der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) (Kap. 4.3) zum Nachweis der in Kapitel 2.4 beschriebenen Reaktionen zur Immobilisierung von ASS auf PCL-, P(3HB)- und PUR-Oberflächen. Eine Übersicht der untersuchten Proben gibt die Tabelle 10.

Tab. 10: Übersicht der untersuchten Proben, deren Eigenschaften und Reaktionsbedingungen während der Ankopplung von ASS. Details zu den Aktivierungen in Kapitel 2.3 bzw. zur Ankopplung in Kapitel 2.4.

| Aktivierung/Modifizierung | Anzahl Reaktions-schritte | Reaktions-medium | Art der Bindung | Hydrolytisch spaltbar |
|--------------------------------------|---------------------------|------------------|-----------------|-----------------------|
| Unaktiviert/DSC/ASS | 2 | Aceton/DMSO | Ester | Ja |
| NH ₃ -Plasma/DSC/ASS | 2 | Aceton/DMSO | Ester | Ja |
| CO ₂ -Plasma/DSC/ASS | 2 | Aceton/DMSO | Ester | Ja |
| O ₂ -Plasma/DSC/ASS | 2 | Aceton/DMSO | Ester | Ja |
| O ₂ -Plasma/APTES/DSC/ASS | 2 | Aceton/DMSO | Ester | Ja |
| MDI/NH ₃ /DSC/ASS | 2 | Aceton/DMSO | Ester | Ja |

4.1 Nachweis der chemischen Oberflächenveränderungen nach Immobilisierung von Acetylsalicylsäure mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen

Die bereits beschriebene Methode der Kontaktwinkelmessung (Kap. 3.1) wurde auch zum Nachweis der Anbindung von ASS über hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen genutzt. Dies beinhaltet die Kopplungsreaktionen mit DSC an NH₂-funktionalisierte und mit CO₂- und O₂-Plasma aktivierte Polymeroberflächen (Kap. 2.4).

Die mit ASS modifizierten Oberflächen wurden nach den im Kapitel 3.1 beschriebenen Bedingungen untersucht. Die Polymerproben, mit über kovalente Carbonatester- und Carbamatesterbindungen (Kap. 2.4.2) immobilisierter ASS, wurden mit trockenem Methanol zur Entfernung von unspezifisch adsorptiv gebundener ASS gewaschen. Das Waschen wurde so lange fortgesetzt bis bei Messungen in der HPLC (Kap. 4.4) keine ASS mehr in der Waschlösung detektiert werden konnte. Für die Untersuchungen wurden je Polymer und Aktivierungsverfahren 16 Einzelmessungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 zusammengefasst.

Tab. 11: Statische Kontaktwinkelmessungen von Wasser, nach Methode des liegenden Tropfens, auf Polymerfilmen nach Oberflächenaktivierung und anschließender Immobilisierung von ASS (n = 16).

| Aktivierung/Modifizierung | θ [°] | | |
|--------------------------------------|------------|------------|------------|
| | PCL | P(3HB) | PUR |
| Unaktiviert | 70,9 ± 4,9 | 69,3 ± 6,9 | 83,1 ± 4,3 |
| Unaktiviert/DSC/ASS | 72,5 ± 5,8 | 71,3 ± 5,3 | - |
| NH₃-Plasma | 47,9 ± 5,7 | 53,4 ± 5,4 | - |
| NH ₃ -Plasma/DSC/ASS | 62,2 ± 7,1 | 69,6 ± 8,6 | - |
| CO₂-Plasma | 49,6 ± 3,6 | 43,9 ± 3,5 | - |
| CO ₂ -Plasma/DSC/ASS | 56,6 ± 4,2 | 69,9 ± 4,5 | - |
| O₂-Plasma | 51,2 ± 3,9 | 43,7 ± 3,0 | - |
| O ₂ -Plasma/DSC/ASS | 75,1 ± 8,4 | 72,0 ± 8,2 | - |
| MDI/NH₃ | 69,4 ± 6,8 | 70,3 ± 6,0 | 44,0 ± 6,2 |
| MDI/NH ₃ /DSC/ASS | 68,4 ± 5,5 | 68,3 ± 5,7 | 61,6 ± 7,4 |
| O₂-Plasma/APTES | 73,8 ± 4,0 | 94,3 ± 9,2 | - |
| O ₂ -Plasma/APTES/DSC/ASS | 56,2 ± 7,0 | 61,4 ± 5,3 | - |

Bei den plasmachemisch aktivierten Oberflächen zeigt sich nach kovalenter Bindung von ASS eine Zunahme des Kontaktwinkels, der hydrophobe Charakter der Oberflächen nimmt zu. Bei den mit O₂-Plasma/APTES aktivierten Oberflächen kommt es nach Ankopplung von ASS durch DSC zu einer Abnahme des Kontaktwinkels. Der hydrophile Charakter der Oberflächen nimmt hier durch die Anbindung von ASS zu. Bei Kopplung über DSC an die mit MDI/NH₃ aktivierten Oberflächen ergeben sich für PCL keine deutliche Änderung, für P(3HB) eine Zunahme und für PUR eine Abnahme des Kontaktwinkels.

4.2 Untersuchungen mit Hilfe der Röntgenfotoelektronenspektroskopie

Zum weiteren Nachweis der immobilisierten ASS wurden exemplarisch XPS-Untersuchungen an den mit NH₃-Plasma aktivierten PCL-Oberflächen durchgeführt. Da sowohl für ASS und PCL die Elemente C und O im gleichen Bindungszustand enthalten sind, ist eine Zuordnung der Elementbanden zu ASS bzw. PCL im Energiespektrum nicht möglich. Eine gezielte Derivatisierung der funktionellen COOH-Gruppen ohne Nebenreaktion mit den vorhandenen OH-Gruppen konnte nicht ohne größere Aufwände etabliert werden, weshalb die C/O-Elementverteilung nach und vor Immobilisierung von ASS zum Nachweis dieser betrachtet werden.

Der Versuchsaufbau und die Durchführung der XPS-Messungen wurden analog zu den XPS-Untersuchungen der generierten NH₂-Gruppen (Kap. 3.5) vollzogen. Tabelle 12 fasst die ermittelten Elementzusammensetzungen (in Atom%) der PCL-Oberflächen bis zu einer

Messtiefe von 3,4 nm im unaktivierten Zustand und nach NH₃-Plasma-Aktivierung sowie der anschließenden Immobilisierung von ASS zusammen.

Tab. 12: Elementzusammensetzung (in Atom%) von PCL-Oberflächen bis zu einer Messtiefe von 3,4 nm im unaktivierten und mit NH₃-Plasma aktivierten Zustand nach Immobilisierung von ASS durch Crosslinking mit DSC.

| Aktivierung/Modifizierung | ∑ C1s [Atom%] | ∑ O1s [Atom%] | ∑ N1s [Atom%] | Verhältniss C/O |
|---------------------------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|
| Unaktiviert | 80,9 | 13,5 | 0 | 6,0 |
| NH ₃ -Plasma | 82,1 | 10,3 | 2,2 | 8,0 |
| NH ₃ -Plasma/DSC/ASS | 73,8 | 22,6 | 1,2 | 3,3 |
| ASS (theoretisch) | 69,2 | 30,8 | 0 | 2,2 |
| PCL (theoretisch) | 75,0 | 25,0 | 0 | 3 |

Bei der Immobilisierung von ASS an die PCL-Oberfläche kommt es zu einer Verschiebung des C/O-Elementverhältnisses. Für die monomere Grundeinheit des PCL ist das C/O-Verhältnis etwa 3, während für ASS das Verhältnis bei 2,2 liegt. In Folge einer ASS-Immobilisierung sollte daher oberflächennah eine Verringerung des C/O-Verhältnisses zu beobachten sein. Dies konnte für die mit NH₃-Plasma aktivierte, über DSC gebundene ASS PCL-Oberfläche beobachtet werden. Die Abweichungen zwischen dem theoretischen und dem gemessenen C/O-Verhältnis beruhen auf der Betrachtung der monomeren Einheit des PCL ohne deren Endgruppen.

4.3 Charakterisierung des *in vitro* Freisetzungsverhaltens der immobilisierten Acetylsalicylsäure mit Hilfe chromatografischer Verfahren

Chromatografische Verfahren dienen zum Auftrennen von Stoffgemischen in ihre Einzelkomponenten. Dabei strömt ein in einem Lösungsmittel oder Gas (mobile Phase) gelöstes Stoffgemisch an einer stationären Phase vorbei. Durch ihre unterschiedliche Affinität zur stationären bzw. mobilen Phase, können die Einzelkomponenten eines Gemisches getrennt werden. Komponenten, welche schwach an die stationäre Phase adsorbieren, werden durch die mobile Phase stärker mitgerissen und verlassen die stationäre Phase früher. Umgekehrt werden Komponenten, welche stark an die stationäre Phase adsorbieren, schwächer mitgerissen und verlassen die stationäre Phase später. Bei der Hochleistung-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) wird hoher Druck verwendet um die mobile Phase durch eine geschlossene Säule zu bewegen, denn bei Verwendung stationärer Phasen mit kleinen Teilchen wird dem Lösemittelstrom ein hoher Widerstand entgegengesetzt [103].

Für die über hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen immobilisierte ASS wurde die Kopplung mit Hilfe des Crosslinker DSC für die unaktivierten, mit CO₂- und mit O₂-Plasma aktivierten, sowie den aminofunktionalisierten Polymeren (Kap. 2.3) untersucht. Die hydroly-

tische Spaltung der gebildeten Ester- und Carbamatesterbindungen (Kap. 2.4.2) wurde in PBS (Dulbecco`s PBS ohne Ca und Mg, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) unter Schütteln (70 rpm) und lichtgeschützten Bedingungen bei 37 °C untersucht. Da verschiedene Untersuchungen zur Abbaubarkeit von Carbamaten eine Abhängigkeit der Ester-spaltung vom pH-Wert, dem Salzgehalt, der Temperatur und Enzymen zeigen [104–107], wurden diese für die gewählten Freisetzungsbedingungen berücksichtigt [106–108].

Zum quantitativen Nachweis der eluierten ASS wurden folgende HPLC-Bedingungen gewählt: Säule Eurospher 100, C18, 5 µm, 250x4 mm ID; Laufmittel Acetonitril/Wasser/85%ige ortho-Phosphorsäure 40/60/0,2 w/w/w; isokratisch; Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min; Säulentemperatur: 25 °C [109].

Die Probekörper (21 x 21 mm, Dicke etwa 100 µm) wurden vor Freisetzungsbeginn in getrocknetem Methanol gewaschen bis keine ASS im Eluat mittels HPLC zu detektieren war. Die Hydrolyse der freigesetzten ASS wurde berücksichtigt, indem im Elutionsmedium sowohl ASS als auch Salicylsäure chromatografisch erfasst und die Gehalte summiert wurden. Als Elutionsvolumen wurden 4 ml gewählt, welches nach jedem Entnahmezeitpunkt gewechselt wurde, um eine verlangsamte Wirkstofffreisetzung durch eine Sättigung des Wirkstoffes im Medium zu verhindern. Zur Kontrolle der vollständigen Freisetzung der kovalent gebundenen ASS wurden die Proben so lange in PBS freigesetzt bis keine ASS mehr im Eluat zu detektieren war.

Die *in vitro* Freisetzung der über hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen immobilisierten ASS ist in der Abbildung 25 dargestellt. Durch die vorherige Entfernung physisorptiv gebundener ASS durch Waschen in trockenem Methanol ist davon auszugehen, dass nur durch Hydrolyse freigesetzte ASS bzw. Salicylsäure in der HPLC vermessen wurde. Auf die Untersuchung der unaktivierten Polymere als Referenz wurde deshalb verzichtet, da in diesem Falle lediglich durch Physisorption gebundene ASS vorhanden ist, die durch den Waschvorgang in Methanol entfernt wird.

Für PCL konnten durch die Aktivierung mit MDI/NH₃, O₂- und NH₃-Plasma und für P(3HB) durch die Aktivierung mit CO₂-Plasma die höchsten ASS-Beladungen und somit ASS-Freisetzungen erzielt werden. Im Vergleich der Polymere setzt PUR die höchste Masse an ASS frei, PCL weniger und P(3HB) die geringste.

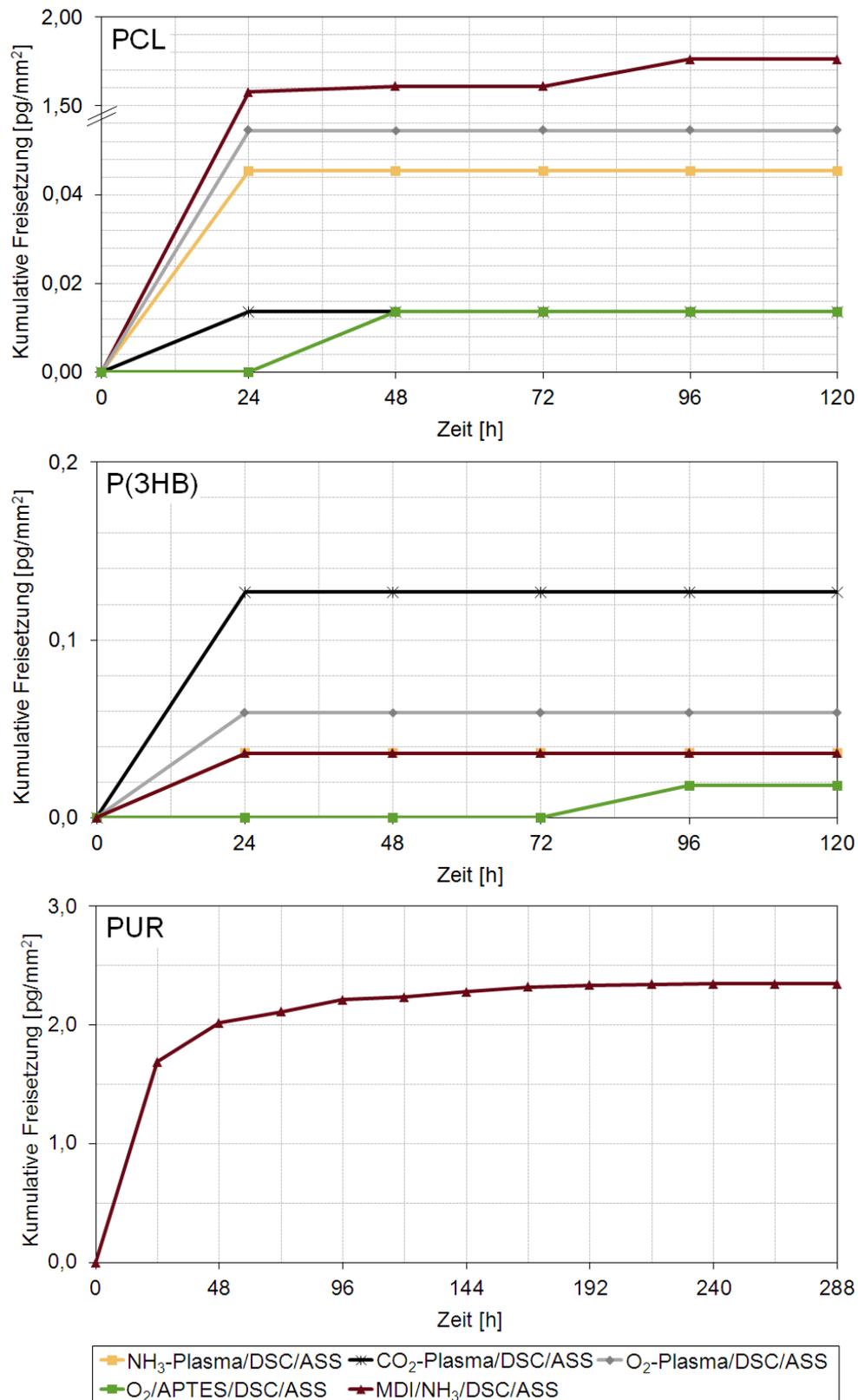


Abb. 25: *In vitro* Freisetzung von an PCL-, P(3HB)- und PUR-Proben mit DSC über hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen (Verbindungen **22** – **23**, Kap. 2.4.2) gebundener ASS in PBS (pH 7,4) bei 37 °C.

5. Nachweis der chemischen Oberflächenmodifizierung unter Immobilisierung des Vascular Endothelial Growth Factor

Zum Nachweis des VEGF wurde zunächst ein indirekter PAP (Peroxidase anti-Peroxidase)-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) entwickelt, der über eine Bestimmung der Masse der adsorbierten Detektionsantikörper zwar keine direkte quantitative Aussage über die Masse des immobilisierten VEGF, jedoch einen quantitativen Vergleich der unterschiedlich funktionalisierten Proben hinsichtlich ihrer Beladung ermöglicht (Kap. 5.1). Eine Umrechnung der quantifizierten Masse an Detektionsantikörper in VEGF konnte über die Entwicklung eines Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-ELISA erfolgen, der parallel zum indirekten PAP-ELISA für einige Stichproben zur Bestätigung der Ergebnisse durchgeführt wurde (Kap. 5.1). Die Quantifizierung der Freisetzung von VEGF unter physiologischen Bedingungen erfolgte durch einen Sandwich-ABC-ELISA (Kap. 5.2). Eine Übersicht der untersuchten Proben liefert Tabelle 13.

Tab. 13: Übersicht der untersuchten Proben, deren Eigenschaften und Reaktionsbedingungen während der Ankopplung von VEGF. Details zu den Aktivierungen in Kapitel 2.3 und zur Ankopplung in Kapitel 2.4.

| Aktivierung/Modifizierung | Anzahl Reaktions-schritte | Reaktions-medium | Verbindung | Hydrolytisch spaltbar |
|---|---------------------------|------------------|----------------|-----------------------|
| Unaktiviert/EDC/NHS/VEGF | 1 | Wässrig | Amid | Nein |
| Unaktiviert/GDA/VEGF | 2 | Wässrig | Azomethin/Amin | Nein |
| Unaktiviert/DSC/VEGF | 2 | Aceton/DMSO | Ester | Ja |
| Unaktiviert/DSS/VEGF | 2 | Aceton/DMSO | Ester | Ja |
| NH ₃ -Plasma/EDC/NHS/VEGF | 1 | Wässrig | Amid | Nein |
| NH ₃ -Plasma/GDA/VEGF | 2 | Wässrig | Azomethin/Amin | Nein |
| NH ₃ -Plasma/DSC/VEGF | 2 | Aceton/DMSO | Ester | Ja |
| NH ₃ -Plasma/DSS/VEGF | 2 | Aceton/DMSO | Ester | Ja |
| O ₂ -Plasma/APTES/EDC/NHS/VEGF | 1 | Wässrig | Amid | Nein |
| O ₂ -Plasma/APTES/GDA/VEGF | 2 | Wässrig | Azomethin/Amin | Nein |
| MDI/NH ₃ /EDC/NHS/VEGF | 1 | Wässrig | Amid | Nein |
| MDI/NH ₃ /GDA/VEGF | 2 | Wässrig | Azomethin/Amin | Nein |

5.1 Bestimmung der Vascular Endothelial Growth Factor-Beladung mit Hilfe von PAP- und ABC-Enzyme-linked Immunosorbent Assays

Zur Bestimmung des auf PCL, P(3HB) und PUR immobilisierten VEGF wurde ein Enzymgekoppelter Immunnachweis entwickelt. Bei einem ELISA wird die Bildung eines Immunkomplexes zwischen einem Antigen und einem für das Antigen spezifischen Antikörper (AK) genutzt [110]. Die hohe Spezifität der Antikörper-Antigen-Bindung und ihre Bindungsstärke ermöglichen auch den Nachweis geringer Antigen- bzw. Antikörpermengen. Zum Nachweis werden die AK mit einem Enzym markiert, welches die Umsetzung eines Substrats katalysiert. Dabei wird das Reaktionsprodukt meist durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz detektiert. Hierbei ist die Signalintensität proportional zu der Masse des gebundenen AK.

Beim einfachen ELISA [110] wird das nachzuweisende Antigen zuerst auf einer Polymeroberfläche, meist in den Kavitäten von Mikrotiterplatten aus Polystyrol, adsorbiert. Die immobilisierten nachzuweisenden Antigene werden dann mit einem für das Antigen spezifischen AK versetzt. Beim direkten ELISA wird der Nachweis des Analyten über diesen, mit einem Enzym markierten, spezifisch adsorbierten AK ermöglicht. Der AK wird deshalb auch häufig als Detektionsantikörper bezeichnet. Beim indirekten ELISA wird der erste unmarkierte AK, auch primärer AK, gegen den Analyten mit einem zweiten Enzym markierten AK, auch sekundärer AK, gegen den primären AK nachgewiesen [110]. Der sekundäre AK reagiert dabei spezifisch mit dem primären AK. Durch die zweimalige Anbindung eines Antikörpers beim indirekten ELISA gibt es zwei Affinitätsschritte die einen sehr spezifischen Nachweis des Antigens möglich machen. Zum Nachweis des an den Polymerfilm immobilisierten VEGF wurde ein indirekter ELISA verwendet, wobei die Signalintensität der Nachweisreaktion durch die Anbindung eines PAP-Komplexes (Peroxidase-Anti-Peroxidase, dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) verstärkt wurde (Abb. 26) [111]. Als Substrat wurde das farblose Diamin 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) genutzt, das in Gegenwart von Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase, HRP) in das gelbe Diimin umgewandelt wird [112].

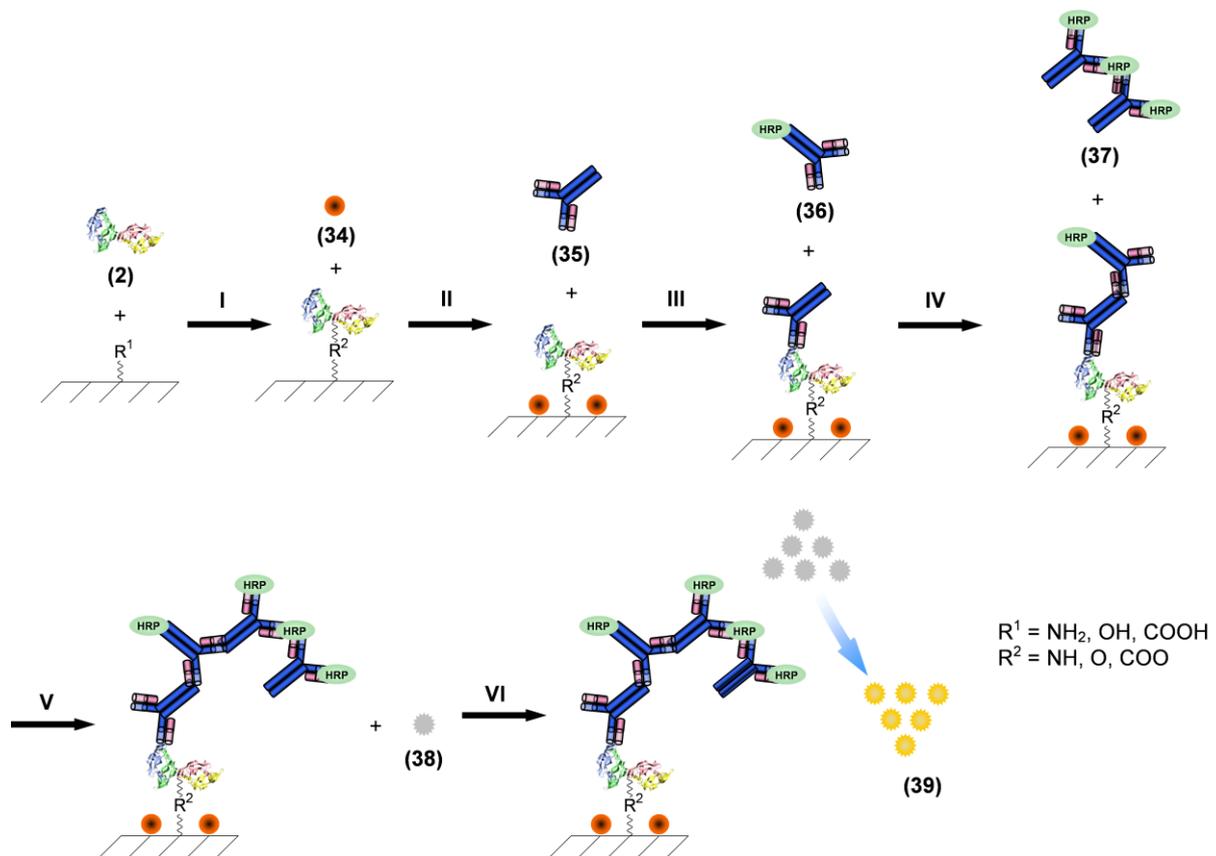


Abb. 26: Schematische Darstellung des PAP-ELISA: I. Ankopplung von VEGF (2) an die Polymeroberfläche, II. Blocken freier Stelle an der Oberfläche durch Bovines Serum Albumin (BSA) (34), um unspezifische Physisorption von Antikörpern zu vermeiden, III. Physisorption des primären AK (anti-VEGF, Wirt Ziege) (35) an VEGF, IV. Physisorption des sekundären AK (anti-Goat mit HRP markiert, Wirt Maus) (36) an primären AK, V. Physisorption des mit HRP markierten PAP-Komplexes (Wirt Ziege) (37) an sekundären AK, VI. Zugabe des farblosen Diamin TMB (38) und dessen Umwandlung in das fotometrisch messbare Diimin (39).

Zur Bestimmung der Masse der realen VEGF-Beladung, anstelle der Masse der mit HRP markierten Antikörper, wurde eine weitere Methode zur Quantifizierung der auf den Polymeroberflächen immobilisierten VEGF-Massen entwickelt. Dadurch soll eine Umrechnung zwischen den detektierten Antikörpermassen (sekundärer AK und PAP-Komplex) und den auf den Polymeroberflächen immobilisierten VEGF-Massen ermöglicht werden. Zum Nachweis des immobilisierten VEGF wurde daher ein indirekter Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-ELISA (Abb. 27) auf Basis des RayBio Human VEGF Sandwich-ELISA Kit® (Ray Biotech Inc., Norcross GA, USA) [113] zur Bestimmung des freigesetzten VEGF verwendet.

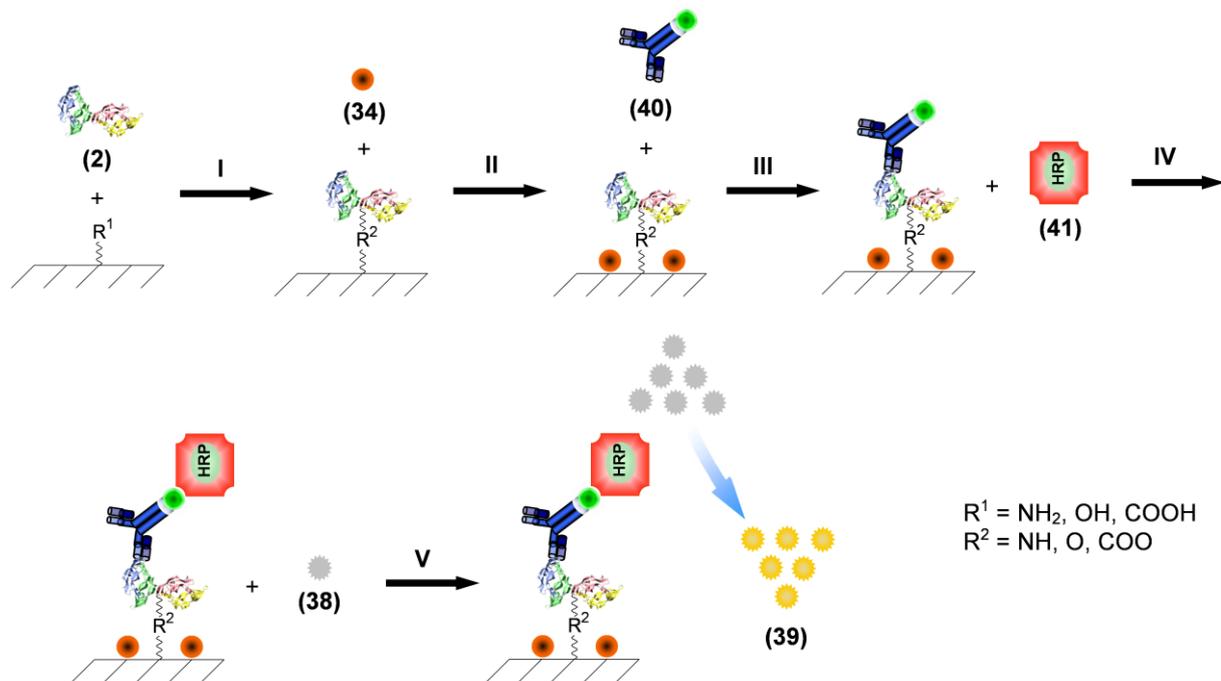


Abb. 27: Schematische Darstellung des ABC-ELISA zur Detektion von VEGF auf Polymeroberflächen: **I.** Ankopplung von VEGF (2) an die Polymeroberfläche, **II.** Blocken freier Stellen an der Oberfläche durch BSA (34), um unspezifische Physisorption von Antikörpern zu vermeiden, **III.** Physisorption des biotinylierten primären AK (anti-VEGF) (40) an VEGF, **IV.** Physisorption des mit HRP markierten Streptavidin (41) an biotinylierten primären AK, **V.** Zugabe des farblosen Diamin TMB (38) und Umwandlung in das fotometrisch messbare Diimin (39).

Durchführung und Ergebnisse des PAP-ELISA

Die untersuchten Proben wurden vor der Analyse zur Minimierung einer unspezifischen Physisorption der Antikörper 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 1%iger Bovine Serum Albumin-Lösung (BSA) in Phosphate buffered saline (PBS, 1,265 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 12,1 g $\text{Na}_2\text{HO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und 8,5 g NaCl auf 1 Liter Reinstwasser aufgefüllt) inkubiert. Die mit BSA geblockten Proben wurden für eine Stunde mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polyklonalen anti-VEGF (Wirt: Ziege, primärer AK) in einer 1%igen BSA PBS-Lösung inkubiert. Nach der Immobilisierung des primären AK wurden die Proben dreimal mit Waschpuffer (100 ml PBS mit 900 ml Reinstwasser und 0,05 % Tween 20) gewaschen. Die Anbindung des sekundären AK an den primären AK erfolgte mit 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polyklonalen anti-Goat-HRP (Wirt: Maus, sekundärer AK) in einer 1%igen BSA PBS-Lösung. Im Anschluss wurden die Proben erneut dreimal mit Waschpuffer zur Entfernung unspezifisch adsorbierter AK gewaschen. Im letzten Schritt erfolgte die Immobilisierung des mit HRP markierten PAP-Komplexes (Wirt: Ziege, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in einer 1%igen BSA-PBS-Lösung). Der sekundäre AK fungiert dabei als Brückenantikörper zwischen dem primären AK und dem PAP-Komplex. Zur Entfernung der nicht spezifisch immobilisierten PAP-Komplexe wurden die Proben erneut dreimal mit Waschpuffer gespült. Die mit Peroxidase markierten Proben wurden in einem Acetatpuffer (8,2 g Natriumacetat in

1 Liter Reinstwasser, pH 5,5) mit 0,004 % (m) Wasserstoffperoxid und 0,1 % (m) TMB als Substrat gegeben. Die Farbreaktion wurde nach Sichtbarwerden eines deutlichen Farbumschlags, jedoch spätestens nach 30 Minuten, mit 100 μ l 2 M Schwefelsäure gestoppt. Durch die Zugabe der Säure wird das chemische Gleichgewicht vom blauen Farbkomplex des enzymatisch gebildeten Semiquinonimin zum gelben Diimin verschoben [112]. Zusätzlich wird die Peroxidase durch den niedrigen pH-Wert denaturiert und es findet keine weitere Substratumwandlung mehr statt. Die Messung der Absorption erfolgte im Mikroplattenlesegerät bei 460 nm. Parallel wurde die enzymatische Aktivität definierter Massen der mit HRP markierten Antikörper (sekundärer AK und PAP-Komplex) untersucht und mit Hilfe der so erhaltenen Kalibrierreihe die Masse an Antikörpern auf den Polymeroberflächen quantitativ bestimmt. Untersucht wurden jeweils 5 Probenkörper ($\varnothing = 6$ mm). Die unspezifische Physisorption der AK während des ELISA wurde für jede der untersuchten Aktivierungen bestimmt und als Blindwert von den Messwerten abgezogen.

Die Ergebnisse des PAP-ELISA für die Polymere PCL, P(3HB) und PUR sind grafisch in den Abbildungen 28 und 29 dargestellt. Dargestellt sind die Ergebnisse der hydrolytisch stabilen, kovalenten Anbindung von VEGF an die mit NH_2 -Gruppen aktivierten Oberflächen mit GDA und EDC/NHS im wässrigen System und die Ergebnisse der Kopplung von VEGF über hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen durch DSC und DSS an die mit OH-Gruppen aktivierten Oberflächen im organischem Lösungsmittel. Als Referenz wurden die verschiedenen Immobilisierungstechniken für die unaktivierten Proben mitgeführt, da hier ein Waschen wie im Falle von ASS aufgrund der Empfindlichkeit von VEGF nicht möglich war. Die Ankopplung von VEGF mit GDA und EDC/NHS an O_2 - und CO_2 -Plasma aktivierte Proben wurde nicht untersucht, da kein Crosslinking zwischen dem Polymer und Protein anzunehmen ist. Ebenfalls wurde auch die Anbindung mit DSS und DSC an die MDI/ NH_3 , NH_3 -Plasma und O_2 -Plasma /APTES aktivierten Proben nicht untersucht, da vorwiegend eine Reaktion mit den nukleophileren NH_2 -Gruppen als mit den OH-Gruppen des VEGF erfolgt [86] und damit eine nicht hydrolytisch spaltbare Amidbindung zwischen Polymer und Protein entsteht.

Ergebnisse der VEGF-Beladung durch hydrolytisch stabile, kovalente Bindungen

Für die stabile, kovalente Anbindung von VEGF in wässrigen Lösungen mit GDA bzw. EDC/NHS (Abb. 28) sind für PCL über die EDC/NHS Kopplungen die höchsten VEGF-Beladungen zu beobachten, wobei auch hier die Werte für die mit NH_2 -Gruppen aktivierten Proben ähnlich hoch und doppelt so hoch wie für die unaktivierten Proben sind. Für die GDA-Kopplung ist beim unaktivierten PCL kaum VEGF nachweisbar. Bei P(3HB) hingegen sind für die GDA-Kopplung höhere Werte zu beobachten als für die EDC/NHS-Kopplung. Hier zeigen die mit O_2 -Plasma/APTES und NH_3 -Plasma aktivierten Proben eine ähnlich hohe Beladung, die deutlich höher ist als die der mit MDI/ NH_3 aktivierten Proben, wobei für unaktiviertes P(3HB)

kaum eine Beladung ermittelt werden konnte. Die Kopplung mit EDC/NHS zeigt nur bei den mit MDI/NH₃ aktivierten Proben eine höhere Beladung als bei GDA-Kopplung, liegt aber dennoch unter den Werten der GDA-Kopplung für mit O₂-Plasma/APTES und NH₃-Plasma aktiviertes P(3HB). Für die stabile kovalente Anbindung von VEGF ist für PUR die höchste Beladung für die EDC/NHS-Kopplungen zu beobachten. Die MDI/NH₃ aktivierten Polymeroberflächen besitzen dabei eine deutlich höhere Beladung als die unaktivierte Referenz. Für die GDA-Kopplung zeigt unaktiviertes und mit MDI/NH₃ aktiviertes PUR ähnlich hohe Beladungen.

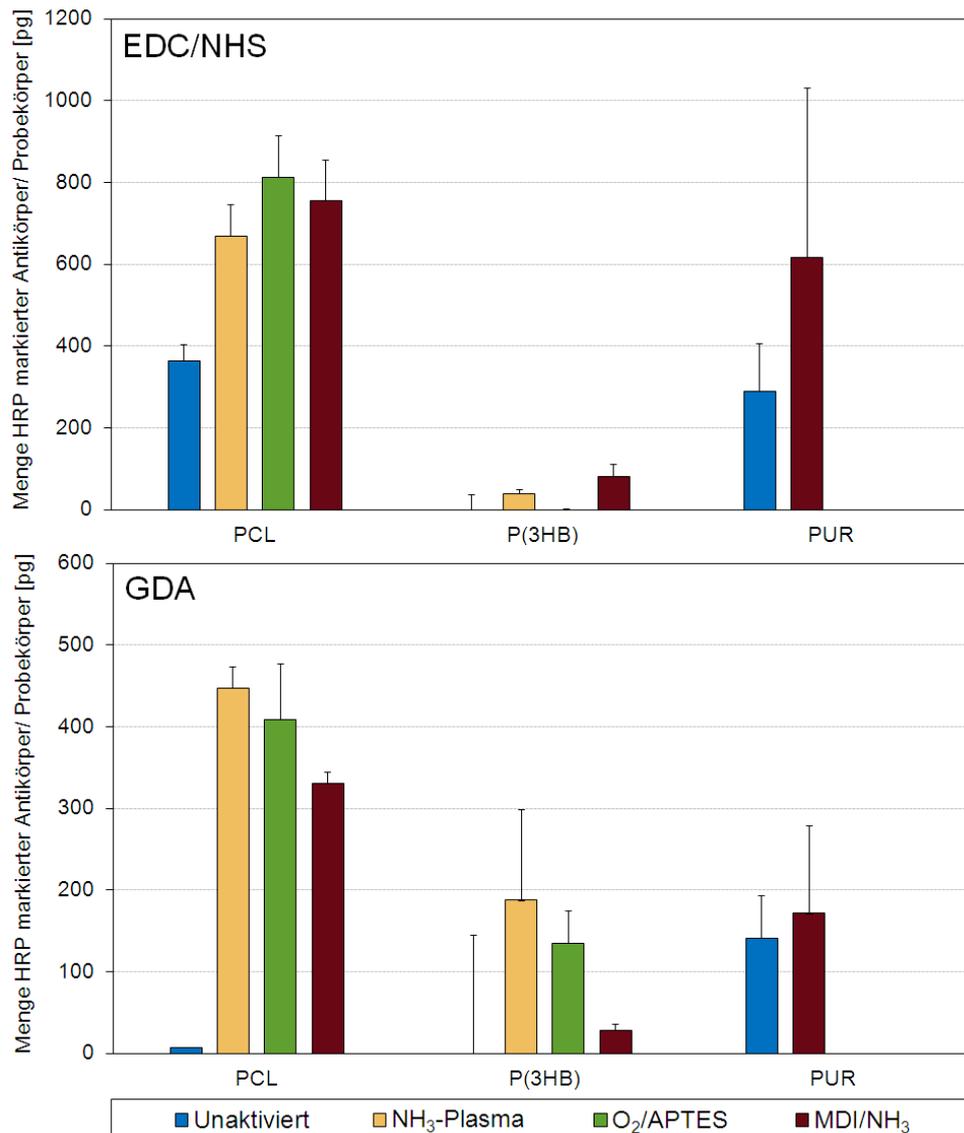


Abb. 28: Massen der mit HRP markierten Antikörper (sekundärer AK und PAP-Komplex) für VEGF nach Kopplung über hydrolytisch stabile, kovalente Bindungen in wässrigen Medien mit Hilfe der Crosslinker EDC/NHS und GDA an PCL-, P(3HB)- und PUR-Filme (Ø = 6 mm) im PAP-ELISA, n = 5.

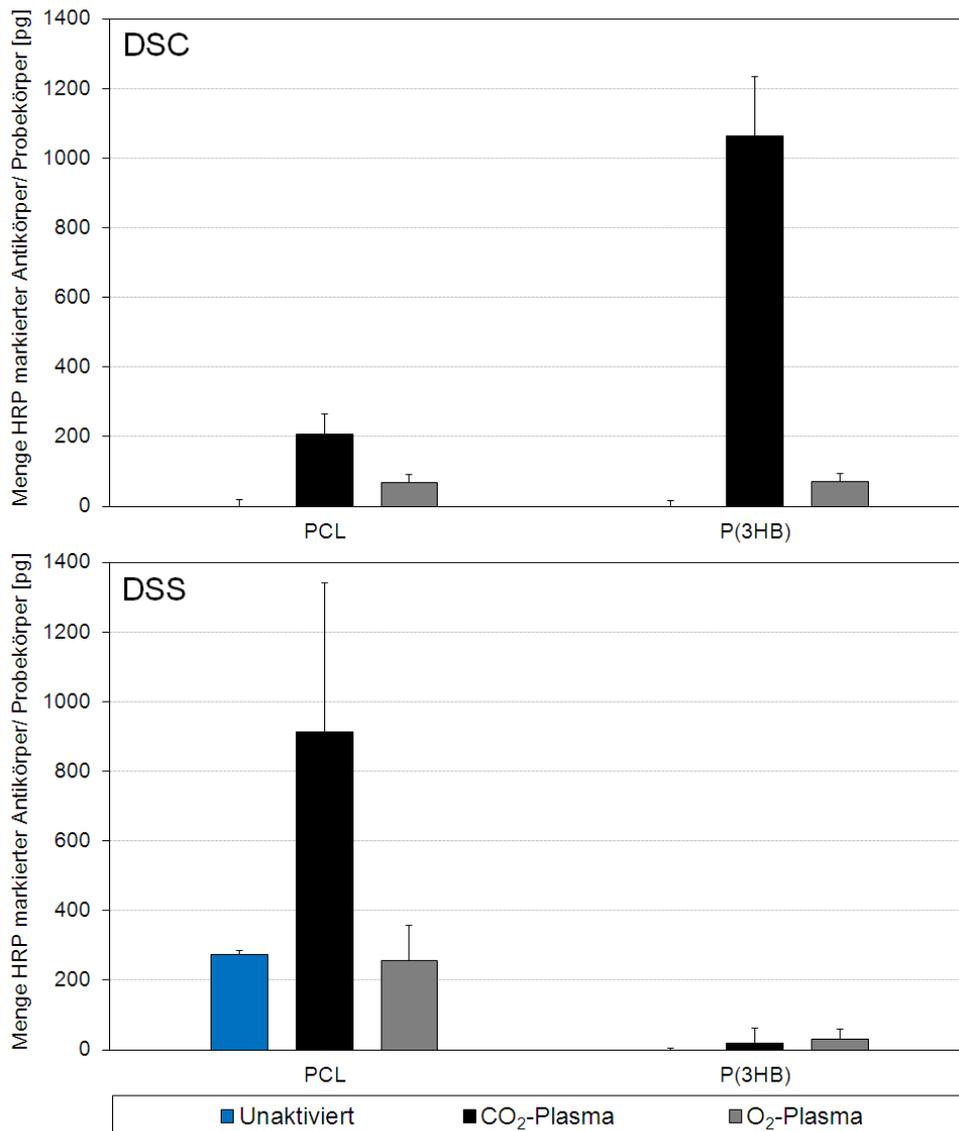


Abb. 29: Massen der mit HRP markierten Antikörper (sekundärer AK und PAP-Komplex) für VEGF nach Kopplung über hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen in organischen Lösungsmitteln mit Hilfe der Crosslinker DSC und DSS an PCL- und P(3HB)-Filme ($\varnothing = 6$ mm) im PAP-ELISA, $n = 5$.

Ergebnisse der VEGF-Beladung durch hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen

Bei der Betrachtung der hydrolytisch spaltbaren, kovalenten Anbindungen von VEGF in organischen Lösungsmitteln mit DSC und DSS (Abb. 29) kann für CO₂- und O₂-Plasma aktiviertes PCL eine ähnlich hohe oder höhere Beladung im Vergleich zum unaktivierten PCL erreicht werden. Dabei ist die Kopplung mit DSS und die Aktivierung mit CO₂-Plasma am besten geeignet hohe Massen an VEGF zu immobilisieren. Für die mit O₂-Plasma aktivierten P(3HB)-Proben ergibt sich bei Ankopplung von VEGF mit DSC bzw. DSS eine sehr geringe Beladung. Und für die mit CO₂-Plasma aktivierten Proben zeigt nur die Kopplung mit DSC eine hohe Masse an immobilisierten VEGF an. Alle Aktivierungen zeigen jedoch eine höhere VEGF-Beladung als die unaktivierten P(3HB) Proben.

Zusammenfassend lässt sich durch das Kombinieren der Oberflächenaktivierung mit den Crosslinkern eine Erhöhung der VEGF-Beladung erkennen. Für die hydrolytisch stabile, kovalente Anbindung in wässrigen Medien ist für PUR und PCL durch EDC/NHS eine höhere VEGF-Beladung zu erreichen, während für P(3HB) durch GDA meist höhere VEGF-Beladungen erreicht werden. Über hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen gebundenes VEGF zeigt für die Aktivierung mit CO₂-Plasma die höchsten Beladungen. Für PCL zeigt dabei der Crosslinker DSS und für P(3HB) der Crosslinker DSC die höchsten VEGF-Beladungen.

Durchführung und Ergebnisse des ABC-ELISA

Exemplarisch wurden unaktivierte 100 µm dicke Filme aus P(3HB) (Ø = 6 mm) über 1,5, 3 und 6 Stunden mit VEGF inkubiert. Eine Charakterisierung der Oberflächenbeladung erfolgte dann für jeweils 5 Proben parallel mit Hilfe des indirekten PAP-ELISA und mit Hilfe des indirekten ABC-ELISA. Für den indirekten ABC-ELISA wurden nach einer Stunde Blocken mit 1%iger BSA-Lösung bei Raumtemperatur die mit VEGF beladenen Filme mit dem biotinylierten anti-VEGF des RayBio Human VEGF ELISA Kit[®] inkubiert. Die Durchführung erfolgte dabei nach Anleitung des Herstellers (Ray Biotech Inc., Norcross GA, USA). Die Filme wurden nach der Inkubation dreimal mit dem Waschpuffer des Kits gewaschen und anschließend nach Anleitung des Herstellers mit Streptavidin-HRP inkubiert. Nachdem die Filme erneut gewaschen wurden, erfolgte der Nachweis durch eine Farbstoffbildung mit dem farblosen Diamin TMB als Substrat. Die Messung des gebildeten Diimins erfolgte im Mikroplattenlesegerät bei 460 nm. Als Kontrollen dienten Filme ohne VEGF zur Bestimmung etwaiger unspezifischer Färbereaktionen, die jedoch nicht auftraten. Die Kalibrierung des detektierten Streptavidin-HRP des indirekten ABC-ELISA mit VEGF erfolgte parallel über den RayBio Human VEGF Sandwich-ELISA Kit[®] (Kap. 5.2). Dadurch konnten die Ergebnisse des indirekten ABC-ELISA für die VEGF-Beladung auf die Ergebnisse der Massen der mit HRP markierten AK (sekundärer AK und PAP-Komplex) des indirekten PAP-ELISA angewendet und in VEGF umgerechnet werden.

Für beide Methoden wurden die Mittelwerte der Absorption gegen die, über die entsprechenden Kalibrationen ermittelten, VEGF (ABC-ELISA)- beziehungsweise mit HRP markierten Antikörpermassen (PAP-ELISA) aufgetragen. Anhand der Kalibrierung beider Methoden für die gleichen Proben konnte eine Funktion zur Umrechnung der bestimmten Antikörpermassen des indirekten PAP-ELISA in VEGF ermittelt werden (Abb. 42, Anhang). Die ermittelte Funktion wurde auf die im PAP-ELISA ermittelten Ergebnisse angewandt und die Resultate in Tabelle 15 im Anhang zusammengefasst.

Bei der Ermittlung der Funktion zur Umrechnung der Werte des PAP-ELISA in VEGF-Massen kann mit $R^2 = 0,925$ ein hohes Bestimmtheitsmaß beobachtet werden, was für den linearen Zusammenhang der beiden Methoden spricht. Die resultierende Funktion

$y = 0,702x - 52,075$, mit y = Masse HRP-AK aus PAP-ELISA und x = Masse VEGF aus dem ABC-ELISA, ergibt für den indirekten PAP-ELISA eine höhere Sensitivität für VEGF als für den indirekten ABC-ELISA, was sich im negativen Summanden und dem Anstieg < 1 widerspiegelt. Grund hierfür ist der PAP-Komplex, an dem eine hohe Anzahl an HRP gebunden [111] ist. Für die Beladung ergibt das ein Verhältnis an VEGF zu den HRP markierten AK des PAP-ELISA von etwa 1:1,5, womit 300 bis 1000 pg HRP markierte AK, die meist während der Untersuchung der VEGF-Beladung gemessen wurden, etwa 500 bis 1500 pg VEGF entsprechen.

5.2 Charakterisierung des *in vitro* Freisetzungsverhaltens des immobilisierten Vascular Endothelial Growth Factor mit Hilfe eines Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assays

Für die Immobilisierung von VEGF auf Polymeroberflächen wurde VEGF über hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen (Kap. 2.4.2) immobilisiert, die einer gesteuerten Freisetzung dienen sollen. Dafür wurden die Aktivierungen mit O_2 - und CO_2 -Plasma sowie mit den inaktivierten Polymeren als Kontrollen untersucht. Die Freisetzung von VEGF, neben der Immobilisierung auf der Oberfläche, sollte einen zusätzlichen Effekt auf die Proliferation der Endothelzellen haben. Für eine Beurteilung der biologischen Wirkung der mit VEGF funktionalisierten Biomaterialien im Organismus wurde die Freisetzung deshalb mit Hilfe eines Sandwich-ELISA untersucht. Für die Untersuchungen wurde jeweils ein Plättchen ($\varnothing = 6$ mm) mit einer Fläche von $56,5$ mm² eluiert, welche in etwa der Oberfläche eines koronaren Stents entspricht.

Zum Nachweis von freigesetztem VEGF wurde ein indirekter Sandwich-ELISA (Abb. 30), der RayBio Human VEGF ELISA Kit[®] (Ray Biotech Inc., Norcross GA, USA), verwendet [113]. Die Freisetzung des VEGF von den Polymerproben ($\varnothing = 6$ mm) erfolgte bei 37 °C unter Schütteln (70 rpm, Promax 1020 mit Inkubator 1000 und Abdeckhaube, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) in $0,5$ ml des Diluent A, einem für Plasma und Serum geeigneten Puffer, des Kits. Die Bestimmung des freigesetzten VEGF in Diluent A erfolgte nach Vorschrift des Herstellers. Auch hier erfolgte der Nachweis durch eine Farbstoffbildung mit dem farblosen Diamin TMB als Substrat. Die Messung des gebildeten Diimins erfolgte im Mikroplattenlesegerät bei 460 nm. Die Freisetzung wurde bei einer Konzentration von unter 100 pg VEGF pro ml Medium beendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt.

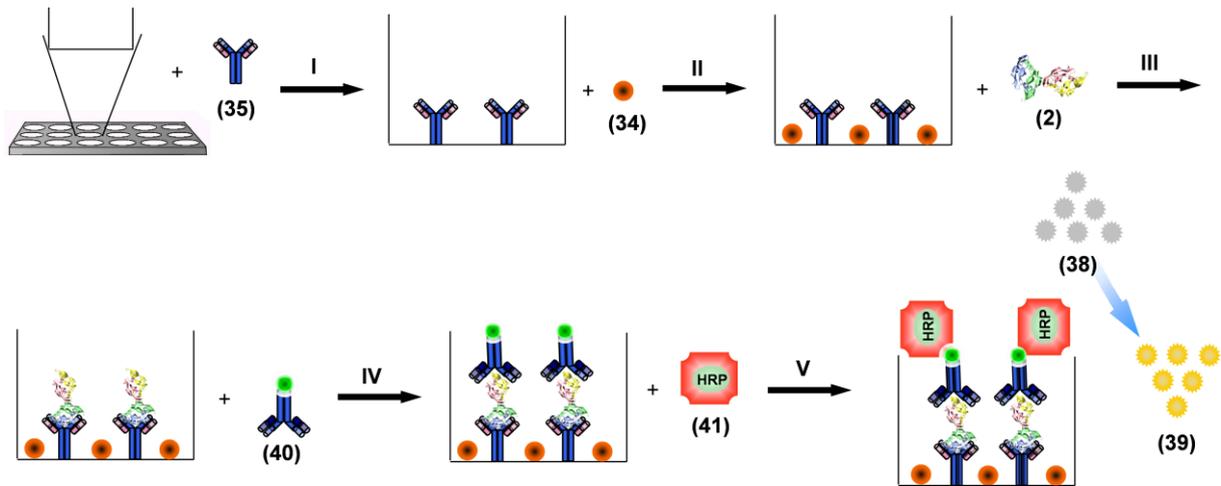


Abb. 30: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA zur Detektion von freigesetztem VEGF: **I.** Physisorption des unmarkierten primären AK (35) an die Oberflächen der Vertiefungen von Mikrotiterplatten, **II.** Blocken freier Stelle an der Oberfläche durch BSA (34), um unspezifische Physisorption von Antikörpern und VEGF zu vermeiden, **III.** Physisorption von VEGF (2) an die unmarkierten primären AK (35), **IV.** Physisorption eines biotinylierten AK (anti-VEGF) (40) an immobilisiertes VEGF, **V.** Physisorption des mit HRP markierten Streptavidin (41) an biotinylierten AK und Umwandlung des farblosen Diamin TMB (38) in das fotometrisch messbare Diimin (39).

Es wurde festgestellt, dass die unaktivierten PCL- und P(3HB)-Proben nach VEGF-Immobilisierung über DSS eine sehr schnelle Freisetzung zeigen, die bereits nach 24 Stunden vollständig ist. Während sich die Freisetzungsprofile bei den PCL-Proben für die Aktivierung mit CO₂-Plasma und anschließende Umsetzung mit DSC/VEGF und DSS/VEGF nahezu kaum unterscheiden, wurde bei P(3HB) eine langsamere Freisetzung mit nahezu linearem Verlauf bei der Modifikation mit O₂-Plasma/DSC/VEGF erreicht. Bei der Oberflächenmodifikation mit CO₂-Plasma/DSC und CO₂-Plasma/DSS wurden sowohl bei PCL als auch bei P(3HB) höhere Freisetzungsgeschwindigkeiten innerhalb der ersten 24 Stunden für die Immobilisierung über DSC im Vergleich zu DSS nachgewiesen.

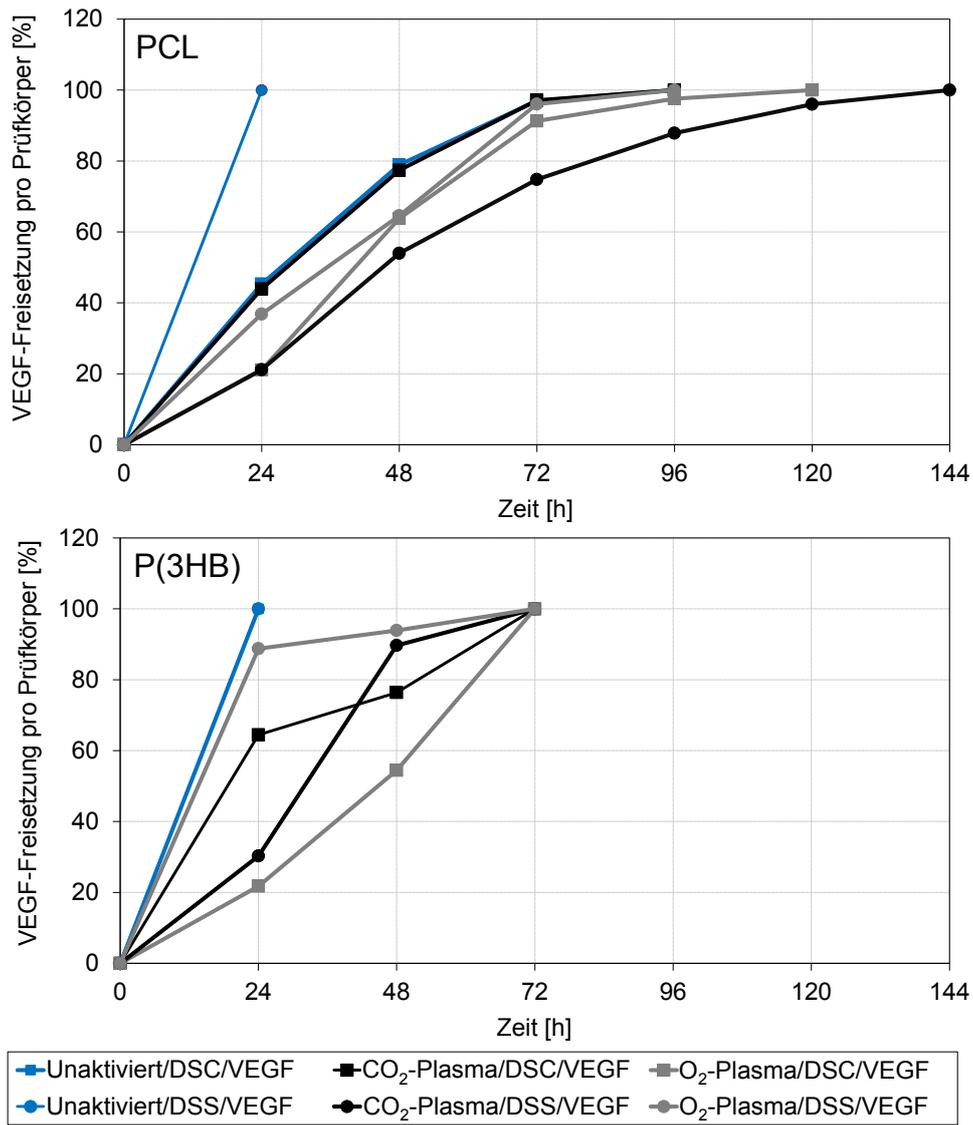


Abb. 31: *In vitro* Freisetzung von mit VEGF beladenen PCL- und P(3HB)-Proben ($\varnothing = 6$ mm, $n = 1$) in Diluent A des RayBio Human VEGF ELISA Kit[®] (Ray Biotech Inc., Norcross GA, USA) bei 37 °C; Freisetzung über Hydrolyse der Verbindungen (22) und (23) entsprechend Kap. 2.4.2.

6. Untersuchung der *in vitro* Biokompatibilität der Polymere nach Oberflächenmodifizierung

Unter Biokompatibilität wird die Verträglichkeit zwischen einem technischen und einem biologischen System verstanden. Sie wird in die Strukturkompatibilität (Anpassung des mechanischen Verhaltens und der Form des Implantats an den Einsatzort) und die Oberflächenkompatibilität (Anpassung der chemischen, physikalischen, biologischen und morphologischen Eigenschaften des Implantats an den Einsatzort) gegliedert [9]. Für die angewandten Oberflächenmodifizierungen ist die Oberflächenkompatibilität relevant, denn erst die optimale Anpassung der chemischen, biologischen, morphologischen und physikalischen Oberflächeneigenschaften des Implantats an das umgebende Gewebe bzw. das Blut ermöglicht die therapeutisch erwünschte Wechselwirkung.

Für Implantate, wie Stents oder Gefäßprothesen, die für einen langfristigen Einsatz im Blutkontakt ausgelegt sind, ist es somit äußerst wichtig, neben der Zytotoxizität auch die Hämkompatibilität der oberflächenmodifizierten Polymere, die als Implantatwerkstoffe zur Anwendung kommen sollen, zu untersuchen.

Durch Fremdkörperoberflächen können im Blut komplexe Aktivierungs- und Schädigungsreaktionen induziert werden. Die Interaktion von Implantaten mit Blut beginnt bereits innerhalb weniger Sekunden mit der Adsorption von Proteinen aus dem Blut auf der Implantatoberfläche. Die gebildete Proteinschicht verändert die originalen Oberflächeneigenschaften und kann eine thrombogene Oberfläche darstellen [113]. Anschließend adhären die Blutplättchen, die dann Agglomerate bilden, ihre Struktur verändern und durch die Freisetzung von Signalmolekülen die weitere Blutgerinnung einleiten [115]. Daneben kann der Kontakt mit dem Implantatmaterial auch zur Aktivierung des Komplementsystems, zur Hämolyse und bei Langzeitapplikationen zur Kalzifizierung der Oberfläche führen [9]. Idealerweise sollten hämkompatible Werkstoffe deshalb keine Blutkoagulation, Änderung der Plasmaproteine des Blutes oder eine Verringerung der Elektrolytkonzentration hervorrufen [9].

6.1 Biokompatibilität der oberflächenaktivierten Polymere

Die im Rahmen der Arbeit erzielten Ergebnisse zur Zytotoxizität der oberflächenaktivierten Polymere im Direktkontakt mit L929 Mausfibroblasten sowie zur Thrombozytenaktivierung und plasmatischen Gerinnung als Maß der Hämkompatibilität sind in den folgenden Kapiteln 6.1.1 bis 6.1.3 zusammengefasst. In die Untersuchungen wurden die aktivierten Polymeroberflächen einbezogen, da diese nach der initialen Freisetzung der biologisch aktiven Wirkstoffe als Implantatoberfläche zurückbleiben. Die Untersuchung des Einflusses des Abbauprozesses der biodegradierbaren Polymere PCL und P(3HB) auf die *in vitro* Biokom-

patibilität musste in die Studien jedoch nicht mit einbezogen werden, da es sich um langsam degradierbare Polymere handelt und diese in den Untersuchungszeiträumen der Studien somit nicht relevant an Molmasse verlieren bzw. fragmentieren [27, 45].

6.1.1 Vitalität von L929 Mausfibroblasten im Direktkontakt mit den oberflächenaktivierten Polymeren

Bei der Auswahl und Herstellung der Polymere und deren Oberflächenaktivierungen muss eine mögliche zytotoxische Reaktion ausgeschlossen werden. *In vitro* Untersuchungen mit Zellkulturen sind Grundlagen zur Beurteilung der Reaktionen auf einen Fremdstoff, wobei Änderungen der Zellstruktur oder -funktion durch morphologische und biochemische Tests analysiert werden können. Zur Bestimmung der Zellzahl auf einem Material werden meist indirekte Methoden genutzt, bei denen die Aktivität intrazellulärer Enzyme vitaler Zellen detektiert wird. Beim verwendeten CellQuanti-Blue™ Test (CQB, BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) wandeln Reduktasen das nicht toxische Substrat Resazurin in das spektroskopisch messbare, nicht toxische Produkt Resorufin um [116]. Dabei ist die Konzentration des gebildeten Produkts proportional zur zellulären Aktivität und der Anzahl vitaler Zellen. Da Fibroblasten zur Untersuchung der Zellmembranintegrität, der Adhäsion an Oberflächen und mitochondrialer und lysosomaler Aktivitäten nach ISO 10993-5 empfohlen werden, wurden diese als Zelltyp für die durchgeführten Untersuchungen verwendet [117].

Zur Untersuchung des Einflusses der Oberflächenaktivierungen auf die Zellvitalität wurden Polymerfilme mit 6 mm Durchmesser in 96 Well-Mikrotiterplatten (CELLSTAR®, Katalognummer: 655090, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) platziert. Die Sterilisation der oberflächenaktivierten Polymerproben erfolgte durch β -Strahlung mit einer Dosis von 25 kGy, wobei eine Temperatur von 40 °C nicht überschritten wurde. Die zur Untersuchung verwendeten L929 Mausfibroblasten (ACC2, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) wurden mit Trypsin-EDTA (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) vom Substrat gelöst und in 96 Well-Mikrotiterplatten auf den Polymerfilmen ausgesät und für 48 Stunden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) mit 4,5 mg/ml Glucose, 10 % Fetalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin G, 100 μ g/ml Streptomycin und 3,7 g/l NaHCO₃ bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Feuchte von 95 % inkubiert. Dabei wurden 4000 Zellen in 200 μ l Zellkulturmedium pro Well verwendet. Als Negativkontrollen wurden Zellen auf Polystyrol (NK) kultiviert, während als Positivkontrolle (PK) ein Polyurethanfilm mit 0,1 % Zinkdiethyldithiocarbamat (Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, Tokyo, Japan) diente. Nachdem das Zellkulturmedium abgesaugt und durch 200 μ l frisches Zellkulturmedium mit 10 % CellQuanti-Blue Reagenz (Resazurinsubstrat) ersetzt war, wurde der Ansatz für 2 Stunden unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Das von zellulären Reduktasen

gebildete Produkt Resorufin, das grünes Licht von 550 nm absorbiert und ein Fluoreszenzlicht von 590 nm emittiert, wurde fluorimetrisch im Mikrotiterplattenleser (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) bestimmt.

Zur Berechnung der relativen Vitalität wurden die Werte der Zellen auf dem Polystyrol der Mikrotiterplatte (NK) als 100 % festgelegt. Die Darstellung der ermittelten Mittelwerte und Standardabweichungen erfolgt in der Abbildung 32, wobei immer mindestens 6 Proben untersucht wurden. Für die Berechnung, ob signifikante Unterschiede bzw. sogar eine signifikante Steigerung der Biokompatibilität durch die verschiedenen Aktivierungen im Vergleich zum unaktivierten Polymer erreicht werden, wurde der Mann-Whitney U-Test der SPSS Version 15.01 angewendet, wobei das Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ festgelegt wurde.

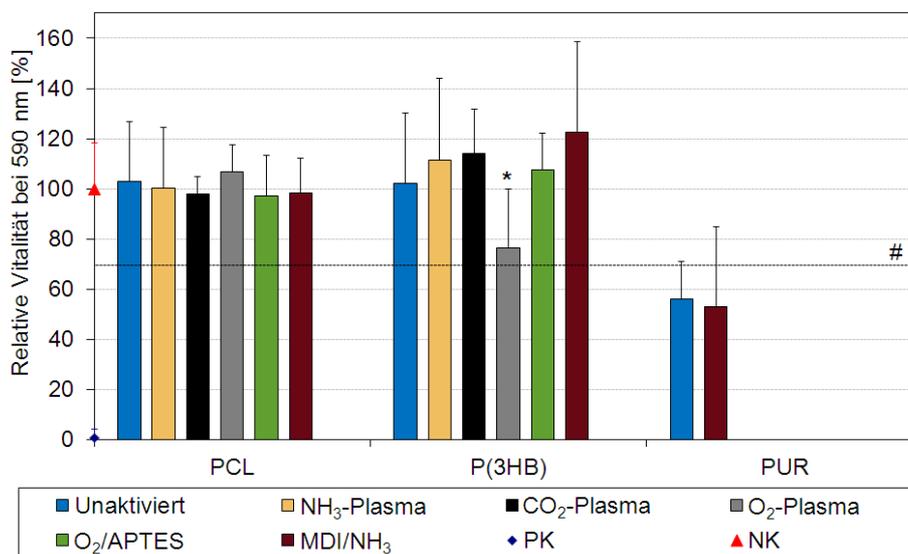


Abb. 32: Relative Vitalität (CQB-Test) von L929 Mausfibroblasten *in vitro* auf oberflächenaktivierten PCL-, P(3HB) und PUR-Filmen ($\varnothing = 6$ mm) nach 48 Stunden Inkubation in Bezug zur Negativkontrolle (NK = Polystyrol), PK = ZEDC, $n = 6$, * = signifikante Abweichungen im Vergleich zum unaktivierten Polymer, # = 75 % Grenzwert für mögliche zytotoxische Effekte nach DIN EN ISO 10993-5:2009-10.

Die Werte der Negativkontrolle entsprechen etwa den Werten des unaktivierten PCL und P(3HB), während für die Positivkontrolle mit etwa 0,6 % relativer Zellvitalität deutliche zytotoxische Effekte zu erkennen sind. Für P(3HB) und PCL ist mit ca. 100 % relativer Zellvitalität keine Zytotoxizität und für unaktiviertes PUR mit 56 % eine leichte Zytotoxizität (Einstufung in Anlehnung an DIN EN ISO 10993-5:2009-10) zu beobachten. Auch für die verschiedenen Aktivierungen der Polymere mit MDI/NH₃, O₂-Plasma/APTES, NH₃-, CO₂- und O₂-Plasma ist, mit Ausnahme der Aktivierung mit O₂-Plasma für P(3HB), keine signifikante Verschlechterung der relativen Vitalität der L929 Mausfibroblasten im Vergleich zu den unaktivierten Polymeren zu beobachten. Trotz der signifikanten Verschlechterung der relativen Zellvitalität

für die mit O₂-Plasma aktivierten P(3HB)-Filme ist mit 76 % relativer Vitalität kein zytotoxischer Effekt gegeben.

Zusammenfassend lassen sich in Bezug auf die jeweiligen unaktivierten Polymere durch die Oberflächenaktivierungen keine Änderungen in der Zytotoxizität beobachten. Die verschiedenen untersuchten Techniken zur Aktivierung der Polymere zeigen somit keinen systematischen signifikant negativen Einfluss auf die Vitalität der Zellen durch Zytotoxizität in Folge der chemischen und physikalischen Reaktionen zur Oberflächenaktivierung. Für die Polyester PCL und P(3HB) sind keine zytotoxischen Effekte zu beobachten, während PUR eine Verringerung der relativen Zellvitalität verursachte.

6.1.2 Hämokompatibilität - Nachweis der Thrombozytenaktivierung

Nach einer Gefäßläsion sind Thrombozyten durch Bildung eines Thrombozytenpfropfs (weißer Abscheidungsthrombus) und durch Freisetzung von Vasokonstringenzen (Thromboxan A₂, Serotonin) wesentlich an der Blutstillung beteiligt. Diese vorläufige, primäre Hämostase wird in die Abschnitte Adhäsion, Aktivierung und Aggregation eingeteilt.

Bei Läsion des Gefäßendothels binden, mittels des thrombozytären GPIIb-V-IX Rezeptors und des von-Willebrand-Faktors, die zirkulierenden nicht aktivierten Thrombozyten an freiliegende subendotheliale Matrixproteine (z. B. Kollagen). Diese Bindung an die subendotheliale Matrix bewirkt die Aktivierung der Thrombozyten. Resultat der Aktivierung ist die Entleerung der thrombozytären Speichergranula über Exocytose, wobei die freigesetzten Inhaltsstoffe eine positive Rückkopplung auf den Thrombozyten haben und weitere Thrombozyten aktivieren. Durch Freisetzung von Arachidonsäure aus den Thrombozyten wird zusätzlich auch die Bildung von Thromboxan A₂ eingeleitet, welches ebenfalls aktivierend und vasokonstriktiv wirkt. Daneben bilden die Thrombozyten Pseudopodien aus, welche die Oberfläche vergrößern und eine bessere Verzahnung ineinander, zur Versiegelung von Gefäßläsionen ermöglichen [118]. Während der Aggregation kommt es zur Quervernetzung durch das Glykoprotein GPIIb/IIIa auf der Thrombozytenoberfläche, welches Fibrinogen bindet. Die Freisetzung von Thrombospondin aus den Thrombozyten bewirkt den Übergang von einer reversiblen zu einer irreversiblen Aggregation, da durch Anbindung dieses großen Glykoproteins die Fibrinogenbrücken, die die Plättchen vernetzen, verfestigt werden.

Die Untersuchung der primären Hämostase erfolgte durch die quantitative Messung von β -Thromboglobulin in plättchenreichem Plasma (PRP). Die Freisetzung von β -Thromboglobulin, erfolgt aus den α -Granula der Thrombozyten und begünstigt die irreversible Bildung eines thrombozytären Pfropfes [119]. Durchgeführt wurden die Untersuchungen der verschiedenen Aktivierungen an PCL und P(3HB), wobei PUR als Referenzmaterial ebenfalls betrachtet wurde, da es im Blutkontakt wegen seiner guten Blutverträglichkeit häufig eingesetzt wird [9].

Für die *in vitro* Untersuchungen wurde frisches humanes, thrombozytenreiches Citratplasma verwendet. Die venöse Blutabnahme erfolgte in 10 ml S-Monovetten® mit 1 ml Natriumcitrat (0,11 mol/l, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, Deutschland). Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 250 g und Raumtemperatur wurde das PRP abpipettiert. Die zu untersuchenden modifizierten Polymerproben ($\varnothing = 15$ mm) wurden in 12Well-Mikrotiterplatten (CELLSTAR®, Cat. No. 665180, Greiner Bio-One GmbH, Essen, Deutschland) platziert und 30 Minuten bei 37 °C in 1 ml des PRP inkubiert. Als Negativkontrolle diente PRP in der Mikrotiterplatte (Polystyrol) und als Positivkontrolle eine Probe mit Thrombin (2 IU/ml PRP). Nach der Inkubation wurde das thrombozytenreiche Plasma in Röhrchen mit Citrat, Theophyllin, Adenosin und Dipyridamol (S-Monovette® 2.9 ml CTAD, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, Deutschland) überführt und für 15 Minuten auf Eis zur Stabilisierung gekühlt. Die Röhrchen wurden anschließend bei 2000 g und 2 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde ein Drittel des Plasmaüberstandes aus dem mittleren Teil abpipettiert. Abschließend wurde mit Hilfe eines Sandwich-Enzymimmuno-Assays (Asserchrom® β -TG, Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland), nach Anleitung des Herstellers, die Konzentration an β -Thromboglobulin in Doppelbestimmung ermittelt.

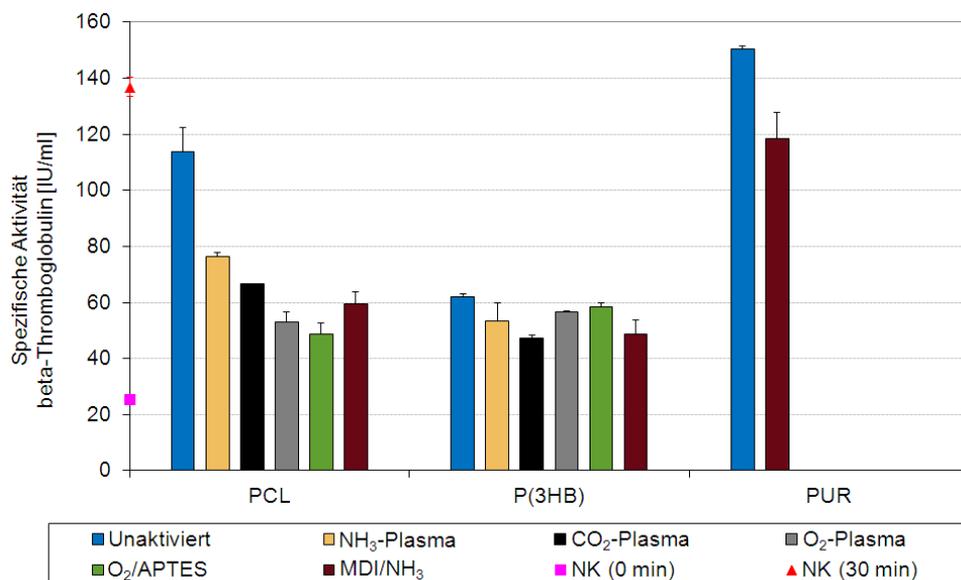


Abb. 33: Spezifische Aktivität von β -Thromboglobulin *in vitro* in humanem PRP bei Kontakt mit verschiedenen unaktivierten und aktivierten Polymeren nach 30 Minuten, NK (0 min) = Aktivität vor Testbeginn und NK (30 min) = Aktivität nach 30 Minuten in Kontakt zu Polystyrol, PK = Thrombin (2 IU/ml PRP) bei 338 IU/ml, n = 2.

Bei der Untersuchung der thrombogenen Eigenschaften der verschiedenen Polymeroberflächen (Abb. 33) zeigen die gewonnenen Thrombozyten vor Versuchsbeginn (NK (0 min)) eine geringe Aktivität, die bei Kontakt mit Polystyrol nach 30 Minuten (NK (30 min)) deutlich

zunimmt. Die Positivkontrolle (Thrombin) zeigt mit einem beinahe dreimal höheren Wert eine deutliche erhöhte Aktivität der Thrombozyten.

Die unaktivierten Proben von PCL, P(3HB) und PUR zeigen jeweils die stärkste Steigerung der Thromboglobulin-Aktivität im Vergleich zu den Oberflächenaktivierungen mit MDI/NH₃, O₂-Plasma/APTES, NH₃⁻, CO₂⁻ und O₂-Plasma. Mit Ausnahme der unaktivierten Proben von PUR liegen die detektierten Werte unter der β -Thromboglobulin Aktivität der Negativkontrolle (Polystyrol) nach 30 Minuten. Die unaktivierten PCL- und P(3HB)-Proben zeigen eine niedrigere Aktivierung von β -Thromboglobulin als die Negativkontrolle nach 30 Minuten. Nach den verschiedenen Oberflächenaktivierungen der PCL-Proben ist eine deutliche Reduzierung der Aktivierung der Thrombozyten bis zu 50 % im Vergleich zur unaktivierten Probe zu erkennen. Für P(3HB) ist eine niedrigere Reduzierung von bis zu 20 % im Vergleich zur unaktivierten Probe zu erkennen. Die mit MDI/NH₃ aktivierten PUR-Proben zeigen ebenfalls eine um etwa 20 % reduzierte β -Thromboglobulinaktivität im Vergleich zur unaktivierten PUR-Probe.

Die Steigerung der β -Thromboglobulinaktivität bei der Negativkontrolle über die Zeit und die Positivkontrolle bestätigen die Eignung des Testes zur Untersuchung der Thrombozytenaktivierung durch die Polymerwerkstoffe. Durch die verschiedenen Techniken zur Aktivierung der Polymeroberflächen ist für alle untersuchten Polymere eine Reduzierung der Thrombozytenaktivierung zu erkennen.

6.1.3 Hämokompatibilität - Nachweis der plasmatischen Gerinnung

Während der sekundären Hämostase wird zur Stabilisierung des weißen Abscheidungsthrombus der primären Hämostase aus dem Fibrinogen-Platelet-Aggregat ein Fibrin-Platelet-Netzwerk gebildet, welches auch Erythrozyten und Leukozyten enthält und Gefäßläsionen endgültig verschließt. Dabei wandelt ein Prothrombinaktivator-Komplex das Proenzym Prothrombin in Thrombin um. Dieses spaltet aus dem löslichen Fibrinogen Fibrin ab, welches für einen Übergang des Blutes vom flüssigen zum gallertartigen Zustand sorgt. Im extrinsischen System der sekundären Hämostase wird die Gerinnung durch Phospholipide und aktivierende Proteine aus verletzten Gefäß- und Bindegewebszellen ausgelöst, ähnlich der Aktivierung der primären Hämostase. Die intrinsische Aktivierung erfolgt über plasmatische Prozesse [120]. Da Verletzungen von Zellen während einer PTCA oder Bypassoperation nicht zu vermeiden sind und diese auch die primäre Hämostase aktivieren, ist die plasmatische Reaktion auf polymeren Oberflächen bei Blutkontakt ebenfalls relevant, um eine dauerhafte Aktivierung der Blutgerinnung nach Abheilen von Zellverletzungen durch die Implantatoberfläche zu vermeiden.

Die Untersuchung der sekundären Hämostase erfolgte durch die quantitative Messung von Prothrombin F1+2 Fragmenten, die bei der Umwandlung des Prothrombins zum Thrombin im Plasma entstehen [121]. Für die *in vitro* Untersuchungen wurde frisches humanes Heparin-

plasma verwendet. Das venöse Blut wurde in S-Monovetten® (Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, Deutschland) mit Lithiumheparin (16 IE Heparin/ml Blut) versetzt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 2000 g und Raumtemperatur wurde das überstehende thrombozytenarme Plasma abpipettiert. Die zu untersuchenden Polymerfilme ($\varnothing = 15$ mm) wurden in 12 Well-Mikrotiterplatten platziert und 30 Minuten bei 37 °C in 1 ml des präparierten Plasmas inkubiert. Als Negativkontrolle diente das Polystyrol der Mikrotiterplatte und als Positivkontrolle eine Probe mit Kaolinit (0,02 mol/l, Produktnummer: 03584, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz). Abschließend wurde mit Hilfe eines Sandwich-Enzymimmuno-Assays (Sandwich-ELISA Kit Enzygnost® F1+2 von Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany), nach Anleitung des Herstellers, die Konzentration des gebildeten Prothrombin F1+2 Fragment in Doppelbestimmung ermittelt.

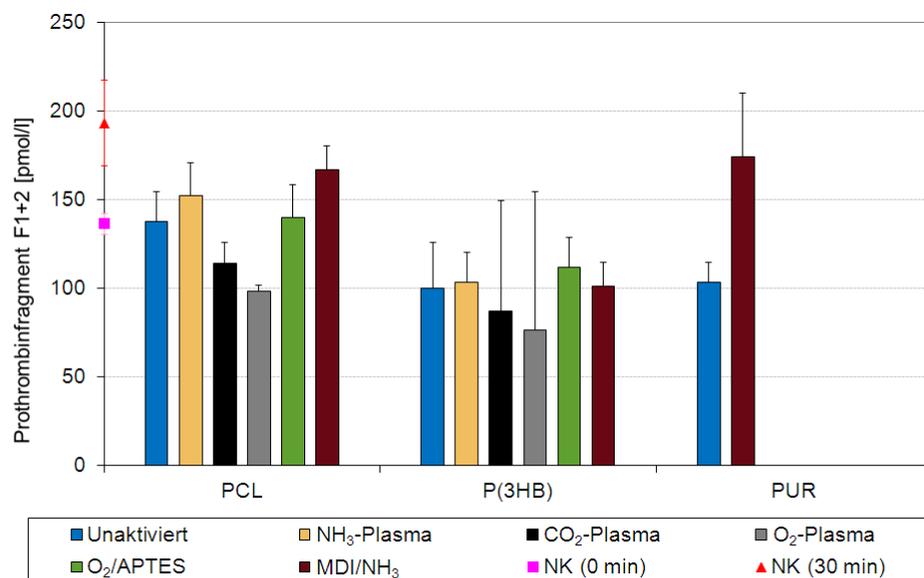


Abb. 34: Konzentration an gebildetem Prothrombinfragment F1+2 *in vitro* in humanem Heparinplasma bei Kontakt mit verschiedenen unaktivierten und aktivierten Polymeren nach 30 Minuten, NK (0 min) = Konzentration vor Testbeginn und NK (30 min) = Konzentration nach 30 Minuten in Kontakt zu Polystyrol, PK = Kaolinit (0,02 mol/l) liegt bei 1188 pmol/l, n = 2.

Bei der Untersuchung der hämokompatiblen Eigenschaften der verschiedenen Polymeroberflächen (Abb. 34) in Bezug auf die plasmatische Gerinnung, zeigt sich vor Versuchsbeginn (NK (0 min)) eine geringere Anzahl an Spaltprodukten vom Prothrombin als nach 30 Minuten (NK (30 min)). Mit einem beinahe 10mal so hohen Wert zeigt die Positivkontrolle eine deutliche Hochregulierung der plasmatischen Gerinnungskaskade.

Die Werte für unaktiviertes PCL und P(3HB) liegen unter dem Wert der Negativkontrolle (30 Minuten). Für die mit NH₃-Plasma, O₂-Plasma/APTES und MDI/NH₃ aktivierten PCL- und P(3HB)-Proben wird eine höhere Konzentrationen an Prothrombinfragment gemessen, die aber alle unter dem Wert der Negativkontrolle (30 Minuten) liegen, während die mit O₂- und

CO₂-Plasma aktivierten PCL- und P(3HB)-Proben eine geringere Konzentrationen als für die unaktivierte Proben zeigen, die unter dem Wert der Negativkontrolle (0°Minuten) liegen.

Unaktiviertes PUR zeigt ebenfalls eine nicht messbare Aktivierungen der plasmatischen Gerinnung, da die ermittelten Werte unterhalb der Negativkontrolle (0 Minuten) liegen. Auch hier zeigen die mit MDI/NH₃ aktivierten PUR-Proben eine erhöhte Konzentration an gebildeten Prothrombinfragment, die unter dem Wert der Negativkontrolle (30 Minuten) liegen.

Zusammenfassend ergibt sich für die verschiedenen Aktivierungsverfahren zur Generierung von NH₂-Gruppen an PCL-, P(3HB)- und PUR-Oberflächen eine Erhöhung der Aktivierung der plasmatischen Gerinnung im Vergleich zu den unaktivierten Polymeren. Die Aktivierung mit CO₂- oder O₂-Plasma hingegen zeigt für PCL und P(3HB) eine Reduzierung der gebildeten Prothrombinfragmentkonzentration im Vergleich zu den unaktivierten Proben. Für unaktiviertes PUR ist im Vergleich zu PCL eine bessere und im Vergleich zu P(3HB) eine ähnliche Biokompatibilität hinsichtlich der plasmatischen Gerinnung gegeben.

6.2 Vitalität humaner koronarer arterieller Endothelzellen auf mit Vascular Endothelial Growth Factor beladenen Polymeroberflächen

Der mitogene Effekt von VEGF auf humane koronare arterielle Endothelzellen (HCAEC) [122] soll eine schnellere und vollständige Reendothelialisierung von polymeren Gefäßimplantaten ermöglichen. Dies ist zur Reduzierung der Gefahr einer möglichen Thrombusbildung oder Restenose erwünscht [123], da die Thrombozyten im Kontakt mit artifiziellen Oberflächen aktiviert werden und somit Mediatoren zur Thrombusbildung [114] und für Entzündungsreaktionen freisetzen [115]. Eine konfluente adhärente Endothelschicht wirkt dagegen antithrombogen durch Präsentation verschiedener Rezeptoren an der Oberfläche (z.B. Thrombomodulin, negativ geladene Proteoglykane) und der Freisetzung verschiedener anti-thrombogener Substanzen (z.B. Stickstoffmonoxid, Prostacyclin) [124].

Um den Einfluss der Oberflächenbeladung mit VEGF und deren Freisetzung zu untersuchen, wurden ausgewählte, über EDC/NHS, GDA, DSC und DSS mit VEGF beladene, PCL-Probekörper (Ø = 6 mm) im Direktkontakt mit HCAEC getestet. Für die Untersuchungen wurden HCAEC (Katalognummer: C-12221, PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) gewählt, da diese Zellen das Zielgewebe der geplanten Anwendung der Polymere am besten repräsentieren.

Die zur Untersuchung verwendeten HCAEC wurden in Endothelial Cell Growth Medium MV (mit Supplement Mix MV) (HCAEC, Katalognummer: C-22020, PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit 5 % FCS, 0,4 % Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin, 10 ng/ml rekombinanten humanen Epidermal Growth Factor, 1 µg/ml Hydrocortison, 620 pg/ml Phenolrot, 50 ng/ml Amphotericin B und 50 µg/ml Gentamicin bei pH 7,4, 37 °C,

5 % CO₂ und einer relativen Feuchte von 95 % kultiviert. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen in der Kulturflasche unter den genannten Umgebungsbedingungen arretiert. Als Arretierungsmedium diente das PromoCell-Basalmedium (Katalognummer: C-22220, PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit 0,5 % FCS (Katalognummer: A15-15, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich). Mit Trypsin-EDTA (Katalognummer: C-41200, PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) wurden die Zellen von ihrem Substrat abgelöst und 150 µl in einer Dichte von 2x10⁴ Zellen/ml Medium in 96 Well-Mikrotiterplatten (3000 Zellen/Well) zu den zu untersuchenden Proben gegeben und unter den vorher beschriebenen Bedingungen im PromoCell-Basalmedium mit 2,5 % FCS für 96 Stunden kultiviert. Die Untersuchung der Vitalität erfolgte abschließend durch den CellQuanti-Blue Test, wie unter Kapitel 6.1.1 beschrieben.

Nach chemischer Aktivierung der Proben (Kap. 2.3) wurden die Plättchen in 70%igem Ethanol 7 Minuten aseptisch behandelt und mit sterilem, gefiltertem Wasser gewaschen. Die Ankopplung von VEGF (Kap. 2.4) wurde anschließend unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Aufgrund der hohen VEGF-Beladung bzw. -Freisetzung wurden die hydrolytisch stabilen, kovalenten Anbindungen von VEGF über EDC/NHS und GDA an O₂-Plasma/APTES aktivierte PCL-Oberflächen und die hydrolytisch spaltbaren, kovalenten Anbindungen von VEGF über DSC und DSS an CO₂-Plasma aktivierte PCL-Filme betrachtet.

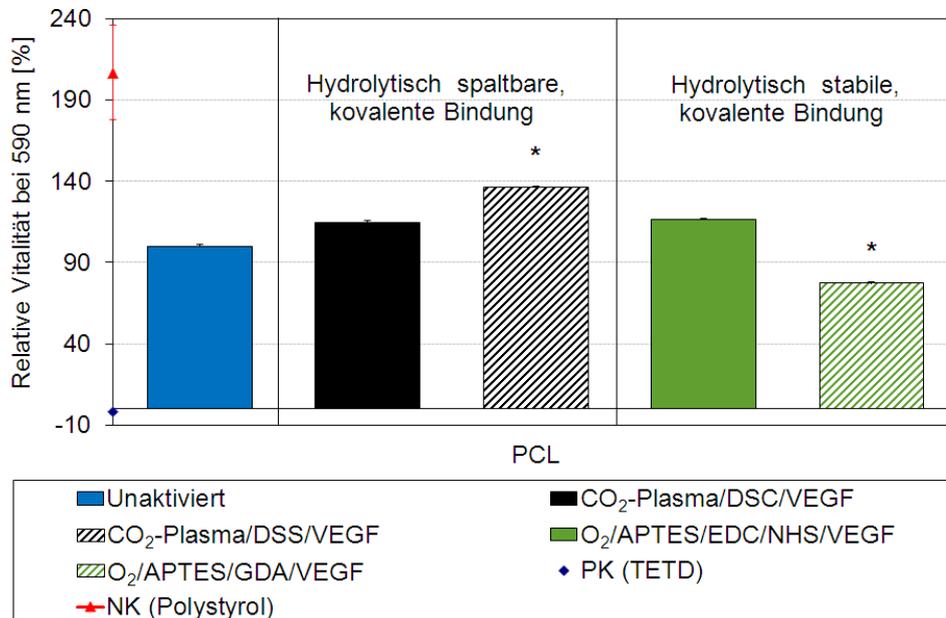


Abb. 35: Relative Vitalität (CQB-Test) von HCAEC *in vitro* auf oberflächenaktivierten und mit VEGF immobilisierten PCL-Filmen (Ø = 6 mm) nach 96 Stunden Inkubation in Bezug zum unaktivierten PCL (= 100 %). NK = Polystyrol, PK = TETD (10⁻⁴ mol/L), n = 8, * = signifikante Abweichungen im Vergleich zum unaktivierten PCL (α = 0,05).

Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus 8 parallel untersuchten Proben berechnet, wobei Tetraethylthiuramdisulfid (TETD, 10⁻⁴ mol/l, Sigma-Aldrich Laborchemikalien

GmbH, Seelze, Deutschland) als Positivkontrolle (PK) und das Zellkulturmedium ohne Zugabe von VEGF als Negativkontrolle (NK) dienten. Für die Untersuchung eines signifikanten Einflusses der verschiedenen Modifikationen auf die Vitalität von HCAECs im Vergleich zum unaktivierten PCL wurde der Mann-Whitney U-Test der SPSS Version 15.01. angewendet, wobei mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ gerechnet wurde. Zur Darstellung des Einflusses der VEGF-Immobilisierung wurde die relative Vitalität von unaktiviertem PCL als 100 % in Abbildung 35 gesetzt.

Für NK ist eine etwa doppelt so hohe relative Zellvitalität wie für unaktiviertes PCL zu beobachten, während die Positivkontrolle mit -2 % einen deutlich zytotoxischen Effekt hervorruft.

Bei der Immobilisierung von VEGF über hydrolytisch spaltbare Esterbindungen mit DSC und DSS zeigen sich höhere Werte als bei unaktiviertem PCL. Für die über DSS beladenen Filme wurde sogar eine signifikant höhere relative Zellvitalität im Vergleich zum unaktivierten PCL nachgewiesen.

Die hydrolytisch stabile Anbindung über GDA an O₂-Plasma/APTES aktivierte Proben zeigt eine signifikant reduzierte relative Zellvitalität während bei EDC/NHS eine leicht erhöhte, nicht signifikante Stoffwechselaktivität gegenüber dem unaktivierten PCL zu erkennen ist.

Zusammenfassend lassen sich für die hydrolytisch spaltbare, kovalente Anbindung von VEGF mit DSC und DSS an CO₂-Plasma aktivierte PCL-Oberflächen höhere relative Zellvitalitäten feststellen als für die hydrolytisch stabile, kovalente Anbindung an O₂-Plasma/APTES aktivierte Oberflächen mit GDA oder EDC/NHS.

7. Diskussion

Der Fokus der Diskussion liegt auf den durchgeführten Oberflächenmodifizierungen der polymeren, biodegradierbaren Biomaterialien PCL und P(3HB) im Vergleich zum in der Medizintechnik für chemische Oberflächenmodifizierungen etablierten PUR. In diesem Rahmen werden die Ergebnisse der verschiedenen nass- und plasmachemischen Oberflächenaktivierungen, mit Schwerpunkt auf der Generierung von NH_2 -Gruppen, diskutiert. Die nach den Oberflächenaktivierungen erforderlichen Immobilisierungstechniken wurden zum einfacheren Nachweis zunächst mit ASS etabliert und danach mit VEGF vollzogen. Außerdem wurden Untersuchungen zur *in vitro* Biokompatibilität der oberflächenaktivierten und mit VEGF modifizierten Polymeroberflächen durchgeführt sowie deren Freisetzung analysiert, um Aussagen zur Effektivität, biologischen Wirksamkeit und möglichen Anwendung der einzelnen Immobilisierungstechniken treffen zu können. Darüber hinaus wurde die Immobilisierung von VEGF über hydrolytisch stabile, kovalente Bindungen derer über hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen gegenübergestellt.

Ergebnisse zur Charakterisierung der Oberflächenaktivierungen

Die chemischen Veränderungen der Oberflächen waren durch die Bestimmung der Kontaktwinkel der nasschemischen sowie der plasmachemischen Methoden der Oberflächenaktivierung eindeutig nachweisbar. So konnte nach basischer Oberflächendegradation von PCL und P(3HB) eine Erniedrigung der Kontaktwinkel gegenüber den unaktivierten Polymeroberflächen durch die Synthese zusätzlicher endständiger Hydroxyl- und Carboxyl-Gruppen nachgewiesen werden. Weiterhin führte die Reaktion mit MDI unter Bildung endständiger Isocyanatgruppen zur Erhöhung der Kontaktwinkel, die sich wiederum nach Ammonolyse durch die Bildung endständiger Aminogruppen erniedrigten.

Die Aktivierung der Polymeroberflächen durch Plasma führte erwartungsgemäß in allen Fällen zu einer Steigerung der Hydrophilie der Oberfläche und stimmt somit mit den Erkenntnissen aus der Literatur überein [80]. Für die Aktivierung mit O_2 -Plasma/APTES konnte für alle untersuchten Polyester eine deutliche Zunahme des Kontaktwinkels nach Anbindung von APTES infolge der unpolaren Anteile des Silans im Vergleich zur vorhergehenden O_2 -Plasma-Aktivierung beobachtet werden. Die Fluoreszenzmessungen (Kap. 3.3) der mit NBD-Cl markierten Aminogruppen bestätigten für PCL und P(3HB) die höchste Beladung durch die Aktivierung mit O_2 -Plasma/APTES. Eine niedrigere Beladung mit Aminogruppen wurde durch die Aktivierung mit MDI/ NH_3 und die geringste Beladung für die Plasmabehandlung mit Ammoniakgas gemessen. Für PUR wurde die höchste Beladung durch die Aktivierung mit MDI/ NH_3 und danach für die Aktivierung mit O_2 -Plasma/APTES erreicht. Die geringste Beladung mit Aminogruppen wurde mit Hilfe von NH_3 -Plasma realisiert. Zu vermuten ist in diesem

Zusammenhang, dass bei der Aktivierung mit O₂-Plasma einzelne funktionelle Ankergruppen ausreichen, um APTES-Moleküle zu binden und die restlichen APTES-Moleküle an der Oberfläche in einem Film zu polymerisieren [125]. Bei der Aktivierung mit NH₃-Plasma entstehen neben den gewünschten Aminogruppen weitere stickstoffhaltige Gruppen, wie z.B. Amidgruppen, die der Reaktion mit NBD-Cl nicht zugänglich sind und somit zu einer geringeren Fluoreszenz der Oberflächen führten [126].

Die quantitative Untersuchung der Aminogruppenbeladung durch fotometrische Bestimmung des Ruhemanns Purpur (Ninhydrin-Test, Kap. 3.4) ergaben für PUR bei der Aktivierung mit MDI/NH₃ eine höhere Beladung mit NH₂-Gruppen als bei den Polyestern. Dies spricht für die erfolgreiche Reaktion der NH-Urethanfunktion unter Bildung eines Allophanats (Abb. 10), während die Beladung auf PCL und P(3HB) aufgrund der in geringerer Anzahl vorhandenen endständigen Hydroxyl- und Carboxyl-Gruppen nach Reaktion mit MDI geringer war. Im Vergleich zu P(3HB) zeigte PCL jedoch eine um knapp 50 % höhere Beladung mit NH₂-Gruppen, so dass auch Unterschiede zwischen beiden Polyestern zu beobachten waren. Wahrscheinliche Ursache ist die geringere Molmasse von PCL (M_n~65.000 g/mol) gegenüber P(3HB) (M_n~760.000 g/mol), womit kürzere Polymerketten und somit mehr endständige OH- und COOH-Gruppen zur Verfügung stehen als bei P(3HB). Rechnerisch ergeben sich für einen PCL-Probekörper (Ø = 6 mm) etwa je 1 µmol mehr Hydroxyl- und Carboxyl-Gruppen als für einen P(3HB)-Probekörper mit gleicher Geometrie und Abmessung. Die Ammoniakplasmabehandlung und die Aktivierung mit O₂-Plasma/APTES waren dagegen so schonend, dass sie nur in geringen Tiefen Aminogruppen generieren [80, 127] und somit die Nachweisgrenze mit dem Ninhydrin-Test unterschritten wurde. Bei der nasschemischen Oberflächen-degradation und anschließenden Reaktion mit MDI/NH₃ hingegen kam es auch in einer größeren Tiefe zur Funktionalisierung mit Aminogruppen, weshalb hier die Anzahl an Aminogruppen in der Polymerprobe insgesamt höher war. Durch die Bulkmodifikation nach Aktivierung mit MDI/NH₃ wurde eine deutliche Bandenausprägung bei einer Messtiefe von bis zu ca. 100 nm (Germaniumkristall, Einfallswinkel von 60 °) [128] im FTIR-ATR-Spektrum (Kap. 3.2) beobachtet. Für die Aktivierung mit O₂-Plasma/APTES und NH₃-Plasma waren hingegen keine Unterschiede im Vergleich zur unaktivierten Probe im IR-Spektrum zu erkennen. Die exemplarischen XPS-Untersuchungen für PCL (Kap. 3.5) bestätigen ebenfalls die Unterschiede in der Aminogruppenbeladung, die mit den unterschiedlichen Aktivierungsverfahren erreicht werden. So wurde für die mit MDI/NH₃ aktivierten PCL-Proben der höchste Stickstoffanteil nachgewiesen, aber mit nur 4,9 % des detektierten Gesamtstickstoffs in Form von Aminogruppen die prozentual geringste Aminogruppenbeladung erreicht. Mögliche Ursachen können Nebenreaktionen sein. So ist die Reaktion des MDI mit den endständigen Hydroxyl- und Carboxyl-Gruppen des PCL unter Bildung einer Urethanbindung beabsichtigt, allerdings können auch einzelne Polymerketten durch Reaktion beider terminaler NCO-

Gruppen des MDI mit einer endständigen Hydroxyl-Gruppe einer Polymerkette vernetzen [130]. Der geringe Anteil generierter Aminogruppen bei der Plasmaaktivierung begründet sich in der Bildung weiterer funktioneller Gruppen wie Amide, Imine oder Nitrile [80]. Dennoch ist mit 11,2 % (Tab. 9) vom Gesamtstickstoffanteil der prozentuale Anteil des Stickstoffs in den generierten Aminogruppen bei der Plasmaaktivierung mit Ammoniakgas höher als bei der Aktivierung mit MDI/NH₃, was weniger Nebenreaktionen bedeutet. Für die Aktivierung mit O₂-Plasma/APTES wurden die geringsten Atomprozent an Stickstoff detektiert, aber mit 26,5 % vom Gesamtstickstoff der höchste prozentuale Anteil von Stickstoff in Form von Aminogruppen und damit auch die höchste Aminogruppenbeladung. Hier ist die Anzahl möglicher Nebenreaktionen am geringsten, wobei aber die Nebenreaktion der Aminogruppen mit den Ethoxygruppen des APTES möglich ist [130].

Als Fazit ist feststellbar, dass durch die nasschemische Behandlung mit MDI/NH₃ nicht nur eine Oberflächenmodifikation der Polymere erreicht wird, sondern auch die Modifizierung des Polymerbulks eine unerwünschte Beeinträchtigung der Polymereigenschaften hervorrufen kann. Dies können einerseits nachteilige Veränderungen der mechanischen Eigenschaften des Polymers infolge Polymerdegradation und andererseits Beeinträchtigungen in der Biokompatibilität der Polymere sein, da die für die chemischen Reaktionen in der Lösung notwendigen toxischen Reagenzien und Lösungsmittel nur durch aufwändige Waschprozesse, wie auch im Rahmen der Arbeit durchgeführt, entfernt werden können.

Für PCL und P(3HB) wird nach Aktivierung mit O₂-Plasma/APTES die höchste Beladung mit Aminogruppen erreicht. Ein weiterer Vorteil der Aktivierung mit O₂-Plasma/APTES ist, dass wie bei der Plasmabehandlung keine morphologischen Veränderungen der Polymeroberflächen resultieren und somit die unerwünschte Bulkmodifikation nahezu ausgeschlossen werden kann (Tab. 14).

Einfluss der Oberflächenaktivierungen im in vitro Zellkontakt

Die *in vitro* Untersuchungen der verschiedenen unaktivierten und aktivierten PCL, P(3HB)- und PUR-Proben im Direktkontakt mit L929-Mausfibroblasten belegten, dass vor allem infolge der nasschemischen Verfahren keine systematische Freisetzung toxischer Substanzen, die einen negativen Einfluss auf die Besiedlung mit Zellen des Zielgewebes haben könnten, erfolgt. Lediglich P(3HB) zeigte nach O₂-Plasmaaktivierung eine statistisch signifikante Reduktion der relativen Zellvitalität im Vergleich zur unaktivierten P(3HB), die jedoch als nicht zytotoxisch zu betrachten ist (Einstufung in Anlehnung an DIN EN ISO 10993-5:2009-10). So scheint die Reduktion der relativen Zellvitalität bei der Aktivierung von P(3HB) mit O₂-Plasma vielmehr durch die Oberfläche an sich bedingt zu sein. Ursache kann somit eine aus der Veränderung der Oberfläche resultierende schlechtere Zelladhäsion sein [9], die eine erniedrigte Zellzahl auf der Probenoberfläche zur Folge hat. Die untersuchten oberflächenmodifizierten Polymere erscheinen somit für die Anwendung als Biomaterialien,

die im direkten Kontakt mit dem Organismus stehen, grundsätzlich geeignet. Dies müsste jedoch durch weitere *in vitro* Untersuchungen zur Aufrechterhaltung der Biofunktionalität der Zellen belegt werden. Darüber hinaus sind weitere *in vivo* Untersuchungen notwendig um die Informationen über die Biokompatibilität der untersuchten Biomaterialien in einer differenzierteren Zell- und Gewebeumgebung ermitteln zu können.

Bei der Untersuchung der oberflächenaktivierten Polymere hinsichtlich ihrer Eignung im Blutkontakt konnte eine deutliche Reduzierung der Aktivierung von Thrombozyten (Kap. 6.1.2) beobachtet werden. Die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten wird meist durch hydrophobe und kationische Oberflächen sowie durch eine hohe Rauigkeit der Oberfläche (Mittelwerte $R_a < 4 \mu\text{m}$ zeigen keinen Einfluss) gefördert [114, 131]. Eine direkte Abhängigkeit zwischen der Zunahme der Hydrophilie der Oberfläche und einer reduzierten Aktivierbarkeit der Thrombozyten konnte im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen jedoch nicht festgestellt werden.

Bei der Untersuchung der plasmatischen Gerinnung (Kap. 6.1.3) war für alle aminogruppenfunktionalisierten Oberflächen eine erhöhte plasmatische Gerinnung gegenüber der unaktivierten Form nachweisbar. Für die mit O_2 -Plasma und CO_2 -Plasma aktivierten Proben wurden geringere Aktivierungen der plasmatischen Gerinnung festgestellt. Die erhöhten Werte für die plasmatische Gerinnung fielen aber dennoch sehr gering aus und lagen unter denen der Negativkontrolle nach 30 Minuten im Direktkontakt mit Heparinplasma. Ausgehend von einem niedrigen Grenzwert von ca. 440 pmol/l Prothrombinfragment F1+2 unter physiologischen Bedingungen [132] wurde dieser Wert in keinem der Versuche überschritten, obwohl mit den Proben ($\varnothing = 15 \text{ mm}$, $A = 353,4 \text{ mm}^2$) eine deutlich höhere Oberfläche getestet wurde als bei koronaren Stents (z.B. $A = 57,2 \text{ mm}^2$ bei 13 mm langen PRO-Kinetic Energy Stents der Firma BIOTRONIK SE & Co.KG, Berlin, Deutschland) üblich. Die Eignung der Aktivierungsmethoden für Anwendungen in Kombination mit PCL, P(3HB) und PUR im Blutkreislauf ist aus hämatologischer Sicht somit gegeben.

Ergebnisse zur ASS-Immobilisierung

Bei der Untersuchung der Freisetzung der über hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen immobilisierten ASS wurde festgestellt, dass nur geringe Massen von ASS freigesetzt werden und somit diese Immobilisierungsvariante nur für hoch wirksame Substanzen geeignet ist, die geringe Wirkstoffdosen für die lokale Wirksamkeit erfordern.

Bei der Betrachtung der verschiedenen Oberflächenaktivierungen sind Unterschiede hinsichtlich der Freisetzung von ASS zu erkennen. So variieren die freigesetzten Massen, der Zeitpunkt der Hydrolyse der Esterbindungen und die Dauer der Freisetzung. So konnte für PCL nach Aktivierung durch MDI/NH_3 , O_2 - und NH_3 -Plasma eine höhere freigesetzte Masse ASS detektiert werden als für unaktiviertes PCL, während bei P(3HB) dies nur nach CO_2 -Plasmaaktivierung zu beobachten ist. Die Betrachtung der freigesetzten Massen zeigt jedoch

für die beiden Polyester eine deutlich geringere Freisetzung als für das PUR, bei dem die Substitution über die NH-Urethanfunktion in jedem Monomerbaustein prinzipiell möglich ist. Auch für den Zeitraum der Freisetzung konnte für die Aktivierungen kein einheitlicher Einfluss zwischen den Polymeren festgestellt werden. So zeigt die Aktivierung mit O₂-Plasma/APTES für PCL und für P(3HB) eine doppelt so lange Freisetzung wie für das unaktivierte Polymer. Dennoch lässt sich bei der Dauer der Freisetzungseräume erkennen, dass für die aminoaktivierten Oberflächen (Carbamatesterbindungen) in einigen Varianten der Aktivierung eine längere Freisetzung zu beobachten war als für die hydroxylaktivierten Oberflächen (Carbonatesterbindungen).

Ergebnisse zur VEGF-Immobilisierung

Die Aktivierungen zur Generierung funktioneller Gruppen an den Polymeroberflächen führten fast ausschließlich zu einer Erhöhung der VEGF-Beladung im Vergleich zur unaktivierten Probe. Die Anzahl der generierten funktionellen Gruppen erscheint jedoch nicht allein entscheidend für die erzielte Beladung an VEGF zu sein. So zeigten die mit NH₃-Plasma aktivierten Proben häufig die höchste Beladung, obwohl hier die geringste Aminogruppenbeladung an der Oberfläche detektiert wurde. Wird eine gewisse Anzahl an funktionellen Gruppen an der Oberfläche überschritten, scheint ein weiterer Anstieg möglicherweise aufgrund sterischer Hinderungen keine Erhöhung der VEGF-Oberflächenbeladung zur Folge zu haben.

Die ermittelten VEGF-Beladungen nach Ankopplung über hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen durch die Crosslinker DSC und DSS wiesen für das jeweilige Polymer deutlichere Unterschiede auf. So konnte für P(3HB) über den Crosslinker DSC mehr VEGF an der Oberfläche immobilisiert werden als über DSS. Bei PCL war es dagegen genau umgekehrt. Ein möglicher Grund für die unterschiedliche Effektivität der Crosslinker kann die Spacerfunktion sein. So konnte über den Crosslinker DSC mit seinem C1-Spacer aufgrund der räumlichen Anordnung mehr VEGF an P(3HB)-Oberflächen angebonden werden, während DSS mit seinem C8-Spacer besser für die Abstände auf PCL-Oberflächen geeignet zu sein schien [86]. Generell sei vermerkt, dass längererkettige Spacer wie GDA und DSS möglicherweise über beide Endgruppen mit der funktionalisierten Oberfläche reagieren können, da sie lang genug sind, um sich entsprechend falten zu können. Weitere mögliche Nebenreaktionen bei der Verwendung von Crosslinkern sind intra- und intermolekulare Bindungen von VEGF, wodurch eventuelle Konformationsänderungen erfolgen, welche die Quantifizierung der VEGF-Beladung durch den ELISA beeinflussen können [133].

Für PCL wurde nach CO₂-Plasmaaktivierung für über DSC immobilisiertes VEGF mit 97 % die höchste Freisetzung nach 3 Tagen erzielt. Gleichzeitig wurden für die Kopplung über DSS deutlich höhere absolute VEGF-Beladungen ermittelt. Mit Ausnahme der unaktivierten Probe, die mit DSS/VEGF umgesetzt wurde, zeigten alle Freisetzungsprofile einen ähnlichen

prozentualen Verlauf und lagen nahe beieinander. Die O₂- und CO₂-Plasma aktivierten Proben setzten dabei meistens länger frei als die unaktivierten Proben.

Für P(3HB) zeigte die O₂-Plasma aktivierte Probe über DSS Kopplung nach 48 Stunden mit 93 % die höchste Freisetzung, obwohl auch hier zuvor die geringste absolute Beladung detektiert wurde. Somit ist kein direkter Zusammenhang zwischen der VEGF-Oberflächenbeladung und -Freisetzung zu erkennen. Hauptsächliche Ursache hierfür ist wahrscheinlich der durchgeführte ELISA zur Bestimmung der Oberflächenbeladung. Zu vermuten ist, dass die Ergebnisse für die Beladung nur einen Teil des insgesamt immobilisierten VEGF darstellen. So könnte durch den ELISA nur oberflächennahes VEGF detektiert werden. Zudem kann es möglich sein, dass während der Beladung über die Crosslinker DSC und DSS intra- und intermolekulares Crosslinking erfolgt, welches die Konformation des VEGF reversibel so verändert, dass die Detektion auf der Oberfläche durch Antikörper im ELISA nicht mehr gewährleistet ist. Nach der Hydrolyse der Bindungen und Freisetzung des VEGF könnte diese Konformationsänderung rückgängig gemacht werden, welches eine ELISA-Messung im Medium wieder ermöglicht. Da funktionelle Gruppen durch plasmachemische Aktivierungen laut Literatur meist nur bis zu 5 nm Eindringtiefe aufweisen [80], muss auch vermutet werden, dass die Immobilisierung des VEGF im Polymerbulk hauptsächlich über Physisorption erfolgt.

Einfluss der VEGF-Immobilisierung auf Endothelzellen in vitro

Es wurde festgestellt, dass die relative Vitalität von HCAEC im Kontakt mit den VEGF beladenen Oberflächen für die Aktivierung mit Hilfe von CO₂-Plasma und die anschließende VEGF-Ankopplung über DSS im Vergleich zur unaktivierten Probe signifikant höher ist. Die mit DSC zur Reaktion gebrachten PCL-Oberflächen zeigten eine geringere Steigerung der relativen Vitalität, was mit der geringeren VEGF-Freisetzung sowie -Beladung einhergeht. Außerdem konnte abgeleitet werden, dass durch die Immobilisierung über hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen im Gegensatz zu hydrolytisch stabilen, kovalenten Bindungen eine stärkere Steigerung der relativen Zellvitalität durch VEGF erfolgt.

Bei der Immobilisierung über hydrolytisch stabile, kovalente Esterbindungen zeigten die HCAEC im Direktkontakt mit zuvor mit O₂-Plasma/APTES aktivierten und anschließend unter Ankopplung von VEGF mit EDC/NHS umgesetzten PCL-Proben eine leicht gesteigerte relative Zellvitalität im Vergleich zu den unaktivierten PCL-Proben. Bei der VEGF-Immobilisierung über GDA wurde dagegen eine signifikante Verringerung der relativen Zellvitalität festgestellt. Die Immobilisierung von Biomolekülen über GDA führte auch in anderen Studien zur Reduktion der Biokompatibilität im Vergleich zur Immobilisierung über NHS/EDC, wobei in diesen Untersuchungen als mögliche Ursache ein zytotoxischer Effekt durch im Polymerbulk verbliebenes GDA nicht ausgeschlossen wurde [134]. Dies verdeutlicht wiederum, dass bei nasschemischen Oberflächenmodifikationen die Einlagerung toxischer Reagenzien in das

Bulkmaterial nicht zu unterschätzen ist und somit gerade für biomedizintechnische Anwendungen, in denen oberflächenmodifizierte Polymere mit dem menschlichen Organismus in Kontakt kommen sollen, der Etablierung der dafür erforderlichen Waschprozesse besondere Bedeutung beigemessen werden muss.

8. Zusammenfassung und Ausblick

An Biomaterialien, die als Implantatwerkstoffe im Blutkontakt zur Anwendung kommen sollen, werden hohe Ansprüche gestellt, die sowohl eine hohe Funktionsfähigkeit und gute Verarbeitbarkeit als auch eine hervorragende Biokompatibilität beinhalten. Für die Gewährleistung der Biokompatibilität ist die Modifizierung der Oberfläche zur Optimierung der Zelle/Gewebe-Biomaterial-Interaktion bei polymeren Biomaterialien eine wesentliche Voraussetzung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb Oberflächenmodifikationen von in der Medizintechnik für Implantatanwendungen im vaskulären Bereich eingesetzten Polymeren, mit dem Ziel der Immobilisierung von Medikamenten und Biomolekülen über unter physiologischen Bedingungen, spaltbare bzw. nicht spaltbare chemische Bindungen untersucht. In diesem Zusammenhang kamen die Polyester Poly(ϵ -caprolacton) (PCL) und Poly(3-hydroxybuttersäure) (P(3HB)) zur Anwendung, die im Monomerbaustein über keine für die chemische Ankopplung erforderlichen funktionellen Gruppen verfügen und für die deshalb verschiedene nass- und plasmachemische Oberflächenaktivierungsprozesse etabliert werden mussten. Als Referenz wurde ein Polyurethan (PUR) verwendet, in dem bereits im Monomerbaustein die chemische Ankopplung von Wirkstoffen durch das Vorhandensein der Urethangruppe gegeben ist.

Unter Verwendung der verschiedenen Charakterisierungsmethoden wie Kontaktwinkelmessungen, FTIR-ATR-Spektroskopie, Fluoreszenzmarkierung, Ninhydrin-Nachweis und XPS-Messungen konnte gezeigt werden, dass die nass- und plasmachemischen Aktivierungsprozesse unterschiedlich hohe Beladungen an funktionellen Gruppen auf den Polymeroberflächen erzeugen. So führte die Aktivierung mit Ammoniak-Plasma beispielsweise zur Generierung oberflächennaher Aminogruppen, während durch die nasschemische Umsetzung mit dem Diisocyanat 4,4'-Methylen-bis(phenylisocyanat) (MDI) und die anschließende Aminolyse mit wässriger Ammoniaklösung auch eine Modifizierung des Polymerbulks resultierte. Die Kombination aus plasma- und nasschemischen Aktivierungen durch Umsetzung mit Sauerstoff-Plasma und 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) stellt ebenfalls eine vielversprechende Methode zur Generierung oberflächennaher endständiger Aminogruppen dar, da durch die Silanisierung mit APTES die höchste Aminogruppenbeladung resultierte und gleichzeitig die Anzahl an möglichen Nebenreaktionen deutlich geringer ist als bei der Aktivierung mit MDI. Durch die Behandlung mit Sauerstoff-Plasma und Kohlenstoffdioxid-Plasma wurden darüber hinaus sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen erzeugt, die in weiteren Prozessschritten der Oberflächenmodifizierung und Wirkstoffankopplung zur Abspaltbarkeit und somit Freisetzung der gebundenen Wirkstoffe über hydrolytisch spaltbare Esterbindungen führten. Somit war durch die unterschiedlichen Oberflächenaktivierungen unter Generierung

von endständigen Amino- bzw. Hydroxylgruppen die gezielte Realisierung von unter physiologischen Bedingungen stabilen Bindungen (Bildung eines Amids, Azomethins bzw. Amins nach vorheriger Generierung von Aminogruppen) bzw. spaltbaren Bindungen (Bildung eines Esters nach vorheriger Generierung von Hydroxylgruppen) möglich.

Um eine mögliche Inkompatibilität der durch die Oberflächenaktivierungen resultierenden Polymeroberflächen ausschließen zu können, wurden Zytotoxizitätsuntersuchungen der Polymere im Direktkontakt mit L929-Mausfibroblasten durchgeführt. Diese bestätigten, dass die verschiedenen Techniken zur Aktivierung der Polymere keinen systematischen, signifikant negativen Einfluss auf die Vitalität der Zellen in Folge der chemischen und physikalischen Oberflächenveränderungen haben.

In Hämokompatibilitätsstudien wurde untersucht, ob die oberflächenaktivierten Polymere bei *in vitro* Kontakt mit humanem thrombozytenreichem Citratplasma die Thrombozyten aktivieren bzw. die plasmatische Gerinnung in humanem, heparinisiertem Blutplasma auslösen. Im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen und den unaktivierten Polymeren konnte festgestellt werden, dass alle aktivierten Polymeroberflächen die Thrombozytenaktivierung verringern, während die mit endständigen Aminogruppen beladenen Polymeroberflächen die plasmatische Gerinnung erhöhen. Für die mit Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxid-Plasma aktivierten Oberflächen hingegen war eine Verringerung der plasmatischen Gerinnung im Vergleich zu den unaktivierten Polymeren zu beobachten.

Außerdem konnte im Rahmen der Arbeit gezeigt werden, dass durch die Einführung spaltbarer Crosslinker die *in vitro* Freisetzung von Modellwirkstoffen wie Acetylsalicylsäure (ASS) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) durch die Spaltung von Esterbindungen gelingt. Zur Vereinfachung der Nachweisbarkeit der Oberflächenmodifizierungen wurden die Untersuchungen zunächst mit ASS durchgeführt, die danach auf das Biomolekül VEGF übertragen wurden. Die Untersuchung verschiedener Crosslinker bewies dabei die Notwendigkeit eines Screenings von Crosslinkern verschiedener Kettenlängen, um die gewünschten, für eine biologische Wirksamkeit ausreichenden Beladungen mit bioaktiven Substanzen zu erreichen.

Im Rahmen der biologischen *in vitro* Biokompatibilitätsstudien wurde demonstriert, dass die über hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen mit VEGF beladenen Polymere eine signifikant höhere relative Zellvitalität im Direktkontakt mit humanen arteriellen Endothelzellen aufweisen als die unbeladenen Polymere und somit eine geeignete Oberflächenmodifikation beispielsweise für polymerbasierte Gefäßprothesen darstellen könnten.

Als Ausblick kann festgestellt werden, dass die etablierten Oberflächenmodifikationen in Kombination mit einer Beschichtungstechnik, welche inkorporierte Wirkstoffe diffusionskontrolliert aus einer polymerbasierten Beschichtung in höheren Wirkstoffdosen freisetzt, angewendet werden könnten. Die Biofunktionalisierung der Oberflächen kann dabei, entspre-

chend den Erfordernissen der Biomaterial- bzw. Implantatregion, über unter physiologischen Bedingungen stabile bzw. spaltbare kovalente Bindungen ausgelegt werden. Die Eignung der etablierten Methoden zur Optimierung der Zelle/Gewebe-Biomaterial-Interaktion sollte in weiteren *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen nachgewiesen werden, um das Potential der plasmachemischen und nasschemischen Oberflächenmodifikationen für spätere Implantatanwendungen abschließend beurteilen zu können.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|--|
| AK | Antikörper |
| anti-VEGF | AK gegen VEGF |
| APTES | 3-Aminopropyltriethoxysilan |
| as | Asymmetrisch |
| ASS | Acetylsalicylsäure |
| BSA | Bovine serum albumin |
| CQB | CellQuanti-Blue™ |
| DES | Drug-Eluting Stent |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| ePTFE | Expanded Polytetrafluorethylen |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| GDA | Glutaraldehyd |
| HRP | Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase) |
| MEA | Monoethanolamin |
| MDI | 4,4'-Methylen-bis(phenylisocyanat) |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOH | Natronlauge |
| NBD-CL | 4-Chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol |
| NHS | N-Hydroxysuccinimid |
| P(3HB) | Poly(3-hydroxybuttersäure) |
| PA | Polyamide |
| PAP | Peroxidase-Anti-Peroxidase |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PC | Polycarbonate |
| PCL | Poly(ε-caprolacton) |
| PDGF | Platelet Derived Growth Factor |
| PE | Polyethylen |
| PEEK | Polyetheretherketon |
| PET | Poly(ethylenterephthalat) |
| PGA | Polyglycolid |
| PHA | Polyhydroxyalkanoate |
| PHEMA | Polyhydroxyethylmethacrylat |
| PLA | Polylactid |
| PMMA | Polymethylmethacrylat |
| PP | Polypropylen |

| | |
|----------|---|
| PRP | Platelet reiches Plasma |
| PSU | Polysulfon |
| PTCA | perkutane transluminale koronare Angioplastie |
| PTFE | Polytetrafluorethylen |
| PTHF | Polytetrahydrofuran |
| PUR | Pellethan, ein Polyetherurethan |
| PVC | Poly(vinylchlorid) |
| REM | Rasterelektronenmikroskop |
| s | symmetrisch |
| TETD | Tetraethylthiuramdisulfid |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin |
| Tween 20 | Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| w | schwach |

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

| | |
|--|----|
| Abb. 1: Lokale Reaktion des biologischen Systems auf Biomaterialien (Fremdkörperreaktion) nach Ratner et al. [14]. | 15 |
| Abb. 2: Strukturformel des Polyesters PCL. | 25 |
| Abb. 3: Strukturformel des Polyesters P(3HB). | 26 |
| Abb. 4: Strukturformel von Pellethane®. | 28 |
| Abb. 5: Strukturformel von Acetylsalicylsäure (1). | 29 |
| Abb. 6: Darstellung der VEGF (2) rezeptorbindenden Domäne, 8. – 109. Aminosäure. Abbildung aus der Protein Datenbank (PDB ID: 2VPF) [66]. | 30 |
| Abb. 7: Schema zur plasmachemischen Oberflächenaktivierung von Polymeren durch NH ₃ -Plasma unter Bildung terminaler NH ₂ -Gruppen (3). | 32 |
| Abb. 8: Schema zur Oberflächenaktivierung von Polymeren mit O ₂ -Plasma/APTES: I. Generierung terminaler OH-Gruppen (4) durch O ₂ -Plasma, II. Reaktion mit APTES unter Bildung eines aminofunktionalisierten Silylethers (5). | 32 |
| Abb. 9: Reaktionsschema der nasschemischen Oberflächenaktivierung von P(3HB) und PCL mit MDI/NH ₃ : I. Reaktion der Polyester nach basischer Oberflächenhydrolyse (6) mit MDI, II. Hydrolyse unter Abspaltung von Kohlenstoffdioxid zu den primären Aminen (7) und (8), III. Ammonolyse zu den Harnstoffderivaten (9) und (10). | 33 |
| Abb. 10: Reaktionsschema der nasschemischen Oberflächenaktivierung von PUR (11) mit MDI/NH ₃ : I. Reaktion mit MDI unter Bildung eines Allophanat, II. Hydrolyse unter Abspaltung von Kohlenstoffdioxid zu dem primären Amin (12), III. Ammonolyse zum Harnstoffderivat (13). | 34 |
| Abb. 11: Schema zur plasmachemischen Oberflächenaktivierung von Polymeren durch CO ₂ -Plasma unter Bildung terminaler COOH-Gruppen (14). | 35 |
| Abb. 12: Schematisch vereinfachte Darstellung von PCL-, P(3HB)- und PUR-Oberflächen mit terminal generierten NH ₂ -Gruppen nach Aktivierung mit MDI/NH ₃ , NH ₃ -Plasma und O ₂ -Plasma/APTES (A) und von PCL- und P(3HB)-Oberflächen mit terminal erzeugten OH- und COOH-Gruppen nach Aktivierung mit O ₂ - und CO ₂ -Plasma (B). | 37 |
| Abb. 13: Reaktionsschema zur Oberflächenmodifizierung von aminoaktivierten Polymeren mit VEGF (2) und EDC (15): I. Bildung eines O-Acylisoharnstoff-Derivats, II. Umsetzung mit NHS (16) zu einem NHS-Ester, III. Reaktion mit aminoaktivierten polymeren Oberflächen unter Bildung einer Amidbindung (17). | 38 |
| Abb. 14: Reaktionsschema zur Oberflächenmodifizierung von aminoaktivierten Polymeren mit VEGF (2) unter Verwendung von Glutaraldehyd (18) als Crosslinker: I: Kopplung | |

| | | |
|----------|--|----|
| | über Bildung von Azomethin (Schiffsche Base) (19) II : Kopplung durch Michael-Addition unter Bildung eines sekundären Amins (20) | 39 |
| Abb. 15: | Reaktionsschema zur Oberflächenmodifizierung von mit NH ₂ -Gruppen (A) und OH-Gruppen (B) aktivierten Polymeren mit ASS mit Hilfe von DSC (21) als Crosslinker: I . Ankopplung funktioneller Succinimidylgruppe an die NH ₂ - bzw. OH-Gruppen der aktivierten Polymeroberfläche über einen Carbamat- (A I) bzw. Carbonatester (B I) unter Abspaltung von NHS, II . Ankopplung von ASS unter Bildung eines Carbamat- (A II) bzw. Carbonatesters (B II) und unter Abspaltung von NHS..... | 41 |
| Abb. 16: | Reaktionsschema zur Oberflächenmodifizierung von mit OH-Gruppen aktivierten Polymeren mit VEGF (2) unter Verwendung von DSC (21) als Crosslinker: I . Ankopplung funktioneller Succinimidylgruppen auf den durch OH-Gruppen aktivierten Polymeroberflächen über einen Carbonatester unter Abspaltung von NHS, II . Ankopplung von VEGF (2) über einen Carbamatester (24) unter Abspaltung von NHS. Aufgrund der höheren Nukleophilie der NH ₂ -Gruppen gegenüber den OH-Gruppen wurden nur diese bei VEGF im Reaktionsschema betrachtet. | 42 |
| Abb. 17: | Reaktionsschema der Hydrolyse der gebildeten Carbamat- (22) und Carbonatester (23) unter Freisetzung von ASS (1) , CO ₂ und den jeweiligen mit NH ₂ - bzw. OH-Gruppen aktivierten polymeren Oberflächen. Die Hydrolyse von ASS zur Salicylsäure wurde nicht dargestellt, bei der Detektion der Freisetzung aber berücksichtigt. .. | 42 |
| Abb. 18: | Reaktionsschema der Hydrolyse des Carbamatesters (24) zu VEGF (2) , CO ₂ und den mit OH-Gruppen aktivierten polymeren Oberflächen..... | 43 |
| Abb. 19: | Reaktionsschema zur Oberflächenmodifizierung von mit OH-Gruppen aktivierten Polymeren mit VEGF (2) unter Verwendung von DSS (25) als Crosslinker: I . Ankopplung von DSS an die OH-Gruppen der aktivierten Polymeroberfläche über eine Esterbindung unter Abspaltung von NHS, II . Ankopplung von VEGF (2) an die Polymeroberfläche über eine Amidbindung (26) unter Abspaltung von NHS. Aufgrund der höheren Nukleophilie der NH ₂ -Gruppen gegenüber den OH-Gruppen wurden nur diese vom VEGF im Reaktionsschemata betrachtet..... | 44 |
| Abb. 20: | Reaktionsschema zur Hydrolyse von (26) zu VEGF mit organischem Rest (27) und den mit OH-Gruppen aktivierten polymeren Oberflächen..... | 45 |
| Abb. 21: | Schema der Reaktion von NBD-Cl (28) mit terminalen NH ₂ -Gruppen polymerer Oberflächen zu (29) | 51 |
| Abb. 22: | Schema der Reaktion von Ninhydrin (30) mit terminalen NH ₂ -Gruppen polymerer Oberflächen zu dem fotometrisch messbaren Ruhemanns Purpur (31) | 52 |
| Abb. 23: | Aminogruppenbeladung von PCL- und P(3HB)-Filmen (n = 3) nach Oberflächen-degradation mit NaOH, Umsetzung mit MDI und anschließender Reaktion mit NH ₃ | |

| | |
|--|----|
| im Vergleich mit PUR nach Umsetzung mit MDI und anschließender Reaktion mit NH ₃ (Kap. 2.3.1). | 53 |
| Abb. 24: Schema der Reaktion von PFBA (32) mit terminalen NH ₂ -Gruppen polymerer Oberflächen zu (33). | 55 |
| Abb. 25: <i>In vitro</i> Freisetzung von an PCL-, P(3HB)- und PUR-Proben mit DSC über hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen (Verbindungen 22 – 23 , Kap. 2.4.2) gebundener ASS in PBS (pH 7,4) bei 37 °C. | 60 |
| Abb. 26: Schematische Darstellung des PAP-ELISA: I. Ankopplung von VEGF (2) an die Polymeroberfläche, II. Blocken freier Stelle an der Oberfläche durch Bovines Serum Albumin (BSA) (34), um unspezifische Physisorption von Antikörpern zu vermeiden, III. Physisorption des primären AK (anti-VEGF, Wirt Ziege) (35) an VEGF, IV. Physisorption des sekundären AK (anti-Goat mit HRP markiert, Wirt Maus) (36) an primären AK, V. Physisorption des mit HRP markierten PAP-Komplexes (Wirt Ziege) (37) an sekundären AK, VI. Zugabe des farblosen Diamin TMB (38) und dessen Umwandlung in das fotometrisch messbare Diimin (39). | 63 |
| Abb. 27: Schematische Darstellung des ABC-ELISA zur Detektion von VEGF auf Polymeroberflächen: I. Ankopplung von VEGF (2) an die Polymeroberfläche, II. Blocken freier Stellen an der Oberfläche durch BSA (34), um unspezifische Physisorption von Antikörpern zu vermeiden, III. Physisorption des biotinylierten primären AK (anti-VEGF) (40) an VEGF, IV. Physisorption des mit HRP markierten Streptavidin (41) an biotinylierten primären AK, V. Zugabe des farblosen Diamin TMB (38) und Umwandlung in das fotometrisch messbare Diimin (39). | 64 |
| Abb. 28: Massen der mit HRP markierten Antikörper (sekundärer AK und PAP-Komplex) für VEGF nach Kopplung über hydrolytisch stabile, kovalente Bindungen in wässrigen Medien mit Hilfe der Crosslinker EDC/NHS und GDA an PCL-, P(3HB)- und PUR-Filme (Ø = 6 mm) im PAP-ELISA, n = 5. | 66 |
| Abb. 29: Massen der mit HRP markierten Antikörper (sekundärer AK und PAP-Komplex) für VEGF nach Kopplung über hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen in organischen Lösungsmitteln mit Hilfe der Crosslinker DSC und DSS an PCL- und P(3HB)-Filme (Ø = 6 mm) im PAP-ELISA, n = 5. | 67 |
| Abb. 30: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA zur Detektion von freigesetztem VEGF: I. Physisorption des unmarkierten primären AK (35) an die Oberflächen der Vertiefungen von Mikrotiterplatten, II. Blocken freier Stelle an der Oberfläche durch BSA (34), um unspezifische Physisorption von Antikörpern und VEGF zu vermeiden, III. Physisorption von VEGF (2) an die unmarkierten primären AK (35), IV. Physisorption eines biotinylierten AK (anti-VEGF) (40) an immobilisiertes VEGF, V. Physisorption des mit HRP markierten Streptavidin (41) an biotinylierten AK und | |

| | |
|---|-----|
| Umwandlung des farblosen Diamin TMB (38) in das fotometrisch messbare Diimin (39)..... | 70 |
| Abb. 31: <i>In vitro</i> Freisetzung von mit VEGF beladenen PCL- und P(3HB)-Proben ($\varnothing = 6$ mm, n = 1) in Diluent A des RayBio Human VEGF ELISA Kit [®] (Ray Biotech Inc., Norcross GA, USA) bei 37 °C; Freisetzung über Hydrolyse der Verbindungen (22) und (23) entsprechend Kap. 2.4.2..... | 71 |
| Abb. 32: Relative Vitalität (CQB-Test) von L929 Mausfibroblasten <i>in vitro</i> auf oberflächenaktivierten PCL-, P(3HB) und PUR-Filmen ($\varnothing = 6$ mm) nach 48 Stunden Inkubation in Bezug zur Negativkontrolle (NK = Polystyrol), PK = ZEDC, n = 6, * = signifikante Abweichungen im Vergleich zum unaktivierten Polymer. | 74 |
| Abb. 33: Spezifische Aktivität von β -Thromboglobulin <i>in vitro</i> in humanem PRP bei Kontakt mit verschiedenen unaktivierten und aktivierten Polymeren nach 30 Minuten, NK (0 min) = Aktivität vor Testbeginn und NK (30 min) = Aktivität nach 30 Minuten in Kontakt zu Polystyrol, PK = Thrombin (2 IU/ml PRP) bei 338 IU/ml, n = 2. | 76 |
| Abb. 34: Konzentration an gebildetem Prothrombinfragment F1+2 <i>in vitro</i> in humanem Heparinplasma bei Kontakt mit verschiedenen unaktivierten und aktivierten Polymeren nach 30 Minuten, NK (0 min) = Konzentration vor Testbeginn und NK (30 min) = Konzentration nach 30 Minuten in Kontakt zu Polystyrol, PK = Kaolinit (0,02 mol/l) liegt bei 1188 pmol/l, n = 2. | 78 |
| Abb. 35: Relative Vitalität (CQB-Test) von HCAEC <i>in vitro</i> auf oberflächenaktivierten und mit VEGF immobilisierten PCL-Filmen ($\varnothing = 6$ mm) nach 96 Stunden Inkubation in Bezug zum unaktivierten PCL (= 100 %). NK = Polystyrol, PK = TETD (10^{-4} mol/L), n = 8, * = signifikante Abweichungen im Vergleich zum unaktivierten PCL ($\alpha = 0,05$). .. | 80 |
| Abb. 36: Schema der Ankopplung von ASS (1) an Polymeroberflächen mit NH ₂ - (A) und OH-Gruppen (B): I. Ankopplung von DSS (25) über eine funktionelle Succinimidylgruppe unter Abspaltung von NHS und Bildung einer Amidbindung (A) bzw. Esterbindung (B), II. Ankopplung von ASS (1) über die zweite funktionelle Succinimidylgruppe des DSS unter Abspaltung von NHS und Bildung einer Esterbindung (A und B) unter Bildung von (42) und (43). | 117 |
| Abb. 37: Schema der hydrolytischen Spaltung der Esterbindung von (42) unter Abspaltung von ASS. | 118 |
| Abb. 38: Schema der hydrolytischen Spaltung von (43): I. Hydrolyse der Esterbindung unter Abspaltung von der Polymeroberfläche (A I) bzw. unter Abspaltung von ASS (1 , B I), II. Hydrolyse der Esterbindung unter Abspaltung von ASS (1) und Octandisäure (44 , A II) bzw. unter Abspaltung der Octandisäure von der Polymeroberfläche (44 , B II). | 119 |

| | |
|--|-----|
| Abb. 39: FTIR-Spektren der mit MDI/NH ₃ aktivierten PCL-Oberflächen in einzelnen Stufen der Aktivierung im Vergleich zur unaktivierten Probe. | 120 |
| Abb. 40: FTIR-Spektren der mit MDI/NH ₃ aktivierten P(3HB)-Oberflächen in einzelnen Stufen der Aktivierung im Vergleich zur unaktivierten Probe. | 121 |
| Abb. 41: FTIR-Spektren der mit MDI/NH ₃ aktivierten PUR-Oberflächen in einzelnen Stufen der Aktivierung im Vergleich zur unaktivierten Probe. | 122 |
| Abb. 42: Kalibrierung der Masse der mit HRP markierten Antikörper zur Detektion von VEGF gegen die gemessene Absorption beim indirekten PAP-ELISA (A), der VEGF-Masse gegen die gemessene Absorption beim indirekten ABC-ELISA (B) und die resultierende Kalibration der Masse HRP markierter Antikörper des PAP-ELISA gegen die VEGF-Masse (C). | 123 |

Tabellen

| | |
|--|----|
| Tab. 1: Auswahl wichtiger medizinisch eingesetzter biostabiler Polymere und deren Anwendungsgebiete [9]. | 12 |
| Tab. 2: Überblick über biodegradierbare aliphatische Polyester und deren bekannteste Vertreter, eingeteilt nach deren chemischen Struktur. | 14 |
| Tab. 3: Übersicht über die Reaktionsbedingungen der nasschemischen Oberflächenaktivierung von PCL, P(3HB) und PUR mit MDI/NH ₃ | 35 |
| Tab. 4: Übersicht über die Reaktionsbedingungen der plasmachemischen Oberflächenaktivierung von PCL und P(3HB) in der Femtoplasmaanlage (Generator: f = 13,56 MHz; Temperatur: <40 °C; Druck: 0,3 mbar). | 36 |
| Tab. 5: Reaktionsbedingungen zur Kopplung von ASS und VEGF an chemisch oberflächenaktivierte PCL-, P(3HB)- und PUR-Filme mit den Crosslinkern DSC und DSS. | 45 |
| Tab. 6: Statische Kontaktwinkelmessungen von Wasser, nach Methode des liegenden Tropfens, auf oberflächenaktivierten PCL-, P(3HB)- und PUR-Filme, n = 24. | 47 |
| Tab. 7: Zuordnung der Peaks der FTIR-Spektren des unaktivierten und der Reaktionsstufen von MDI/NH ₃ -aktivierten PCL-, P(3HB)- und PUR-Filmen (Tab. 3) zu den Schwingungsdaten wichtiger Molekülgruppen. | 49 |
| Tab. 8: Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen der mit NBD-Cl gelabelten aminofunktionalisierten Polymeroberflächen von PCL und P(3HB) in relativen Prozent, n = 5, wobei die jeweilige effektivste Aktivierung eines Polymers als 100 % festgelegt wurde (für PUR nur MDI/NH ₃ Aktivierung charakterisiert). | 52 |
| Tab. 9: Elementzusammensetzung (in Atom%) von PCL-Oberflächen bis zu einer Messtiefe von 3,4 nm im unaktivierten Zustand und nach Aktivierung mit NH ₃ -Plasma, MDI/NH ₃ bzw. O ₂ -Plasma/APTES. | 55 |

| | |
|---|-----|
| Tab. 10: Übersicht der untersuchten Proben, deren Eigenschaften und Reaktionsbedingungen während der Ankopplung von ASS. Details zu den Aktivierungen in Kapitel 2.3 bzw. zur Ankopplung in Kapitel 2.4. | 56 |
| Tab. 11: Statische Kontaktwinkelmessungen von Wasser, nach Methode des liegenden Tropfens, auf Polymerfilmen nach Oberflächenaktivierung und anschließender Immobilisierung von ASS (n = 16)..... | 57 |
| Tab. 12: Elementzusammensetzung (in Atom%) von PCL-Oberflächen bis zu einer Messtiefe von 3,4 nm im unaktivierten und mit NH ₃ -Plasma aktivierten Zustand nach Immobilisierung von ASS durch Crosslinking mit DSC..... | 58 |
| Tab. 13: Übersicht der untersuchten Proben, deren Eigenschaften und Reaktionsbedingungen während der Ankopplung von VEGF. Details zu den Aktivierungen in Kapitel 2.3 und zur Ankopplung in Kapitel 2.4..... | 61 |
| Tab. 14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM, Philips XL30 ESEM, 10 kV bei 10 ⁻⁷ mbar) der Morphologie der aminofunktionalisierten Biomaterialoberflächen (mit Gold besputtert durch Agar Sputter Coater 109, Plano GmbH Wetzlar, 120 s bei 0,2 mbar und 25 mA). PCL unaktiviert (A), nach Aktivierung mit NH ₃ -Plasma (B), mit O ₂ -Plasma/APTES (C) und mit MDI/NH ₃ (D). P(3HB) unaktiviert (E), nach Aktivierung mit NH ₃ -Plasma (F), mit O ₂ -Plasma/APTES (G) und mit MDI/NH ₃ (H). PUR unaktiviert (I) und nach Aktivierung mit MDI/NH ₃ (J). | 115 |
| Tab. 15: Berechnete Massen für die VEGF-Beladung aus dem indirekten PAP-ELISA mit Hilfe des indirekten ABC-ELISA für PCL, P(3HB) und PUR-Probekörper (Ø = 6 mm); GDA und EDC/NHS für mit O ₂ - und CO ₂ -Plasma aktivierte Proben nicht untersucht, da kein Crosslinking zwischen Polymer und Protein; DSS und DSC nur für CO ₂ - und O ₂ -Plasma aktivierte Proben für Freisetzungsstudien untersucht. | 124 |

Literaturverzeichnis

- [1] Schneider R, Knüchel-Clarke R, Neuss S. Mesenchymale Stammzellen und ihre Interaktionen mit Biomaterialien. *Pathologie* 2011; [Suppl 2] 32:296–303.
- [2] Flemming RG, Murphy CJ, Abrams GA, Goodman SL, Nealey PF. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials* 1999; 20(6):573–88.
- [3] Sternberg K, Grabow N, Petersen S, Weitschies W, Harder C, Ince H et al. Advances in coronary stent technology - active drug-loaded stent surfaces for prevention of restenosis and improvement of biocompatibility. *Current Pharmaceutical Biotechnology*; 14(1):76–90.
- [4] Goddard JM, Hotchkiss JH. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science* 2007; 32(7):698–725.
- [5] Epple M. *Biomaterialien und Biomineralisation*. Wiesbaden: Teubner; 2003.
- [6] Wintermantel E, Ha S-W. *Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen*. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag; 1998.
- [7] Bremus-Köbberling EA. *Strukturierung und Modifizierung von Polymeren mit UV-Laserstrahlung für Life Science Anwendungen [Dissertation]*. Aachen: Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen; 2004.
- [8] Sternberg K. *Funktionalisierte, degradierbare Polymerbeschichtungen zur lokalen Freisetzung von Wirkstoffen: Entwicklung und Charakterisierung von Drug-Eluting Stents für verschiedene medizinische Indikationen [Habilitation]*. Rostock: Univ. Rostock; 2008.
- [9] Wintermantel E, Ha S. *Medizintechnik - Life Science Engineering*. 5. überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2009.
- [10] Potts JE, Clendinnings RA, Ackart WB, Niegisch WD. The biodegradability of synthetic polymers. *Polymer science and technology* 1973; 3:61–79.
- [11] Diamond MJ, Freedman B, Gaibaldi JA. Biodegradable polyester films. *International Biodeterioration Bulletin* 1975; 2:127–32.
- [12] Fields RD, Rodriguez F, Finn RK. Microbial degradation of polyesters: Polycaprolactone degraded by *P. pullulans*. *J. Appl. Polym. Sci.* 1974; 18(12):3571–9.
- [13] Tokiwa Y, Suzuki T. Hydrolysis of polyesters by lipases. *Nature* 1977; 270(5632):76–78.
- [14] Ratner B, Hoffman A, Schoen F, Lemons J. *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*. Acad. Press; 2008.

- [15] Tanzi MC, Bozzini S, Candiani G, Cigada A, Nardo L de, Farè S et al. Trends in biomedical engineering: focus on Smart Bio-Materials and Drug Delivery. *J Appl Biomater Biomech* 2011; 9(2):87–97.
- [16] von der Mark K, Park J, Bauer S, Schmuki P. Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix. *Cell Tissue Res.* 2010; 339(1):131–53.
- [17] Desmet T, Morent R, De GN, Leys C, Schacht E, Dubruel P. Nonthermal Plasma Technology as a Versatile Strategy for Polymeric Biomaterials Surface Modification: A Review. *Biomacromolecules* 2009; 10(9):2351–78.
- [18] Hepp W, Kogel H. *Gefäßchirurgie*. München: Urban & Fischer Verlag; 2007.
- [19] Khan W, Farah S, Domb AJ. Drug eluting stents: Developments and current status. *Journal of Controlled Release* 2012; 161(2):703–12.
- [20] Larena-Avellaneda A. Gefäßkunst und Kunstgefäße - von den Anfängen der Gefäßchirurgie zum modernen Gefäßersatz. *Viszeralchirurgie* 2007; 42(2):108–15.
- [21] Kühnl A, Jauch KW, Kopp R. Mechanismen der arteriellen Restenose und Therapieansätze zur Prävention. *Gefäßchirurgie* 2006; 11(5):347–55.
- [22] van Belle E, Tio FO, Chen D, Maillard L, Kearney M, Isner JM. Passivation of metallic stents after arterial gene transfer of phVEGF165 inhibits thrombus formation and intimal thickening. *Journal of the American College of Cardiology* 1997; 29(6):1371–1379.
- [23] Van Belle E, Tio FO, Couffinhal T, Maillard L, Passeri J, Isner JM. Stent Endothelialization: Time Course, Impact of Local Catheter Delivery, Feasibility of Recombinant Protein Administration, and Response to Cytokine Expedition. *Circulation* 1997; 95(2):438–48.
- [24] van Belle E, Maillard L, Tio FO, Isner JM. Accelerated endothelialization by local delivery of recombinant human vascular endothelial growth factor reduces in-stent intimal formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; 235(2):311–6.
- [25] Labet M, Thielemans W. Synthesis of polycaprolactone: A review. *Chemical Society Reviews* 2009; 38(12):3484–504.
- [26] van de Velde K, Kiekens P. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. *Polymer Testing* 2002; 21(4):433–42.
- [27] Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* 2010; 35(10):1217–56.
- [28] Doi Y, Kunioka M, Nakamura Y, Soga K. Biosynthesis of copolyesters in *Alcaligenes eutrophus* H16 from carbon-13 labeled acetate and propionate. *Macromolecules* 1987; 20(12):2988–91.

- [29] Hazer B. Amphiphilic Poly(3-hydroxy alkanate)s: Potential Candidates for Medical Applications. *International Journal of Polymer Science* 2010; 2010:8.
- [30] Steinbüchel A, Valentin HE. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters* 1995; 128(3):219–28.
- [31] Lee SY, Choi JI. Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. *Polymer Degradation and Stability* 1998; 59(1-3):387–93.
- [32] Slater SC, Voige WH, Dennis DE. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *Journal of Bacteriology* 1988; 170(10):4431–6.
- [33] Sim SJ, Snell KD, Hogan SA, Stubbe J, Rha C, Sinskey AJ. PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo. *Nature Biotechnology* 1997; 15(1):63–7.
- [34] Jedlinski Z, Kurcok P, Lenz RW. First Facile Synthesis of Biomimetic Poly-(R)-3-hydroxybutyrate via Regioselective Anionic Polymerization of (S)- β -Butyrolactone. *Macromolecules* 1998; 31(19):6718–20.
- [35] Steinbüchel A, Doi Y. *Biopolymers*. Weinheim, Cambridge: Wiley-VCH; 2002.
- [36] Gogolewski S, Jovanovic M, Perren SM, Dillon JG, Hughes MK. Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA). *Journal of Biomedical Materials Research* 1993; 27(9):1135–48.
- [37] Hocking PJ, Marchessault RH. Biopolyester. In: GJL G, editor. *Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers*. Glasgow: Blackie; 1994. p. 48–96 .
- [38] Reusch RN, Huang R, Kosk-Kosicka D. Novel components and enzymatic activities of the human erythrocyte plasma membrane calcium pump. *FEBS Letters* 1997; 412(3):592–6.
- [39] Reusch RN, Sparrow AW, Gardiner J. Transport of poly-beta-hydroxybutyrate in human plasma. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* 1992; 1123(1):33–40.
- [40] Seebach D, Brunner A, Burger HM, Schneider J, Reusch RN. Isolation and ¹H-NMR spectroscopic identification of poly(3-hydroxybutanoate) from prokaryotic and eukaryotic organisms. Determination of the absolute configuration (R) of the monomeric unit 3-hydroxybutanoic acid from *Escherichia coli* and spinach. *European Journal of Biochemistry* 1994; 224(2):317–28.
- [41] Ebert G. *Biopolymere – Struktur und Eigenschaften*. Stuttgart: B. G. Teubner; 1993.

- [42] Bledzki AK, Gassan J, Heyne M. Auswirkungen von Sterilisationsverfahren auf biologisch abbaubare Kunststoffe. *Angewandte Makromolekulare Chemie* 1994; 219(1):11–26.
- [43] Holmes PA. Sterilised powders of Poly (3-hydroxybutyrate). Publication Number 2160208 (A); 1985.
- [44] Miller ND, Williams DF. On the biodegradation of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) homopolymer and poly-beta-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers. *Biomaterials* 1987; 8(2):129–37.
- [45] Artsis MI, Bonartsev AP, Iordanskii AL, Bonartseva GA, Zaikov GE. Biodegradation and Medical Application of Microbial Poly(3-hydroxybutyrate). *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 2010; 523:21–49.
- [46] Ciardelli G, Saad B, Hirt T, Keiser O, Neuenschwander P, Suter UW et al. Phagocytosis and biodegradation of short-chain poly [(R)-3-hydroxybutyric acid] particles in macrophage cell line. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1995; 6(12):725–30.
- [47] Saad B, Ciardelli G, Matter S, Welti M, Uhlschmid GK, Neuenschwander P et al. Cell response of cultured macrophages, fibroblasts, and co-cultures of Kupffer cells and hepatocytes to particles of short-chain poly[(R)-3-hydroxybutyric acid]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1996; 7(1):56–61.
- [48] Saad B, Ciardelli G, Matter S, Welti M, Uhlschmid GK, Neuenschwander P et al. Characterization of the cell response of cultured macrophages and fibroblasts to particles of short-chain poly[(R)-3-hydroxybutyric acid]. *Journal of Biomedical Materials Research* 1996; 30(4):429–39.
- [49] Saad B, Matter S, Ciardelli G, Uhlschmid GK, Welti M, Neuenschwander P et al. Interactions of osteoblasts and macrophages with biodegradable and highly porous polyesterurethane foam and its degradation products. *Journal of Biomedical Materials Research* 1996; 32(3):355–66.
- [50] Howard GT. Biodegradation of polyurethane: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 2002; 49(4):245–52.
- [51] Howarter JA, Youngblood JP. Surface modification of polymers with 3-aminopropyltriethoxysilane as a general pretreatment for controlled wettability. *Macromolecules* 2007; 40(4):1128–32.
- [52] Pinchuk L. A review of the biostability and carcinogenicity of polyurethanes in medicine and the new generation of 'biostable' polyurethanes. *Journal of biomaterials science. Polymer edition* 1994; 6(3):225–67.

- [53] Owida A, Chen R, Patel S, Morsi Y, Mo X. Artery vessel fabrication using the combined fused deposition modeling and electrospinning techniques. *Rapid Prototyping Journal* 2011; 17(1):37–44.
- [54] Grad S, Kupcsik L, Gorna K, Gogolewski S, Alini M. The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. *Bio-materials* 2003; 24(28):5163–71.
- [55] Pfister LA, Papaloizos M, Merkle HP, Gander B. Nerve conduits and growth factor delivery in peripheral nerve repair. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2007; 12(2):65–82.
- [56] Ashton JH, Ayyalasomayajula A, Simon BR, Vande Geest JP. Wall Stress Reduction in Abdominal Aortic Aneurysms as a Result of Polymeric Endoaortic Paving. *Ann Biomed Eng* 2011; 39(6):1680–9.
- [57] Silber S, Hoffmeister HM, Bode C. Optimal platelet inhibition after coronary stent implantation. Current status. Optimale Thrombozytenaggregationshemmung nach koronarer Stentimplantation. *Aktueller Stand* 2008; 33(4):244–53.
- [58] Zimmermann N, Gams E, Hohlfeld T. Aspirin in coronary artery bypass surgery: new aspects of and alternatives for an old antithrombotic agent. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2008; 34(1):93–108.
- [59] Larena-Avellaneda A, Debus ES, Siegel R, Körner C, Dietz UA, Franke S et al. The silicone coated polyester prosthesis. Further modifications and introduction of the "drug releasing graft". *Gefässchirurgie* 2004; 9(2):105–10.
- [60] Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324(7329):71–86.
- [61] Prieue J, Tümmers D. *Kompndium Vorklinik - GK1*. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2007.
- [62] Lopez-Farre A, Riesco A, Digiuni E, Mosquera JR, Caramelo C, De Miguel LS et al. Aspirin-Stimulated Nitric Oxide Production by Neutrophils after Acute Myocardial Ischemia in Rabbits. *Circulation* 1996; 94(1):83–7.
- [63] Lopez-Farre A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millas I, Monton M et al. Effects of Aspirin on Platelet-Neutrophil Interactions: Role of Nitric Oxide and Endothelin-1. *Circulation* 1995; 91(7):2080–8.
- [64] Weber C, Erl W, Pietsch A, Weber PC. Aspirin inhibits nuclear factor-kappaB mobilization and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells. *Circulation* 1995; 91(7):1914–7.

- [65] Ylä-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vascular Endothelial Growth Factors: Biology and Current Status of Clinical Applications in Cardiovascular Medicine. *Journal of the American College of Cardiology* 2007; 49(10):1015–26.
- [66] Muller YA, Christinger HW, Keyt BA, Vos AM de. The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure (London, England : 1993)* 1997; 5(10):1325–38.
- [67] Li X, Han Y, Pang W, Li C, Xie X, Shyy JYJ et al. AMP-activated protein kinase promotes the differentiation of endothelial progenitor cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2008; 28(10):1789–95.
- [68] Abrahams JM, Forman MS, Grady MS, Diamond SL. Delivery of human vascular endothelial growth factor with platinum coils enhances wall thickening and coil impregnation in a rat aneurysm model. *American Journal of Neuroradiology* 2001; 22(7):1410–7.
- [69] Randone B, Cavallaro G, Polistena A, Cucina A, Coluccia P, Graziano P et al. Dual Role of VEGF in Pretreated Experimental ePTFE Arterial Grafts. *Journal of Surgical Research* 2005; 127(2):70–9.
- [70] Swanson N, Hogrefe K, Javed Q, Gershlick AH. In vitro evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF)-eluting stents. *International Journal of Cardiology* 2003; 92(2-3):247–51.
- [71] Patil SD, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ. Concurrent delivery of dexamethasone and VEGF for localized inflammation control and angiogenesis. *Journal of Controlled Release* 2007; 117(1):68–79.
- [72] Zisch AH, Lutolf MP, Hubbell JA. Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors. *Cardiovascular Pathology* 2003; 12(6):295–310.
- [73] Jay SM, Shepherd BR, Andrejcsk JW, Kyriakides TR, Pober JS, Saltzman WM. Dual delivery of VEGF and MCP-1 to support endothelial cell transplantation for therapeutic vascularization. *Biomaterials*; 31(11):3054–62.
- [74] Sun G, Shen YI, Kusuma S, Fox-Talbot K, Steenbergen CJ, Gerecht S. Functional neovascularization of biodegradable dextran hydrogels with multiple angiogenic growth factors. *Biomaterials* 2011; 32(1):95–106.
- [75] Chiu LL, Weisel RD, Li RK, Radisic M. Defining conditions for covalent immobilization of angiogenic growth factors onto scaffolds for tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2011; 5(1):69–84.
- [76] Chiu LLY, Radisic M. Scaffolds with covalently immobilized VEGF and Angiopoietin-1 for vascularization of engineered tissues. *Biomaterials* 2010; 31(2):226–41.
- [77] Leslie-Barbick JE, Moon JJ, West JL. Covalently-Immobilized Vascular Endothelial Growth Factor Promotes Endothelial Cell Tubulogenesis in Poly(ethylene glycol) Di-

- acrylate Hydrogels. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2009; 20:1763–79.
- [78] He Q, Zhao Y, Chen B, Xiao Z, Zhang J, Chen L et al. Improved cellularization and angiogenesis using collagen scaffolds chemically conjugated with vascular endothelial growth factor. *Acta Biomaterialia* 2011; 7(3):1084–93.
- [79] Wu J, Zeng F, Huang XP, Chung JCY, Konecny F, Weisel RD et al. Infarct stabilization and cardiac repair with a VEGF-conjugated, injectable hydrogel. *Biomaterials* 2011; 32(2):579–86.
- [80] Rieß K. *Plasmamodifizierung von Polyethylen [Dissertation]*. Halle Wittenberg: Martin-Luther-Universität; 2001.
- [81] Girardeaux C, Zammateo N, Art M, Gillon B, Pireaux JJ, Caudano R. Amination of poly(ethylene-terephthalate) polymer surface for biochemical applications. *Plasmas and Polymers* 1996; 1(4):327–46.
- [82] Nitschke M, Schmack G, Janke A, Simon F, Pleul D, Werner C. Low pressure plasma treatment of poly(3-hydroxybutyrate): Toward tailored polymer surfaces for tissue engineering scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research* 2002; 59(4):632–8.
- [83] Hermanson GT. *Bioconjugate Techniques*. San Diego: Academic Press; 1996.
- [84] Jayakrishnan A, Jameela SR. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterials* 1996; 17(5):471–84.
- [85] Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Bio-Techniques* 2004; 37(5):790–802.
- [86] Mattson G, Conklin E, Desai S, Nielander G, Savage MD, Morgensen S. A practical approach to crosslinking. *Molecular Biology Reports* 1993; 17(3):167–83.
- [87] Morpurgo M, Bayer EA, Wilchek M. N-hydroxysuccinimide carbonates and carbamates are useful reactive reagents for coupling ligands to lysines on proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 1999; 38(1):17–28.
- [88] Mercado AE, He X, Xu W, Jabbari E. The release characteristics of a model protein from self-assembled succinimide-terminated poly(lactide-co-glycolide ethylene oxide fumarate) nanoparticles. *Nanotechnology* 2008; 19(32).
- [89] Hemaprabha E. Chemical crosslinking of proteins: a review. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation* 2012; 1 (1): 22-26.
- [90] Kwok DY, Lam CNC, Li A, Leung A, Wu R, Mok E et al. Measuring and interpreting contact angles: a complex issue. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 1998; 142(2-3):219–35.
- [91] Kasemo B, Lausmaa J. Surface science aspects on inorganic biomaterials. *CRC Crit. Rev. Clin. Neurobiol.* 1986; 2(4): 335-380

- [92] Schwarz F, Herten M, Wieland M, Dard M, Becker J. Chemisch modifizierte, ultra-hydrophile Titanimplantatoberflächen. *Mund Kiefer Gesichtschirurgie* 2007; 11(1):11–17.
- [93] 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* 2000; 371(1-2):140–7.
- [94] Pretsch E, Bühlmann P, Affolter C, Badertscher M. *Spektroskopische Daten zur Strukturaufklärung*. Berlin-Heidelberg; Springer-Verlag 2001.
- [95] Ivanov VB, Behnisch A, Hollander F, Mehdorn F, Zimmermann H. Determination of Functional Groups on Polymer Surfaces Using Fluorescence Labelling. *Surface and Interface Analysis* 1996; 24:251–61.
- [96] Holländer A. Labelling techniques for the chemical analysis of polymer surfaces. *Surface and Interface Analysis* 2004; 36(8):1023–6.
- [97] Kazuhiro I, Toshimasa T, Hiroshi M. Fluorogenic reagents for primary and secondary amines and thiols in high-performance liquid chromatography. A review. *Analyst* 1984; 109:1365–73.
- [98] Taha EA. Kinetic spectrophotometric methods for the determination of dothiepin hydrochloride in bulk and in drug formulation. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003; 376:1131–1136.
- [99] Lawrence JF, Frei RW. Fluorogenic labeling in N-methyl- and N,N-dimethylcarbamates with 4-chloro-7-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazole. *Analytical Chemistry* 1972; 44(12):2046–9.
- [100] Joullié MM, Thompson TR, Nemeroff NH. Ninhydrin and ninhydrin analogs. Syntheses and applications. *Tetrahedron* 1991; 47(42):8791–830.
- [101] Hong Y, Gao C, Xie Y, Gong Y, Shen J. Collagen-coated polylactide microspheres as chondrocyte microcarriers. *Biomaterials* 2005; 26(32):6305–13.
- [102] Mix R, Hoffmann K, Buschmann HJ, Friedrich JF, Resch-Genger U. Anbindung von Fluoreszenzfarbstoffen an plasmachemisch funktionalisierte und Cucurbituril-modifizierte Oberflächen. *Vakuum in Forschung und Praxis* 2007; 19(5):31–7.
- [103] Harris CD. *Lehrbuch der quantitativen Analyse*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2002.
- [104] Fukuto TR, Fahmy MAH, Metcalf RL. Alkaline hydrolysis, anticholinesterase, and insecticidal properties of some nitro-substituted phenyl carbamates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1967; 15(2):273–81.
- [105] Van Vranken DL, Panomitros D, Schultz PG. Catalysis of carbamate hydrolysis by an antibody. *Tetrahedron Letters* 1994; 35(23):3873–6.

- [106] Wauchope RD, Haque R. Effects of pH, light and temperature on carbaryl in aqueous media. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1973; 9(5):257–60.
- [107] Strikovskiy AG, Kasper D, Grün M, Green BS, Hradil J, Wulff G. Catalytic molecularly imprinted polymers using conventional bulk polymerization or suspension polymerization: Selective hydrolysis of diphenyl carbonate and diphenyl carbamate. *Journal of the American Chemical Society* 2000; 122(26):6295–6.
- [108] Wentworth P, Datta A, Smith S, Marshall A, Partridge LJ, Blackburn GM. Antibody Catalysis of BAc₂ Aryl Carbamate Ester Hydrolysis: A Highly Disfavored Chemical Process. *Journal of the American Chemical Society* 1997; 119(9):2315–6.
- [109] European Pharmacopeia. 4. Auflage: European Directorate for the Quality of Medicines; 2002.
- [110] Crowther JR. Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In: *Molecular Biomedical Methods Handbook*; 1998: 595–617.
- [111] Sternberger LA, Sternberger NH. The unlabeled antibody method: Comparison of peroxidase-antiperoxidase with avidin-biotin complex by a new method of quantification. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1986; 34(5):599–605.
- [112] Josephy PD, Eling T, Mason RP. The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates. *Journal of Biological Chemistry* 1982; 257(7):3669–75.
- [113] Gey MH. Selektive Bioanalytik. In: *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*; 2008: 347–72.
- [114] Glasmacher B. Materialkunde — Biokompatibilität. In: *Empfehlungen zum Einsatz und zur Verwendung der Herz-Lungen-Maschine*; 2006: 109–26.
- [115] Horn M. Untersuchungen zum Einfluss von alpha Defensinen aus neutrophilen Granulozyten auf die primäre Hämostase [Dissertation]. Gießen: Univ. Gießen; 2008.
- [116] Zayas-Santiago A, Derwent JJK. Preservation of intact adult rat photoreceptors in vitro: Study of dissociation techniques and the effect of light. *Molecular Vision* 2009; 15:1–9.
- [117] Wintermantel E, Shah-Derler B, Bruinink A, Petitmermet M, Blum J, Ha SW. Biokompatibilität. In: *Medizintechnik Life Science Engineering*; 2008: 59–96 .
- [118] Colman RW. Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice. 4th ed. Philadelphia, London: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
- [119] Ghasemzadeh M, Hosseini E. Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Thromb Res.* 2013 Mar;131(3):191-7
- [120] Jelkmann W. Blut. In: Schmidt RF, Lang F, editors. *Physiologie des Menschen*; 2007: 523–49.

- [121] Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22(9):1381–9.
- [122] Fischbach C, Mooney DJ. Polymeric systems for bioinspired delivery of angiogenic molecules. *Advances in Polymer Science* 2006; Volume 203: 191-221.
- [123] de Mel A, Jell G, Stevens MM, Seifalian AM. Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: A review. *Biomacromolecules* 2008; 9(11):2969–79.
- [124] Mitchell SL, Niklason LE. Requirements for growing tissue-engineered vascular grafts. *Cardiovascular Pathology* 2003; 12(2):59–64.
- [125] Jang L, Liu H. Fabrication of protein chips based on 3-aminopropyltriethoxysilane as a monolayer. *Biomed. Microdevices* 2009; 11(2):331–8.
- [126] Nitschke M, Schmack G, Janke A, Simon F, Pleul D, Werner C. Low pressure plasma treatment of poly(3-hydroxybutyrate): Toward tailored polymer surfaces for tissue engineering scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 59(4):632–8.
- [127] Pasternack RM, Rivillon Amy S, Chabal YJ. Attachment of 3-(Amino-propyl)triethoxysilane on Silicon Oxide Surfaces: Dependence on Solution Temperature. *Langmuir* 2008; 24(22):12963–71.
- [128] Fülleborn M. Zeitaufgelöste FTIR Transmissions- und ATR-Spektroskopie von Flüssigkristallen im elektrischen Feld [Dissertation]. Essen, Universität–Gesamthochschule Essen; 2003.
- [129] Földes E, Gulyás J, Rosenberger S, Pukánszky B. Chemical modification and adhesion in carbon fiber/epoxy micro-composites; coupling and surface coverage. *Polymer Composites* 2000; 21(3):387–95.
- [130] Ek S, Iiskola EI, Niinistö L, Pakkanen TT, Root A. New bonding modes of gas-phase deposited γ -aminopropyltriethoxysilane on silica studied by ^{29}Si CP/MAS NMR. *Chemical Communications* 2003; 9(16):2032–3.
- [131] Kashefi-Khorasani AA. Untersuchungen zu Stofftransport und Fluidodynamik bei extrakorporalen Membranoxygenatoren [Dissertation]. Aachen: Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen; 2004.
- [132] Ernst R, Schaudin E, Hoffmann C, Postler C, Nowak-Göttl U. Intraoperative Verdünnung von Gerinnungsfaktoren und aktivierte Gerinnung bei Kindern mit Ewingund Osteosarkomen. Eine prospektive Longitudinalstudie. In: 26. Hämophilie-Symposium 1995: Springer Berlin Heidelberg; 1997: 93-97.
- [133] Schulz DM, Sinz A. Chemical cross-linking and mass spectrometry for structural and functional characterization of proteins. *BioSpektrum* 2004; 10(1):45–8.
- [134] Khor E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses. *Biomaterials* 1997; 18(2):95–105.

Veröffentlichungen und Fachvorträge

Veröffentlichungen

1. Petersen S, Kaule S, **Teske M**, Minrath I, Schmitz KP, Sternberg K. Development and in vitro characterization of hyaluronic acid-based coatings for implant-associated local drug delivery systems. Journal of Chemistry: Volume 2013 (2013), online DOI: 10.1155/2013/587875.
2. Koehler K, Marquardt F, **Teske M**, Keul H, Sternberg K, Möller M. Enhanced hydrolytic degradation of heterografted polyglycidols: Phosphonoethylated monoester – and polycaprolactone grafts. Biomacromolecules 2013: online DOI: 10.1021/bm401428b.
3. Wulf K, **Teske M**, Löbler M, Luderer F, Schmitz K-P, Sternberg K. Surface functionalization of poly(ϵ -caprolactone) improves its biocompatibility as scaffold material for bioartificial vessel prostheses. Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials, 2011: 98(1):89-100 DOI: 10.1002/jbm.b.31836.
4. Theiler S, **Teske M**, Keul H, Sternberg K, Möller M. Synthesis, Characterization and in vitro Degradation of 3D-Microstructured Poly(ϵ -caprolactone) Resins. Polymer Chemistry 2010: 1: 1215-1225 DOI: 10.1039/c0py00097c.

Tagungsbeiträge

1. Storm T, **Teske M**, Wulf K, Löbler M, Schmitz KP, Sternberg K. Enhanced Endothelialization of PCL Through Chemical Activation, Protein Precoating and VEGF Stimulation. Biomedizinische Technik 2013, September 2013, DOI: 10.1515/bmt-2013-4092.
2. Petersen S, Wulf K, Schünemann S, **Teske M**, Schmitz KP, Sternberg K. Biofunctionalization of Polymer Implant Surfaces: From Drug Delivery to Stable Surface Functionality. Biomedizinische Technik 2013, September 2013, DOI: 10.1515/bmt-2013-4052.
3. Storm T, **Teske M**, Löbler M, Wulf K, Schmitz KP, Sternberg K. Influence of cell source and adhesion substrate on growth factor responsiveness in primary endothelial cells. Biomedizinische Technik 2012, August 2012, DOI: 10.1515/bmt-2012-4369.
4. Kunna K, **Teske M**, Löbler M, Keul H, Wilhelmi M, Jockenhövel S, Ovsianikov A, Schmitz KP, Sternberg K. Development of a biodegradable scaffold based on poly(ϵ -caprolactone) and VEGF for bioartificial vascular prostheses. Biomedizinische Technik 2010;55 (S1), DOI: 10.1515/BMT.2010.123.
5. **Teske M**, Rohm HW, Kunna K, Keul H, Wilhelmi M, Jockenhövel S, Ovsanikov A, Schmitz KP, Sternberg K. Chemical surface modification of poly(ϵ -caprolactone)

- for accelerated wound healing after implantation of vascular devices. IFMBE Proceedings 2009, 25/X, DOI: 10.1007/978-3-642-03900-3_62.
6. **Teske M**, Rohm HW, Roock A, Keul H, Wilhelmi M, Jockenhövel S, Ovsianikov A, Schmitz KP, Sternberg K. Chemical modification of polymeric implant surfaces for enhancement of vascular healing. *Biomaterialien* 2009: 10(S1):122.
 7. **Teske M**, Rohm HW, Grabow N, Schmitz KP, Sternberg K. Chemical modifications of polymeric implant surfaces for local drug delivery. *IFMBE Proceedings* 2008: Vol. 22, DOI: 10.1007/978-3-540-89208-3_541.
 8. Gocke C, Sternberg K, **Teske M**, Schmitz KP. Rasterkraftmikroskopische Untersuchung von wirkstofffreisetzenden Polymeroberflächen an vaskulären Implantaten. *Biomedizinische Technik* 2007: 52(E1): 29-30.
 9. Schmidt W, Behrens P, **Teske M**, Schultze C, Grabow N, Sternberg K, Behrend D, Schmitz KP. Untersuchungsmethoden zur Charakterisierung der Schichtintegrität von polymerbeschichteten Drug eluting stents. *Biomedizinische Technik* 2007: 52(E1): 333-334.
 10. **Teske M**, Langer T, Gocke C, Grabow N, Schmitz KP, Sternberg K. Nasschemische Modifizierung polymerer Implantatoberflächen zur lokalen Freisetzung von Medikamenten. *Biomaterialien* 2007:8(3):171.

Fachvorträge

1. **Teske M**, Rohm HW, Kunna K, Keul H, Wilhelmi M, Jockenhoewel S, Ovsanikov A, Schmitz KP, Sternberg K. Chemical surface modification of poly(epsilon-caprolactone) for accelerated wound healing after implantation of vascular devices. *IFMBE Proceedings* 2009, 25/X, DOI: 10.1007/978-3-642-03900-3_62.

Danksagung

Ich danke meiner Frau, meinem Sohn, meinen Eltern und Schwiegereltern für ihre Mühen und Opfer, die mir ermöglicht haben zu studieren, was ich wünsche, und meine Promotion zu beenden.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Klaus-Peter Schmitz, Direktor des Institut für Biomedizinische Technik der Universität Rostock für die permanente Unterstützung dieser Arbeit.

Besonders danke ich Frau Prof. Dr. Katrin Sternberg, Institut für Biomedizinische Technik der Universität Rostock, für die Überlassung dieses spannenden und interdisziplinären Themas. Die fachlichen Anregungen und das Vertrauen in mich und diese Arbeit waren eine große Unterstützung beim Gelingen der Dissertation.

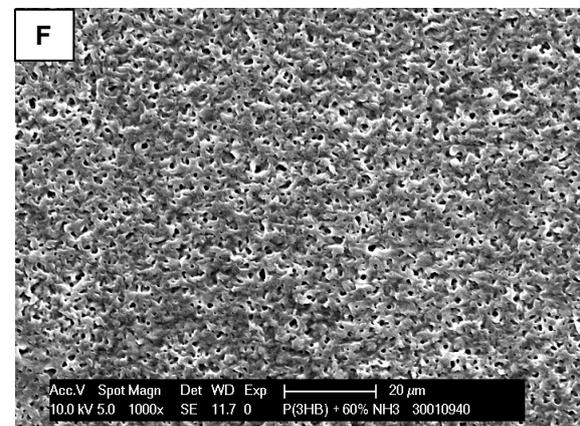
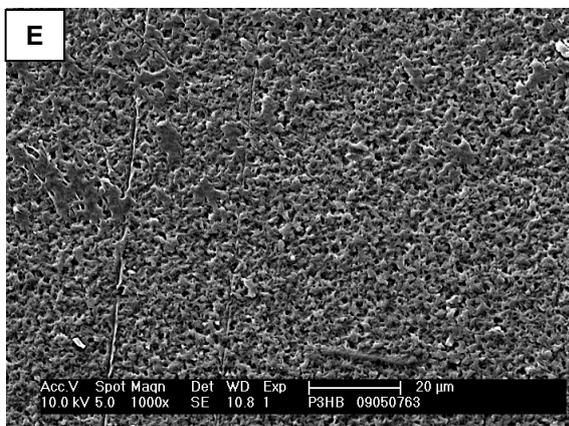
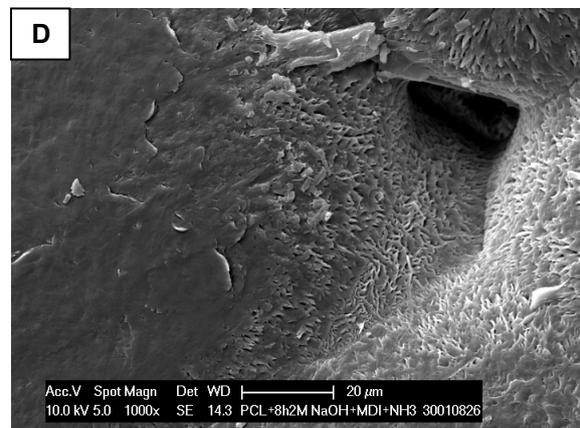
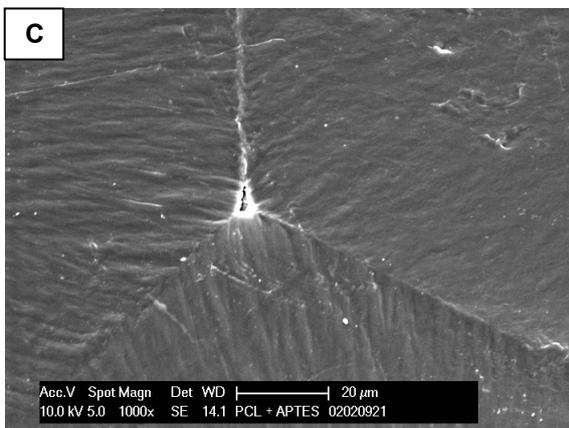
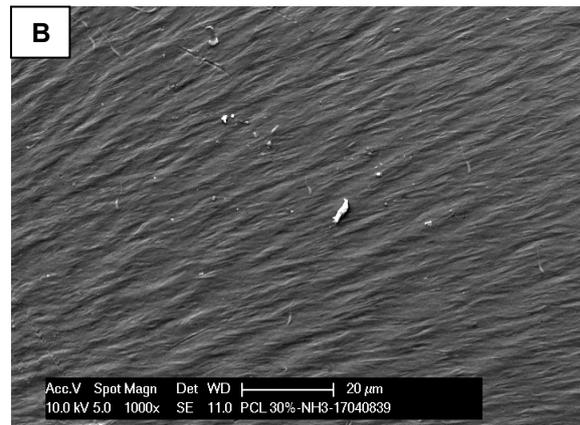
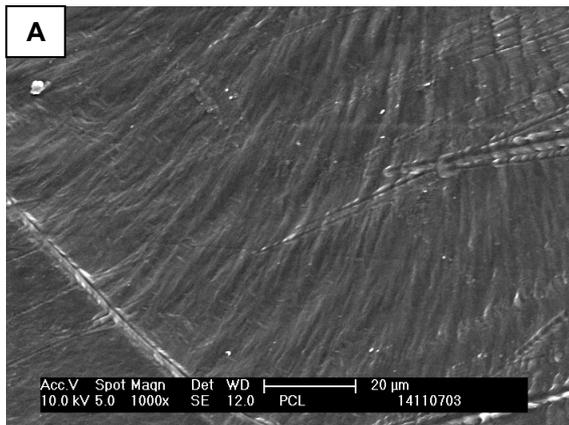
Auch Herrn Prof. Dr. Kiefel und seinem Arbeitskreis danke ich ganz herzlich für die Hilfe und Ratschläge bei den hämatologischen Untersuchungen.

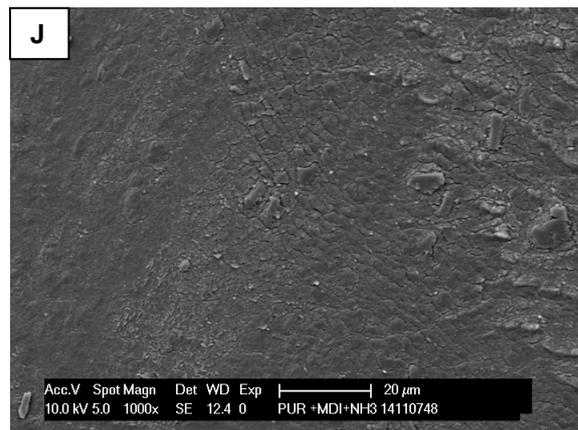
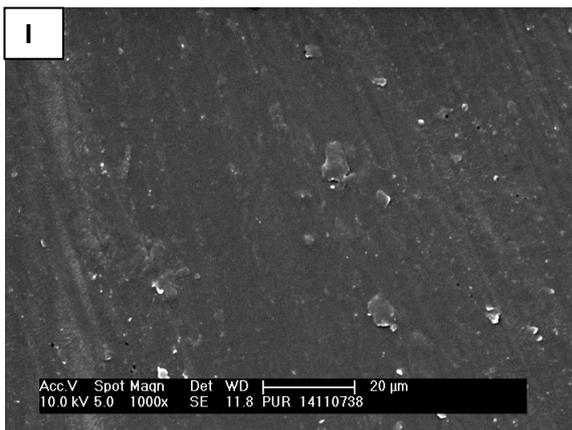
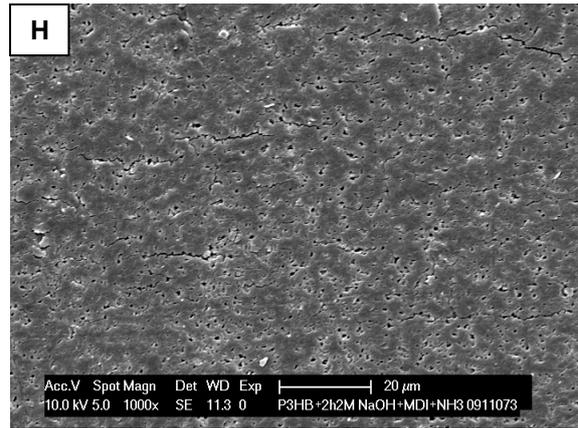
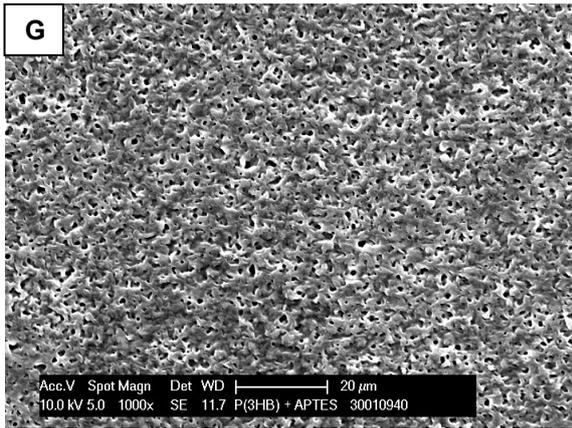
Ferner sei auch der CORTRONIK GMBH für die Durchführung der Sterilisation des Probenmaterials gedankt.

Zahlreiche Mitarbeiter des Instituts für Biomedizinische Technik haben diese Arbeit in vielen Stunden mit Arbeit, Ratschlägen und aufmunternden Worten unterstützt, denen hiermit ganz herzlich gedankt sei. Eine Auflistung aller beteiligten Mithelfer würde leider den Rahmen sprengen aber ausdrücklich erwähnt seien die Kollegen aus der Chemie (Svea Petersen, Claudia Lurtz, Anne Bohl, Thomas Langer, Henning Rohm, Frank Luderer, Thomas Reske, Karsten Voß, Arne Bernsdorf, Thomas Eickner und Ingo Minrath) und aus der Biologie (Marina Hovakimyan, Babette Hummel, Martina Nerger, Gabi Karsten, Marian Löbler, Christian Kastner, Thilo Storm und Andreas Rudolph). Frau Katharina Wulf sei speziell gedankt für die tatkräftige und *motivierende* Unterstützung während dieser Arbeit.

Anhang

Tab. 14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM, Philips XL30 ESEM, 10 kV bei 10^{-7} mbar) der Morphologie der aminofunktionalisierten Biomaterialoberflächen (mit Gold besputtert durch Agar Sputter Coater 109, Plano GmbH Wetzlar, 120 s bei 0,2 mbar und 25 mA). PCL unaktiviert (A), nach Aktivierung mit NH_3 -Plasma (B), mit O_2 -Plasma/APTES (C) und mit MDI/ NH_3 (D). P(3HB) unaktiviert (E), nach Aktivierung mit NH_3 -Plasma (F), mit O_2 -Plasma/APTES (G) und mit MDI/ NH_3 (H). PUR unaktiviert (I) und nach Aktivierung mit MDI/ NH_3 (J).





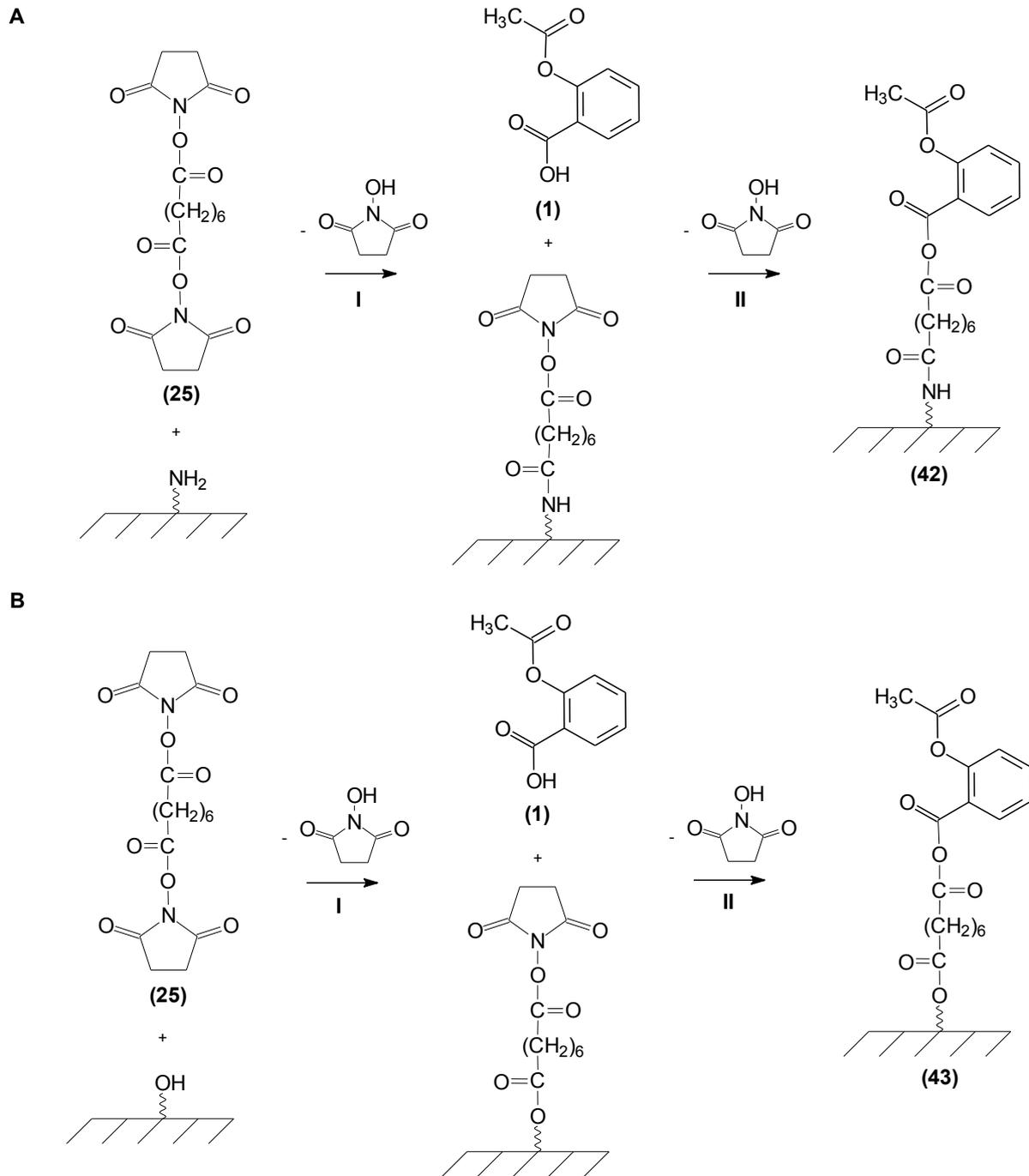


Abb. 36: Schema der Ankopplung von ASS (**1**) an Polymeroberflächen mit NH_2 - (**A**) und OH -Gruppen (**B**): I. Ankopplung von DSS (**25**) über eine funktionelle Succinimidylgruppe unter Abspaltung von NHS und Bildung einer Amidbindung (**A**) bzw. Esterbindung (**B**), II. Ankopplung von ASS (**1**) über die zweite funktionelle Succinimidylgruppe des DSS unter Abspaltung von NHS und Bildung einer Esterbindung (**A** und **B**) unter Bildung von (**42**) und (**43**).

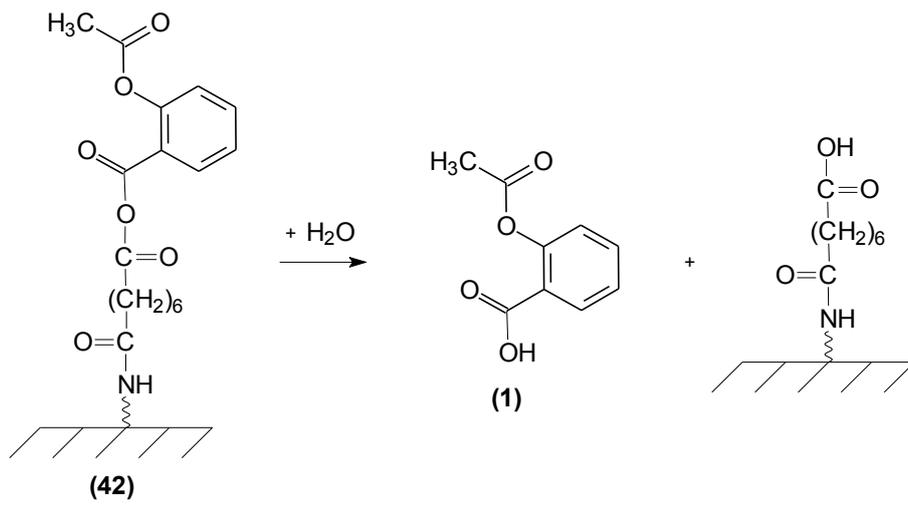


Abb. 37: Schema der hydrolytischen Spaltung der Esterbindung von **(42)** unter Abspaltung von ASS.

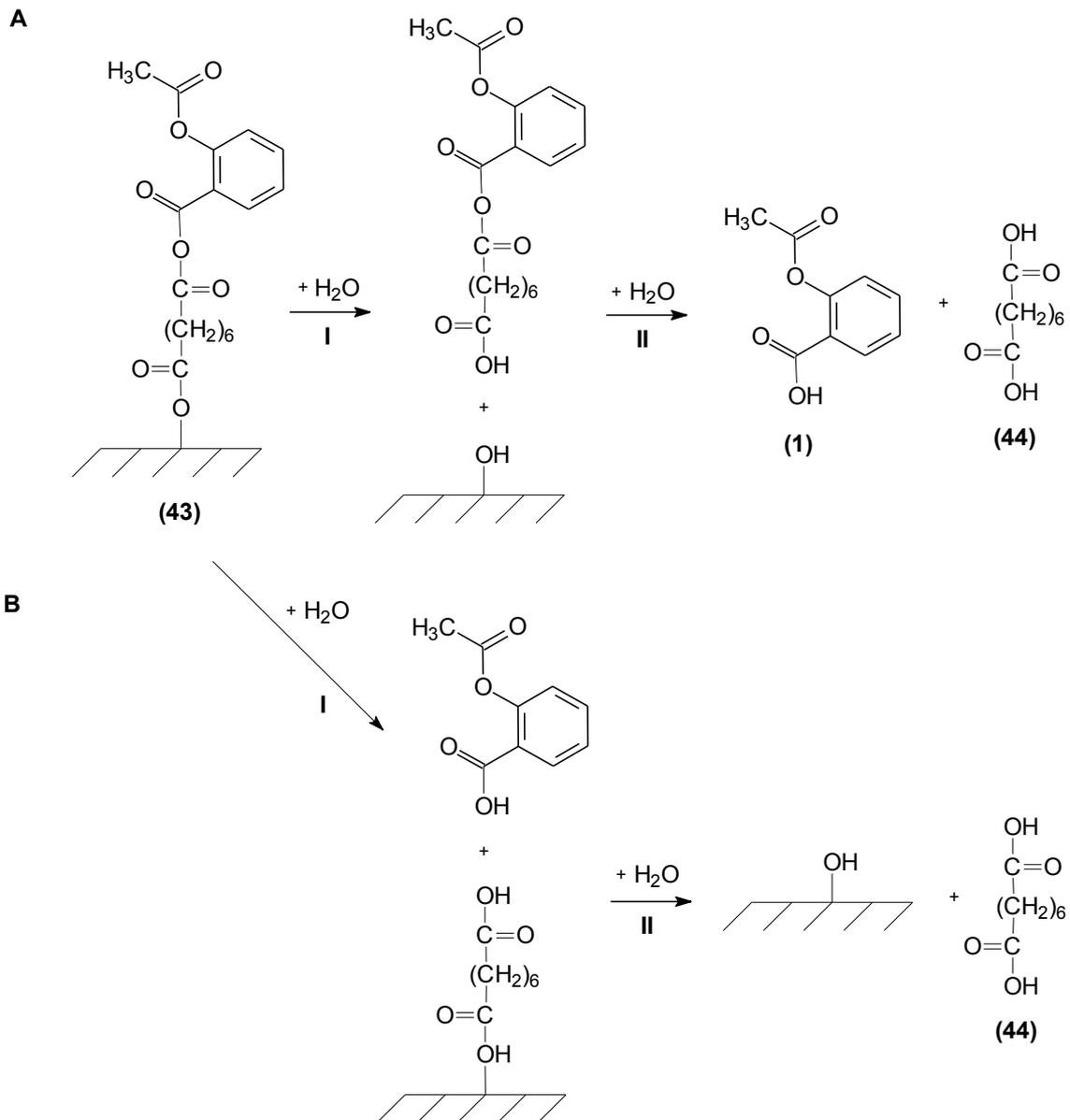


Abb. 38: Schema der hydrolytischen Spaltung von (43): I. Hydrolyse der Esterbindung unter Abspaltung von der Polymeroberfläche (**A I**) bzw. unter Abspaltung von ASS (**1, B I**), II. Hydrolyse der Esterbindung unter Abspaltung von ASS (**1**) und Octandisäure (**44, A II**) bzw. unter Abspaltung der Octandisäure von der Polymeroberfläche (**44, B II**).

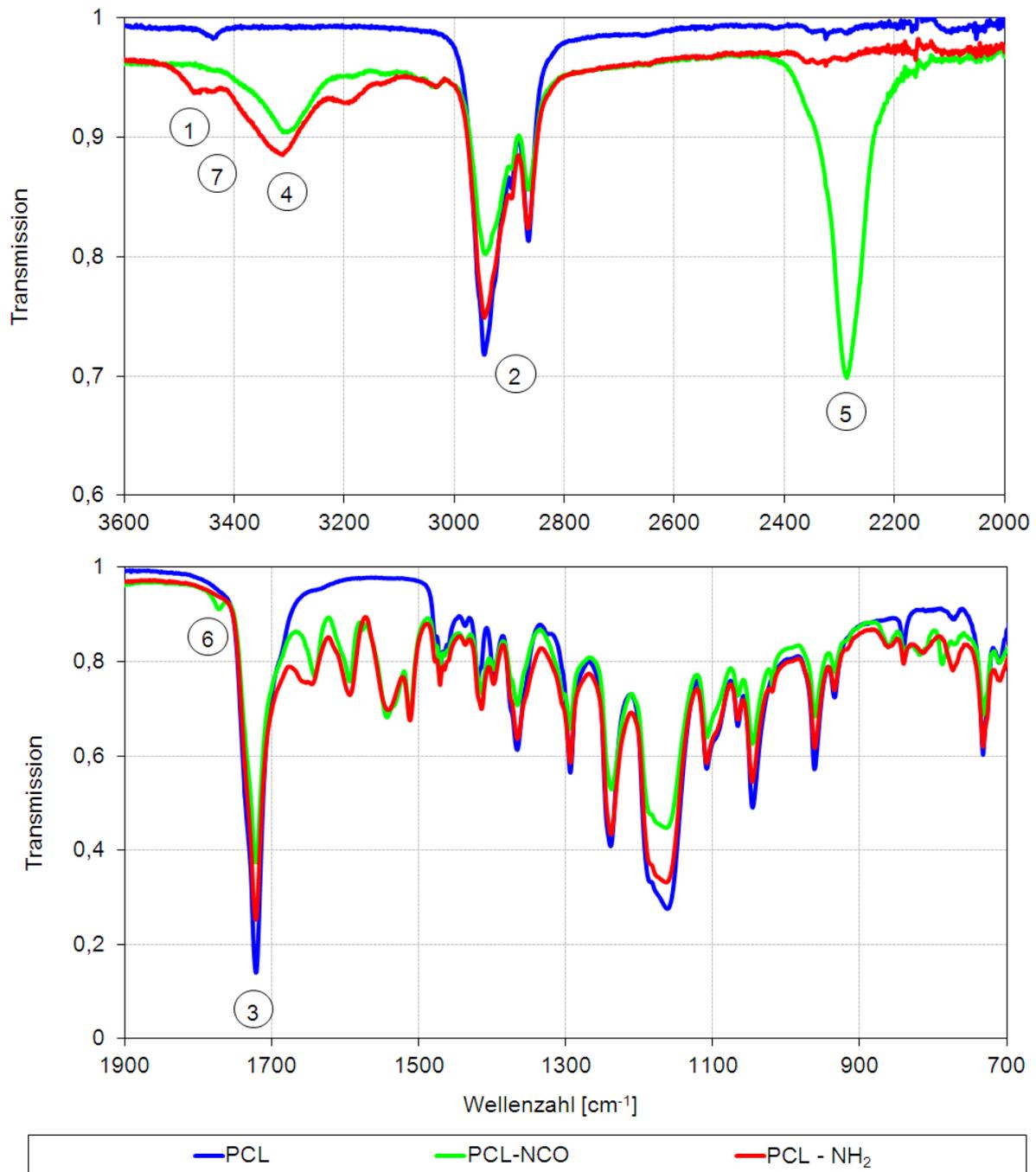


Abb. 39: FTIR-Spektren der mit MDI/NH₃ aktivierten PCL-Oberflächen in einzelnen Stufen der Aktivierung im Vergleich zur unaktivierten Probe.

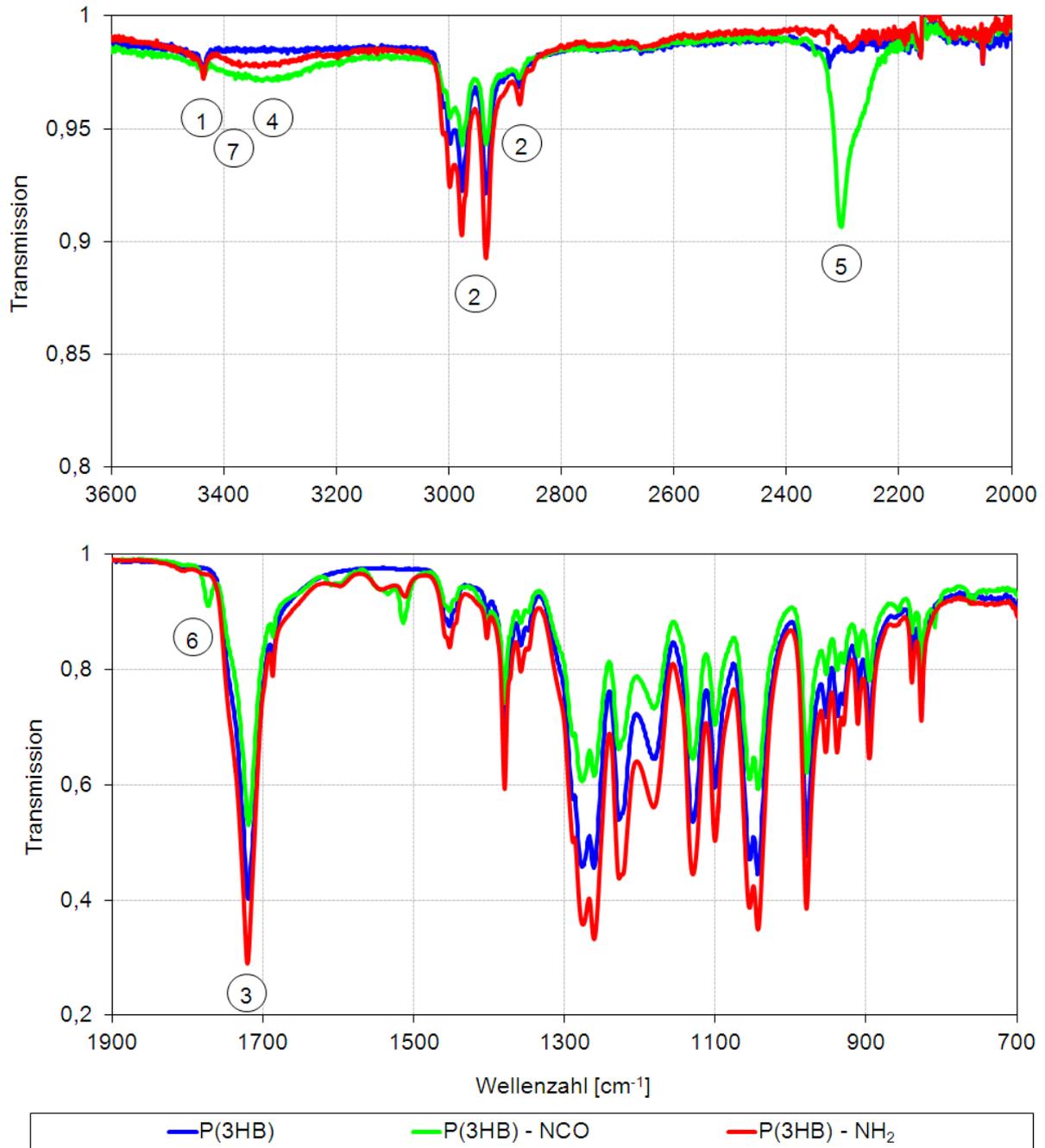


Abb. 40: FTIR-Spektren der mit MDI/ NH_3 aktivierten P(3HB)-Oberflächen in einzelnen Stufen der Aktivierung im Vergleich zur unaktivierten Probe.

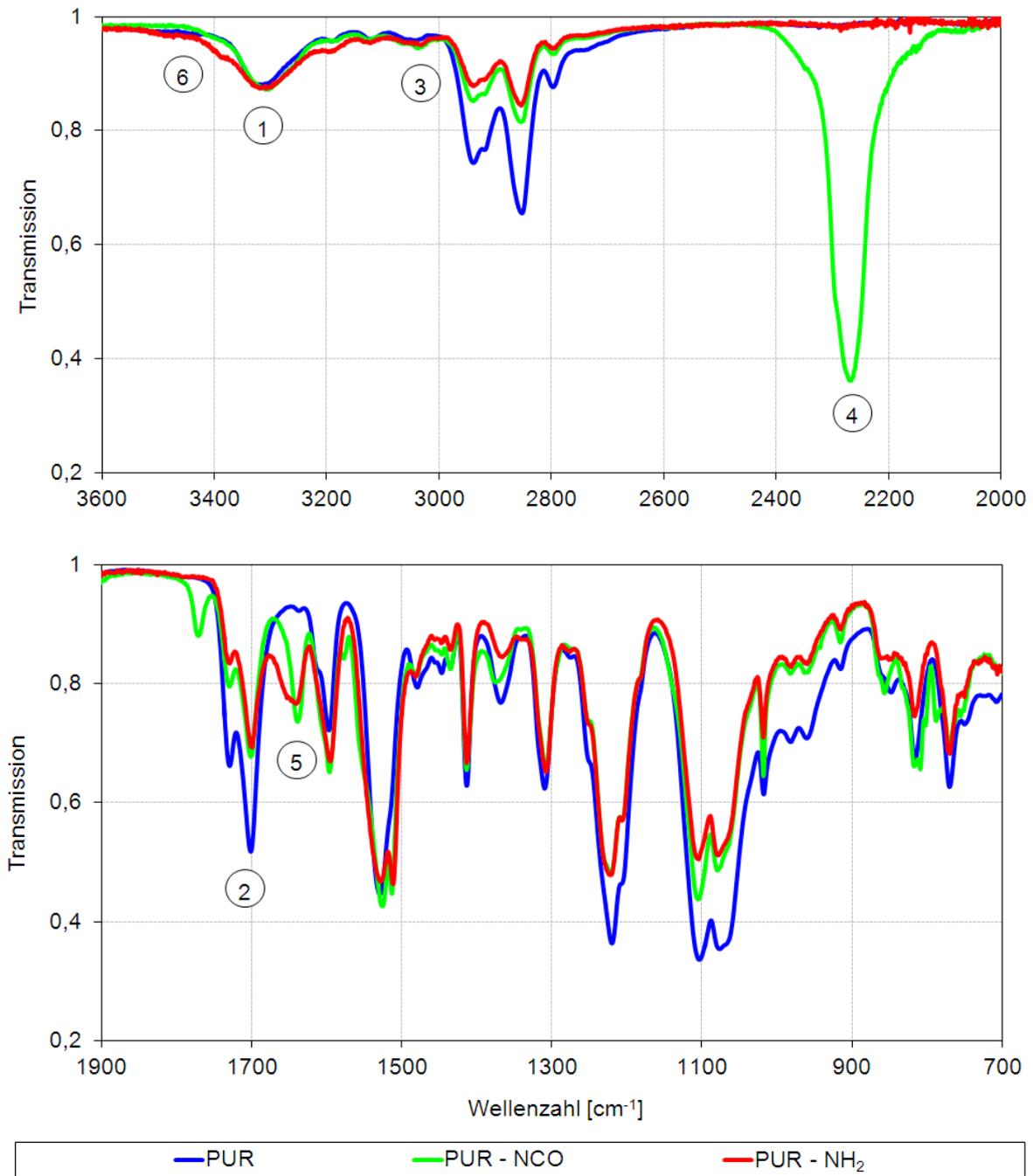


Abb. 41: FTIR-Spektren der mit MDI/NH₃ aktivierten PUR-Oberflächen in einzelnen Stufen der Aktivierung im Vergleich zur unaktivierten Probe.

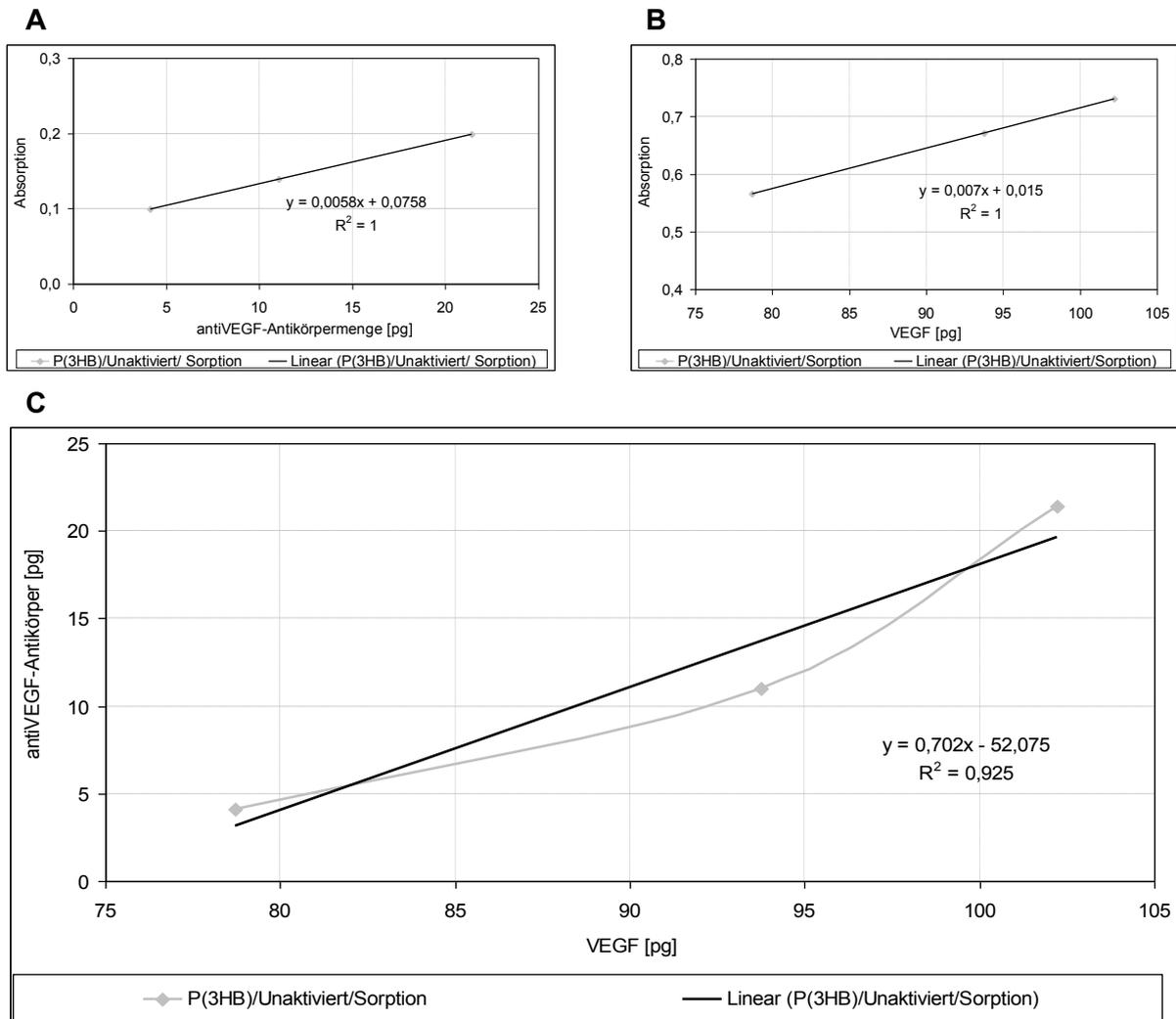


Abb. 42: Kalibrierung der Masse der mit HRP markierten Antikörper zur Detektion von VEGF gegen die gemessene Absorption beim indirekten PAP-ELISA (**A**), der VEGF-Masse gegen die gemessene Absorption beim indirekten ABC-ELISA (**B**) und die resultierende Kalibration der Masse HRP markierter Antikörper des PAP-ELISA gegen die VEGF-Masse (**C**).

Tab. 15: Berechnete Massen für die VEGF-Beladung aus dem indirekten PAP-ELISA mit Hilfe des indirekten ABC-ELISA für PCL, P(3HB) und PUR-Probekörper ($\varnothing = 6$ mm); GDA und EDC/NHS für mit O_2 - und CO_2 -Plasma aktivierte Proben nicht untersucht, da kein Crosslinking zwischen Polymer und Protein; DSS und DSC nur für CO_2 - und O_2 -Plasma aktivierte Proben für Freisetzungsstudien untersucht.

| Aktivierung/Modifizierung | Berechnete Masse VEGF je Probekörper [pg] | | |
|--|---|------------|-----------|
| | PCL | P(3HB) | PUR |
| Unaktiviert | | | |
| EDC/NHS/VEGF | 592 ± 65 | 0 ± 31 | 484 ± 190 |
| GDA/VEGF | 84 ± 6 | 0 ± 165 | 275 ± 94 |
| DSC/VEGF | 74 ± 27 | 0 ± 3 | - |
| DSS/VEGF | 463 ± 19 | 50 ± 13 | - |
| Aktivierung mit NH_3-Plasma | | | |
| EDC/NHS/VEGF | 1027 ± 117 | 130 ± 33 | - |
| GDA/VEGF | 712 ± 40 | 342 ± 201 | - |
| Aktivierung mit CO_2-Plasma | | | |
| DSC/VEGF | 368 ± 107 | 1590 ± 254 | - |
| DSS/VEGF | 1373 ± 648 | 103 ± 214 | - |
| Aktivierung mit O_2-Plasma | | | |
| DSC/VEGF | 172 ± 55 | 175 ± 58 | - |
| DSS/VEGF | 440 ± 173 | 117 ± 114 | - |
| Aktivierung mit O_2-Plasma/APTES | | | |
| EDC/NHS/VEGF | 1231 ± 153 | 73 ± 52 | - |
| GDA/VEGF | 655 ± 110 | 266 ± 77 | - |
| Aktivierung mit MDI/NH_3 | | | |
| EDC/NHS/VEGF | 1149 ± 153 | 191 ± 66 | 953 ± 640 |
| GDA/VEGF | 545 ± 23 | 113 ± 34 | 319 ± 182 |