

**Stimulusinduzierte Wirkstofffreisetzung aus  
biokonjugierten implantatassoziierten  
Wirkstofffreisetzungssystemen auf Hydrogelbasis**

**Inauguraldissertation**

zur

**Erlangung des akademischen Grades**

**Doktor der Naturwissenschaften**

**(doctor rerum naturalium, Dr. rer. nat.)**

**der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock**



vorgelegt von:

Herrn Ingo Minrath  
Geb. am 25.01.1983 in Bonn,  
aus Rostock

Rostock, (21.05.2015)

**Gutachter:**

1. Gutachter:  
Prof. Dr. Udo Kragl  
Institut für Chemie, Universität Rostock
2. Gutachter:  
Dr. Katrin Sternberg  
Aesculap AG, Tuttlingen
3. Gutachter:  
Prof. Dr. Carsten Werner  
Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e. V. (IPF), Dresden

Datum der Verteidigung:  
17.11.2015

## **I. Inhaltsverzeichnis**

<b>Danksagung.....</b>	<b>i</b>
<b>I. Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>iii</b>
<b>II. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>vii</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Stand der Wissenschaft und Technik.....</b>	<b>5</b>
2.1. Implantatassoziierte Wirkstofffreisetzungssysteme.....	5
2.1.1. Diffusionskontrollierte Freisetzungssysteme.....	6
2.1.2. Chemisch kontrollierte Freisetzungssysteme.....	9
2.1.3. Lösungsmittelaktivierte Freisetzungssysteme.....	10
2.2. Hydrogele als Beschichtungsmatrix.....	13
2.2.1. Grundlagen.....	13
2.2.2. Schaltbare Hydrogele.....	20
<b>3. Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>26</b>
<b>4. Materialien und Methoden.....</b>	<b>28</b>
4.1. Gelpräparation.....	28
4.1.1. Synthese der Polyacrylamidhydrogele.....	29
4.1.1.1. Synthese der konventionellen Polyacrylamidhydrogele.....	29
4.1.1.2. Synthese der semi-IPN Polyacrylamidhydrogele.....	30
4.1.2. Synthese der Polyacrylamid/Alginat-Hybridhydrogele.....	31
4.2. Biokonjugation.....	32
4.2.1. Modifikation der Biomoleküle mit Acrylatresten für den Einbau in die Hydrogelnetzwerke.....	32
4.2.2. Biokonjugation der semi-IPN-Polyacrylamidhydrogele.....	34
4.2.3. Biokonjugation der Polyacrylamid/Alginat-Hybridhydrogele.....	36
4.3. Oberflächenanbindung.....	36
4.3.1. Vorbereitung der Oberflächenmodifizierung über Aktivierung mittels Plasmaprozess.....	37
4.3.2. Silanisierung.....	38
4.3.3. Hydrogelankopplung.....	38

4.3.3.1. Generierung der Oberflächengekoppelten PAAm-Hydrogele über das Pipettierverfahren.....	39
4.3.3.2. Hydrogelankopplung der PAAm-Hydrogele über das Kleben vorpräparierter Hydrogele.....	39
4.3.3.3. Hydrogelankopplung der PAAm/Alginate-Hybridhydrogele über das Kleben vorpräparierter Hydrogele.....	40
4.4. Generierung implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssysteme.....	40
4.4.1. Generierung eines stimulusresponsiven implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems über das Pipettierverfahren auf Polyacrylamidbasis.....	40
4.4.2. Generierung eines stimulusresponsiven implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems über Klebung der vorpräparierten PAAm/Alginate-Hybridhydrogele.....	41
4.5. Charakterisierung.....	42
4.5.1. Permeationsstudie.....	42
4.5.1.1. Aufbau/Durchführung der Permeationsstudie.....	42
4.5.1.2. Proteinquantifizierung mittels BCA.....	44
4.5.1.3. Proteinquantifizierung mittels Fluoreszenzspektroskopie.....	45
4.5.2. Wassergehaltsbestimmung der gequollenen Hydrogele.....	46
4.5.3. Zugversuche.....	46
4.5.3.1. Bestimmung der mechanischen Kennwerte über Zugversuche.....	46
4.5.4. Fluoreszenzmikroskopie.....	47
4.5.5. Proteinquantifizierung von im Hydrogel gekoppelten Proteinen.....	47
4.6. Charakterisierung der Oberflächenbehandlungen.....	47
4.6.1. Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	47
4.6.2. Analyse der Oberflächenmodifizierung über Kontaktwinkeländerung.....	48
4.6.3. Schichtdickenbestimmung.....	49
4.6.4. Bestimmung der Haftfestigkeit von Hydrogelbeschichtungen.....	50
<b>5. Ergebnisse.....</b>	<b>52</b>
5.1. Charakterisierung unmodifizierter Hydrogele.....	52
5.1.1. Permeationsverhalten der Modellwirkstoffe in Abhängigkeit des Gelgehaltes.....	52
5.1.2. Permeationsverhalten der Modellwirkstoffe in Abhängigkeit des Vernetzungsgrades (AAm/MBAA).....	54

5.1.3.	Permeationsverhalten der Modellwirkstoffe in Abhängigkeit der Hydrogelarchitektur.....	55
5.1.4.	Wassergehalt der gequollenen Hydrogele während der Freisetzung.....	56
5.1.5.	Bestimmung der Abhängigkeit der mechanischen Kennwerte vom Gelgehalt, der Gelarchitektur sowie dem Vernetzungsgrad.....	57
5.2.	Biokonjugation der unterschiedlichen Hydrogele.....	60
5.2.1.	Biokonjugation der Polyacrylamid-Systeme mit Maus IgG/Kaninchen Anti-Maus IgG.....	60
5.2.2.	Biokonjugation der Polyacrylamid-Systeme mit Insulin/Anti-Insulin.....	65
5.2.3.	Biokonjugation der Polyacrylamid/Alginat-Hybridhydrogele.....	66
5.3.	Oberflächenmodifikation.....	66
5.3.1.	Untersuchung der Oberflächenhydrophilie.....	67
5.3.2.	Oberflächenmorphologische Untersuchung.....	68
5.3.3.	Schichtdickenbestimmung.....	69
5.3.3.1.	Schichtdickenbestimmung der generierten Polyacrylamid-Anker.....	69
5.3.3.2.	Schichtdickenbestimmung von Hydrogelbeschichtungen, hergestellt über das Pipettierverfahren.....	70
5.3.3.3.	Bestimmung des Klebervolumeneinflusses auf die Schichtdicke der durch Klebung präparierten Hydrogelbeschichtung.....	71
5.3.3.4.	Bestimmung des Volumeneinflusses im Rahmen der Vorpräparation der Hydrogele auf die Schichtdicke der Hydrogelbeschichtung.....	72
5.3.4.	Bestimmung der Abschälkraft der aufgeklebten Hydrogelbeschichtungen.....	73
5.4.	Stimulusinduzierte Freisetzung.....	74
5.4.1.	Testung der stimulusinduzierten Wirkstofffreisetzung durch biokonjugierte Hydrogele.....	75
5.4.2.	Stimulusinduzierte in-vitro Wirkstofffreisetzung durch eine implantat-assoziierte, biokonjugierte Hydrogelbeschichtung.....	76
<b>6.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>79</b>
6.1.	Charakterisierung unmodifizierter Hydrogele.....	79
6.2.	Biokonjugation der verwendeten Hydrogele.....	85
6.3.	Oberflächenmodifikation.....	88
6.4.	Stimulierte Freisetzung und implantatassoziiertes Wirkstofffreisetzungssystem.....	92

<b>7. Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>95</b>
---	-----------

## **Anhang**

<b>III. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>x</b>
<b>IV. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>xxi</b>
<b>V. Tabellen- und Formelverzeichnis.....</b>	<b>xxviii</b>

## II. Abkürzungsverzeichnis

% (vol/vol)	Volumenprozent
% (w/w)	Gewichtsprozent
%ige	prozentige
°C	° Celsius
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
AAm	Acrylamid
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumpersulfat
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
BSA-FITC	Fluoresceinisothiocyanat gelabeltes Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
Ca <sup>2+</sup>	Calcium(II)-Ionen
CaCl <sub>2</sub>	Calcium(II)-Chlorid
CLSM	confocal laser scanning microscopy
cm	Zentimeter
CrNi	Chrom-Nickel-Edelstahl-Plättchen
Cu <sup>+</sup> / Cu <sup>2+</sup>	Kupfer(I)/ Kupfer (II)-Ion
D	Diffusionskoeffizient
Da	Dalton
DDS	Drug Delivery System
DEA	N,N'-Diethylaminoethylmethacrylat

DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung
E	E-Modul
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscope
et al.	et alii, et aliae oder et alia (deutsch: und andere)
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GmbH & Co. KG	Gesellschaft mit beschränkter Haftung & Compagnie Kommanditgesellschaft
HEMA	2-Hydroxyethylmethacrylat
HPMA	2-Hydroxypropylmethacrylat
IgG	Immunoglobulin G/ Gammaglobulin
J	Teilchenstromdichte
kDa	Kilodalton
LDD	Local Drug Delivery System
Lsg.	Lösung
M	Molar
m	Meter
mA	Milliampere
MBAA	N,N'-Methylenbisacrylamid
mbar	Millibar
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min.	Minute
mm	Millimeter
MPTMS	3-Methacrylpropyltrimethoxysilan
N	Newton
nmol	Nanomol
NSA	N-Succinimidylacrylat

P3HB	Poly-3-hydroxybutyrat
Pa	Pascal
PAA	Polyacrylsäure
PAAm	Polyacrylamid
PEG	Polyethylenglykol
PET	Polyethylenterephthalat
PGA	Polyhydroxyessigsäure bzw. Polyglycolid
PHEMA	Poly(2-hydroxyethylmethacrylat)
PLLA	Poly-L-Lactid
PMMA	Polymethylmethacrylat
PVA	Polyvinylalkohol
RET	Resonanz Energie Transfer
ROI	region of interest
rpm	revolutions per minute
sec.	Sekunde
semi-IPN	semi-interpenetrating polymer network
SPA	staphylococcal protein A
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
vgl.	vergleiche
w	Gewicht
W	Watt
WFS	Wirkstofffreisetzungssystem
$\epsilon_B$	Bruchdehnung
$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{exc}$	Extinktionswellenlänge
$\sigma_m$	Zugfestigkeit

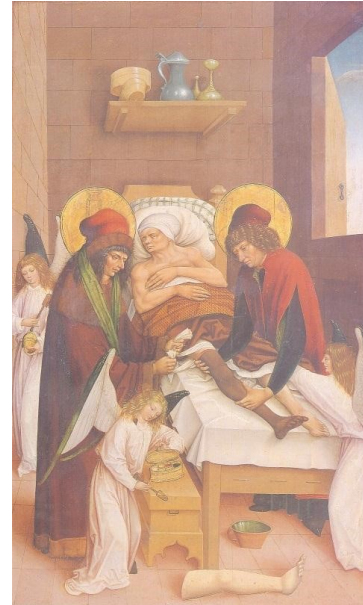
## 1. Einleitung

„...Und wenn Ihr der Kaiser wärt, Ihr müßtet mit dieser vorliebnehmen. Meine Rechte, obgleich im Kriege nicht unbrauchbar, ist gegen den Druck der Liebe unempfindlich: sie ist eins mit ihrem Handschuh; Ihr seht, er ist Eisen....“

Zeilen aus Goethes Schauspiel in fünf Aufzügen „Götz von Berlichingen mit der eisernen Hand“ [1], welche von einem der in der Literatur bekanntesten Beispiele einer Exoprothese – der eisernen Hand des fränkischen Reichsritters von Berlichingen – zeugen. Aber auch vor dieser Zeit gab es schon Prothesen und Implantate. So gingen am 14/15. Februar 2011 Meldungen über die erfolgreiche Testung und damit verbundene Verifizierung eines früheren Sensationsfundes durch die deutsche Presse: „Älteste Prothese der Welt an Mumie entdeckt“ (Die Welt) [2], „Ägyptische Mumie trug älteste Prothese der Welt“ (Scinexx) [3], welche sich auf die Trägerin der ältesten bekannten Prothese der Welt bezogen und bereits 4 Jahre zuvor in den Medien auftauchte, ohne den genauen Hintergrund zu kennen: „Altägypten: Mumien-Zehe soll älteste Prothese der Welt sein“ (Spiegel) [4]. Hierbei handelte es sich um die Priestertochter Tabaketenmut, welche zwischen 950 und 710 vor Christi Geburt in Theben lebte, ebendort einbalsamiert wurde, und einen aus Holz und Leder hergestellten großen Zeh an ihrem rechten Fuß aufwies [5,6]. Dieses Beispiel, wie auch der Versuch der Etrusker im 6.-4. Jahrhundert vor unserer Zeit verloren gegangene Zähne durch Goldimplantate zu ersetzen (Endo-Exo-Prothesen) [7], weist auf das Bestreben der Menschen hin, verloren gegangene oder erkrankte – oft gleichbedeutend mit dem Verlust der Extremität (**Abbildung 1**) [8] – Gliedmaßen adäquat zu ersetzen. Neben dem Ersatz fehlender Gliedmaßen mittels Prothesen gab es seltener auch Versuche kranke durch gesunde Körperteile zu ersetzen. Als eine der ersten Transplantationen gilt der Ersatz eines verfaulten Beines durch das eines Verstorbenen, durchgeführt von den beiden frühchristlichen Heiligen und Ärzten Cosmas und Damian, im 3. Jahrhundert nach Christi Geburt (**Abbildung 2**) [8].

Infolge körpereigener Reaktionen welche bei Endo-Exo-Prothesen häufig, aufgrund fehlender Hygiene und hierauf folgender infektiöser Entzündungen, zu Komplikationen, welche zur Abstoßung und im schlimmsten Fall zum Tod des Patienten, führten, kam es auch hier zum Tode der operierten Person. Aber auch 1890 scheiterte der Berliner Chirurg Themistokles Gluck noch an der Implantation von

Knieprothesen aus Elfenbein, welche er mit Zement am Knochen fixierte, da Blutungen und Infektionen einfach nicht zu kontrollieren waren – obwohl die Zellenlehre von Rudolf Virchow 1855 das Verständnis von gesunden und kranken Körperzellen verbesserte.



**Abbildung 1** Beinamputation (*Serratura*), 1517 kolorierter Holzschnitt auf wieder-verwendetem Papier, 20 x 12,7 cm. Johann Wechlin, aus Hans von Gersdorffs “Feldbuch der Wundarztney”, SmithKline Beckman Corporation Fund, Philadelphia Museum of Art [8].

**Abbildung 2** Transplantation eines Beines durch die Heiligen Cosmas und Damian, um 1500. Altarbild aus Schwaben, 106 x 63 cm. Württembergisches Landesmuseum, Stuttgart [8].

Durch technische Entwicklungen, neue Materialien und die Umorientierung von ingenieurwissenschaftlichen Unternehmen auf dieses Gebiet hat seit 1945 auf diesem Gebiet ein Innovationsschub stattgefunden [9], wodurch heutzutage eine Vielzahl an Implantaten für vielfältige Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung steht. Gerade die Herkunft der Materialien der sogenannten ersten Generation aus dem ingenieurwissenschaftlichen, beziehungsweise dem handwerklichen Bereich, kombiniert mit der reinen Zielsetzung im Hinblick auf die Funktion des Implantates führte in der Anfangszeit zu massiven Problemen bezüglich der Fremdkörper – wie auch der Entzündungsreaktionen. Infolge dessen wurde in der zweiten Generation eine Änderung des Bulkmaterials auf sogenannte inerte Materialien vorgenommen, welche in Ermangelung von Abbauprodukten geringe körpereigene Reaktionen hervorrufen sollten. Aufgrund der fehlenden Interaktionen konnten diese jedoch auch nicht zu einer positiven Beeinflussung von Heilungsprozessen beitragen. Aus diesem Grund

wurden Versuche im Bereich der geometrischen Abänderung des Oberflächendesigns angestrebt, um eine Verbesserung der Interaktion zwischen Implantatoberfläche und Gewebe zu erreichen. Eine wesentliche Verbesserung zur Induktion spezifischer Stoffwechselantworten sowie eine gezielte Anregung der angrenzenden Gewebereiche zu einem positiven Wachstum wurde jedoch weitestgehend erst mit sogenannten biokompatiblen Werkstoffen der dritten Generation erreicht. In der Zukunft sollen diese Eigenschaften im Rahmen der Verwendung von Implantatmaterialien der vierten Generation – einer Kombination aus Zellverbünden mit klassischen Werkstoffen – oder, zur besseren Interaktion des umgebenden Gewebes mit dem Implantat, gänzlich aus Zellverbünden bestehenden Implantaten weiter verbessert werden [9].

Nach heutigem Stand stellen Fremdkörperreaktionen bei Implantaten jedoch immer noch – wie 1890 – ein Risiko jeder Implantation, ob eines Stents, einer Herzklappe oder eines künstlichen Hüftgelenkes, dar.

Sich auf diese Problematik beziehend, sowie um das Einwachsverhalten der Implantate zu verbessern, wird heutzutage eine Beschichtung der Implantate mit wirkstoffhaltigen Polymerbeschichtungen angestrebt. Dies dient der Generierung lokaler Wirkstofffreisetzungssysteme („Local Drug Delivery (LDD) System“) mit einer kontrollierten und lange andauernden Wirkstofffreisetzung von welchen exemplarisch einige in **Tabelle 1** dargestellt werden [10–13].

Eine Herausforderung solcher Implantate ist unter anderem in der permanenten Wirkstoffabgabe zu sehen, welche unabhängig vom Nutzen zu jedem Zeitpunkt erfolgt und im entscheidenden Moment zur fehlenden Effektivität des Systems beitragen kann.

In dieser Arbeit wird daher die Etablierung und Charakterisierung einer intelligenten, stimulusresponsiven Implantatbeschichtung angestrebt.

Hierbei wird, um eine im Anwendungsspektrum möglichst flexible Beschichtung zu generieren, auf eine Hydrogelbeschichtung zurückgegriffen welche sich die gewebeähnlichen, mechanischen Eigenschaften und die einfache Modifizierbarkeit dieser Stoffklasse [18] zunutze macht, um rezeptorartige Strukturen einbauen zu können. Um diese möglichst variabel für unterschiedliche Stimuli gestalten zu können, werden in dieser Arbeit Antigen/Antikörper-crosslinker als Rezeptorstrukturen verwendet. Sie sollen in Gegenwart eines körpereigenen Stimulus (z. B. Protein) eine

erhöhte Quellungsneigung des Hydrogelkomplexes ermöglichen und somit eine erhöhte Durchlässigkeit für einen Wirkstoff erhalten [19–22].

**Tabelle 1** Beispiele von verschiedenen verwendeten Wirkstofffreisetzungssystemen (LDD) und deren Zielaufgaben anhand des zu heilenden Krankheitsbildes – sowie Beispiele für auf dem Markt befindliche Produkte.

Krankheitsbild	LDD/Wirkstoff (Bsp.)	Ziel	Produkt
Arteriosklerose/Stenose	Stent/Sirolimus [14]/ Stent/Paclitaxel [14]	Restenose verhindern [14][15]	Ultimaster® - Stent (Terumo)/ ION™ Paclitaxel- Eluting Coronary Stent System (Boston Scientific)
Arteriosklerose/Stenose	Ballonkatheter/Paclitaxel	Restenose verhindern [14][15]	Pantera® Lux (Biotronik)
Bradykardie	Schrittmacherelektrode/ Dexamethasone [14]	Reduktion der akuten Entzündungsreaktion [14]	Stelid II (ELA Medical, S.A.)
Hydrocephalus	Shunt/ Rifampin [16]	Verhinderung bakterieller Infektionen durch Staphylococcus epidermidis und Staphylococcus aureus [14]	Noch in der Erforschung [16]
Osteomyelitis	Knochenzement/ Gentamycin [17]	Verhinderung einer bakteriell ausgelösten Knochenentzündung [14]	PALACOS® Bone Cements (Zimmer)
Katheterassoziierte Sepsen	Katheter/Silberionen [14]	Antimikrobiotikum [14]	Agion® Nature's antimicrobial (Algion)

Zusammenfassend gesagt werden soll im Rahmen dieser Arbeit eine Hydrogelbeschichtung für die lokale, stimulusinduzierte Wirkstofffreisetzung von Implantatoberflächen entwickelt und bezüglich der Wirkstofffreisetzung charakterisiert werden.

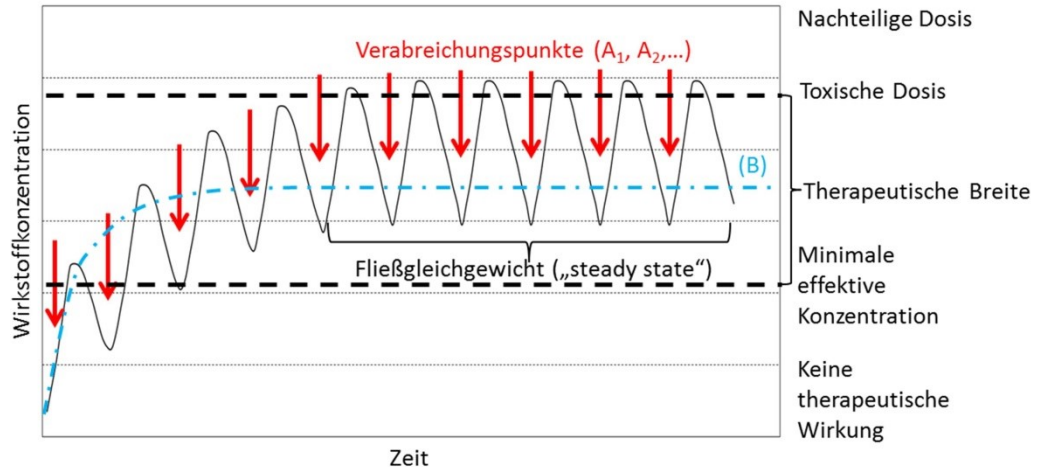
Zur genaueren Einordnung der Thematik schließt sich hierzu im Folgenden eine Darstellung der Grundlagen von implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystemen sowie hydrogelbasierten Freisetzungsmechanismen zur Einordnung der Generierung eines implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems an.

## 2. Stand der Wissenschaft und Technik

### 2.1. Implantatassoziierte Wirkstofffreisetzungssysteme

Viele Wirkstoffe werden – applikationsmäßig bedingt – systemisch verabreicht. Daher müssen diese, um einen therapeutischen Nutzen am Wirkort entfalten zu können, ausreichend dosiert verabreicht werden. Diese Art der Medikation führt an den Zielkompartimenten, wie auch im gesamten Körper, zwangsläufig zu stark schwankenden Wirkstoffkonzentrationen (vgl. **Abbildung 3**) [23,24]. Die schwankenden Wirkstoffkonzentrationen und auftretenden Maxima können auch in anderen Körperkompartimenten als auslösende Quelle von Nebenwirkungen dienen und hier, abseits des biologischen Targets, Reaktionen auslösen.

Eine weitere Limitation der systemischen Gabe liegt in der Berücksichtigung der Metabolisierung des Wirkstoffes sowohl im Magen-Darm-Trakt (Oral applizierte Wirkstoffe) wie auch der Leber [25] und hieraus folgend dessen richtiger Dosierung, was bei fehlerhafter Gabe zu Akkumulationen mit toxischen Konsequenzen führen kann.

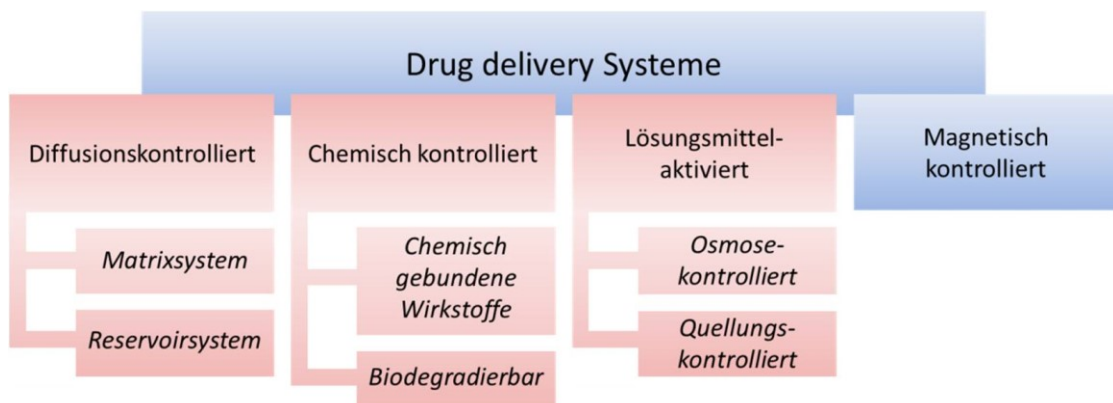


**Abbildung 3** Schematische Darstellung der Akkumulation eines Wirkstoffes infolge mehrfacher Verabreichungen ( $A_1, A_2, \dots$ ) bis zum Einstellen eines Fließgleichgewichtes („steady state“) [24]. Dem gegenüber dargestellt ist das ideale Wirkstofffreisetzungprofil (B) [23].

Auch bei Behandlungen von implantationsbedingten Reaktionen können diese Problematiken eine Rolle spielen. Um die körperliche Belastung möglichst gering zu halten sowie das Einwachsverhalten der Implantate zu verbessern, wurde in den letzten vier Jahrzehnten [26] damit begonnen, Implantate mit einer wirkstoffhaltigen Beschichtung auszustatten, welche in der Lage ist den Wirkstoff über einen definierten

Zeitraum und Ort konstant abzugeben [11]. Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit die Dosis hochwirksamer Wirkstoffe, welche sonst zu starken Nebenwirkungen führen könnten, signifikant zu reduzieren und außerdem durch die Polymerbeschichtung für eine Stabilisierung der Wirkstoffe zu sorgen. Generell wird ein solcher Systemaufbau als Drug Delivery System (DDS) oder auch Local Drug Delivery System (LDD) bezeichnet [27] (In Folge nur noch als LDD bezeichnet).

Nach Ranade et al. lassen sich polymerbasierte LDD in vier Hauptgruppen untergliedern [27]. Neben diffusionskontrollierten Systemen sind dies chemisch kontrollierte und lösungsmittelaktivierte Systeme. Als vierte Gruppe sind die magnetisch kontrollierten Systeme zu nennen, welche im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht behandelt werden, da diese sich thematisch von dem verwendeten Prinzip, anders als die diffusionskontrollierten, die lösungsmittelaktivierten sowie die chemisch kontrollierten Wirkstofffreisetzungssysteme, zu stark entfernen (Abbildung 4).



**Abbildung 4** Einteilung der Drug Delivery Systeme in verschiedene Freisetzungsklassen [27]. Bei den vom Prinzip der Arbeit nahestehenden Klassen handelt es sich um die diffusionskontrollierten, die lösungsmittelaktivierten sowie die chemisch kontrollierten Wirkstofffreisetzungssysteme. Mit Blau unterlegt sind außerdem die durch Magnetismus kontrollierten Systeme dargestellt, auf welche infolge zu weiter thematischer Abweichung nicht weiter eingegangen wird.

### 2.1.1. Diffusionskontrollierte Freisetzungssysteme

Diffusionskontrollierte LDD lassen sich weiterhin in zwei Unterkategorien untergliedern – jene der Reservoirsysteme sowie jene der Matrixsysteme [27,28]. In beiden ist der Wirkstoff nicht chemisch gebunden. Als treibender Faktor der

Wirkstofffreisetzung dient in beiden Fällen die *Ficksche Diffusion* (vgl. **Formel 1**) [28] und nicht die Mobilisierung des Wirkstoffes aus dem Depot.

$$J = -D \frac{\delta c}{\delta x}$$

**Formel 1** 1. Ficksches Gesetz. Die Teilchenstromdichte  $J$  ist proportional dem negativen Konzentrationsgradienten  $dc/dx$  entgegen der Diffusionsrichtung. Der Proportionalitätsfaktor ist der Diffusionskoeffizient  $D$ .

Der inkorporierte Wirkstoff beginnt, sobald das wirkstoffhaltige System am Implantationsort vorliegt, entlang des Konzentrationsgradienten aus dem wirkstoffreichen LDD in das wirkstoffarme umgebende Gewebe zu diffundieren. Insofern keine weiteren Einflüsse wie die Quellung (quellungskontrollierte Freisetzung (lösemittelaktivierte Freisetzung)), Degradation (degradationskontrollierte Freisetzung (chemisch kontrollierte Freisetzung)) oder ein inhomogener (poriger) Aufbau die Freisetzung beeinflussen, ergibt sich eine ungerichtete Brownsche Molekularbewegung aus dem System heraus.

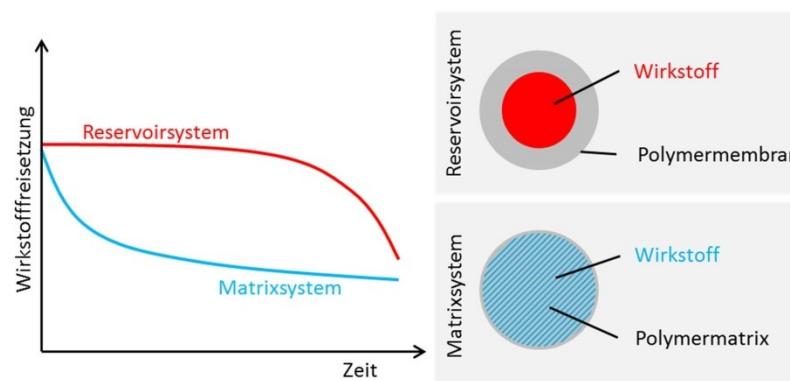
Daher spielt auch die Art und Weise der Implementierung des Wirkstoffes bei diffusionskontrollierten LDD eine wesentliche Rolle. Sobald der Wirkstoff hier nicht komplett gelöst vorliegt und daher als Wirkstoffdepot fungiert, steigt die Bedeutung von Konzentrations- und Partialdruckunterschieden für die Abgabe des Wirkstoffes in konstanter Art und Weise. Dieses führt zu der Erkenntnis, dass physikalischen Wechselwirkungen, zwischen Wirkstoff und Polymer, eine signifikante Bedeutung bei der Wirkstofffreisetzung haben können [29].

Neben Polymereigenschaften wie dem Kristallinitätsgrad (Variationen über die Fläche lassen starke Wirkstofffreisetzungsschwankungen erwarten, da zwischen kristallinen und amorphen Bereichen [30] ein Unterschied in der Wirkstoffaufnahme – diese ist für amorphe Bereiche stärker ausgeprägt, da dieser in kristallinen Bereichen lediglich in Störstellen oder in das Netzwerk erfolgt [28] – auftritt), der Glasstemperatur [31] sowie dem Degradationsverhalten stellen hierbei auch Werkstoffeigenschaften wie Hydrophilie und Wirkstoffkristallinität einen wesentlichen Parameter dar [30,32].

Betrachtet man das Degradationsverhalten, so sind Systeme welche langsam degradieren (wie Poly-L-lactid (PLLA), Poly-3-hydroxybutyrat (P3HB) [33]) der Gruppe der diffusionskontrollierten Freisetzungssysteme zuzuordnen. Hier treten vor allem lokale Kristallinitätsunterschiede wie auch Unterschiede in der Glasstemperatur

bei der Gleichmäßigkeit und Schnelligkeit der Freisetzung [31,34] ebenso wie hydrophilen/hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Polymer und Wirkstoff [35] als maßgebliche Faktoren der Freisetzungsscharakteristik in den Fokus. Zusätzlich spielt der Systemaufbau eine nicht unwesentliche Rolle.

Wie dargelegt, lassen sich die diffusionskontrollierten Systeme in zwei Gruppen unterteilen, bei welchen sich starke Unterschiede bei der Wirkstofffreisetzung ergeben (vgl. **Abbildung 5**). So zeigen Reservoirsysteme bis zur Erschöpfung des Speichers über längere Zeit eine konstante lineare Freisetzung (vgl. **Abbildung 5**, linke Seite, rote Kurve). Das System setzt also, da für diffusionsgesteuerte Freisetzungssysteme nicht bioabbaubare Membranen verwendet werden, den unterhalb dieser vorliegenden Wirkstoff in einer konstanten Geschwindigkeit frei. Matrixsystem hingegen zeigen zu Beginn erhöhte – bis hin zu sehr starken – Wirkstofffreisetzen (vgl. **Abbildung 5**, linke Seite, blaue Kurve). Hierbei spiegelt sich die immer weitere Abnahme der Freisetzungsgeschwindigkeit durch die gesteigerten Diffusionswege des Wirkstoffes wider, während zu Beginn der Freisetzung der Wirkstoff von der Oberfläche und aus randnahen Schichten schnell austritt [11].



**Abbildung 5** Idealisiertes Wirkstofffreisetzungsprofil eines Membransystems gegenüber dem eines Matrixsystems (links) und Aufbau dieser Systeme (rechts) [28].

Eine Variante den Burst-Release-Effekt von Matrixsystemen zu vermeiden, oder abzumildern, kann über den Aufbau als Schichtsystem erfolgen. Hierbei wird über die Matrix beispielsweise eine weitere Polymermembran gelegt, welche zusätzlich über Diffusionsparameter die Freisetzung steuert [36].

Ein solches System basiert wiederum auf membrangesteuerter Diffusion.

Darstellbar sind solche Systeme, sowohl im Falle der Matrix als auch der Reservoirsysteme, über das Verfahren der Sprüh- bzw. der Tauchbeschichtung bzw. im Falle eines Wirkstoff/Polymer Bulks als kompletter Guss- bzw. Tauchkörper.

### **2.1.2. Chemisch kontrollierte Freisetzungssysteme**

Im Gegensatz zu den nicht, oder langsam degradierenden, diffusionsgesteuerten Wirkstofffreisetzungssystemen gliedern sich chemisch kontrollierte Freisetzungssysteme in Systeme welche biodegradierbar sind oder den Wirkstoff chemisch gekoppelt vorliegen haben [27]. Bei degradierbaren Systemen (vgl. **Abbildung 4**) handelt es sich um Formulierungen welche den Wirkstoff neben der Diffusion auch durch Abbau der Polymermatrix abgeben. Anders als bei diffusionsgesteuerten Systemen erfolgt der Abbau der Polymermatrix jedoch schneller als die Diffusion des Wirkstoffes, weswegen dies der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Wirkstoffabgabe ist [9]. Den Abbau der Matrix kann man je nach Polymer in Bulk- und Oberflächenabbau unterteilen. Hierbei erfolgt die Auflösung der Matrix über den Kettenabbau des Polymerverbundes. Im Laufe dieses Prozesses kommt es durch Auflösung der Matrix zum Auslösen des Wirkstoffes aus dem Polymerverbund.

Hierbei ergibt sich im Falle eines schnell bioabbaubaren Materials – aufgrund der Degradationskinetik – eine sehr komplexe Situation der Wirkstofffreisetzung. Daher greift man zur gleichmäßigen Freisetzung des Wirkstoffes eher auf langsam degradierende Polymere, wie unter **Kapitel 1** dargestellt, zurück.

Für schnell degradierbare Systeme werden vorzugsweise biodegradierbare Polymere verwendet. Ein Beispiel wäre Polyhydroxyessigsäure, auch Polyglycolid (PGA) genannt [37]. Die Degradationsvarianten und Geschwindigkeiten hängen von der Homogenität des Bulks, seiner Zusammensetzung, physikochemischen und physikalischen Faktoren sowie unter anderem auch der Morphologie sowie den auch hierauf basierenden Wechselwirkungen mit dem umgebenden Medium ab [38]. Zusätzlich wirkt sich hier, im Falle der Anwesenheit hydrophiler Gruppen, eine verstärkte Wasseraufnahme beschleunigend auf die Degradation aus [28]. Neben den hydrolytisch degradierbaren Systemen sind auch enzymatisch oder mikrobiell degradierbare Systeme bekannt [38].

Auch diese Systeme sind, wie im Falle der Matrix- als auch der Reservoirsysteme, über das Verfahren der Sprüh- bzw. der Tauchbeschichtung oder im Falle eines Wirkstoff/Polymerbulks als kompletter Guss- bzw. Tauchkörper darstellbar.

Im Gegensatz hierzu unterliegen Systeme mit chemisch gebundenen Wirkstoffen zusätzlich der Spaltungskinetik einer spezifischen Bindung. So erfolgt die Wirkstoffabgabe des kovalent gebundenen Wirkstoffes erst nach Spaltung der Bindung, wodurch dieser Schritt der geschwindigkeitsbestimmende im Rahmen der Wirkstofffreisetzung wird [39]. Dies bedeutet, dass der Wirkstoff über Linker im Polymerbulk gebunden vorliegt, oder an der Oberfläche linkervermittelt etabliert wird [39,40].

Sinnvoll kann eine solche Vorgehensweise bei zeitlich begrenzten Infektionen sein. Hier könnten gekoppelte Antibiotika, welche nur im Falle der Infektion freigesetzt werden sollen, an das Polymerrückgrat angekoppelt werden. Ein mögliches Beispiel ist die Kopplung von Gentamycin über Peptidlinker. Hierbei müssen die Linker für ein Enzym spaltbar sein, welches im benötigten Fall verstärkt auftritt. Beobachtungen zeigten, dass Thrombin, in mit *Pseudomonas aeruginosa* infizierten Wunden, verstärkt im Wundsekret auftaucht. Daher stellen durch Thrombin spaltbare Linker eine Möglichkeit dar, zeitaufgelöst Gentamycin auszuschütten [39]. Jedoch muss ein solches System entweder porös genug sein, um ein Eindringen des Enzyms zu gewährleisten, oder aber oberflächenmodifiziert.

Systeme mit hydrolytisch spaltbaren Bindungen sind hingegen im kompletten Polymerbulk anwendbar und ermöglichen daher höhere Wirkstoffbeladungen, was bei ausreichender Wasseraufnahme zu einer gleichmäßigen Wirkstoffausschüttung führt.

### **2.1.3. Lösungsmittelaktivierte Freisetzungssysteme**

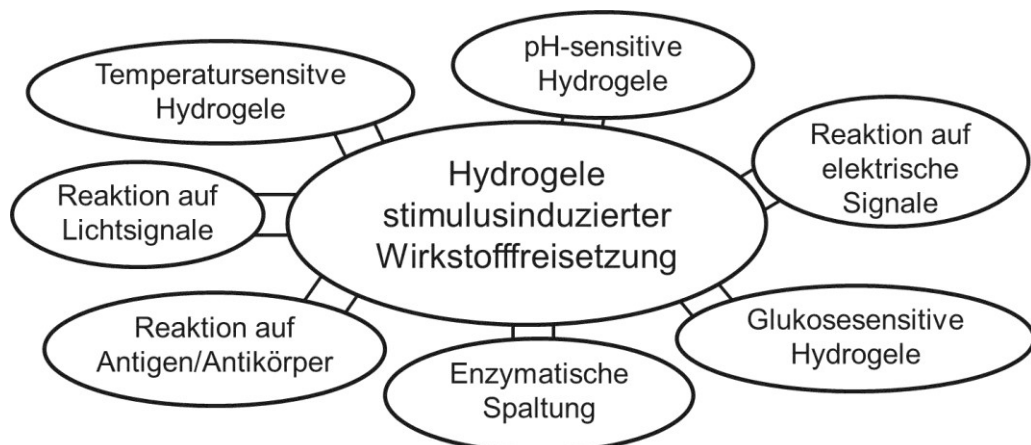
Als abschließenden Punkt im Kapitel der dargestellten LDD sind lösungsmittelaktivierte Systeme zu nennen. Auch hier sind zwei Vertreter zu nennen. Zuerst zu erwähnen wären die osmosekontrollierten Freisetzungssysteme (vgl. **Abbildung 4**). Es handelt sich hierbei um Systeme beruhend auf der Verwendung einer semipermeablen Membran. Hierdurch wird die Verwendung des osmotischen Druckes als Triebfeder der Wirkstoffabgabe ermöglicht. Dringt in das wirkstoffbeladene System wässriges Medium ohne Wirkstoff ein, so kommt es an der semipermeablen Membran über Osmose zu einem Ausgleich der Konzentrationsgefälle. Der hochkonzentrierte Wirkstoff aus dem System wird zum Beispiel über Zelluloseacetatmembranen [41] in das umliegende Gewebe abgegeben [27].

Eine weitere Variation der lösungsmittelaktivierten Freisetzungssysteme stellen die quellungskontrollierten Wirkstofffreisetzungssysteme dar (vgl. **Abbildung 4**). Hier liegt eine quellfähige Matrix, z. B. ein Hydrogel, in getrocknetem Zustand vor. Zuvor wurde hier im gequollenen Zustand der Wirkstoff inkorporiert. Kommt dieses System in Kontakt mit Wasser, wie in Körperkompartimenten üblich, beginnt es zu quellen. In Bereichen, in welchen die Quellung bereits stattgefunden hat, kann der Wirkstoff nun frei diffundieren. Diese langsame Quellung ermöglicht so eine gleichmäßig erfolgende Wirkstofffreisetzung.

Als Sonderfall der quellungskontrollierten Systeme sollen hier nun, da sich diese Arbeit wesentlich mit diesen Systemen befasst, stimulusresponsive LDD (vgl. **Abbildung 6**) dargestellt werden. Bei dieser Variante handelt es sich um einen Mischtyp aus quellungskontrollierten sowie Systemen mit gebundenen Wirkstoffen oder Sensorstrukturen.

Das Ziel dieses Aufbaues liegt in einem Mechanismus begründet, welcher die Quellung des Hydrogels erst bei Anwesenheit eines Stimulus oder einer Spaltung, sowohl physikalischer oder chemischer Natur, ermöglicht [19–22,39].

In einem solchen System ist – im Falle der Anwesenheit eines Stimulus – wie auch bei quellungskontrollierten Systemen die Diffusion der geschwindigkeitsbestimmende Faktor [39].



**Abbildung 6** Verschiedene Stimulusarten, auf welche Hydrogele stimulusinduzierter Wirkstofffreisetzung reagieren können [39].

### *Quellungskontrollierte Systeme und Systeme mit gekoppelten Wirkstoffen und Sensorstrukturen*

Die Verwendung und Entwicklung quellungskontrollierter Freisetzungssysteme stellt eine Verbesserung der bisherigen LDD in Bezug auf einen definierten Zeitrahmen der Freisetzung dar. Systeme mit gekoppelten Wirkstoffen oder Sensorstrukturen sind, als Erweiterung quellungskontrollierter Systeme, eine Materialgruppe welche geeignet ist auf bestimmte körpereigene Signale zu reagieren. Im Gegensatz zu den diffusionsgesteuerten Systemen ist diesen Systemen weiterhin gemeinsam, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Diffusion erst infolge von Parametern wie der chemischen Spaltung oder Quellung eintritt [9,18]. Hierdurch wird das Spektrum, gerade im Bereich der Systeme mit gekoppelten Wirkstoffen oder Sensorstrukturen, um den Faktor der Beeinflussung durch einen weiteren genau definierten Faktor – den zeitlichen – erweitert.

Mögliche Varianten der Steuerung sind unter anderem spezifische Schnittstellen für Proteine oder pH-Änderungen [42]. Heutigen Varianten ist eine weitestgehend unspezifische – und wenn doch spezifische, so irreversible – strukturelle Veränderung der das Wirkstoffreservoir abschirmenden Schutzschicht gemeinsam, weswegen diese bezüglich der individualisierten Medizin an Grenzen stoßen [43], auch wenn dies natürlich die Compliance des Patienten verbessern und eine Verringerung der Plasmakonzentrationsschwankungen, wie oben erwähnt, bewirken [25].

Moderne Varianten der LDD werden dahin gehend vermehrt in die Richtung von intelligenten LDD entwickelt, um den Wirkstoff nicht nur in einer definierten, gleichbleibenden Dosierung zu halten, sondern eine Freisetzung nur in spezifischen Fällen zu erreichen. Um diese Sensitivität zu erreichen, müssen Systeme als Beschichtung etabliert werden welche Strukturen beinhalten, die diese Signale aufnehmen können. Neben den chemisch gebundenen Wirkstoffen, auf welche hier nicht weiter eingegangen werden soll, da diese vorzugsweise unselektiv über hydrolytische Spaltung freigesetzt werden, ist die Verwendung von quellbaren Systemen, gekoppelt mit Sensorstrukturen oder chemisch spaltbaren Linkern, welche das Quellen erst ermöglichen oder zusätzlich verstärken, eine vielversprechende Variante.

Für solche Systeme bieten sich, da auf Quellung basierend, vor allem Hydrogele als vielseitig modifizierbare Matrix an. Hierbei treten sowohl Matrix als auch

Membransysteme als Freisetzungsvarianten auf. Die Verwendung von Hydrogelen ist vorwiegend auf die Quellbarkeit, die Variabilität sowie die biomimetischen Eigenschaften zurückzuführen.

Vorteil dieser Systeme ist die permanente Anwesenheit von stimulussensitiven Sensorstrukturen, welche auf spezifische Signale reagieren können. Aus diesem Grund wird im folgenden Kapitel der Einsatz von Hydrogelen, und weiterführend derjenige von modifizierten Hydrogelen, als Beschichtungsmatrix genauer betrachtet.

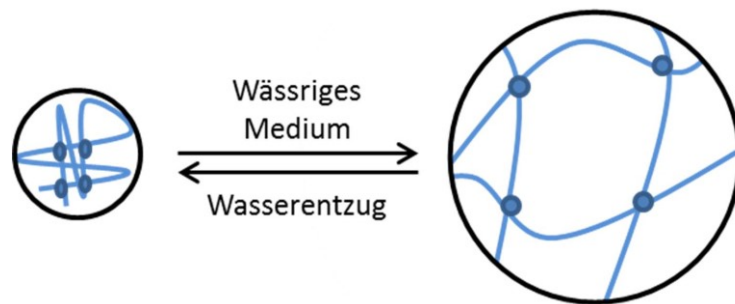
## **2.2. Hydrogele als Beschichtungsmatrix**

### **2.2.1. Grundlagen**

120 Jahre sind seit der ersten Nennung des Begriffes Hydrogel im Jahre 1894, sowie mehr als 50 Jahre seit der ersten biomedizinischen Verwendung und Synthese eines Hydrogels (2-Hydroxyethylmethacrylat, HEMA, 1960) durch Wichterle und Lim [44,45], vergangen. In diesem Zeitraum wurde allerdings auch die Begrifflichkeit einem starken Wandel unterzogen. Bezeichnete er noch 1894 kolloidale Gele anorganischer Salze [45], so werden heute unter dem Begriff dreidimensionale Netzwerke [18,45] verknüpfter, und so in der Gesamtheit nicht mehr wasserlöslicher, Monomere verstanden [46,47]. Bezüglich dieses Terminus hat sich seit den 50er-60er Jahren die Anzahl der Veröffentlichungen wesentlich erhöht und ist auch im Bereich der intelligenten Hydrogele in den letzten 10 Jahren geradezu in die Höhe geschneit [48], woran sich die wachsende Bedeutung und das Potenzial von Hydrogelen ablesen lassen.

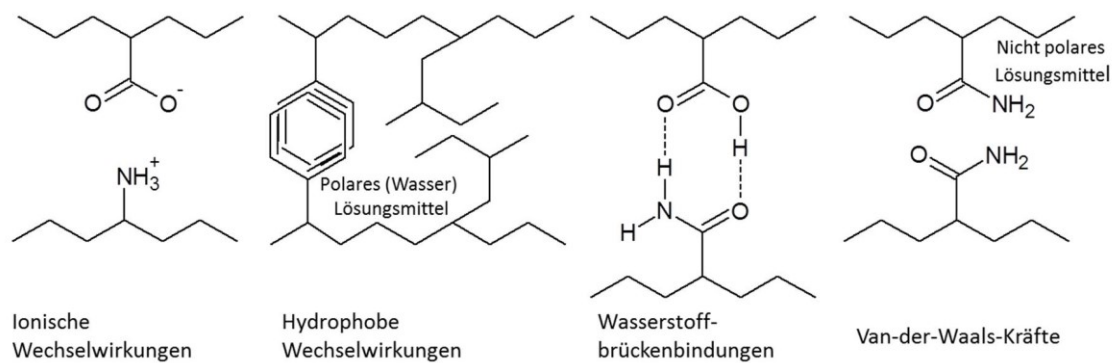
Bei Kontakt mit Wasser können diese Netzwerke, welche unter anderem durch die Variation des Verhältnisses hydrophober zu hydrophilen Monomere bei der Synthese (Copolymer) in der Hydrophilie variiert werden können [18,49], teilweise ein Vielfaches ihres Eigengewichtes an Wasser aufnehmen. Dieser Prozess, Quellung genannt wird, führt zu Hydrogelverbänden welche teilweise zu über 95% aus eingelagertem Wasser bestehen [47,50,51]. Oberhalb dieser Größenordnung spricht man von der Klasse der Superabsorber. Ein Beispiel wäre das Copolymer Acrylsäure/Natriumacrylat [52].

Im Rahmen der Quellung kommt es zu einer Erweiterung der im getrockneten Zustand durch die fehlende Oberflächenspannung kollabierten Poren mittels der Einlagerung von Wasser zwischen die Polymerstränge des Netzwerkes (vgl. **Abbildung 7**). Dieses Verhalten hängt direkt von der Polymerstruktur und der Vernetzungsdichte ab [46,48,51]. Die Erweiterung der Poren im Polymerverbund erfolgt, da unter anderem die Van-der-Waals Brücken zwischen den unterschiedlichen Polymersträngen gelöst und durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Polymer- und Wassermolekülen ersetzt werden.



**Abbildung 7** Prinzip der Quellung in Anwesenheit bzw. Abwesenheit eines wässrigen Mediums.

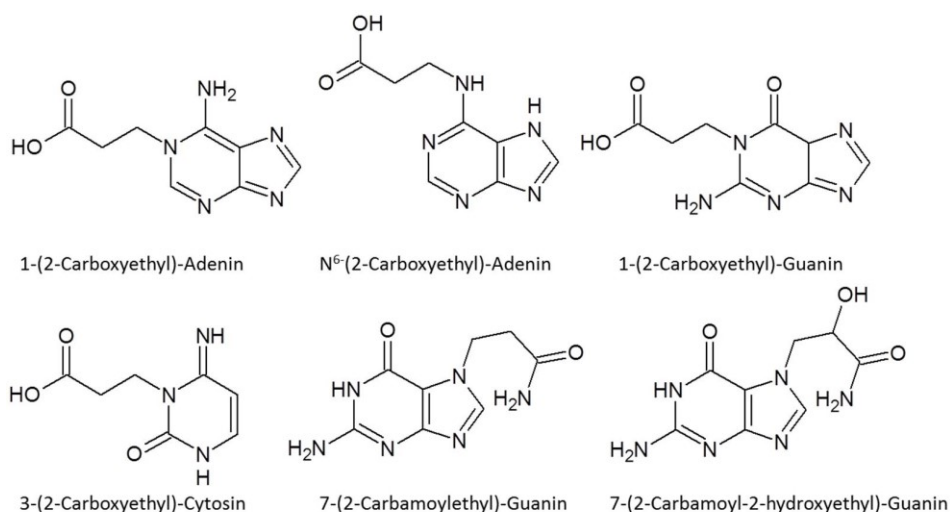
Durch die erweiterte Porengröße können Wirkstoffe mit passendem oder kleinerem, hydrodynamischen Durchmesser [53–55] durch das Netzwerk hindurch permeieren, da deren Mobilität im Hydrogelverbund erhöht ist [26], was eine Grundvoraussetzung für die quellungsgesteuerte Freisetzung darstellt. Einstellen lässt sich die Vernetzungsdichte sowohl durch kovalente Bindungen als auch physikalische Wechselwirkungen zwischen dem Polymerrückgrat sowie den Seitenketten. Mögliche Wechselwirkungen von ionischen, hydrophoben Wechselwirkungen bis hin zu Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräften sind in der **Abbildung 8** dargestellt [56]. Dass trotz des hohen Wasseranteils die mechanische Integrität des Netzwerkes dennoch gewahrt ist, wird neben den Wechselwirkungen zusätzlich über Verdrillungen und Überlappungen sowie durch das Vorliegen teilkristalliner Bereiche im Hydrogel erreicht [57,58]. Hierdurch können trotz der geringen mechanischen Belastbarkeit gewebeähnliche Eigenschaften erreicht werden, was zu einem stark wachsenden Verwendungsspektrum geführt hat.



**Abbildung 8** Exemplarische Darstellung möglicher Wechselwirkungen innerhalb eines Hydrogelverbundes [56].

Vor allem im Sektor der Biomedizintechnik findet sich ein breites Anwendungsfeld, wie Wundauflagen und Scaffolds für die Regeneration von Gewebe oder auch Organabdichtungen. Eine weitere Verwendungsmöglichkeit sind Biosensormembranen.

Für die Entwicklung dieser Materialien sind in den letzten Jahren neben natürlichen Hydrogelen (Polysaccharide (Alginat, Pektin, Stärke, Hyaluronsäure, Kollagen, Fibrin, Gelatine, Agarose, Alginat und Chitosan) und Proteinen (Kollagen)) welche über gute Biokompatibilitätseigenschaften verfügen, zusätzlich eine Vielzahl von synthetischen Hydrogelen wie Polyacrylamid (PAAm), Poly(2-hydroxyethylmethacrylate) (PHEMA), Polyvinylalkohole (PVA) oder Polyethylenglykole (PEG) in den Fokus des Interesses gerückt. Der Grund hierfür liegt in der einfacheren Synthese, beispielsweise über radikalische Polymerisation und auch die bessere Einstellbarkeit der Reaktionsparameter bezüglich der gewünschten Eigenschaften begründet [59–61]. Problematisch wirkt sich in diesem Falle die mögliche Anwesenheit toxischer Syntheserückstände, wie etwa von Monomeren, aus. Ein Beispiel hierfür stellt die Synthese des nicht toxischen Polyacrylamids aus Acrylamid dar, welches seinerseits über seine elektrophile Doppelbindung mutagen wirken kann (vgl. **Abbildung 9**) [62].

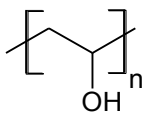
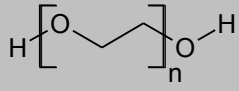


**Abbildung 9** Reaktionsprodukte des mutagen wirkenden Acrylamids (*in vitro*) sowie dem Metaboliten Glycidamid (*in vivo*) mit den elektronenreichen Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Bausteinen Adenin, Guanin und Cytosin [62].

In der folgenden Tabelle sind einige Beispiele für Hydrogele mit Struktur und Anwendungsbereich gegeben.

**Tabelle 2** Beispiele natürlicher und künstlicher Hydrogele [18,49,63].

Natürliche Hydrogele	Struktur	Verwendung (Beispiele)
Alginat		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Emulgator, Gelier-, Überzugs-, Verdickungsmittel [64–66]</li> <li>- Calciumalginatkompressen [67]</li> <li>- Wundauflage/Wundfüller [68,69]</li> <li>- Abformung Zahnabdruck [70]</li> </ul>
Stärke		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nahrungsmittelindustrie</li> <li>- Kleber in der Papierindustrie [71]</li> <li>- Bioethanol [72]</li> </ul>
Pektin		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lebensmittelindustrie [73]</li> <li>- Pharmaindustrie [74] (Geliemittel, Stabilisierungsmittel)</li> </ul>
Künstliche Hydrogele	Struktur	Verwendung (Beispiele)
Polyacrylamid		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Polyacrylamid-Gelelektrophorese [75]</li> <li>- Kosmetikindustrie (Gelbildner) [76]</li> <li>- als Copolymer in Superabsorbent [77] wie Windeln [78]</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Erdölförderung (Polymerfluten) [79]</li> <li>- Als Copolymer mit kationischen Esterquats Flockungsmittel in Abwassertechnik [80]</li> <li>- Retentionsmittel in Papierherstellung [80]</li> <li>- Embolisation von Tumorgefäßen wie dem Nasenrachenfibrom [81]</li> <li>- Formentrennmittel in der Herstellung von Kunststoffverbundwerkstoffen [82,83]</li> <li>- Kosmetische Produkte (Verdickungsmittel) [84]</li> <li>- Papierherstellung [85]</li> <li>- Benetzungs- und Adhäsionsmittel in künstlicher Tränenflüssigkeit [86]</li> <li>- Kontaktlinsen [87]</li> </ul>
Polyvinylalkohol		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elektrophorese [88]</li> <li>- Zellfusion [89]</li> <li>- Transfektion [90]</li> <li>- Gastroenterologie für Magnetresonanztomografie [91]</li> <li>- Präparation und Restauration [92]</li> <li>- Wirkstoffträger [93]</li> </ul>
Polyethylenglycol		

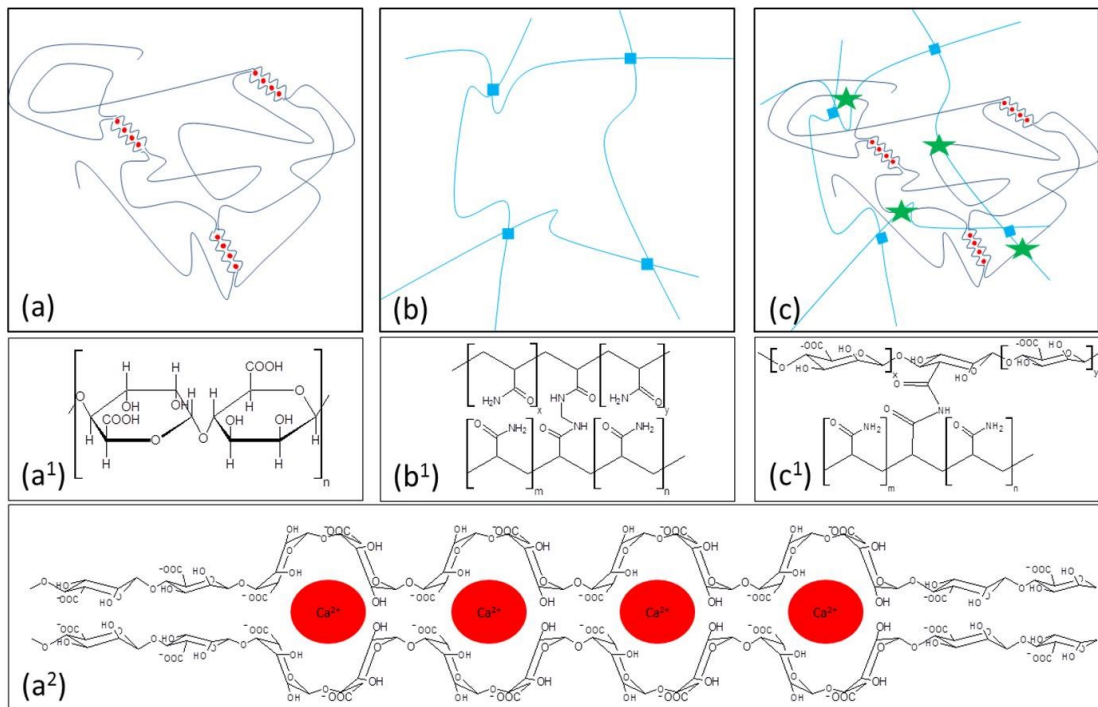
Eine Möglichkeit, die Vorteile beider Gruppen zu kombinieren, liegt in der Bildung von Hybridhydrogelen. Auch bei diesen Gelen ist eine Feinjustierung der chemischen und physikalischen Eigenschaften möglich, wodurch auch das Diffusionsverhalten bei Wirkstofffreisetzungen sowie die chemische Stabilität und physiologische Kompatibilität variabel einstellbar sind.

Verwendet werden solche Systeme unter anderem bei biologischen Fragestellungen wie der Steuerung von Zellanhaftungen oder auch als Kontrastmittel für das Imaging derselben [48,94–96].

Ein Beispiel für ein solches Hybridgel stellt ein Polyacrylamid/Alginate-Hydrogel dar [97–99]. Dargestellt in **Abbildung 10** zeichnet sich dieses Hybridgel durch die Kombination aus Matrixbereichen mit vermehrt ionischem Bindungscharakter, in welchen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit den Carboxylgruppen der alternierenden  $\alpha$ -L-Glucuronsäure- und  $\beta$ -D-Mannuronsäure-Bausteinen eine sogenannte „Eggbox-Struktur“ ausbilden (vgl. **Abbildung 10**, (a), (a<sup>1</sup>), (a<sup>2</sup>)), sowie kovalentem Bindungscharakter, in welchem ein Polyacrylamidnetzwerk (vgl. **Abbildung 10**, (b), (b<sup>1</sup>)) vorliegt, aus.

Neben der Einteilung bezüglich der Herkunft der Hydrogele gibt es eine große Bandbreite an weiteren Unterteilungsmöglichkeiten (vgl. **Abbildung 11**). So lassen sich Hydrogele außerdem nach Peppas et al. in unterschiedliche Gelarchitekturen, wie

auch in **Abbildung 12** dargestellt, unterteilen [18]. Eine weitere gängige Einteilungsmöglichkeit besteht in der Beurteilung von Hydrogelen nach der Art des Aufbaues anhand der Monomereinheiten. Diese können entweder einheitlich sein (Homopolymer) oder aus unterschiedlichen Einheiten (Copolymer) zusammengesetzt sein, welche ihrerseits wiederum in der Abfolge der Einheiten Unterschiede aufweisen können (statistisch zufällig, in Blöcken, oder alternierend) [18].



**Abbildung 10** Polyacrylamid/Alginat-Hybridgel [98]. Schema eines Alginathydrogels (a) mit der chemischen Struktur der alternierenden  $\alpha$ -L-Glucuronsäure- und  $\beta$ -D-Mannuronsäure-Bausteine (a<sup>1</sup>) sowie der mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen entstehenden Eggbox-Struktur (a<sup>2</sup>). Unter (b) dargestellt ist neben der schematischen Darstellung die chemische Formel von Polyacrylamid (b<sup>1</sup>). Rechts dargestellt ist neben der schematischen Darstellung des Hybridgels (c) auch ein Ausschnitt der chemischen Struktur des Netzwerkes (c<sup>1</sup>).

Wie in **Abbildung 11** dargestellt, sind weiterhin Unterteilungen anhand des ionischen Charakters der Hydrogele (anionisch, kationisch, zwitterionische oder amphoter), sowie bezüglich der physikalischen Wechselwirkungen im Hydrogelverbund möglich. Bei diesen kann man zwischen festen, kovalenten Bindungen sowie schwachen, nicht kovalenten Verknüpfungen unterscheiden. Schon erwähnt wurde außerdem, dass in Polymerverbünden kristalline und amorphe Bereiche auftreten können. Diese Art der Unterteilung beschreibt die physikalische Struktur des Hydrogels und ist, wie die Unterscheidung nach Art der Präparation, heutzutage eine gängige Variante. So

können, über unterschiedliche Arten der Präparation, Hydrogele unterschiedlicher Größenordnungen generiert werden ( $10^{-8}$  bis 1 m) [18]. Hierbei werden makroskopische und auch Mikrogele u. a. durch radikalische Polymerisation aus Monomeren und Crosslinkern hergestellt, während kleinere Nanopartikel auf Synthesetechniken wie der Emulsionspolymerisation oder der Nanoprägelithografie aufbauen [100,101].

Weitere Varianten der Synthese von makroskopischen Gelen liegen in der chemischen Vernetzung durch ionisierende Strahlung [102,103] oder der Ausbildung chemischer Verknüpfungen über Reaktionen zwischen den Seitenketten.

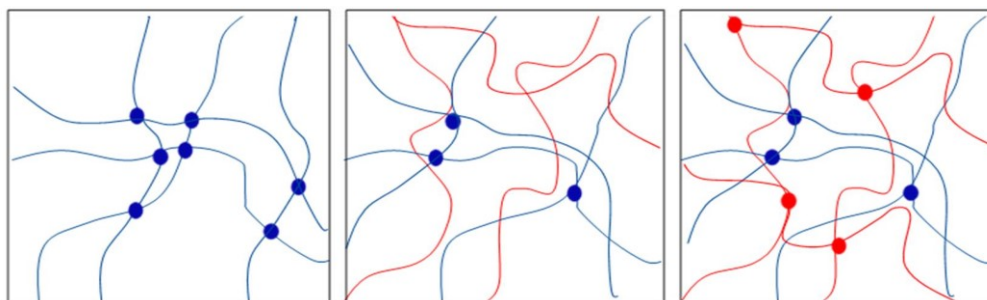
Hydrogele						
Herkunft	Gelarchitektur	Aufbau	Ionischer Charakter	Wechselwirkungen	Physikalische Struktur	Präparation
Natürlich	Konventionell	Homopolymer	Ungeladen	Schwache, nicht kovalente Verknüpfungen	Amorph	Chemisch
Künstlich	Interpenetrating Polymer Network	Copolymer	Kationisch Anionisch	Zeitlich begrenzte Wechselwirkungen	Semikristallin	Physikalisch
	Semi-Interpenetrating Polymer Network	Multipolymer	Amphoter Zwitterionisch	Kovalente Bindungen	Kristallin	

**Abbildung 11** Mögliche Aufgliederung von Hydrogelen in verschiedene Unterkategorien [18].

Einen anderen wesentlichen Punkt stellt die Unterteilung nach Gelarchitektur dar. Neben den auftretenden Netzwerken ohne weitere Einlagerungen (konventionelle Netzwerke) treten auch ineinander verschränkte Netzwerke auf (**Abbildung 12**). Hierbei gibt es neben zwei ineinander verschränkten Netzwerken (interpenetrating polymer network [18,104–107]), auch ein sogenanntes semi-interpenetrating polymer network (semi-IPN), bei welchem das zweite Netzwerk nur aus linearen oder alternativ auch aus verzweigten Fasern besteht [21,104,107,108].

Wie bei Polymermaterialien kann auch bei Hydrogelen eine verstärkte Freisetzung über eine Degradation der Polymermatrix erfolgen. Beschleunigt wird dies durch zusätzliche hydrolysierbare Strukturen im Hydrogelverbund. Zu nennen wären hier neben Estern, Orthoestern und Aminoestern vor allem Anhydride und Oligopeptide [37,109]. So stellt dies neben der quellungskontrollierten Freisetzung eine weitere Möglichkeit der Freisetzung aus Hydrogelverbünden dar. Es stellt eine partielle Variante der Steuerung über die Verwendung schaltbarer Strukturen im Hydrogelverbund dar. Gestalten lässt sich ein solches System mit Hydrogelen vor allem, weil in die flexiblen Netzwerke des Hydrogels schaltbare Strukturen einfach zu

implementieren sind und über die Veränderung der Quelleigenschaften auch eine unterschiedliche Freisetzung von Molekülen aus einem Depot erlauben können.



**Abbildung 12** Konventionelles Netzwerk (a). Verschränkt man in dieses Netzwerk lineare Polymerfasern, so erhält man ein semi-IPN (b). Unter (c) dargestellt liegt der verwendete Fall eines interpenetrating polymer network.

## 2.2.2. Schaltbare Hydrogele

Die Quellungseigenschaft eines Hydrogels stellt im Rahmen der Verwendung für diffusionsgesteuerte und chemisch kontrollierte Freisetzen einen wesentlichen Faktor dar. Bezüglich der Freisetzung kann man das System so modifizieren, dass diese Freisetzen nur in Anwesenheit eines Stimuli begünstigt – oder verlangsamt – werden. Ein solches System wird stimulusresponsives System, smartes oder auch intelligentes System genannt [39].

Dieser Stimulus (**Abbildung 6, Kapitel 1**) kann sowohl von einer internen Quelle (vorwiegend chemisch/biologisch) ausgehen, als auch extern (vorwiegend physikalisch) angelegt werden. In **Tabelle 3** sind folgend einige dieser Stimuli tabellarisch kurz der Herkunft nach Quellen zugeordnet.

**Tabelle 3** Aufgliederung verschiedener Stimuli nach externer und interner Steuerung.

Interne Stimuli	Extern/interne Stimuli	Externe Stimuli
<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH-Wert</li> <li>• Enzyme</li> <li>• Temperatur</li> <li>• Ionenstärke</li> <li>• Salztyp</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glucose</li> <li>• Antigen/Antikörper</li> <li>• pH-Wert</li> <li>• Enzymatisch</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Licht</li> <li>• Druck</li> <li>• Elektrisches Feld</li> <li>• Magnetfeld</li> </ul>

Viele Hydrogele reagieren mit reversiblen Veränderungen auf diese Reize. Dies bedeutet, dass die Gelstruktur hier keinen Schaden nimmt und das Hydrogel in Abwesenheit des Stimulus wieder in den Ausgangszustand zurückversetzt wird. Als biologische Stimuli treten besonders Antigene oder Antikörper sowie Enzyme in den Vordergrund. Während auf Hydrogele, welche in Anwesenheit eines Enzyms ihre

Eigenschaften oftmals aufgrund von Schnittmustern im Hydrogelverbund ändern [39], eine Reversibilität nur teilweise zutrifft, funktioniert die Schaltung über Antigen/Antikörper-Kontakte zerstörungsfrei, was einen reversiblen Mechanismus der Quellung ermöglicht [19,20,22]. Diese Eigenschaft kann für LDD zur bedarfsgerechten Abgabe von Wirkstoff verwendet werden, da mit schwankenden Biomolekülspiegeln – Stimuluskonzentrationen – unterschiedliche, benötigte Wirkstoffmengen abgegeben werden können.

Neben den schon genannten Freisetzungssystemen, welche auf Biomolekülen beruhen, stellt unter anderem die Variante der glukosesensitiven Insulinfreisetzung ein schaltbares System dar [39].

Im Folgenden werden ein insulinfreisetzendes System, als Kombination eines pH- und biomolekülgesteuerten Wirkstofffreisetzungssystems, ein Wirkstofffreisetzungssystem, basierend auf pH-Variation und enzymatischen Bindungsbruch, sowie ein antigensensitives Wirkstofffreisetzungssystem näher erläutert.

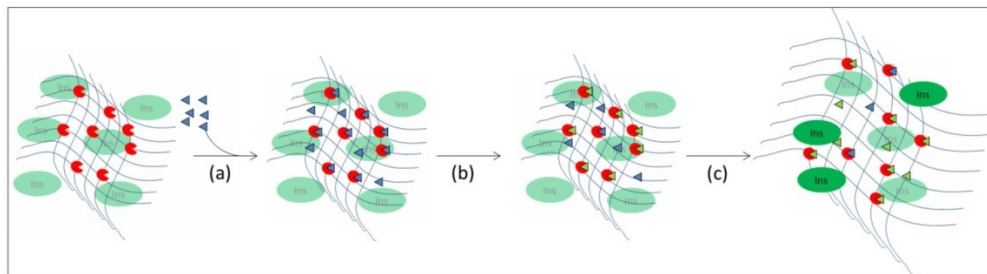
#### *Glukosesensitives Freisetzungssystem*

Dieses System, welches vorzugsweise für die Freisetzung von Insulin entwickelt werden soll, stellt eine Kombination aus pH-sensitiven und biomolekülsensitiven Hydrogelverbünden dar. Insulin – in Kombination mit Glukagon – Regulator des Glukosehaushaltes, bewirkt über den Glykogenaufbau eine Senkung des Blutzuckerspiegels. Gebildet in den Langerhansschen Inseln der Bauchspeicheldrüse, kommt es bei einem Funktionsverlust der Zellen bei Diabetes Typ I. zu einem Ausbleiben der Insulinausschüttung im Falle hoher Glukosespiegel. In solchen Fällen kommt heutzutage die Gabe von Insulin in Form von Tabletten oder subkutan als Injektion als Therapieform in Frage.

Als Herausforderung stellt sich in diesen Fällen die Compliance des Patienten dar, da neben der rechtzeitigen Insulineinnahme auch die genaue Bestimmung des Blutzuckerspiegels sowie die hieraus abgeleitete Dosierung des Insulins von Nöten sind. Eine wesentliche Erleichterung für den Patienten, sowie Steigerung seiner Lebensqualität, könnte daher über die Verwendung eines LDD, welches dem Prinzip der Bauchspeicheldrüse folgt, erreicht werden [110]. Dieses System könnte, anhand des Blutzuckerspiegels, die nötige Insulinausschüttung selbstregulierend vollziehen. Hierbei könnte ein Aufbau, basierend auf den oben genannten Hydrogelen zum Einsatz kommen. So wurden bereits 1984 glukosesensitive Hydrogele entwickelt

[111], und bezüglich des Potenzials der Insulinfreisetzung bei Glukoseanwesenheit charakterisiert [112].

Eine elegante Applikationsvariante würde hier die Injektion in Form einer Mikrokapsel darstellen, wobei sich solche Systeme immer noch im Entwicklungsstadium befinden. Die Mikrokapsel, welche als Doppelhüllen-variante ausgeführt ist, besitzt einerseits eine äußere, dem Blut zugewandte Seite aus großporigem, nichtionischem Hydrogel (PAAm), in welchem das glukoseoxidierende Enzym Glukoseoxidase eingebaut vorliegt (**Abbildung 13**), sowie daran angelehnt eine innere Membran, welche aus einem ionischen Hydrogel besteht (Copolymer aus 2-Hydroxypropylmethacrylat (HPMA) und *N,N'*-Diethylaminoethylmethacrylat (DEA)) [20,111].



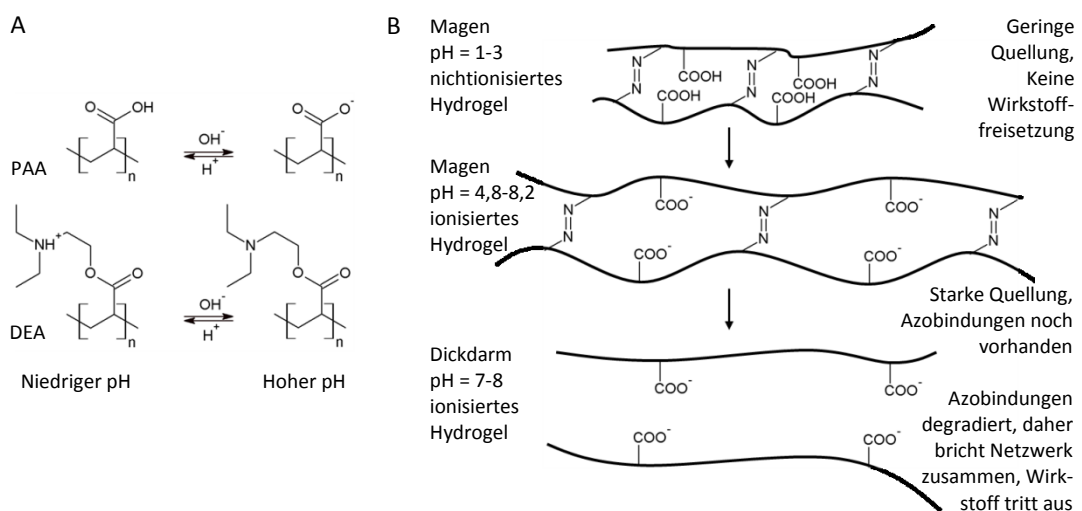
**Abbildung 13** Freisetzung von Insulin aus einem potenziellen Freisetzungssystem. In diesem Freisetzungssystem wird ein Glukoseoxidase (rot) gekoppeltes Polyacrylamidhydrogel (blaue Faserstruktur) als Sensor- und Quellungsmatrix verwendet [111]. Eindringende Glukose (a) (blaue Dreiecke) wird durch die gebundene Glukoseoxidase zu Glukonsäure (grüne Dreiecke) umgewandelt (b), wobei als Nebenprodukt Protonen entstehen. Durch den sinkenden pH-Wert kommt es zu einem Quellen des Hydrogels und einer Freisetzung des Insulins (c) (grüne Ellipsen).

DEA liegt bei dem vom Blutpuffer vorgegebenen pH von 7,35-7,45 [20,113] in einem nicht gequollenen Zustand vor, wodurch der Austritt des Insulins aus der Kapsel verhindert wird. Kommt es zu einem Anstieg der Glukosekonzentration im Blut, so steigt diese auch in dem großporigen Hydrogelverbund des PAAm. Über die enzymatische Umsetzung der Glukose zu Glukonsäure mittels der gekoppelten Glukoseoxidase werden als Nebenprodukt Protonen gebildet, welche den pH-Wert im Hydrogel senken [20,39,113]. Über Diffusion wandern die Protonen zu der aus DEA bestehenden Membran. Dadurch kommt es durch den sinkenden pH-Wert über eine Ionisierung der Aminogruppen zu einem Aufquellen des Hydrogels. Die Permeation des Insulins wird so durch beide Membranen ermöglicht. Sinkt in Folge über die Mobilisierung der Glykogensynthese die Glukosekonzentration im Blut wieder, so werden weniger Protonen erzeugt – der pH-Wert steigt. Durch den folgenden Kollaps

sinkt die Porenweite des Hydrogels so weit, dass das Insulin nicht mehr durch den Hydrogelverbund permeieren kann [20,39,50,51].

#### *Enzymgesteuertes Wirkstofffreisetzungssystem*

In einem solchen System werden durch Enzyme spaltbare Sequenzen zur Wirkstoffankoppelung oder zur Verknüpfung des Polymernetzwerkes verwendet. Ein solches Netzwerk kann auch bei dickdarmspezifischen Freisetzungssystemen verwendet werden [39]. Auch bei diesem System handelt es sich um eine Kombination mit einem pH-sensitiven System. Ein Hydrogel, basierend auf Polyacrylsäure (PAA), wird über Azoverbindungen, wie in **Abbildung 14** dargestellt, quervernetzt. Dieses Hydrogel liegt im neutralen Zustand in einer gequollenen Variante vor. Im sauren Umfeld des Magens ist die Quellung vernachlässigbar, was mit einer sehr geringen Freisetzung des Wirkstoffes korreliert. Mit dem Ansteigen des pH-Wertes im Dickdarmbereich kommt es zu einer Deprotonierung der Carboxylgruppen. Dieses führt durch Wassereinlagerung zu einem leichten Aufquellen des Hydrogelverbundes. Eine beschleunigte Freisetzung des Wirkstoffes wird jedoch durch die noch vorhandenen Azo-Quervernetzungen verhindert. Erst im Dickdarmbereich werden diese Bindungen durch die Azoreduktase (auftretend in der spezifischen mikrobiellen Dickdarmflora) gespalten (**Abbildung 14**) [114,115] und aus dem Prozess der reinen Wirkstoffdiffusion eine beschleunigte Freisetzung über Degradation.



**Abbildung 14** Links: Varianten von pH-Wert gesteuerten Hydrogelen. Rechts: Dickdarmspezifisches Wirkstofffreisetzungssystem. Die in der stark sauren Magen Umgebung protoniert vorliegende PAA wird folgend bei steigendem pH-Wert deprotoniert und beginnt zu quellen. Die Wirkstofffreisetzung erfolgt jedoch erst im Dickdarmbereich durch die Degradation des Systems über eine Azoreduktase [39].

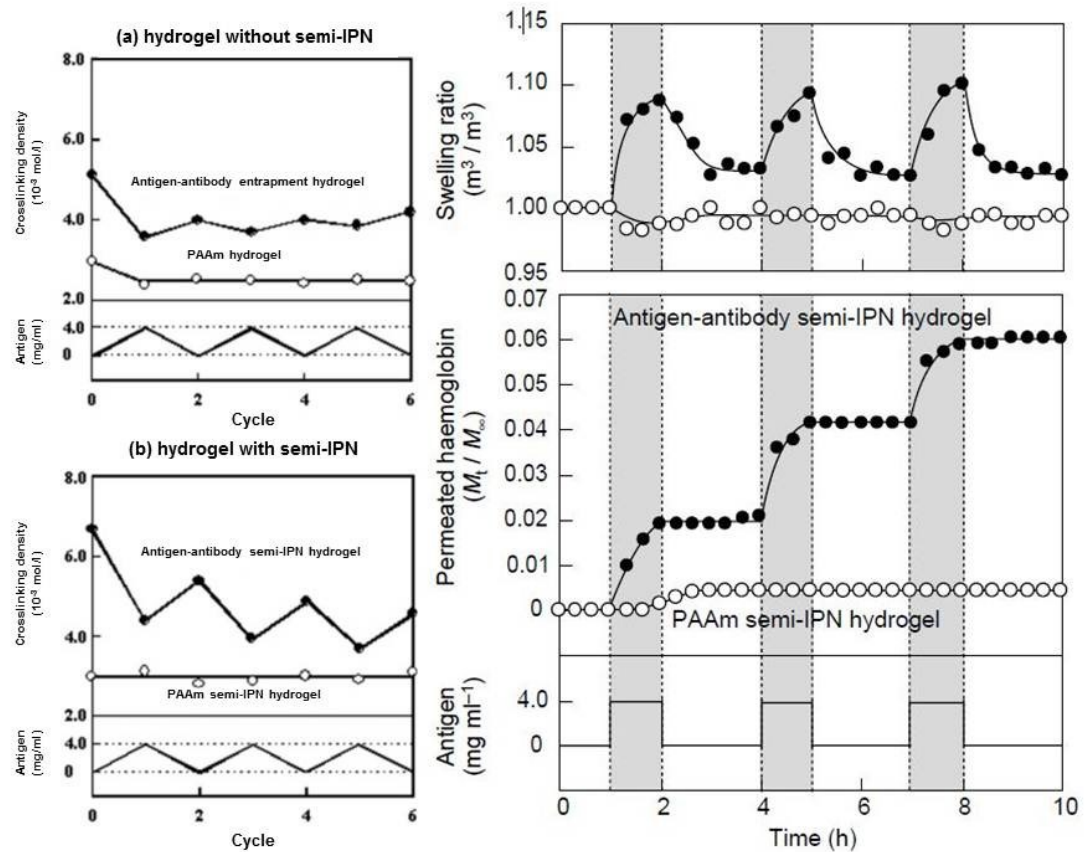
Eine weitere Variante der nur enzymatisch gesteuerten Freisetzung stellt die oben erwähnte Ankopplung des Wirkstoffes über Peptidlinker oder anderer spezifisch spaltbarer Crosslinker, an das Hydrogelnetzwerk dar [39,116].

So konnten Shimizu et al. zeigen dass bestimmte Linkersequenzen über die Spaltung mittels Thrombin, in Anwesenheit einer bakteriellen Infektion durch *Pseudomonas aeruginosa*, geeignet sind, gekoppeltes Gentamycin freizusetzen, während das Exsudat nicht infizierter Wundbereiche die hydrolytische Spaltung nicht katalysieren konnte [39,117].

### *Antigensensitive Hydrogele*

Im Gegensatz zu den geschilderten enzymgesteuerten Wirkstofffreisetzungssystemen liegt der wesentliche Vorteil des antigensensitiven Systems, wie von Miyata et al. 1999 beschrieben [19], bei der Wahrung der Integrität des Wirkstofffreisetzungssystems während der Freisetzung des Wirkstoffes und eine hierdurch gewährleistete Möglichkeit der Reversibilität. Hiermit ähnelt es den pH-sensitiven Hydrogelen, kann aber auf einen wesentlich selteneren Stimulus als quellungsauslösenden Faktor zurückgreifen, da in Netzwerk korrespondierende Antigene und Antikörper eingebaut werden, deren Bindung zueinander spezifisch, d. h. nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip funktionierend, ist. Hierdurch wird das System wesentlich sensibler. Antigene und Antikörper stellen wichtige Indikatoren der physiologischen Funktionen dar und haben heutzutage aufgrund der Spezifität schon Eingang in eine Reihe von Anwendungen mittels Immunoassays gefunden [18]. Der schnell und selektiv erfolgende Antigen/Antikörper-Kontakt stellt hierbei und auch bei den antigensensitiven Hydrogelen den Garanten für eine schnelle Detektion und einen daher im Falle der Hydrogele sofort einsetzenden Quellmechanismus dar. Durch die Diffusion des Antigens in den Hydrogelverbund kommt es zu einer Konkurrenzsituation zwischen dem in das Netzwerk integrierten Antigen und dem freien Antigen um die Bindungsstellen am gekoppelten Antikörper. Da durch die Modifizierung des Antigens, zwecks Einbaus in das Hydrogelnetzwerk, die Affinität zum Antikörper absinkt [118], erfolgt bei Anwesenheit des freien Antigens eine Verdrängung des gekoppelten Antigens aus der Antigen-Antikörperbindung. So nimmt die effektive Vernetzungsdichte ab, sobald Antigen/Antikörperkontakte im Gel durch Anwesenheit eines Antigens gelöst werden (**Abbildung 15**, linke Seite) [119]. Miyata et al. [19–22] beschreibt in diesem Zusammenhang die Steigerung der

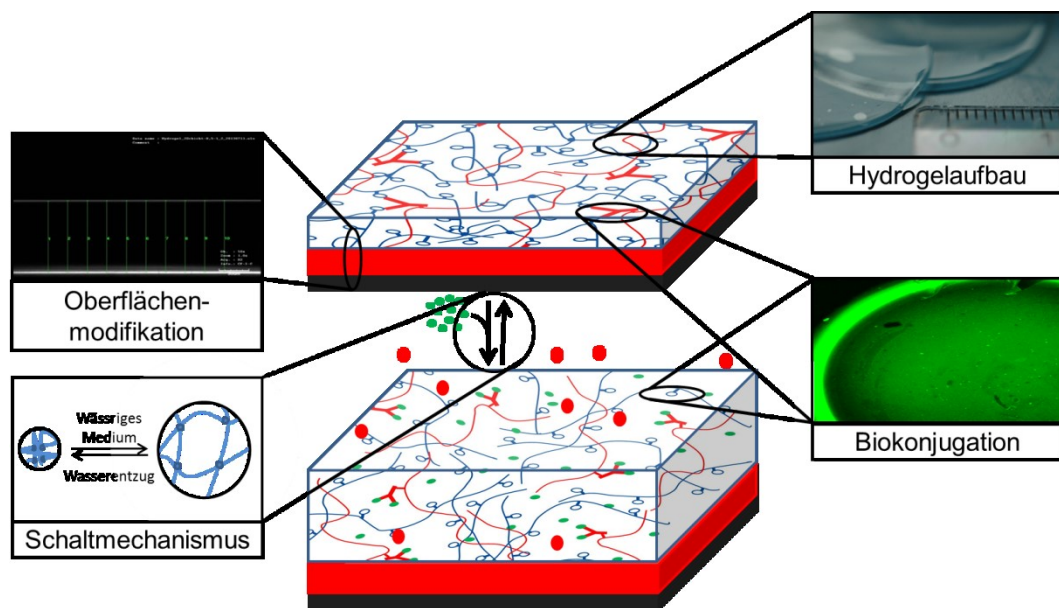
Quellfähigkeit, welche bei Verwendung von Antigen-Antikörperkomplexen als Bindungspunkte im Hydrogel unter dem Zusatz von einem Modellantigen auftritt und die hierdurch auftretende Permeationsänderung eines Modellproteins (Hämoglobin) (Abbildung 15, rechte Seite).



**Abbildung 15** Linke Seite: Crosslinkerdichte eines Gels mit eingelagerten Antikörpern (a) im Vergleich zu einem semi-IPN Hydrogel (b). Zu sehen ist, dass sich die Dichte an Crosslinkern in dem semi-IPN Hydrogel wesentlich stärker an dem zugegeben Antigen orientiert als diejenige des Gels mit eingelagerten Antikörpern [22]. Rechte Seite: Reversibles Quellverhalten und antigen-gesteuertes Permeationsverhalten eines semi-IPN-Hydrogels. Gezeigt werden die Wechsel im Quellverhalten von Polyacrylamid (weiße Punkte) und von Antigen-Antikörper-funktionalisierten Gelen (schwarze Punkte) in Abhängigkeit des frei vorliegenden Antigens. Des Weiteren ist das Permeationsprofil des Modellwirkstoffes Hämoglobin ebenfalls als Funktion des frei vorliegenden Antigens dargestellt [19].

### 3. Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Generierung eines Modellsystems/Studie einer biokonjugierten, sensitiven Hydrogelbeschichtung als Coating für ein LDD-System (vgl. **Abbildung 16**). Als bioresponsive Faktoren des Hydrogels wurden Antigene beziehungsweise die korrespondierenden Antikörper ausgewählt, wodurch eine schnelle, selektive Antwort des Hydrogels auf spezifische Proteinsignale ermöglicht wird. Aufgrund der Orientierung des Aufbaues der Matrix an der Arbeit von Miyata et al. wurde als Modellmatrix ein Polyacrylamidgel verwendet. In der Absicht dieses System für eine Implantatbeschichtung abzuwandeln, sollten verschiedene Parameter der Hydrogele Permeationsstudien unterzogen werden, um genauere Vorstellungen von der nötigen Beschaffenheit eines solchen Systems zu erhalten. Hierbei wurde neben dem Gelgehalt und dem Vernetzungsgrad auch ein Augenmerk auf die Gelarchitektur gelegt, um eine Vergleichsmöglichkeit zwischen konventionellen und semi-interpenetrating Networks zu erhalten.

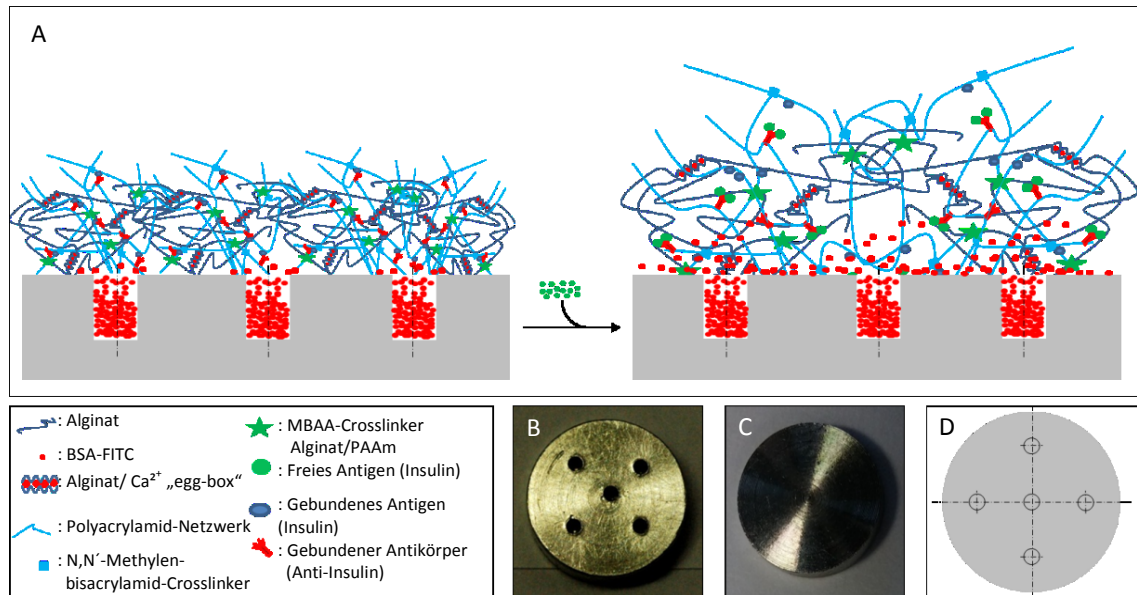


**Abbildung 16** Übersichtsgrafik der Arbeitspunkte.

Neben den Studien bezüglich der Permeation von verschiedenen Modellwirkstoffen wurde das System folgend bezüglich der Fähigkeiten zur Beschichtung von Modellsubstraten untersucht. Hierzu sollten neben Schichtdickenbestimmungen auch Haftfestigkeiten auf dem Substrat getestet werden. Als weitere Variante eines Hydrogels sollte als Vergleichsmöglichkeit ein Hybrid aus Polyacrylamid und Alginatgel herangezogen werden. Dies dient vor allem als Beurteilung der

Verbesserungsmöglichkeiten bezüglich der Systemeigenschaften betreffend der Haftfestigkeit, sowie der erreichbaren Schichtdicken auf dem Modellsubstrat.

Als abschließender Punkt sollte die Freisetzung aus einem solchen System bezüglich der Anwesenheit eines Stimulus getestet werden. Hierfür wurde auch ein stimulusresponsives, implantatassoziiertes Wirkstofffreisetzungssystem auf seine Freisetzungseigenschaften von Fluoresceinisothiocyanat gelabeltem Bovinem Serum Albumin (BSA-FITC) getestet (Prinzip: vgl. **Abbildung 17**).



**Abbildung 17** Schematische Darstellung des stimulusresponsiven implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems auf Basis eines Alginat/Polyacrylamid-Hybridhydrogels mit gekoppelten Insulin/Anti-Insulin-Crosslinkerstrukturen und in die Kavitäten eingebrachtem BSA-FITC als Modellwirkstoff (A) im geschlossenen Zustand (links) und nach Zugabe des Stimulus im freisetzenden Zustand (rechts). Verwendet wurden 9 mm Chrom-Nickel-(CrNi)-Edelstahl-Plättchen (B, Vorderseite; C, Rückseite) mit 0,8 mm Bohrungen. Schematische Darstellung (D).

#### 4. Materialien und Methoden

Ein stimulusresponsives, implantatassoziiertes Wirkstofffreisetzungssystem auf Basis von Antigen/Antikörper-Crosslinkern welches spezifisch auf einen biologischen Stimulus reagieren kann ist von mehreren Punkten abhängig. Ein wesentlicher Punkt ist hierbei ein Hydrogelverbund, welcher flexibel genug ist, den Einbau der Antigen/Antikörperfunktionen in das System, aber auch stimulusinduziert eine signifikante Permeabilitätsänderung zuzulassen. Des Weiteren muss die Kopplung auf dem Substrat sowie die Funktionalität eines solchen Verbundes auch in stark reduzierter Schichtdicke im substratgebundenen Zustand einer Oberflächenbeschichtung gewährleistet bleiben.

Daher wurde im ersten Schritt die auf der Basis der Forschungsergebnisse von Miyata et al. verwendete Hydrogelmatrix aus Polyacrylamid in verschiedenen Hydrogelgehalten, Gelarchitekturen und Vernetzungsgraden präpariert (**Kapitel 4.1**) und in der Folge der Einbau von Antigen/Antikörperstrukturen vollzogen (**Kapitel 4.2**).

Um eine solche Hydrogelmatrix auf eine Oberfläche aufzubringen, erfolgte anschließend die Modifizierung der Oberflächen mit entsprechenden Gruppen um eine ausreichende Oberflächenhaftung zu erzeugen (**Kapitel 4.3**). Als Abschluss wurden die verschiedenen Schritte zur Generierung eines stimulusresponsiven, implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems vereinigt (**Kapitel 4.4**).

Für die Systeme wurden teilweise sich überschneidende Charakterisierungen durchgeführt. Daher werden diese in einem gesonderten Kapitel betrachtet (**Kapitel 4.5**).

##### 4.1. Gelpräparation

Neben den auf den Grundlagen von Miyata et al. [19] basierenden semi-IPN Hydrogelen (vgl. **Kapitel 4.1.1.2**) wurden zum besseren Verständnis des Einflusses unterschiedlicher Hydrogelparameter (Gelgehalt, Gelarchitektur, Vernetzungsgrad), sowie zur Hydrogelcharakterisierung, konventionelle Hydrogele präpariert (vgl. **Kapitel 1**). Im Laufe der Generierung des implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems wurden außerdem aus Stabilitätsgründen PAAm/Alginate-Hybridhydrogele als Hydrogelmatrix eingeführt (vgl. **Kapitel 4.1.1**).

#### 4.1.1. Synthese der Polyacrylamidhydrogele

Die Synthese der Hydrogele wurde mit Acrylamid (AAm, > 99%), *N,N'*-Methylenbisacrylamid (MBAAm, >99%), *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS, >99%) (alle Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) in Phosphat gepufferter Salzlösung (Dulbecco's PBS, DPBS, pH 7,2, Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany) bei Raumtemperatur durchgeführt.

##### 4.1.1.1. Synthese der konventionellen Polyacrylamidhydrogele

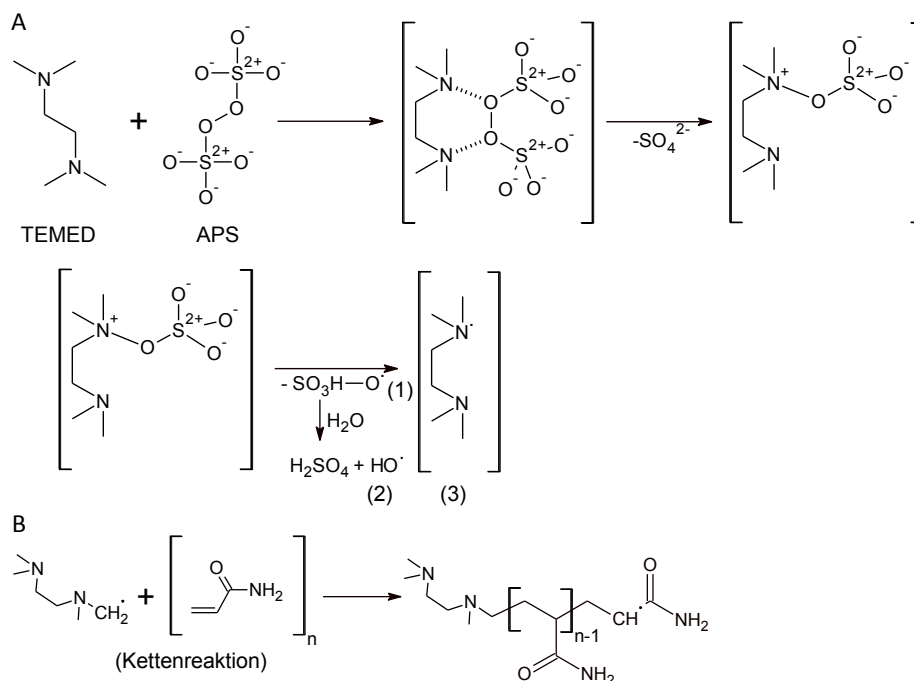
Die Synthese der konventionellen Hydrogele erfolgte mit einer 30%igen (w/w) 58/1 (AAm/MBAA)-Lösung (für die 58/1-AAm/MBAA-Hydrogele) bzw. einer 30%igen (w/w) 58/1 (AAm/MBAA)-Lösung in Kombination mit einer 30 %igen (w/w) AAm-Lösung (für die 117/1-AAm/MBAA-Hydrogele) in einem entsprechenden Mischungsverhältnis mit DPBS (vgl. **Tabelle 4**).

**Tabelle 4** Überblick über die für die Herstellung der konventionellen Polyacrylamidhydrogele unterschiedlichen Gelgehaltes und Vernetzungsgrades verwendeten Volumina von 30% (w/w), 58/1 (AAm/MBAA in DPBS), 30% (w/w)(AAm in DPBS) und DPBS.

Vernetzungsgrad (AAm/MBAA)	Gelgehalt, Polymermassenanteil im Hydrogel [%]	AAm/MBAA-Lösung (30 %ig (w/w); 58/1) [μl]	AAm-Lösung (30 %ig; (w/w)) [μl]	DPBS [μl]
58/1	7,5	75	-	225
	15	150	-	150
	22,5	225	-	75
	30	300	-	-
117/1	7,5	37,5	37,5	225
	15	75	75	150
	22,5	112,5	112,5	75
	30	150	150	-

Nachdem die Volumina zusammenpipettiert worden waren, wurden zu 300 μl der Lösung jeweils 30 μl einer 0,1 M APS und 30 μl einer 0,8 M TEMED Lösung gegeben, um die Reaktion zu starten (vgl. **Abbildung 18**). Von dieser Lösung wurden 330 μl zwischen zwei Glaträger von 25 mm im Durchmesser gegeben und die Reaktion nach 50 Minuten ( $T = 23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) durch Waschen in DPBS abgebrochen. Hierin wurden die Gele 18 Stunden belassen und somit sichergestellt, dass das

Hydrogel komplett gequollen war und kaum noch AAm-Monomere im Hydrogelverbund vorliegen.



**Abbildung 18** Mögliche Variante der Initiation der radikalischen Polymerisationsreaktion durch TEMED und APS (A) mit Zwischenstufen bis zur Bildung möglicher Radikale (1),(2),(3). (B): Eine der möglichen Varianten des Kettenstarts durch ein freies Methylradikal des TEMED [120].

#### 4.1.1.2. Synthese der semi-IPN Polyacrylamidhydrogele

Die Synthese der semi-IPN Hydrogele erfolgte in einem 2-Stufenprozess [19,121].

Hierbei wurden über die radikalische Polymerisation von Acrylamid zuerst Polymerfasern gebildet. Für die Synthese wurden zu der, aus DPBS und einer 16,38 %igen (w/w) AAm-Lösung in DPBS, entsprechend je Gelgehalt (vgl. **Tabelle 4**), gemischten Reaktionslösung 5,25  $\mu\text{l}$  APS und 5,25  $\mu\text{l}$  TEMED pipettiert und diese 7 Minuten zur Reaktion gebracht.

**Tabelle 5** Die Synthese von semi-IPN Hydrogelen basiert auf der Verwendung unterschiedlicher Acrylamid bzw. Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid-Monomer Lösungen (Lsg.). Die Werte der Konzentrationen, für die im Rahmen der Präparation angesetzten Lösungen, werden folgend für 58/1 und 117/1 (AAm/MBAA)-Verhältnisse in Stufe 1 als auch Stufe 2 dargestellt.

Vernetzungsgrad (AAm/MBAA) [w/w]	Stufe 1	Stufe 2
58/1	16,38 %ige Lsg. (w/w) (819 mg (AAm)/4181 mg DPBS)	48,3 %ige Lsg. (w/w) (1636,5 mg (AAm), 41,4 mg (MBAA)/ 3472,8 mg DPBS)
117/1	16,38 %ige Lsg. (w/w) (819 mg (AAm)/4181 mg DPBS)	48,3 %ige Lsg. (w/w) (1656,8 mg (AAm), 20,6 mg (MBAA)/ 3472,8 mg DPBS)

Zu dieser Reaktionslösung erfolgten nach 7 Minuten die Zugabe einer Mischung aus DPBS und einer 48,3 %igen (w/w) AAm/MBAA-Lösung in DPBS mit definierten AAm/MBAA-Verhältnissen (je nachdem ob ein Hydrogel mit einem Vernetzungsgrad von 58/1 oder 117/1 synthetisiert werden soll) sowie 17,75 µl APS und 17,75 µl TEMED (vgl. **Tabelle 5**, **Tabelle 6**). Die weitere Verarbeitung erfolgte analog der konventionellen Hydrogele. [121].

**Tabelle 6** Die Mischverhältnisse der in **Tabelle 5** dargestellten Lösungen mit DPBS für die Synthese von semi-IPN Hydrogelen unterschiedlicher Gelgehalte.

Vernetzungsgrad (AAm/MBAA) [w/w]	Stufe 1 (7 Minuten)		Stufe 2 (50 Minuten)	
Gelgehalte [%]	AAm in DPBS [µl] (16,38 %ige Lsg. (w/w))	DPBS [µl]	AAm/MBAA in DPBS [µl] (48,3 %ige Lsg. (w/w))	DPBS [µl]
7,5 %	91,6	274,7	67	201,6
15 %	183,1	183,1	134,3	134,3
22,5 %	274,7	91,6	201,6	67
30 %	366,2	0	268,6	0

#### 4.1.2 Synthese der Polyacrylamid/Alginat-Hybridhydrogele

In Hinblick auf die Generierung eines implantatassoziierten Wirkstoff-freisetzungssystems (**Abbildung 16**) wurde eine möglichst geringe Schichtdicke auf dem Modellsubstrat von  $\leq 100$  µm angestrebt, welche aus Stabilitätsgründen auf einem Polyacrylamid/Alginat-Hybridhydrogel [97–99] (**Abbildung 10**) basierte.

Wie die konventionellen Polyacrylamidgele wurden die Hybridhydrogele bei Raumtemperatur in einer Einstufenreaktion synthetisiert. Aufgrund der Kettenlänge des Alginats wurde auf die Herstellung einer semi-IPN Variante verzichtet, da die Antigene und Antikörper – im Gegensatz zu den aus Monomeren generierten konventionellen Polyacrylamidnetzwerken – auch so über ausreichenden Bewegungsfreiraum verfügen sollten. 500 µl AAm-Lösung (50 % (w/w) in DPBS), 500 µl DPBS, 100 µl MBAA-Lösung (1 % (w/w) in DPBS) wurden gut gemischt und 1000 µl Alginatlösung (Natriumalginat von der Braunalge, Mittlere Viskosität, Sigma Aldrich) verwendet. (2 % (w/w) in DPBS), sowie 500 µl DPBS hinzugefügt (pH = 7,4). Initiiert wurde die Reaktion mit 12,5 µl TEMED (40 % (vol/vol)) sowie 12,5 µl APS (20 % (w/w)). Hierdurch ergibt sich ein 9,65 %iges (w/w) (bezogen auf den AAm/MBAA-Anteil (250/1)) bzw. 10,4 %iges (w/w) (Polyacrylamid/Alginat-Anteil)

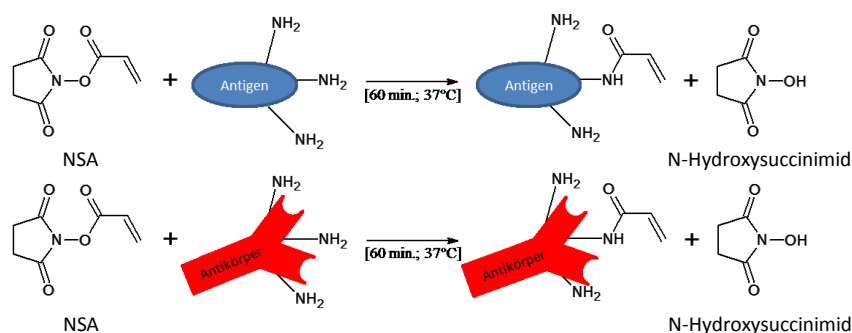
Hybridhydrogel. Für die Freisetzungsstudien wurden 330 µl zwischen zwei Glaträger mit 25 mm Durchmesser pipettiert und 30 Minuten lang zur Reaktion gebracht, folgend in DPBS überführt um noch vorhandene Monomere auszuwaschen sowie das Hydrogel zur Quellung zu bringen (ca. 18 Stunden).

## 4.2 Biokonjugation

Für die Biokonjugation wurden zwei verschiedene Antigen/Antikörper-Paare verwendet. Einerseits waren dies die Paarung aus Maus IgG (Jackson ImmunoResearch Europe, Newmarket, Vereinigtes Königreich)/Kaninchen Anti-Maus IgG (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) welche in das PAAm-Hydrogel eingebaut wurden und andererseits eine Paarung aus Insulin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)/Anti-Insulin (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) welche aufgrund der geringeren Größe im Zuge späterer Versuche verwendet wurde. Dieses Paar wurde sowohl in das PAAm-Hydrogel als auch in das PAAm/Alginat-Hybridhydrogel eingebaut. Vor dem Einbau der Antigene und Antikörper in das Hydrogel (vgl. **Kapitel 4.2.2**) wurden diese modifiziert (vgl. **Kapitel 4.2.1**).

### 4.2.1 Modifikation der Biomoleküle mit Acrylatresten für den Einbau in die Hydrogelnetzwerke

Den ersten wichtigen Schritt bei der Biofunktionalisierung der Hydrogele stellt die Modifizierung des Antigens bzw. des Antikörpers mit von *N*-Succinimidylacrylat (NSA) (TCI Deutschland GmbH) dar. Hierüber werden Acrylatgruppen in die entsprechenden Proteine eingeführt [118], deren Anzahl bei der Modifikation mittels NSA an den freien Aminogruppen jedoch wesentlich von dem molaren Verhältnis von NSA/AG (AK) abhängt.



**Abbildung 19** Modifizierung der verwendeten Proteine (Maus IgG/Insulin als Antigen bzw. Kaninchen Anti Maus IgG/ Anti-Insulin IgG als Antikörper) über Bildung eines Amides mittels der Verwendung von *N*-Succinimidylacrylat (NSA) [19,118].

Wie aus **Abbildung 19** deutlich wird, erfolgt hierbei die Umsetzung des Antigens bzw. des Antikörpers mit *N*-Succinimidylacrylat zu einem Amid.

Nachdem die Acrylatgruppen sowohl in den Antikörper als auch das Antigen eingeführt wurden, erfolgte die Aufreinigung und das Entfernen von nicht reagierten NSA-Molekülen über die Filtration mittels Zentrifugation (Centrifuge 5430, Eppendorf, Hamburg, Deutschland, 9,5 cm Durchmesser, 3758 revolutions per minute (rpm)) durch Zeba Spin Desalting Columns 7-k MWCO (Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland).

Für die Maus IgG/Kaninchen Anti-Maus IgG gekoppelten PAAm-Hydrogele wurden 120 µl einer 2 mg/ml Antigen (Antikörper)-Lösung mit 3,5 µl (3,5 µl) 0,5 mg/ml (1 mg/ml) NSA-Lösung in DPBS bei 37°C für 60 Minuten geschüttelt. Die unterschiedlichen Antigen/NSA bzw. Antikörper/NSA-Verhältnisse von 6,5 bzw. 13 spiegeln die unterschiedlichen Anforderungen bezüglich des Einbaues in die lineare Fasern des semi-IPN Hydrogels bzw. dessen verzweigtes Netzwerk wider.

Im Rahmen der Umstellung auf ein anderes Antigen/Antikörpersystem aus Insulin/Anti-Insulin wurde, da es sich hierbei um ein wesentlich kleineres Protein (~6000 g/mol) als Maus IgG (~155000 g/mol) handelt und daher die Affinitätsänderungen und strukturelle Integrität des unterschiedlich modifizierten Insulins getestet werden sollte, erst einmal der Einfluss des NSA/Insulin-Verhältnisses auf den späteren Einbau in das Netzwerk getestet (vgl. **Tabelle 7**).

**Tabelle 7** *Verwendete Volumina einer NSA-Lösung (10 mg/ml in DPBS) für die unterschiedlichen NSA-Modifizierungsverhältnisse des Insulins (100 µg, 2mg/ml).*

NSA/Insulin-Verhältnis	1/5	1/10	1/15	1/20	1/30
NSA-Lösung (10 mg/ml, in DPBS) [µl]	2,9	5,8	8,7	11,6	17,4
Insulin-Lösung (2 mg/ml in DPBS) [µl]	100	100	100	100	100

Anhand der Ergebnisse aus der Versuchsreihe der Insulin-gekoppelten PAA-Hydrogele (vgl. **Tabelle 17**) wurde eine Modifizierung des Antigens (Insulin) mit NSA im Verhältnis 6/1 durchgeführt. Im Zuge des gleichen Versuches wurde die Antikörpermodifizierung auf ein Verhältnis von 10/1 (NSA/Anti-Insulin) eingestellt (vgl. **Tabelle 8**).

**Tabelle 8** *Verwendete Volumina der Proteinlösung an Insulin bzw. Anti-Insulin in DPBS sowie das über unterschiedliche NSA-Lösungsvolumina eingestellte Verhältnis aus NSA/Insulin bzw. NSA/Anti-Insulin.*

	Insulin	Anti-Insulin
Proteinkonzentration [mg/ml]	0,2	2
Volumen [ $\mu$ l]	100	100
NSA/Protein-Verhältnis	6	10
NSA Volumen [ $\mu$ l] ( $c=x$ mg/ml)	3,3 (1)	2,2 (1)

#### 4.2.2 Biokonjugation der semi-IPN-Polyacrylamidhydrogele

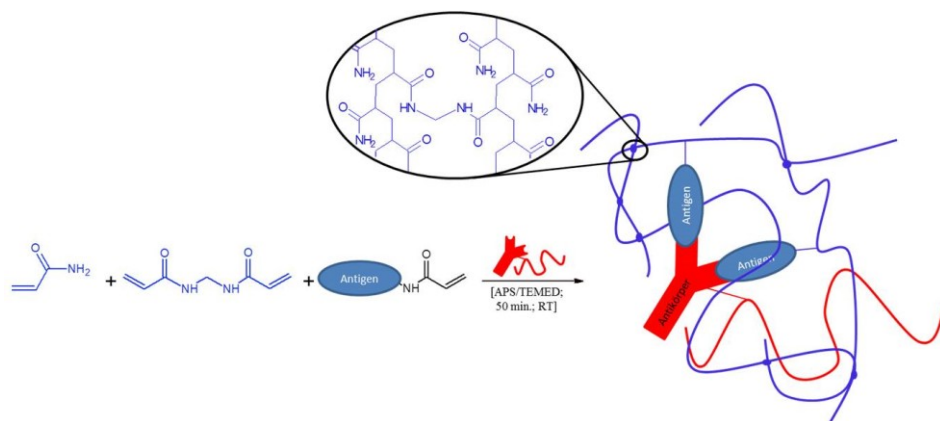
Im Rahmen der Synthese wurden im Falle eines 7,5%igen (w/w) oder 15%igen (w/w) semi-IPN Hydrogels von dem DPBS (vgl. **Tabelle 6**) jeweils die entsprechende Menge DPBS durch eine Lösung aus modifiziertem Antikörper/Antigen ersetzt.

Im Übrigen verlief die weitere Präparation nach den Vorgaben aus **Kapitel 4.1.1.2.**

So wurden bei einem 15 %igen (w/w) Hydrogel von den 183,1  $\mu$ l DPBS der ersten Synthesestufe 120  $\mu$ l durch eine Lösung des modifizierten Maus IgG bzw. Insulin (2 mg/ml in DPBS, solange nicht anders genannt) ersetzt (vgl. **Tabelle 6**), wodurch das mit Acrylatresten modifizierte Protein in die Fasern einbaut werden kann (vgl. **Abbildung 20**). Ebenso wurde im Verlauf der Präparation des semi-IPN Hydrogels 120  $\mu$ l der 134  $\mu$ l DPBS in der zweiten Stufe zur Bildung des Netzwerkes durch eine Lösung von modifiziertem Kaninchen Anti-Maus IgG bzw. Anti-Insulin (2 mg/ml, solange nicht anders genannt) ersetzt (vgl. **Abbildung 21, Tabelle 6**).



**Abbildung 20** *Copolymerisation des modifizierten Antikörpers mit Acrylamid in der ersten Stufe zur Synthese der biokonjugierten semi-IPN Hydrogele [19,118].*



**Abbildung 21** Einführen der biokonjugierten Polyacrylamidfaser in ein biokonjugiertes Polyacrylamidnetzwerk zur Generierung eines biokonjugierten semi-IPN-Netzwerkes [19,118].

Im Rahmen der Biokonjugation der Netzwerke mit Antigen/Antikörper-Crosslinkern wurde auch die Möglichkeit, unterschiedlich hohe Konzentrationen an Biomolekülen in das Netzwerk einzubauen, untersucht. Hierfür wurden erst einmal 7,5 %ige (w/w) 117/1 (AAm/MBAA)-Hydrogele mit unterschiedlichen Antigen/Antikörper-Konjugationsvarianten in unterschiedlichen Konzentrationen generiert (vgl. **Tabelle 9**).

**Tabelle 9** Synthese der biokonjugierten Maus IgG/Anti-Maus IgG-gekoppelten Hydrogele unterschiedlicher Konzentrationsverhältnisse von AG/AK in einem 7,5 %igen (w/w) 117/1(AAm/MBAA-Hydrogel).

AG/AK	AAm-Lösung [μl]	DPBS [μl]	Antigen-Lösung (5,6 mg/ml) [μl]	AAm/MBAA-Lösung [μl]	DPBS [μl]	Antikörper-Lösung (5,6 mg/ml) [μl]
	1. Stufe			2. Stufe		
AG (IgG Maus)						
(8μg/64 mm <sup>2</sup> )	11,8	27,7	7,7	8,6	26,7	-
(16 μg/64 mm <sup>2</sup> )	11,8	19,9	15,5	8,6	26,7	-
(24μg/64 mm <sup>2</sup> )	11,8	12,2	23,2	8,6	26,7	-
AK (Anti-Maus-IgG)						
(8μg/64 mm <sup>2</sup> )	11,8	35,4	-	8,6	19,0	7,7
(16 μg/64 mm <sup>2</sup> )	11,8	35,4	-	8,6	11,2	15,5
(24μg/64 mm <sup>2</sup> )	11,8	35,4	-	8,6	3,5	23,2
AG/AK						
(8μg/64 mm <sup>2</sup> )	11,8	27,7	7,7	8,6	19,0	7,7
(16 μg/64 mm <sup>2</sup> )	11,8	19,9	15,5	8,6	11,2	15,5
(24μg/64 mm <sup>2</sup> )	11,8	12,2	23,2	8,6	3,5	23,25
Blindwert	11,8	35,4	-	8,6	26,7	-

Für die fluoreszenzmikroskopischen Messungen wurden jeweils 2 9 mm Gele mit einer Fläche von 63,61 mm<sup>2</sup> Lösungen nach dem in **Tabelle 9** dargestellten Schema

angesetzt und mittels der entsprechenden Menge an APS/TEMED-Lösung zur Reaktion gebracht (vgl. **Kapitel 4.1.1.2**). Zusätzlich erfolgte nach demselben Prinzip die Präparation von 6 mm Gelkörpern, von welchen nach der Quellung ein definierter Bereich von 5 mm ausgestanzt wurde um die Biokonjugation der Gelproben über die Vermessung mittels Bicinchoninsäure (BCA) quantifizieren zu können. Im Rahmen des BCA-Assays wurden von der Reaktionslösung 225 µl abgezogen, und wie im **Kapitel 4.5.1.2** beschrieben, vermessen.

#### 4.2.3 Biokonjugation der Polyacrylamid/Alginat-Hybridhydrogele

Für die Biokonjugation der Hybridhydrogele wird, um eine Kopplung zwischen dem Insulin und Anti-Insulin sicherzustellen, das modifizierte Insulin gegenüber dem modifizierten Anti-Insulin (vgl. **Tabelle 10**) im mehr als 2-fachen Überschuss eingesetzt. Die Synthese wird folgendermaßen durchgeführt: 57 µl AAm-Lösung (50 % (w/w) in DPBS), 57 µl DPBS und 11,4 µl MBAA-Lösung (1 % (w/w)) werden vermischt und mit einer Mischung aus 171 µl Alginat-Lösung (2 % (w/w)) und 140 µl modifizierter Insulin/Anti-Insulin-Lösung versetzt. Im Anschluss erfolgt die Zugabe von 1,42 µl APS (40 % (vol/vol)) sowie 1,42 µl TEMED (20 % (w/w)). Die Dauer der Reaktion liegt bei 30 Minuten.

**Tabelle 10** Menge an eingebrachtem Antigen/Antikörper in die verschiedenen Hydrogelverbünde.

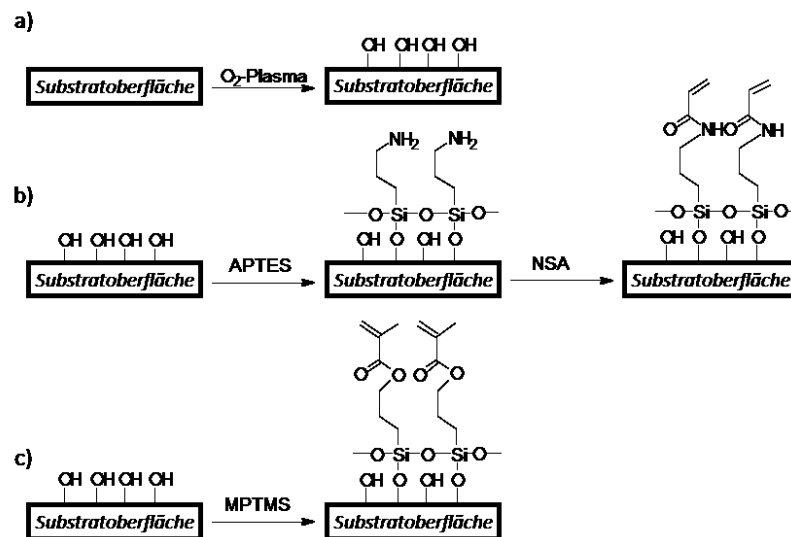
System	Hydrogel	Protein	Molare Menge an Protein
Stimulusresponsives Hydrogel	PAAm	Maus IgG	1,54 nmol
Stimulusresponsives Hydrogel	PAAm	Kaninchen Anti Maus IgG	1,54 nmol
Stimulusresponsives Hydrogel	PAAm PAAm/Alginat	Insulin	3,33 nmol
Stimulusresponsives Hydrogel	PAAm PAAm/Alginat	Anti-Insulin	1,29 nmol
Stimulusresponsives implantatassoziiertes Wirkstofffreisetzungssystem	PAAm/Alginat	Insulin	3,33 nmol
Stimulusresponsives implantatassoziiertes Wirkstofffreisetzungssystem	PAAm/Alginat	Anti-Insulin	1,29 nmol

#### 4.3. Oberflächenanbindung

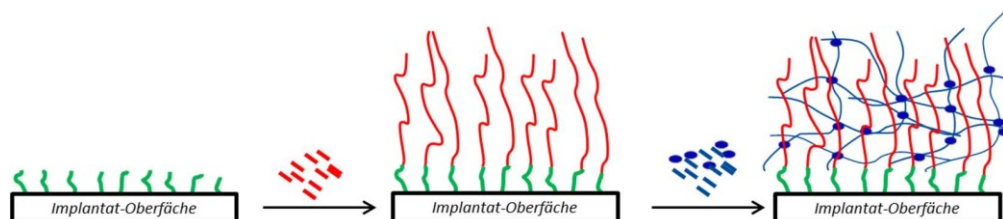
Für die Etablierung der Hydrogele auf Substratoberflächen (vgl. Zielvorstellung: **Abbildung 17**) wurden mehrere Verfahren verwendet. Wie aus **Abbildung 22**

deutlich wird, handelt es sich hierbei im ersten Schritt um eine Modifizierung der Substratoberfläche mit Vinylgruppen. Im Folgeschritt werden auf diese modifizierte Oberflächen Polyacrylamid-Fasern aufgebracht, welche die Grundlage für die Kopplung der Hydrogele darstellen (vgl. **Abbildung 23**).

Als Substrat verwendet wurden einerseits Glaträger sowie andererseits Plättchen von 9 mm Durchmesser aus medizinischem CrNi-Edelstahl (vgl. **Abbildung 17, B, C, D**).



**Abbildung 22** Modifizierung der Substratoberfläche mit Niederdrucksauerstoffplasma (a). An die entstandenen Hydroxylgruppen wurden über eine Umsetzung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) und eine folgende Umsetzung mit N-Succinimidylacrylat (NSA) (b) oder alternativ mit 3-Methacrylpropyltrimethoxysilan (MPTMS) (c) endständige Vinylgruppen erzeugt.



**Abbildung 23** Schematischer Aufbau der Hydrogelbeschichtung. Auf die MPTMS-Gruppen (grün) werden in einer Copolymerisation AAm-Fasern aufpolymerisiert und in der Folge AAm/MBAA (blau) zu einem Netzwerk in die bereits bestehende Faserstruktur copolymerisiert.

#### 4.3.1. Vorbereitung der Oberflächenmodifizierung über Aktivierung mittels Plasmaprozess

Zu Modifizierung der Oberflächen wurden im ersten Schritt die Aktivierung der Substrate mit einem nichtthermischen Niederdruckplasma durchgeführt. Durch diese häufig für die Aktivierung von Oberflächen verwendete Technik können sowohl beschichtende als auch abtragende Effekte erreicht werden. Mittels eines

Sauerstoffplasmas von 0,3 mbar (Frequenz 13,56 MHz, Leistung 50 W, Diener Elektronik GmbH & Co. KG, Ebhausen, Deutschland) und einer Minute Dauer wurden Hydroxylgruppen etabliert wie in **Abbildung 22**, (a), dargestellt ist.

#### 4.3.2. Silanisierung

Im Folgeschritt wurde in einem nasschemischen Prozess eine Silanisierung der aktivierten Oberfläche vorgenommen, um endständige Vinylgruppen zu generieren. Hierfür wurden die Proben, in Anlehnung an Wulf et al. [40], für 24 Stunden in 4 ml einer essigsauren Aminopropyltriethoxysilan (APTES)-Lösung (0,2 M, DPBS) (vgl. **Abbildung 22**, (b)) beziehungsweise einer essigsauren Acetonitril (ACN)-Lösung von 3-(Trimethoxysilyl)-propylmethacrylat (**Abbildung 22**, (c)) (0,2 % (w/w) Essigsäure, 0,4 % (w/w) MPTMS) [122] umgesetzt.

Nachdem die Proben entnommen wurden, erfolgte das einmalige Waschen der Probenkörper in DPBS (5 Minuten). Im Anschluss wurden die Probenkörper bei Raumtemperatur getrocknet. Im Falle der APTES-Modifizierung ist jedoch ein weiterer Schritt zur Generierung einer endständigen Vinylfunktion nötig (**Abbildung 22**, (b)). So erfolgt das Einbringen der endständigen Vinylfunktion in diesem Fall äquivalent zu der Proteinmodifizierung mittels einer NSA-Lösung (0,3 M) für 1 Stunde bei 37°C [22,123]. Im Anschluss werden die Proben mittels DPBS nochmals für 5 Minuten gewaschen und getrocknet.

#### 4.3.3. Hydrogelankopplung

Im ersten Schritt wurden über radikalische Polymerisation Hydrogelfäden an die Vinylendgruppen der Oberfläche aufpolymerisiert um ein semi-IPN Hydrogel auf der Oberfläche erzeugen zu können (vgl. **Abbildung 21**).

Hierfür wurden 183 µl einer 16,38%igen (w/w) AAm-Lösung in DPBS durch die Zugabe von DPBS auf die Hälfte verdünnt. Die Reaktion wurde mit 5,25 µl einer 0,1 M APS und 5,25 µl einer 0,8 M TEMED-Lösung initiiert.

Eine entsprechende Menge dieser Lösung wurde in der Folge auf verschiedene Substrate aufgetragen und für 30 Minuten zur Reaktion gebracht (vgl. **Tabelle 12**).

#### **4.3.3.1. Generierung der Oberflächengekoppelten PAAm-Hydrogele über das Pipettierverfahren**

Für die Generierung einer pipettierten Beschichtung auf medizinischem CrNi-Edelstahlsubstraten von 9 mm Durchmesser wurden nach der Reaktionszeit von den aufgetragenen 80 µl 75 (bzw. 70) µl abgezogen und verworfen sowie 2 (bzw. 9,45) µl einer 21,39%igen (w/w) AAm/MBAA-Lösung (80/1) in DPBS (vgl. **Tabelle 12**, PAAm (Stufe 2)) auf die Träger pipettiert und in Folge das ganze System mit einem Glasträger abgedeckt. Nach 50 Minuten Reaktionszeit wurde das Deckglas entfernt und das komplette System in DPBS zum Entfernen der Monomere zum Quellen gebracht.

#### **4.3.3.2. Hydrogelankopplung der PAAm-Hydrogele über das Kleben vorpräparierter Hydrogele**

Eine weitere Variante, infolge des Probenverhaltens im Rahmen der Abdeckungsentfernung, war die Präparation der Beschichtungen mittels Vorfertigung der Hydrogelschichten. Hierfür wurden Volumen von 42,7, 85,4 und 341,6 µl für semi-IPN PAAm-Hydrogele unterschiedlicher Schichtdicke mit einem Gelgehalt von 15 % (w/w) und einem Vernetzungsgrad von 117/1, zusammengesetzt wie unter **Kapitel 4.1.1.2** beschrieben, auf Glasträger eine Fläche von 1440 mm<sup>2</sup> (24 x 60 mm x 0,13 - 0,16 mm, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) pipettiert und abgedeckt 50 Minuten zur Reaktion gebracht. Hiernach wurde das Hydrogel 16 Stunden getrocknet und am nächsten Tag vorsichtig von dem Glasträger gelöst.

Ausgeschnittene Hydrogelfilme einer Größe von 10 x 15 mm wurden mittels 2, 4, 6, oder 8 µl (vgl. **Tabelle 11**) einer Kleberlösung bestehend aus 183,1 µl einer 16,38 %igen (w/w) AAm-Lsg, 134 µl einer 48,3 %igen (w/w) AAm/MBAA(40/1)-Lösung, 371,1 µl DPBS und jeweils 23 µl APS und TEMED auf nach den **Kapiteln 4.3.1, 4.3.2 und 4.3.3** vorpräparierten CrNi-Edelstahlsubstraten von 9 mm Durchmesser fixiert.

Für die Haftfestigkeitsuntersuchungen erfolgte das Aufkleben eines 10 x 15 mm Hydrogelfilmes so, dass etwa die Hälfte auf 10 x 6,5 mm fixiert ist und die zweite Hälfte über den Träger hinausragt.

#### 4.3.3.3. Hydrogelankopplung der PAAm/Alginate-Hybridhydrogele über das Kleben vorpräparierter Hydrogele

Die Präparation verläuft identisch der unter **Kapitel 4.3.3.2** beschriebenen Vorgehensweise, mit dem Unterschied der lediglich über 4 µl erfolgten Klebung und der Hydrogelpräparation welche unter **Kapitel 4.1.1** dargelegt wird (vgl. **Tabelle 11**).

**Tabelle 11** Die verschiedenen für eine Fläche von 75 mm<sup>2</sup> verwendeten Klebervolumina im Kontext der Haftvermittlung der auf der Oberfläche aufgetragenen Hydrogelvarianten.

Hydrogeltyp	Schichtdicken [µm]	Volumen Kleber [µl]
PAAm	70	2, 4, 6, 8
PAAm	110	2, 4, 6
PAAm/Alginate-Hybrid	90	4
PAAm/Alginate-Hybrid	450	4

#### 4.4. Generierung implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssysteme

##### 4.4.1. Generierung eines stimulusresponsiven implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems über das Pipettierverfahren auf Polyacrylamidbasis

Für die Permeationsstudien der biokonjugierten Hydrogele im Rahmen eines implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems auf Polyacrylamidbasis wurde die Präparation über ein Pipettierverfahren angewandt. Begründen lässt sich dies mit der zu hohen präparativen Herausforderung bei der Präparation der ~100 µm dicken PAAm-Schichten.

Als Substratmaterial wurden für die *in vitro*-Versuche die in der Medizintechnik häufig als Implantatwerkstoff auftretenden CrNi-Edelstähle verwendet. Die Metallsubstrate eines Durchmessers von 9 mm wurden zusätzlich mit Kavitäten eines Bohrungsdurchmessers von 0,8 mm und einer Tiefe von ca. 1,5 mm für die Verwendung als Wirkstoffdepot ausgestattet (vgl. **Abbildung 17, Kapitel 4.4.2**).

Nachdem in die Kavitäten ca. 1 mg an BSA-FITC eingebracht worden war, erfolgte im ersten Schritt das Auftragen von 80 µl AAm-Lösung mit APS und TEMED (vgl. **Tabelle 12**). Von diesem Volumen wurden nach 30 Minuten 75 (bzw. 70) µl verworfen und gleichmäßig 2 (bzw. 9,45) µl einer AAm/MBAA Lösung mit APS/TEMED aufgetragen (vgl. **Tabelle 12**). Die Reaktion der 15 %igen (w/w) 117/1

(AAm/MBAA) PAAm-Hydrogele wurde nach 50 Minuten durch die Überführung in DPBS für die Freisetzung gestoppt.

#### 4.4.2. Generierung eines stimulusresponsiven implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems über Klebung der vorpräparierten PAAm/Alginat-Hybridhydrogele

Im Falle des implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems auf Alginat/Polyacrylamid-Hybridhydrogel-Basis wurde Insulin und Anti-Insulin als Crosslinker verwendet. Dieses wurde aufgrund der Präparation in einer möglichst geringen Schichtdicke ausschließlich mit Alginat/Polyacrylamid-Hybridhydrogelen durchgeführt. Als Vergleich zu den verschiedenen anderen biokonjugierten sowie nicht modifizierten Freisetzungssystemen wird auf die Freisetzungsversuche in der Freisetzungskammer verwiesen (vgl. **Kapitel 4.2.3**).

Als Substratmaterial wurden die schon erwähnten Metallsubstrate (**Abbildung 17**) verwendet.

Für die Freisetzungsstudie (vgl. auch **Abbildung 17**) wurden die Kavitäten nach der Aktivierung über das Plasmaverfahren (vgl. **Kapitel 4.3.1**) sowie der Silanisierung mittels MPTMS (vgl. **Kapitel 4.3.2**) mit etwa 1 mg BSA-FITC gefüllt und im Anschluss die Kopplung der vorpräparierten Hydrogele (vgl. **Tabelle 12**) auf dem mit BSA-FITC gefüllten Substrat durchgeführt (vgl. **Abbildung 17**).

**Tabelle 12** *Verwendete Lösungen und Volumina bei Präparation von stimulusresponsiven, implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystemen auf der Basis von biokonjugierten PAAm und Alginat/PAAm-Hybridhydrogelen*

Hydrogeltyp	Zusammensetzung der aufgetragenen Lösung je 80 µL	Aufgetragenes Volumen [µL]
PAAm (Stufe 1)	38,9 µl AAm-Lsg. (16,4 % (w/w)) in DPBS	80/ abgezogen 75 (70)
	38,9 µl DPBS oder Kaninchen Anti-Maus IgG in DPBS (2 mg/ml)	
	1,1 µl APS (0,1 M) in DPBS	
	1,1 µl TEMED (0,8 M) in DPBS	
	35,4 µl AAm/MBAA-Lösung (48,1 % (w/w), 80/1 (AAm/MBAA), in DPBS)	
PAAm (Stufe 2)	35,4 µl DPBS oder Maus IgG-Lösung in DPBS (2 mg/ml)	2; (9,45)
	4,6 µl APS (0,1 M) in DPBS	
	4,6 µl TEMED (0,8 M) in DPBS	
	15,2 µL AAm-Lösung (50 % (w/w)) in DPBS	
PAAm/Alginat-Hybrid (vorgefertigtes Hydrogel)	3,05 µL MBAA-Lösung (1 % (w/w)) in DPBS	42,7
	30,48 µL Alginatlösung (2 % (w/w)) in DPBS	
	30,48 µl modifizierte Insulin/Anti-Insulin-Lösung	
	0,38 µl APS (40 % (vol/vol)) in DPBS	

	0,38 µl TEMED (20 % (w/w)) in DPBS	
	19,95 µl AAm-Lsg. (16,38 % (w/w) in DPBS)	
PAAm/Alginat-Hybrid- Klebung	14,60 µl AAm/MBAA-Lösung (48,1 % (w/w), 40/1 (AAm/MBAA), in DPBS)	4
(Kapitel 4.3.3.2, <i>Aufbringen der vorgefertigten Hydrogele</i> )	40,44 µl DPBS	
	2,51 µl APS (0,1 M) in DPBS	
	2,51 µl TEMED (0,8 M) in DPBS	

## 4.5. Charakterisierung

Neben den Untersuchungen bezüglich der Permeabilität der präparierten Hydrogele (**Kapitel 4.5.1**) und der Biokonjugation der Hydrogele (**Kapitel 4.5.4**) wurden noch weitere Charakteristika der Hydrogele untersucht. Neben dem Wassergehalt im gequollenen Zustand (**Kapitel 4.5.2**) sind dies vor allem auch die mechanischen Kennwerte (**Kapitel 4.5.3.1**).

Da das Ziel ein implantatassoziiertes System war, rückten allerdings ebenso Untersuchungen bezüglich der Modifizierung von Substratoberflächen wie Glas oder CrNi-Edelstahl in den Fokus. So wurde die Änderung der Oberflächenhydrophilie (**Kapitel 4.6.2**) mittels Kontaktwinkelmessung ebenso betrachtet wie die Oberflächemorphologie (**Kapitel 4.6.1**) mittels Rasterelektronenmikroskopie und die Schichtdicke mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie (**Kapitel 4.6.3**).

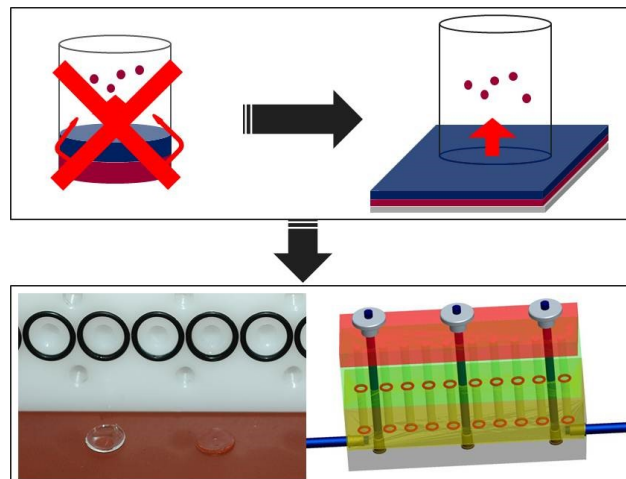
Als Abschluss erfolgte dann die Bestimmung der Haftfestigkeit der auf den Substraten etablierten Hydrogelen (**Kapitel 4.6.4**) wie auch die Testung des implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems bezüglich Permeabilität und Schaltbarkeit (**Kapitel 4.5.1.1**).

### 4.5.1. Permeationsstudie

Die Permeationsstudie wurde mit den Proteinen Bovines Serum Albumin (BSA, SERVA Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland), Fluoresceinisothiocyanat gelabeltes BSA (BSA-FITC, Sigma-Aldrich), staphylococcal protein A (SPA, ProSpec, Rehovot, Israel) und Myoglobin (vom Pferdeherzen, Sigma-Aldrich) durchgeführt. Die Auswahl wurde bezüglich der Stokeschen Radien (vgl. **Kapitel 4**) beziehungsweise der Molekülgröße (BSA: 67000 Dalton (Da), SPA: 42000 Da, Myoglobin: 16900-17000 Da) getroffen.

#### 4.5.1.1. Aufbau/Durchführung der Permeationsstudie

Nach der Einstellung des Quellungsgleichgewichtes wurden aus den entsprechenden gequollenen Gelkörpern (vgl. **Kapitel 4.1**) kleinere kreisförmige Gelkörper von 10 mm im Durchmesser herausgelöst und folgend für die Permeationsstudie in der Freisetzungskammer (**Abbildung 24**) eingespannt. Unter dem Gelkörper wurde hierzu eine definierte Menge Wirkstoff von 200 µg auf Glasträgern eines Durchmessers von 9 mm platziert. Als Medium für die Freisetzung wurde jeweils ein Volumen von 500 µl DPBS verwendet.



**Abbildung 24** Dem Kammernaufbau zugrunde liegende Idee und die sich daraus ergebende Umsetzung in Teflon/ Polyethylenterephthalat (PET) Ausführung.

Nach Ablauf von 24 Stunden bei Raumtemperatur wurden hiervon jeweils 200 µl abgezogen und zur Bestimmung des Proteinanteiles zur Seite gestellt, während diese durch 200 µl frischen DPBS ersetzt werden. Dieser Schritt wurde nach 48 sowie nochmals nach 72 Stunden wiederholt [124] und die erhaltenen Konzentrationen kumulativ in Bezug zu einer Proteinquelle ohne Hydrogel gesetzt.

Im Falle einer stimulusinduzierten Freisetzung wurden ebenfalls 500 µl DPBS (pH 7,4) (bzw. 0,04 mg/ml Lösung des entsprechenden Stimulus in DPBS) als Medium verwendet. Zu fest definierten Zeitpunkten wurden 200 µl zur Analyse entnommen und die Proteinkonzentration (im Falle der Verwendung von BSA) der Lösung unter Berücksichtigung der vorgelegten Menge an Stimulus berechnet.

Im Falle der Verwendung von BSA-FITC als Wirkstoff konnte die Quantifizierung nach dem Dequenchen (vgl. **Kapitel 4.5.1.3**) direkt durchgeführt werden.

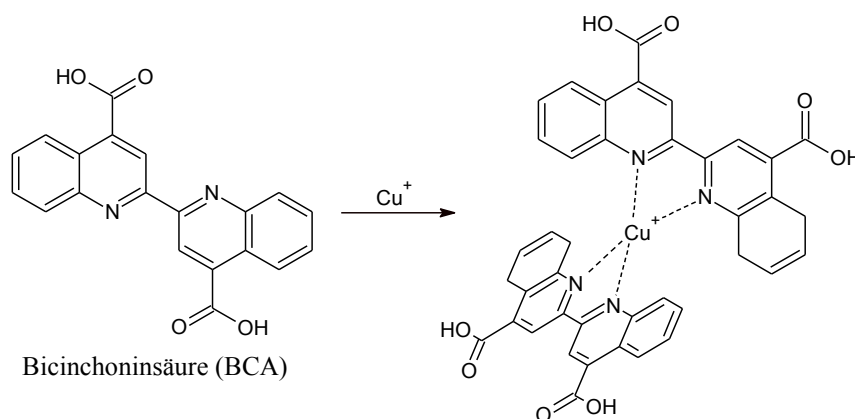
Im Falle der Testung der Permeation aus einem implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystem wurde die Freisetzung von BSA-FITC bei 37°C unter leichtem Schütteln in 1500 µl DPBS (pH 7,4) (bzw. 0,04 mg/ml Insulin Lösung in DPBS) vermessen. Zu fest definierten Zeitpunkten (0,5; 1; 2; 4; 6; 12; 24; 48 Stunden) wurden 500 µl zur Analyse abgezogen und durch frisches Medium ersetzt. Das Medium wurde wie oben beschrieben vermessen.

#### 4.5.1.2. Proteinquantifizierung mittels BCA

Für die Bestimmung von BSA, SPA sowie Myoglobin wurde ein Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) der Firma Thermo Scientific (Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Dieser auf der Komplexbildung von Bicinchoninsäure mit  $\text{Cu}^+$  basierende Nachweis beruht auf der Reduktion der im Assay vorgelegten  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen, durch reduktive Gruppen im Protein unter alkalischen Bedingungen zu  $\text{Cu}^+$  (Biuret Reaktion) (**Abbildung 25**). Hierfür wurden in 96-Wellplates jeweils 25 µl des Freisetzungsmediums/Probe mit 200 µl einer Reaktionslösung umgesetzt (37°C/30 Minuten unter Schütteln). Diese Reaktionslösung beinhaltet in einem Verhältnis von 50:1 eine 0,1 M NaOH Lösung, welche Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat enthält, sowie eine 4,0 %ige (w/w) Kupfersulfat-Pentahydrat Lösung.

Folgend wurde die Absorption der Lösungen mittels eines Fluostar Optima Spektrometers (BMG Labtech, Ortenberg Germany) bei 560 nm vermessen.

Für die Kalibration wird jeweils ein Bereich von 0-2000 µg/ml angesetzt und viermal mit einem Volumen von 25 µl pro Well vermessen (Stammlösung  $c = 2\text{mg/ml}$ ).



**Abbildung 25** Komplexbildung des reduzierten, nun einwertigen,  $\text{Cu}^+$ -Ions mit jeweils zwei Bicinchoninsäuremolekülen. Der entstehende violette Komplex wird spektrometrisch bei 560 nm detektiert.

#### 4.5.1.3. Proteinquantifizierung mittels Fluoreszenzspektroskopie

Für die Proteinquantifizierung im Falle der Anwesenheit eines stimulierenden Proteins wurde nicht auf die Methode der Quantifizierung über einen BCA Proteinassay zurückgegriffen, da dieses Verfahren von zu vielen Parametern abhängig wäre. Zu nennen wären hier eine ungenaue Zugabe des stimulierenden Proteins – wie auch die Art des zugegebenen Proteins durch seine unterschiedlich reduktiven Eigenschaften eine Quantifizierung des freigesetzten Proteins als sehr schwierig erscheinen lassen. Stattdessen wurde in diesem Fall auf FITC-markierte Proteine zurückgegriffen, welche über ihre Fluoreszenz eine Aussage bezüglich der permeierten Menge an Protein zuließen.

Problematisch in diesem Fall ist, aufgrund der mehrfach FITC-gelabelten BSA-Moleküle die direkte Quantifizierung. Erwähnt wird häufiger ein Verhältnis von Fluorophor/Protein = 10. Grund für die hohe Modifizierung soll unter anderem die Möglichkeit einer sensitiveren Erfassung sein [125].

Problematisch erscheint die häufige FITC-Modifizierung in Hinblick auf eine Dimerisierung der FITC-Moleküle, was in der Folge zu einer Reduktion der Fluoreszenz führen kann. Als weiterer Effekt kann es zu einem sogenannten Resonanz Energie Transfer (RET) kommen – ein Phänomen welches bei Fluorescein in einem Abstand von 20 bis 42 Angström mit über 50 % auftritt (Förster Distanz für FITC) – und somit zu einem Transfer der Energie von einem fluoreszierenden FITC-Marker zu einem nicht fluoreszierenden FITC-Dimer. Durch dieses Verhalten kann es zu einer weiteren Abnahme der Fluoreszenz-Intensität bei BSA kommen, da dieses strukturell bedingt Abstände von 45 – 60 Angström zulässt [125].

Aus diesem Grund wurde ein Verdau mit Proteinase K durchgeführt um BSA-FITC in Einzelsegmente zu zerlegen, welche eine unabhängige Quantifizierung einzelner FITC-Moleküle ohne entstehende Dimere zulassen.

Für das Dequenzen des Proteins wurde folgender Ansatz gewählt: 25 µl BSA-FITC-Lösung der Permeationsstudie (maximal 400 µg/ml, DPBS) wurden mit 5 µl (250 µg/ml, Proteinase K in DPBS) Proteinase K sowie 175 µl DPBS auf einer 96er Well-Platte vermengt und 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Hiernach erfolgte die Messung der Fluoreszenz mittels eines Fluostar Optima Spektrometers ( $\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ).

Die Kalibration wird mit BSA-FITC für einen Bereich von 0-100  $\mu\text{g/ml}$  angesetzt und dreimal mit einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$  pro Well vermessen (Stammlösung  $c = 1\text{mg/ml}$ ).

#### **4.5.2. Wassergehaltsbestimmung der gequollenen Hydrogele**

Um den angegebenen Gelgehalt auch für den gequollenen Zustand experimentell zu untermauern, wurde auf die Wassergehaltsbestimmung nach Karl-Fischer zurückgegriffen. Proben von 16 Stunden in DPBS-Puffer gequollenen Hydrogelen mit 5 mm Durchmesser wurden vorsichtig von überschüssig anhaftendem Wasser befreit und in dem Trockenofen D0308 (Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) des Karl-Fischer-Titrators bei  $230^{\circ}\text{C}$  platziert. Der Wassergehalt der Proben wurde folgend über die Verwendung eines Karl-Fischer Coulometer C20 (Mettler Toledo) mit der Hydranal-Coulomat AG KF bestimmt. Der bestimmte Wassergehalt der Proben wurde in Proportion zur Trockenmasse des Polyacrylamids gesetzt, welche über die Wägung mit einer Mikrowaage (UMX5, Mettler Toledo) bestimmt wurde.

#### **4.5.3. Zugversuche**

Im Rahmen der Etablierung eines Hydrogelverbundes Zugversuche zur Beurteilung der mechanischen Stabilität nach ISO 527-4, durchgeführt. Dies diente dem Herausarbeiten von Unterschieden der mechanischen Stabilität zwischen den unterschiedlichen Gelarchitekturen, Gelgehalten sowie Vernetzungsgraden, was für die Charakterisierung der Hydrogelbeschichtung von Interesse ist.

##### **4.5.3.1. Bestimmung der mechanischen Kennwerte über Zugversuche**

Für die Zugversuche wurde eine Hydrogellösung nach **Kapitel 4.1** hergestellt und zur Reaktion gebracht. Die in Folge in DPBS-Puffer zur Quellung und Reinigung eingelegten Schulterstäbe wurden für den Versuch zwischen zwei Spannbacken eingespannt und an einer Zwicki ZN 2,5 (Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland) mit einem 10-N Kraftaufnehmer und einer Traversalggeschwindigkeit von 12 mm/min Zugversuche durchgeführt (**Abbildung 26, A**).

Hierbei wurden sowohl die Zugfestigkeit ( $\sigma_m$ ) als auch die Bruchdehnung ( $\epsilon_B$ ) direkt gemessen und der E-Modul (E) (über lineare Regression) bestimmt.

#### 4.5.4. Fluoreszenzmikroskopie

Die Testung der Inkorporation der Antigene und Antikörper in die PAAm-Hydrogele, wichtig als Grundlage für einen funktionierenden biologisch stimulierten Schaltmechanismus, erfolgte mit FITC-gelabelten Sekundär-antikörpern (30 µg/ml) gegen die korrespondierenden gekoppelten Biomoleküle. Verwendet wurden hierfür: Ziege Anti-Maus IgG (FITC) (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) (gegen Maus IgG), Ziege Anti-Kaninchen IgG (FITC) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland), (gegen Kaninchen Anti-Maus IgG); Insulin (FITC) (Human) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) (gegen Anti-Insulin) und Anti-Insulin + Proinsulin IgG (FITC) (Abcam) (gegen Insulin).

Die Gelkörper eines Durchmessers von 6-8 mm wurden für 1,5 Stunden bei  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  in DPBS mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert.

Die Messung der relativen Lichtintensität und mikroskopische Aufnahmen wurden nach dem Waschen in DPBS (30 min.) mittels Fluoreszenzmikroskopie ( $\lambda_{\text{exc}}=488\text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}}=505\text{-}525\text{ nm}$ ) mit einem FluView1000 (Olympus, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

Zusätzlich erfolgte über dieses Verfahren versuchsweise die Quantifizierung der relativen Proteinmenge bezüglich eines Blindwertes über die ausgestrahlte Lichtintensität eines definierten Bereiches des Hydrogels (region of interest, ROI).

#### 4.5.5. Proteinquantifizierung von im Hydrogel gekoppelten Proteinen

Neben der Quantifizierung der Proteinmenge über die ROI wurde, im Falle von hydrogelgekoppelten Proteinen, versucht die Menge im Verbund über Verwendung des BCA-Assays zu quantifizieren. Hierzu wurden zu den 5 mm Stanzen 250 µl Reaktionslösung zugegeben. Nach Ablauf einer Stunde ( $37^\circ\text{C}$  unter Schütteln) wurden 225 µl der Lösung abgezogen und, wie im **Kapitel 4.5.1.2** beschrieben, vermessen.

### 4.6. Charakterisierung der Oberflächenbehandlungen

#### 4.6.1. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Oberflächenmorphologie der Proben wird über Rasterelektronenmikroskopie analysiert. Hierfür wird ein Quanta FEG 250 verwendet.

Untersucht wurden Glasprobenkörper welche einer unterschiedlicher Oberflächenbehandlung unterworfen worden waren. So wurden unbehandelte Glasträger, Proben welche plasmaaktiviert wurden (vgl. **Kapitel 4.3.1**), mit APTES,

APTES/NSA oder MPTMS (vgl. **Kapitel 4.3.2**) versehen worden waren oder den abschließenden PAAm-Modifizierungen (vgl. **Kapitel 4.3.3**) unterworfen worden waren, vermessen.

Die Aufnahme in 50-facher, 500-facher und 1000-facher Vergrößerung. Bei dem verwendeten Gerät wird der Elektronenstrahl (Primärstrahl), mit welchem das zu untersuchende Objekt abgerastert wird, durch Feldemission erzeugt. Trifft dieser Primärstrahl nun auf die zu analysierende Probe, werden, infolge von Wechselwirkungen zwischen Elektronen und dem Probenmaterial, Sekundärelektronen aus der Probe herausgeschlagen, welche über einen Detektor erfasst werden. Hierbei korreliert das Signal mit der Menge der ausgeschlagenen Sekundärelektronen. Stellen erhöhter Intensität werden in diesem Fall heller dargestellt [126].

Im Falle der verwendeten Proben handelte es sich des Weiteren um nicht leitende Objekte, weswegen die Aufnahmen im ESEM-Modus (Environmental Scanning Electron Microscope) durchgeführt wurden. Hierbei werden die Proben nicht im Hochvakuum, sondern einem Niedrigvakuum mit kontrollierter Wasserdampfatmosphäre von etwa 50 Pascal (Pa), vermessen. Der ionisierte Wasserdampf verhindert so einerseits das lokale Aufladen von nicht leitenden Probenkörpern, zum anderen wird der Sekundärioneneffekt hierbei zusätzlich verstärkt. Begründen lässt sich dies über das Herausschlagen weiterer Elektronen bei der Kollision mit Wasserdampfmolekülen.

#### **4.6.2. Analyse der Oberflächenmodifizierung über Kontaktwinkeländerung**

Als eine Methode zur Feststellung der Oberflächenmodifizierung, welche über Rasterelektronenmikroskopie nicht feststellbar war, war die Messung eines Kontaktwinkels mittels Contact Angle System (OCA 20, Dataphysics Instruments GmbH, Filderstadt, Deutschland). Hierbei wurde die Methode des liegenden Tropfens (Sessile Drop Method) angewandt. Hierbei wurde auf ein ebenes Substrat ein Tropfen von 12 µl Reinstwasser gegeben, wobei die Auswertung mithilfe einer CCD-Kamera über die Auswertesoftware (SCA 20) nach der Young-Laplace-Methode durchgeführt wurde [127].

Über den Kontaktwinkel des liegenden Tropfens, einem Maß für die Benetzbarkeit, kann die Oberflächenveränderung des Substrates nachgewiesen werden.

Begründen lässt sich dies über die Ausbildung einer Dreiphasengrenze bei Kontakt des Flüssigkeitstropfens mit der Substratoberfläche, welche in Folge der Einstellung eines Kräftegleichgewichtes zur Ausbildung eines spezifischen Kontaktwinkels  $\Theta$  führt.

Der zwischen der Tangente entlang der Tropfenkontur und der Substratoberfläche im Drei-Phasen-Punkt definierte Winkel nähert sich  $0^\circ$ , wenn man von einer idealen Benetzbarkeit ausgeht [128]. In diesem Fall liegt eine stärkere Wechselwirkung zwischen Festkörper und Flüssigkeitsmolekülen als zwischen den Flüssigkeitsmolekülen selbst vor [127].

#### **4.6.3. Schichtdickenbestimmung**

Für die Untersuchung der Schichtdicke wurde als Methode die confocal laser scanning microscopy (CLSM) verwendet. Bei dieser Methode handelt es sich um ein lasergestütztes Verfahren basierend auf der Reflexion des erzeugten Laserstrahls durch das Probenmaterial. Um eine Reflexion durch die Probe erreichen zu können, wurde im Falle der Präparation auf Glassubstraten auf diesen zusätzlich eine dünne Goldschicht aufgedampft (0,2 mbar, 20 mA, 120 sec.; Agar Sputter coater, Agar scientific, Stansted, Essex, Vereinigtes Königreich), eine Vorgehensweise, welche sich bei Edelstahlsubstraten aufgrund der Reflexionseigenschaften erübrigte. Für das Auftragen der Goldschicht mittels Hochspannung wird ein Prozessgas, hier Argon, ionisiert. Die hierbei entstehenden Ionen sind in der Lage Festkörperteilchen aus einer Kathodenoberfläche, dem sogenannten Target – in verwendeten Fall Gold – herauszuschlagen. Diese Teilchen scheiden sich auf dem Glaträger ab und bilden so eine dünne, gleichmäßige Goldschicht [129].

Hierbei wird das von der Probe emittierte Reflexionslicht über ein Linsen/Blenden-System zum Detektor weitergeleitet, über die Verwendung eines Fotomultipliers verstärkt, erfasst und ermöglicht über die Fokussierbarkeit des Lasers auf eine spezifische Brennebene (z-Richtung) und das Rastern entlang der z-Achse die Generierung eines Bildes einer hohen Tiefenschärfe in der x-z-Ebene, an welchem die Schichtdicke der Proben ermittelt werden kann. [130,131]

Die Messung wurde mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop LEXT OLS 3000 der Firma Olympus (Hamburg, Deutschland) (Brechungsindex: 1,5) durchgeführt.

Die Untersuchungen wurden in Anbetracht der Tatsache, dass es bei reinen Polyacrylamidhydrogelen zu Abrissen der Beschichtungsmatrix gekommen war, mit Polyacrylamid/Alginat-Hybridhydrogelen durchgeführt.

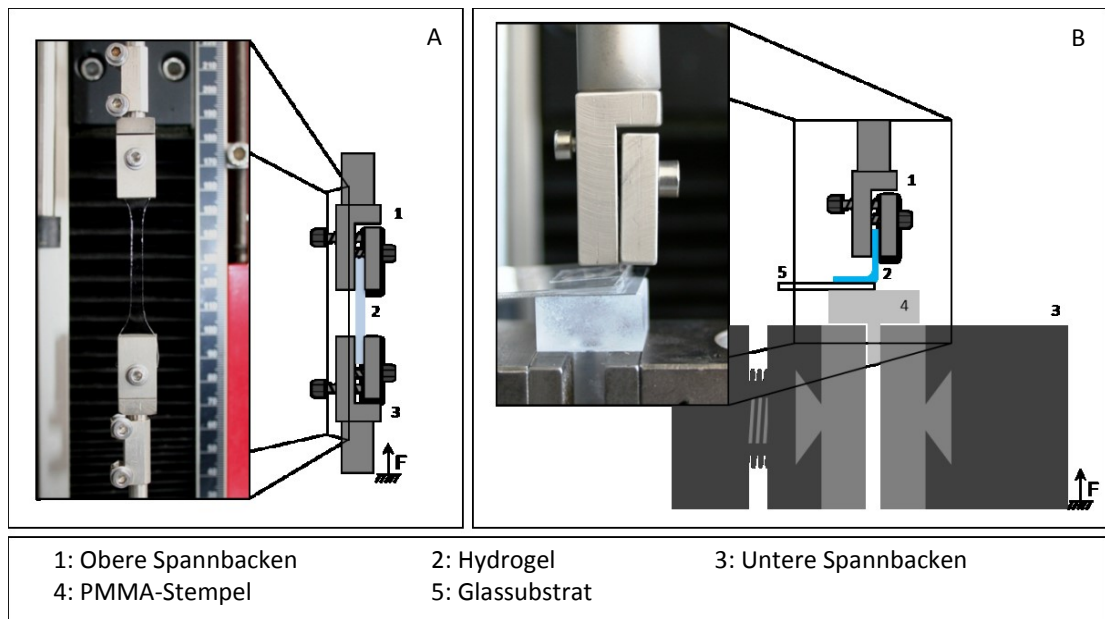
Die Beschichtungsdicke wurde sowohl im trockenen als auch im gequollenen Zustand ermittelt. Es wurde jeweils die Schichtdicke von drei Proben an drei unterschiedlichen Messpunkten untersucht. Hierbei erhält man für jeden Messpunkt eine Grafik, womit die Probe durch die Abstufung der Grauwerte vermessen werden kann. Um statistisch aussagekräftige Werte zu erhalten, werden für jede Grafik zehn Messungen durchgeführt. Aus den resultierenden Werten wird anschließend der Mittelwert gebildet.

#### **4.6.4. Bestimmung der Haftfestigkeit von Hydrogelbeschichtungen**

Im Rahmen der Etablierung eines Hydrogelverbundes auf den Substratoberflächen wurden Haftversuche zur Testung der Haftfestigkeit des Hydrogelnetzwerkes auf der Oberfläche von Modellsubstraten (Glas) und damit der Beurteilung der Funktionalität des Haftvermittlungsverfahrens nach DIN SPEC 91063 „Haftfestigkeiten von Beschichtungen“ durchgeführt. Diese ist als „Maß für den Widerstand eines Schicht-Untergrund-Verbundes gegen Adhäsionsbruch“, also eine von außen bewirkte Abtrennung der Beschichtung vom Untergrund definiert.

Wie auch im Falle der Zugversuche wurde die Zugfestigkeit ( $\sigma_m$ ) und die Bruchdehnung ( $\epsilon_B$ ) direkt gemessen. Die Versuche orientierten sich hierbei an der sogenannten „Abschälprüfung 1“ (DIN SPEC 91063, Sektion 4.1.3).

Für die Haftfestigkeitsuntersuchungen wurden die vorpräparierten Hydrogelfilme nach **Kapitel 4.3.3** mittels 4  $\mu$ L des Klebers auf einem Glasträger immobilisiert, sodass die Hälfte (15 x 10 mm) auf der Oberfläche verankert wurde, während die andere Hälfte des Hydrogels in die obere Spannbacke der Versuchsvorrichtung eingespannt wurde (**Abbildung 26, B**). Die Proben wurden nicht wie bei dem Zugversuch mit einem zwischen zwei Spannbacken fixierten Hydrogel durchgeführt, sondern mittels einer Probe bei welcher in einer Spannbacke fixiert ein Polymethylmethacrylat (PMMA)-Stempel vorlag, auf welchen das Modellsubstrat aufgebracht wurde. Der überstehende Teil des Hydrogelfilms wurde im 90° Winkel an die obere Klemmbake angelehnt und über Zugabe von 40  $\mu$ l DPBS bzw. 40  $\mu$ l einer gesättigten  $\text{CaCl}_2$ -Lösung in DPBS das Hydrogel zur Quellung gebracht. In der Folge erfolgte das endgültige Einspannen der Probe. Unter Verwendung eines 10-N Kraftaufnehmers wurde das Hydrogel bei einer Traversalggeschwindigkeit von 5 mm/min einer Haftfestigkeitsuntersuchung unterzogen. Als Referenz wurden allein durch Adhäsion auf den Glasträgern immobilisierte Hydrogele vermessen.



**Abbildung 26** Darstellung (Fotografisch und schematisch) eines Zugversuches mit einem Schulterstab (Gelgehalt: 15% (w/w), 117/1 (AAm/MBAA), semi-IPN) (A) und einer Haftfestigkeitsmessung (B) (Alginat/PAAm-Hybrid Hydrogel).

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Charakterisierung unmodifizierter Hydrogele

Der Einfluss des Gelgehaltes (Polymermassenanteils im Hydrogel), der Vernetzung sowie der Gelarchitektur auf die *in vitro* Freisetzung wurden mittels der Permeation mehrerer Modellwirkstoffe, in diesem Fall dreier Proteine, getestet. Als Proteine wurden BSA (66 kDa), SPA (42 kDa) und Myoglobin (17 kDa) verwendet, da diese Proteine über Unterschiede im Permeationsverhalten verfügen sollten. Zumindest lassen dies die unterschiedlichen hydrodynamischen Durchmesser (7,68 nm (BSA), 5,0 nm (SPA), 2,4 nm (Myoglobin) [53–55]) über welche die Proteine verfügen, vermuten. Die Beurteilung der Permeabilität der Hydrogele wurde anhand der freigesetzten Menge an Protein mittels BCA-Assay durchgeführt.

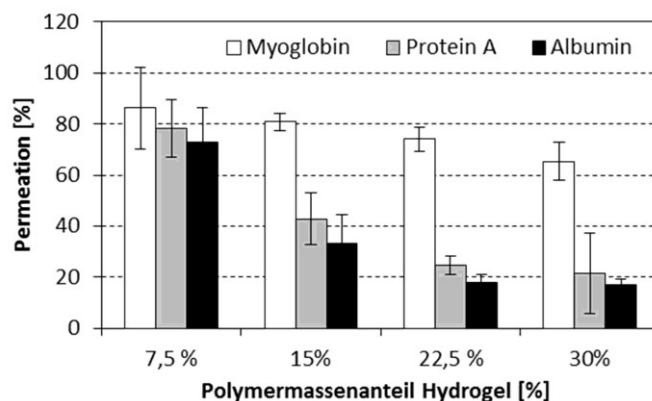
Um zusätzlich einen Eindruck des Gelgehaltes während der Freisetzung zu erhalten, wurde im gequollen Zustand eine Wassergehaltsbestimmung nach Karl-Fischer durchgeführt. Diese Messungen sollen helfen, die Permeation im Kontext der im gequollen Zustand geringeren Unterschiede zu beurteilen.

Zur weiteren Verwendung des Hydrogels auf Implantatoberflächen wurden außerdem mechanische Kennwerte des Hydrogels wie die Zugfestigkeit ( $\sigma_m$ ), die Bruchdehnung ( $\epsilon_B$ ) sowie der E-Modul (E) bestimmt.

#### 5.1.1. Permeationsverhalten der Modellwirkstoffe in Abhängigkeit des Gelgehaltes

Aufgrund des hohen Einflusses auf die Porengröße und Porosität ist der Gelgehalt einer der entscheidenden Faktoren bei der Beeinflussung der Wirkstoffpermeation [63]. Exemplarisch werden, obwohl sowohl konventionelle als auch semi-IPN-Hydrogele mit einem Vernetzungsgrad von 58/1 und 117/1 (AAm/MBAA) getestet wurden, nur die Ergebnisse für ein semi-IPN-Hydrogel 117/1 dargestellt. Begründen lässt sich dies mit dem beobachteten Verhalten für Gelgehalte der anderen Gelarchitekturen und Vernetzungsgrade welche die gleichen Veränderungen der Permeationstendenzen aufweisen. Wie unter **Kapitel 5.2.1.** außerdem dargelegt, erwies sich aufgrund der Freisetzungsergebnisse das 15 %ige (w/w) 117/1 (AAm/MBAA)-Hydrogel als geeignet für die Biokonjugation sowie die spätere Verwendung als Beschichtungsmatrix, weswegen sich die Darstellung in den folgenden Kapiteln im Wesentlichen dieser Matrix widmet.

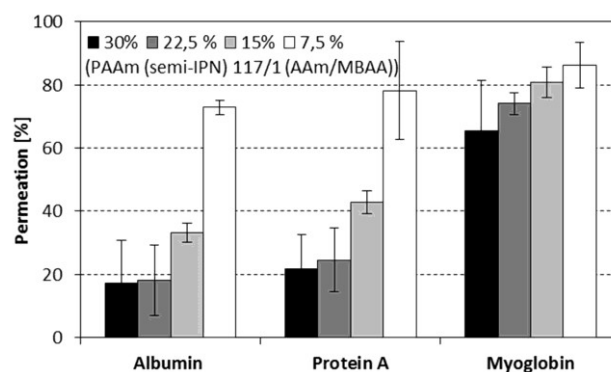
Dargestellt ist in **Abbildung 27** die Permeation unterschiedlicher Modellwirkstoffe bezüglich der verwendeten Gelgehalte von 7,5 - 30 % (w/w). Deutlich zu erkennen ist für jeden Gelgehalt eine Abnahme der Permeation bei steigender Proteinmasse. Allerdings zeigen sich innerhalb der Gelgehalte leichte Unterschiede. So ergibt sich für ein 7,5 %iges (w/w) Hydrogel eine leichte Abnahme der Permeation von  $86,3 \pm 7,3$  % (Myoglobin) auf  $72,8 \pm 2,2$  % (Albumin). Diese Tendenz liegt auch bei höheren Gelgehalten vor, wobei allerdings die Differenz der Permeation von Myoglobin zu Albumin bei steigendem Gelgehalt stark zunimmt. So liegt bei einem 30 %igen (w/w) Hydrogel immer noch eine Permeation von  $65,4 \pm 16$  % für das kleinste der getesteten Proteine vor, während für das Albumin lediglich noch Werte von  $17,2 \pm 13,5$  % erreicht werden.



**Abbildung 27** Permeation der Modellwirkstoffe (BSA, Protein A und Myoglobin) durch PAAm Hydrogele (Dicke: 2 mm; Vernetzungsgrad: 117/1 (AAm/MBAA); Gelarchitektur: semi-IPN) in Abhängigkeit eines Gelgehaltes zwischen 7,5 und 30 % (w/w). Die Permeation wird dargestellt in [%] des freigesetzten Modellwirkstoffes nach 72 Stunden. Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens vier Experimenten.

Um die Abstufungen innerhalb der Freisetzungsreihen bezüglich der Molekülgröße des permeierenden Proteins noch deutlicher herauszuarbeiten, wurden die Daten bezüglich der Permeation in **Abbildung 28** nochmals auf die Proteine bezogen dargestellt. Zu erkennen ist eine Zunahme der Wirkstofffreisetzung mit abnehmendem Gelgehalt. So zeigen die Ergebnisse der Albuminpermeation eine Abnahme der Permeation von  $72,8 \pm 2,2$  % (7,5 % (w/w)) auf  $17,2 \pm 13,5$  % (30 % (w/w)). Ähnliche Werte ergeben sich für das, mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 5,0 nm, kleinere Protein A. Die Permeation dieses Proteins nimmt im ähnlichen Rahmen von  $78,2 \pm 15,6$  % (7,5 % (w/w)) auf  $21,6 \pm 11,1$  % (30 % (w/w)) ab. Das noch kleinere Myoglobin zeigt zwischen den verschiedenen Gelgehalten eine geringere Abnahme der Permeation. Jedoch befinden sich die Werte generell auf einem wesentlich höheren

Niveau. So nimmt die Permeation hier von  $86,3 \pm 7,3$  % (7,5 %iges (w/w) Hydrogel) auf  $65,4 \pm 16$  % für ein 30 %iges (w/w) Hydrogel ab. Deutlich wird in dieser Darstellungsweise auch die Differenz der Permeation für ein Protein bei unterschiedlichen Gelgehalten. Diese liegt bei den Proteinen Albumin und Protein A in einem ähnlichen Rahmen, während die Differenzen für die Permeation von Myoglobin zwischen den einzelnen Gelgehalten wesentlich geringer ausfallen. Auffallend ist im Falle der beiden Proteine Albumin und Protein A allerdings die starke Zunahme der Permeation zwischen einem 15 % (w/w) und einem 7,5 %igen (w/w) Hydrogel.

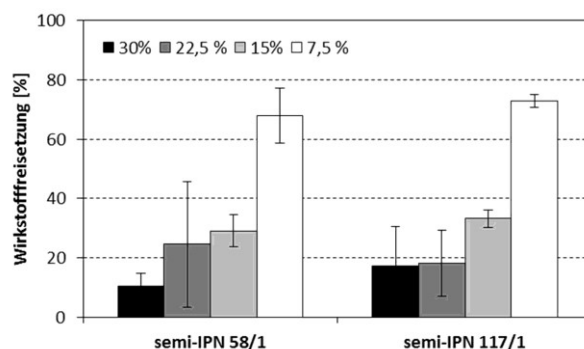


**Abbildung 28** Permeation der Modellwirkstoffe BSA, Protein A und Myoglobin durch PAAm Hydrogele (Dicke: 2 mm; Gelgehalt: 7,5 %, 15 %, 22,5 %, 30 % (w/w); Vernetzungsgrad: 117/1 (AAM/MBAA); Gelarchitektur: semi-IPN). Die Permeation wird dargestellt in [%] des freigesetzten Modellwirkstoffes nach 72 Stunden. Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens vier Experimenten.

### 5.1.2. Permeationsverhalten der Modellwirkstoffe in Abhängigkeit des Vernetzungsgrades (AAM/MBAA)

Neben dem Gelgehalt wurde auch die Menge an Crosslinker in dem System verändert. Durch die unterschiedlichen Mengen an MBAA im System ergibt sich eine größere Vernetzung im Hydrogelverbund. Getestet wurden Systeme mit einem AAM/MBAA-Verhältnis von 58/1 und 117/1. Da die Ergebnisse für konventionelle und semi-IPN-PAAm-Hydrogele für die verwendeten Modellproteine die gleichen Tendenzen aufweisen, werden in **Abbildung 29** die verschiedenen Vernetzungsgrade für verschiedene Gelgehalte zwischen 7,5 und 30 % (w/w) eines semi-IPN-Hydrogels exemplarisch für ein Protein (BSA) dargestellt. Deutlich wird, dass die Werte für ein semi-IPN eines Vernetzungsgrades von 58/1 gegenüber dem von 117/1 keine großen Unterschiede aufweisen. Die Permeation von BSA nimmt für beide Vernetzungsgrade im gleichen Maße von  $10,4 \pm 4,3$  % (30 % (w/w), 58/1) bzw.  $17,2 \pm 13,2$  % (30 %

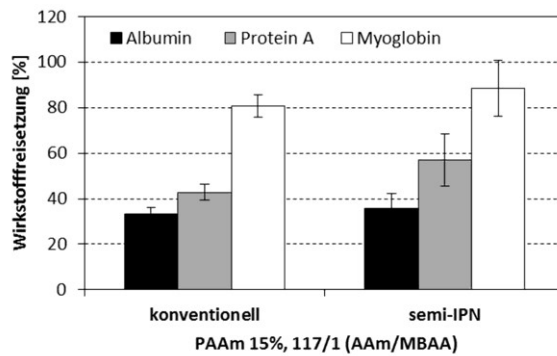
(w/w), 117/1) auf  $67,9 \pm 9,2$  % (7,5 % (w/w), 58/1) bzw.  $72,8 \pm 2,2$  % (7,5 % (w/w), 117/1) zu.



**Abbildung 29** Permeation des Modellwirkstoffes BSA durch semi-IPN PAAm-Hydrogele unterschiedlicher Vernetzungsgrade (Dicke: 2 mm; Gelgehalte: 7,5 %, 15 %, 22,5 % und 30 % (w/w); Gelarchitektur: semi-IPN). Die Permeation wird dargestellt in [%] des freigesetzten Modellwirkstoffes nach 72 Stunden. Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens vier Experimenten.

### 5.1.3. Permeationsverhalten der Modellwirkstoffe in Abhängigkeit der Hydrogelarchitektur

Neben der Untersuchung bezüglich des Gelgehaltes, des Vernetzungsgrades und der Abhängigkeit von der Molekülgröße tritt die Hydrogelarchitektur als weiterer Punkt der Untersuchungen in den Fokus. Wie in **Abbildung 12** dargestellt, liegt ein wesentlicher Unterschied der beiden Hydrogeltypen in den Fasern, welche zusätzlich in das konventionelle Netzwerk eingelagert werden und so aus einem konventionellen ein semi-IPN Hydrogel bilden. Vom Prinzip her ist dies, bei gleichbleibendem AAm/MBAA-Verhältnis, gleichbedeutend mit einer Änderung des Vernetzungsgrades, Acrylamid dem Verhältnis für die Synthese der Fasern des Netzwerkes entzogen wird. Wie aus **Kapitel 5.1.2.** hervorgeht hat der Vernetzungsgrad in den verwendeten Varianten keinen Einfluss auf die Permeation. Aus **Abbildung 30** wird außerdem deutlich, dass die Freisetzung von BSA, Protein A und Myoglobin durch ein 15 %iges (w/w), 117/1er (AAm/MBAA) Hydrogel durch das konventionelle Netzwerk ähnlich der Freisetzung durch das semi-IPN Hydrogel verläuft.



**Abbildung 30** Permeation der Modellwirkstoffe (BSA, Protein A und Myoglobin) durch PAAm Hydrogele unterschiedlicher Gelarchitektur (Dicke: 2 mm; Gelgehalt: 15 %; Vernetzungsgrad: 117/1). Permeation wird dargestellt in [%] des freigesetzten Modellwirkstoffes nach 72 Stunden. Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens vier Experimenten.

#### 5.1.4. Wassergehalt der gequollenen Hydrogele während der Freisetzung

Die in **Abbildung 27**, **Abbildung 28** und **Abbildung 30** dargestellten Ergebnisse lassen Erkenntnisse bezüglich des Trends der Beeinflussung einer Freisetzung von Proteinen (Modellwirkstoffen) unterschiedlicher Größen durch eine Polyacrylamid-Hydrogelmatrix unterschiedlicher Gelgehalte, Crosslinker-verhältnisse und Gelarchitektur zu.

Dargestellt wurden in **Abbildung 27** bis **Abbildung 29** bezüglich des Gelgehaltes, also des prozentualen Anteils der Polymermasse, die präparativ eingesetzten Massen. Diese verändern sich jedoch im Zuge der Quellung während der Freisetzungsversuche. Um einen Überblick über den real vorliegenden Gelgehalt während der Freisetzung zu erhalten, wurden die Proben gequollen auf den Wassergehalt hin untersucht. Die in **Tabelle 13** dargestellten Werte geben einen Überblick über die aufgenommene Menge Wasser/mg Polymer. Sie weisen gegenüber den eingesetzten Polymermassen/mg (Hydrogel) (vgl. **Tabelle 4**, **Tabelle 5** und **Tabelle 6**) durchweg niedrigere Werte auf. So kommen die 30 %igen (w/w) Hydrogele nach einer Quellzeit von 18 Stunden auf einen Gelgehalt von nahezu 10 % (w/w), während 7,5 %ige (w/w) Hydrogele lediglich einen Gelgehalt von etwa 4,5 % (w/w) aufweisen. Hierbei sinkt die Wasseraufnahme pro mg Hydrogel von 21 mg Wasser auf etwa 9,5 mg Wasser ab. Auch zeigt sich hier, dass die Werte für semi-IPN Hydrogele jenen der konventionellen, wie anhand des 15 %igen (w/w) Hydrogels belegt wird (vgl. **Tabelle 13**), entsprechen.

**Tabelle 13** Messergebnisse der Karl-Fischer-Titration zur Bestimmung des Wassergehaltes von semi-IPN-Hydrogelen aller getesteten Gelgehalte sowie der unterschiedliche Crosslinker Verhältnisse von 58/1 bzw. 117/1. Zusätzlich sind neben den Werten der semi-IPN Hydrogelen die Werte des konventionellen 15%igen (w/w) Hydrogels dargestellt.

AAm/MBAA-Gehalt (w/w) bei Präparation	Wasseraufnahme mg (H <sub>2</sub> O)/mg (Polymer) [mg], (58/1)	Massenanteil an Polymer im Hydrogel [%], (58/1)	Wasseraufnahme mg (H <sub>2</sub> O)/mg (Polymer) [mg], (117/1)	Massenanteil an Polymer im Hydrogel [%], (117/1)
7,5 % semiIPN	21,1 ± 1,4	4,4 ± 0,3	21,3 ± 2,5	4,5 ± 0,5
15,0 % semiIPN	11,7 ± 1,7	8,0 ± 0,9	15,6 ± 0,2	6,0 ± 0,1
15,0 % konv.	11,6 ± 1,2	8,0 ± 0,8	14,7 ± 2,5	6,5 ± 1,1
22,5 % semiIPN	10,0 ± 0,3	9,1 ± 0,3	10,5 ± 0,9	8,7 ± 0,8
30 % semiIPN	10,0 ± 1,8	9,3 ± 1,4	9,6 ± 0,8	9,9 ± 0,9

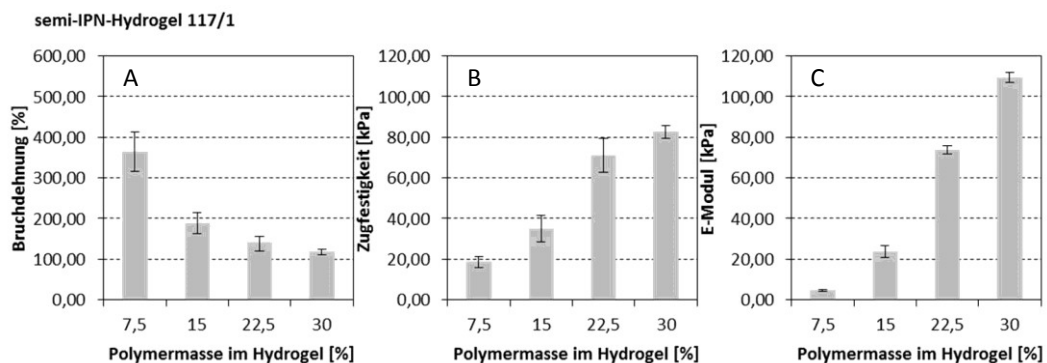
#### 5.1.5. Bestimmung der Abhängigkeit der mechanischen Kennwerte vom Gelgehalt, der Gelarchitektur sowie dem Vernetzungsgrad

Um neben dem Einfluss der unterschiedlichen Gelparameter wie Hydrogelgehalt, der Architektur des Hydrogelverbundes sowie der Größe des Vernetzungsgrades auf die Permeation des Wirkstoffes, einen Überblick über die mechanische Belastbarkeit des Hydrogels zu erhalten, wurden die verschiedenen Hydrogele bezüglich der Zugfestigkeit ( $\sigma_m$ ), Bruchdehnung ( $\epsilon_B$ ) sowie dem E-Modul (E) untersucht. Dies dient der Beurteilung der Verwendbarkeit des Hydrogels für Implantatbeschichtungen. So stellt ein hoher Gelgehalt, einhergehend mit einer hohen Steifigkeit des Materials, hinsichtlich eines dilatierbaren Systems aufgrund seiner geringen Bruchdehnung sowie seiner Sprödigkeit und des schnell folgenden Kollaps, einen Nachteil für die Verwendung als Oberflächenbeschichtung dar. Betrachtet man die Bewahrung der Beschichtungsintegrität, so wirkt sich hier andererseits ein zu geringer Gelgehalt negativ aus.

Zur besseren Übersicht wurden die Werte für das semi-IPN Hydrogel, Vernetzungsgrad 117/1, der unterschiedlichen Gelgehalte exemplarisch in **Abbildung 31** dargestellt, während die Parameter für die Vergleichshydrogele anderer Gelarchitektur und Vernetzungsgrade in **Tabelle 14** dargelegt werden [132].

Erkennbar ist eine Abnahme der Bruchdehnung ( $\epsilon_B$ ) sowohl bei konventionellen als auch semi-IPN-Hydrogelen von  $324 \pm 36\%$  (konv. 7,5 %) und  $262 \pm 105\%$  (semi-IPN 7,5 % (w/w)) nach  $104,3 \pm 33,4\%$  (konv. 30,0 % (w/w)) und  $87,6 \pm 38,0\%$  (semi-IPN, 30,0 % (w/w)) für Hydrogele mit einem Vernetzungsgrad von 58/1. Im Gegenzug

nimmt  $\sigma_m$  bei steigendem Gelgehalt von  $11,2 \pm 6,6$  kPa (konv. 7,5 % (w/w)) und  $10,6 \pm 1,9$  kPa (semi-IPN 7,5 % (w/w)) auf  $71,4 \pm 23,2$  kPa (konv. 30,0 % (w/w)) und  $66,7 \pm 7,5$  kPa zu. Die Werte des Vernetzungsgrades von 117/1 liegen mit einer Abnahme der Bruchdehnung von  $246,1 \pm 108,4$  % (konv. 7,5 % (w/w)) und  $365 \pm 120$  % (semi-IPN 7,5 % (w/w)) auf  $121,5 \pm 35,3$  % (konv. 30,0 % (w/w)) und  $117,7 \pm 17,3$  % (semi-IPN, 30,0 % (w/w)) sowie einer Zunahme der Zugfestigkeit von  $9,1 \pm 1,8$  kPa (konv. 7,5 % (w/w)) und  $18,7 \pm 2,6$  kPa (semi-IPN 7,5 % (w/w)) auf  $54,2 \pm 6,1$  kPa (konv. 30,0 % (w/w)) und  $82,7 \pm 3,2$  kPa in einem ähnlichen Bereich.



**Abbildung 31** Bruchdehnung (A), Zugfestigkeit (B) und E-Modul (C) eines semi-IPN PAAm-Hydrogels eines Vernetzungsgrades von 117/1 unterschiedlicher Gelgehalte nach ISO 527-4. Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens drei Experimenten.

Betrachtet man die E-Module, so stellt man einen Anstieg des E-Moduls in Korrelation mit der Steigerung des Gelgehaltes fest, wobei die Werte auch hier für die Vernetzungsgrade 58/1 und 117/1 und deren unterschiedliche Gelarchitekturen in gleichen Bereichen liegen (vgl. **Abbildung 31**, (C)).

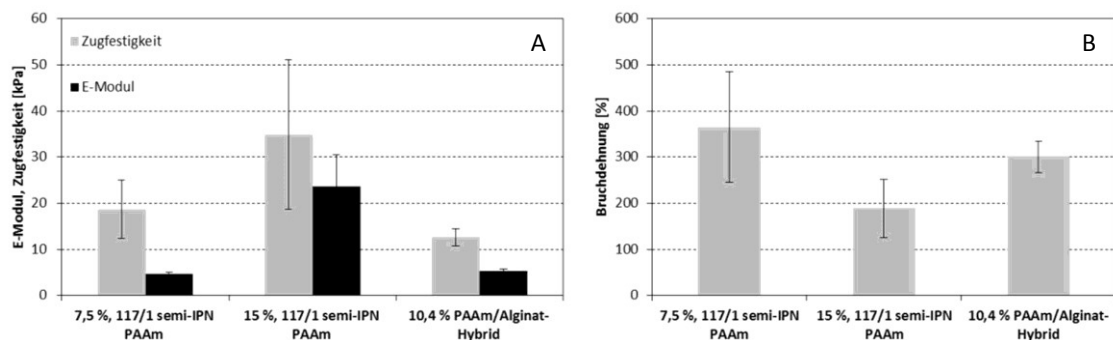
Im Zuge der Erfahrungen für die präparative Umsetzung einer Oberflächenbeschichtung, erwies sich das PAAm-Hydrogel als mechanisch nicht stabil genug und wurde daher durch ein Hybridhydrogel eines Gelgehaltes von 10,4 % (w/w) aus PAAm und Alginat ersetzt, welches nach Sun et al. [98] eine größere Dehnbarkeit und daher präparativ eine höhere Stabilität aufweisen sollte. Wie aus **Abbildung 32** (A) und **Tabelle 14** deutlich wird, weist das 10,4 %ige Hybridhydrogel bezüglich des E-Moduls wie auch der Zugfestigkeit ähnliche Werte wie ein 7,5 %iges (w/w) semi-IPN PAAm-Hydrogel (117/1) auf, während diejenigen für ein 15 %iges semi-IPN PAAm-Hydrogel (117/1) höher liegen.

Auch der Vergleich der Bruchdehnung (vgl. **Abbildung 32** (B)) zeigt mit  $365 \pm 120$  % (7,5 % (w/w), 117/1, semi-IPN-PAAm) gegenüber  $301 \pm 34$  % (PAAm/Alginat-

Hybridhydrogel) wesentlich höhere Werte als jene des 15 %igen (w/w) semi-IPN PAAm-Hydrogels (117/1) mit einer Größe von  $189 \pm 63$  %.

**Tabelle 14** Bruchdehnung, Zugfestigkeit und elastischer Modul von konventionellen und semi-IPN Hydrogelen unterschiedlicher Hydrogelgehalte, Gelarchitekturen und Vernetzungsverhältnissen von 58/1 und 117/1 [w/w] nach ISO 527-4. Dargestellt sind Werte  $\pm$  Standardabweichung von mindestens drei Experimenten.

AAm und MBAA Hydrogelgehalt [%](w/w)		58/1 konv.	58/1 semi-IPN	117/1 konv.
Bruch-dehnung, $\epsilon_B$ [%]	7,5	$324,1 \pm 37,5$	$262,2 \pm 104,7$	$246,1 \pm 108,4$
	15	$99,6 \pm 24,5$	$104,7 \pm 11,4$	$232,2 \pm 46,8$
	22,5	$148,4 \pm 5,2$	$146,1 \pm 64,8$	$140,5 \pm 46,8$
	30	$104,3 \pm 33,4$	$87,6 \pm 38,1$	$121,5 \pm 35,3$
Zugfestig-keit, $\sigma_m$ [kPa]	7,5	$11,2 \pm 6,6$	$10,6 \pm 1,9$	$9,1 \pm 1,8$
	15	$17,6 \pm 3,7$	$34,0 \pm 2,0$	$39,1 \pm 5,1$
	22,5	$57,4 \pm 1,4$	$54,4 \pm 3,12$	$42,2 \pm 5,8$
	30	$71,4 \pm 23,2$	$66,7 \pm 7,5$	$54,2 \pm 6,1$
Elastischer Modul, E [kPa]	7,5	$3,2 \pm 0,2$	$3,2 \pm 1,0$	$3,2 \pm 0,3$
	15	$22,0 \pm 0,3$	$41,0 \pm 1,4$	$21,9 \pm 2,1$
	22,5	$50,7 \pm 0,1$	$57,4 \pm 24,2$	$42,8 \pm 1,0$
	30	$86,1 \pm 5,4$	$103,2 \pm 20,5$	$64,8 \pm 1,3$



**Abbildung 32** Vergleichende Darstellung der Zugfestigkeit und des E-Moduls (A) sowie der Bruchdehnung (B) des PAAm/Alginate-Hybridhydrogels mit einem 7,5 und einem 15 %igen PAAm-Hydrogel (Vernetzungsgrad 117/1; Gelarchitektur: semi-IPN) nach ISO 527-4. Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens drei Experimenten.

## 5.2. Biokonjugation der unterschiedlichen Hydrogele

Als einer der wesentlichen Punkte an welchen die Zielvorstellung eines stimulusresponsiven Wirkstofffreisetzungssystems gekoppelt ist, steht der Einbau geeigneter Sensorstrukturen ebenso im Fokus wie die Wahl der geeigneten Hydrogelparameter.

Demzufolge stellt die erfolgreiche Integration der als stimulusresponsive Funktionen verwendeten Antigene/Antikörper-Paare eine der zentralen Herausforderungen dieser Arbeit dar.

Neben einem Polyacrylamid-System wurde als Basis aufgrund der unter **Kapitel 5.1.5.** erwähnten Herausforderung auch auf das Polyacrylamid/Alginat-Hybridhydrogel zurückgegriffen.

Das Feststellen eines erfolgreichen Einbaus der Biomoleküle erfolgte über die Inkubation des Hydrogelkörpers mit für die entsprechenden antigen- und antikörpersensitiven, FITC-markierten Antikörpern.

### 5.2.1. Biokonjugation der Polyacrylamid-Systeme mit Maus IgG/Kaninchen Anti-Maus IgG

Um die bisherigen Versuche, aufbauend auf den Arbeiten nach Miyata et al. [18], fortzuführen, wurde aufgrund der Permeationsergebnisse (vgl. **Kapitel 5.1.**) ein 15 %iges, 117/1 (AAm/MBAA), semi-IPN-Hydrogel zur Integration der Antigen/Antikörperstrukturen verwendet, da die Voraussetzung für die Bildung eines biokonjugierten Systems eine ausreichende strukturelle Flexibilität des Netzwerkes für die Biokonjugation bei einer gleichzeitig nicht zu großen Permeationsrate des Modellwirkstoffes ist. Für die Biokonjugation wurden *N*-Succinimidylacrylat (NSA) modifizierte Maus IgG sowie Kaninchen Anti-Maus IgG als Antigen/Antikörper-Crosslinker verwendet. Dies lag einerseits an der hohen Stabilität der verwendeten Antikörper und andererseits an den massiven Veränderungen, wie der Reduzierung der Schichtdicke, dem Anpassen des Crosslinkeranteils sowie des Gelgehaltes, welchen das System von Miyata et al. schon unterzogen war, um eine mögliche Implantatbeschichtung zu generieren. Die Modifizierung mit NSA war notwendig um eine erfolgreiche Integration der Antikörper in das Netzwerk zu ermöglichen.

Um den Einbau der Biomoleküle in den Hydrogelkörper sowie die Wahrung der strukturellen Integrität derselben zu belegen, erfolgte die Detektion über fluoresceinisothiocyanatmarkierte (FITC) Antikörper.

Da für eine erfolgreiche Integration der Antigen/Antikörper-Strukturen der Gelgehalt von nachrangiger Bedeutung ist, wurde der Nachweis mit 7,5 %igen (w/w), 117/1 (AAm/MBAA)-PAAm-Hydrogelen durchgeführt, um im Rahmen einer Inkubation von 2 Stunden eine ausreichende Detektion zu ermöglichen. Neben dem einfachen Nachweis der erfolgreichen Integration der Antigene und Antikörper in das Hydrogelnetzwerk konnten hier zusätzlich Schlüsse bezüglich Einflusses auf den Einbau bei Anwesenheit beider (Antigen und Antikörper) Biomoleküle bezogen werden.

Daher wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe biokonjugierte Hydrogele in drei verschiedenen Varianten getestet. Bei diesen handelte es sich um Hydrogele mit gekoppeltem Maus IgG, gekoppeltem Kaninchen Anti-Maus IgG bzw. einem System mit beiden Antikörpern: Maus IgG/Kaninchen Anti-Maus IgG. Jedes dieser Hydrogele wurde außerdem in drei verschiedenen Konzentrationen an gekoppelten Antigen/Antikörpercrosslinkern in der Hydrogelmatrix ausgeführt.

So wurde das mit Maus IgG gekoppelte Hydrogel mit Ziege Anti-Maus IgG (FITC) inkubiert. Ebenso wie auch die Kombination aus Maus IgG/Kaninchen Anti-Maus IgG. Dies diente dem Beleg einer erfolgreichen Integration von Maus IgG in das Netzwerk – sowohl ohne, als auch mit korrespondierendem Antikörper während der Synthese.

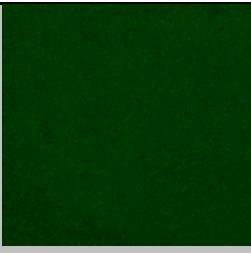
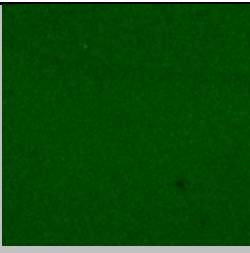
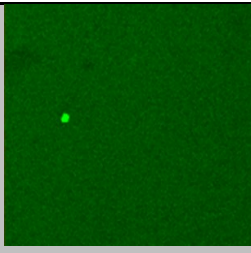

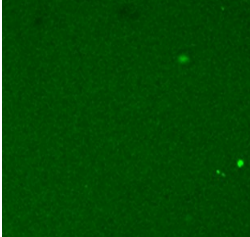
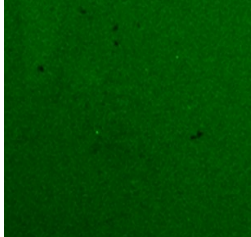
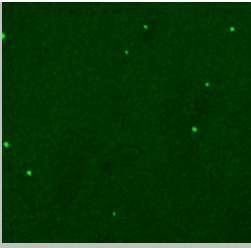
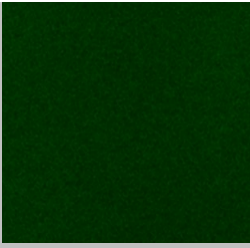
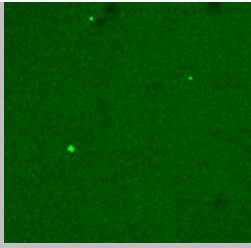
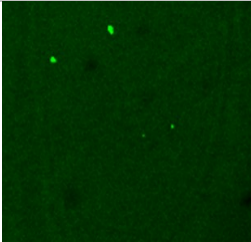
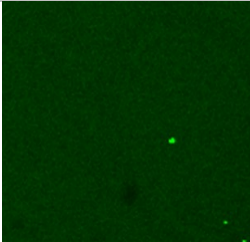
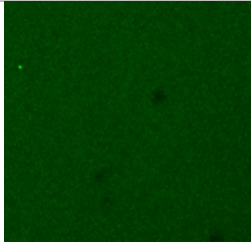
Für den Nachweis des Kaninchen Anti-Maus IgG wurde in der Variante des einzeln gekoppelten Kaninchen Anti-Maus IgG, wie auch in der Kombination aus Maus IgG/Kaninchen Anti-Maus IgG Ziege Anti-Kaninchen IgG (FITC) verwendet.

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie über den Nachweis von Maus IgG (Kaninchen Anti-Maus IgG) mittels Ziege Anti-Maus IgG (FITC) (Ziege Anti-Kaninchen IgG (FITC)) in den verschiedenen Kombinationen sowie Konzentrationen im Hydrogelkörper werden in **Tabelle 15** deutlich. Dargestellt werden die fluoreszierenden Gele der Versuchsreihen in Abhängigkeit von der verwendeten Antikörperzusammensetzung sowie der verwendeten Antikörpermenge im Hydrogel in einem definierten Bereich – der sogenannten „region of interest“ (ROI) einer Fläche von  $1450\ \mu\text{m} \times 1400\ \mu\text{m}$ . Da sich die Rückstrahlintensität in diesem definierten Bereich in Relation zum verwendeten Blindwert quantifizieren lässt, erfolgte Wiedergabe der relativen Lichtintensität zusätzlich in **Tabelle 16**.

Aus **Tabelle 15** wird ersichtlich, dass die zwei gezeigten Geltypen (mit Maus IgG, und Maus IgG/Kaninchen Anti-Maus IgG), nachgewiesen mit dem entsprechenden

fluoreszenzmarkierten Antikörper Ziege Anti-Maus IgG (FITC), für jede der drei Gelkonzentrationen eine sichtbare Fluoreszenz aufweisen. Dies gilt sowohl für den einzeln eingebrachten Antikörper (Maus IgG) sowie das kombinierte System (Maus IgG/Kaninchen Anti-Maus IgG). Erkennbar ist außerdem eine qualitative Zunahme der Fluoreszenzintensität bei steigender Antikörperkonzentration im Hydrogel mit Zunahme der eingesetzten Antigen bzw. Antigen/Antikörper-Konzentration während der Synthese, bezüglich beider Systeme.

**Tabelle 15** Fluoreszenzaufnahmen der „region of interest“ (ROI) ( $1450\ \mu\text{m} \times 1400\ \mu\text{m}$ ) von Maus IgG/Kaninchen Anti-Maus IgG biokonjugierten semi-IPN-PAAm-Hydrogelen (Geldicke: 2 mm; Gelgehalt: 7,5 %; Vernetzungsgrad: 117/1), 2 Stunden mit Ziege Anti-Maus IgG (FITC) bzw. Ziege Anti-Kaninchen IgG (FITC) inkubiert. Aufnahmen erfolgten über Fluoreszenzmikroskopie ( $\lambda_{\text{exc}}=488\ \text{nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}}=505\text{-}525\ \text{nm}$ ). Die relative Rückstrahlintensität dieser Hydrogele, bedingt über die FITC-Markierung, wurde für die Quantifizierung, wie in **Tabelle 16** dargestellt, verwendet.

AG/AK-System/ Sekundärantikörper	8 $\mu\text{g}/28,27\ \text{mm}^2$	16 $\mu\text{g}/28,27\ \text{mm}^2$	24 $\mu\text{g}/28,27\ \text{mm}^2$
Maus IgG/ Ziege Anti-Maus IgG (FITC)			
Maus IgG/ Kaninchen Anti-Maus IgG // Ziege Anti-Maus IgG (FITC)			
Kaninchen Anti-Maus IgG // Ziege Anti-Kaninchen IgG (FITC)			
Maus IgG/ Kaninchen Anti-Maus IgG // Ziege Anti-Kaninchen IgG (FITC)			

Untermauern lässt sich dies mit den Ergebnissen, welche in **Tabelle 16** dargestellt werden. So nimmt die relative Lichtintensität (0 µg Protein = 1) des Maus IgG konjugierten 7,5 %igen (w/w) PAAm-Hydrogels (semi-IPN, 117/1) bei einer Steigerung der Konzentration an Maus IgG im Hydrogelverbund von 11,26 (8 µg/28,27 mm<sup>2</sup>) auf 16,99 (24 µg/28,27 mm<sup>2</sup>) zu.

**Tabelle 16** Relative Lichtintensität (0 µg Protein = 1) einer definierten Region der Fluoreszenzaufnahmen (ROI = region of interest) der mit Maus IgG bzw. Kaninchen Anti-Maus IgG biokonjugierten semi-IPN-PAAm-Hydrogele (Dicke: 2 mm; Gelgehalt: 7,5 %; Vernetzungsgrad: 117/1), gemessen mittels Fluoreszenzmikroskopie ( $\lambda_{exc}=488$  nm;  $\lambda_{em}=505-525$  nm). Inkubation erfolgte mit FITC-markierten Sekundärantikörpern (Ziege Anti-Maus IgG/Ziege Anti-Kaninchen IgG).

AG/AK-System/ Sekundärantikörper	ROI* (8 µg/ 28,27 mm <sup>2</sup> )	ROI* (16 µg/ 28,27 mm <sup>2</sup> )	ROI* (24 µg/ 28,27 mm <sup>2</sup> )
Maus IgG// Ziege Anti-Maus (FITC)	11,26	14,90	16,99
Maus IgG/ Kaninchen Anti- Maus IgG//Ziege Anti-Maus (FITC)	11,06	15,19	16,56
Kaninchen Anti-Maus IgG// Ziege Anti-Kaninchen (FITC)	8,02	7,02	12,64
Maus IgG/ Kaninchen Anti- Maus IgG//Ziege Anti- Kaninchen (FITC)	7,79	8,13	9,84

\*Der absolute Wert der ROI lag für den Blindwert von Ziege Anti-Maus IgG bei 76,02, für Ziege Anti-Kaninchen bei 100,8

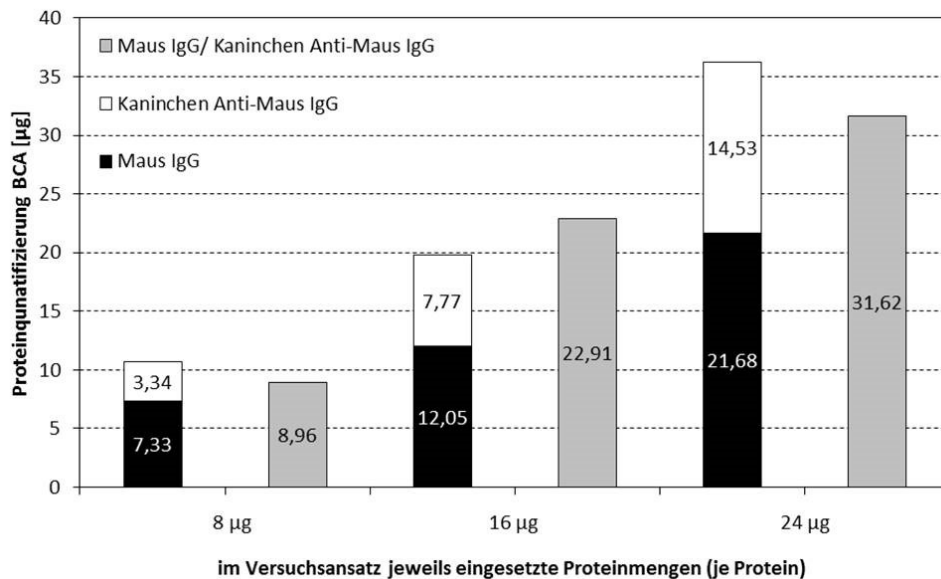
Diese Steigerung ergibt sich ebenso für Kaninchen Anti-Maus IgG gekoppelte Hydrogele. Hier steigen die Werte von 8,0 auf 12,6 an, weisen jedoch bei dem Wert von 16 µg einen niedrigeren Wert auf.

Generell lässt sich feststellen, dass die Fluoreszenzintensität der mit Ziege Anti-Kaninchen IgG gekoppelten biokonjugierten Hydrogele wesentlich geringer ausfällt als jene der mit Ziege Anti-Maus IgG inkubierten Gele.

Als weiterer Punkt lässt sich jedoch belegen, dass die Modifizierung mit einem Antigen und einem Antikörper keinen Einfluss auf den Nachweis des entsprechenden Biomoleküls mittels FITC-markierter Antikörper hat (vgl. **Tabelle 16**).

Die BCA-Messungen der biokonjugierten Hydrogele (vgl. **Abbildung 33**) weisen in dieselbe Richtung wie die Ergebnisse der Bestimmung der relativen Lichtintensität mittels Fluoreszenzmikroskopie (vgl. **Tabelle 16**). So wird bei steigender Konzentration der im Hydrogel immobilisierten Biomoleküle eine Steigerung der gemessenen Konzentration beobachtet. Dieses gilt für alle drei vermessenen Systeme.

Allerdings wird bei keinem der verwendeten Antikörperkombinationen (Maus IgG, Kaninchen Anti-Maus IgG und deren Kombination) die komplette eingesetzte Konzentration wieder gefunden.



**Abbildung 33** BCA-Messung von Maus IgG, Kaninchen Anti-Maus IgG und Maus IgG/Kaninchen Anti-Maus IgG gekoppelten semi-IPN-PAAm-Hydrogelen (Geldicke: 2 mm; Gelgehalt: 7,5 %; Vernetzungsgrad: 117/1). Aufgetragen sind einerseits die für die einzelnen Proteine erhaltenen [µg]-Werte bezogen auf die jeweils je Protein eingesetzten Mengen (Maus IgG und Kaninchen Anti-Maus IgG) als aufsummierte Einzelmessung und andererseits die Werte [µg] der direkt vermessenen Kombination beider Proteine (Maus IgG/Kaninchen Anti-Maus IgG).

Maus IgG zeigt die Werte, welche am nächsten der eingesetzten Konzentration liegen. Diese steigen von 7,3 µg (8 µg eingesetztes Protein) auf 21,7 µg (24 µg) an. Wesentlich geringer fallen die Werte für den verwendeten Antikörper Kaninchen Anti-Maus IgG aus. Hier werden 3,3 µg (8 µg) bis 14,5 µg (24 µg) wieder gefunden. Die Messung beider Proteine in Kombination ergibt wiederum wesentlich niedrigere Werte, als die eingesetzte Proteinmenge vermuten lassen würde. Die Steigerung von 9,0 µg (16 µg) auf 31,6 µg (48 µg) ist jedoch vergleichbar der Summe der einzeln quantifizierten Proteine (Maus IgG und Kaninchen Anti-Maus IgG).

Zusätzlich zu den bisher – für den Nachweis der Biokonjugation – mit 7,5 %igen (w/w), 117/1 (AAm/MBAA)-PAAm-Hydrogelen ausgeführten Versuchen, wurden diese auch mit den entsprechenden Antigenen und Antikörpern bei 15 %igen (w/w), 117/1 (AAm/MBAA)-PAAm-Hydrogelen durchgeführt. Hier konnte die Biokonjugation jedoch nicht befriedigend analysiert werden. Vermutet wurde durch die Verwendung eines FITC-markierten Anti-IgG als Detektionsantikörper eine

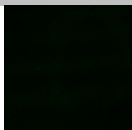
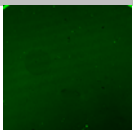
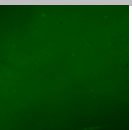
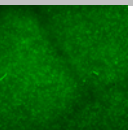
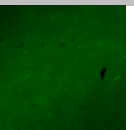
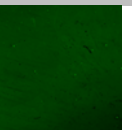

verlangsamte Diffusion in Folge einer zu geringen Maschenweite für das Biomolekül mit einer Größe von 155000 Dalton.

### 5.2.2. Biokonjugation der Polyacrylamid-Systeme mit Insulin/Anti-Insulin

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde das System im Hinblick auf die Verwendung eines neuen Crosslinker-Paares verändert. In diesem sollte das Antigen wesentlich kleiner sein als die bisher verwendeten 155000 Da des Maus IgG. Gewählt wurde ein System mit Insulin als Antigen welches die Anforderung, besser ins System zu permeieren, mit 6000 Da erfüllt. Nötig wurde dies um eine bessere Stimulierung des Freisetzungssystems zu erreichen, ohne vorher den Wirkstoff zu verlieren.

Um einen guten Einbau zu gewährleisten und den Einfluss der Modifizierung des Biomoleküls mit Acrylatresten (über eine Reaktion mit NSA) auf den Einbau in das Netzwerk bei gleichzeitiger Wahrung der strukturellen Integrität zu beurteilen, wurde eine Versuchsreihe mit dem gegenüber den bisher verwendeten IgG's wesentlich kleineren Insulin durchgeführt. Wie aus **Tabelle 17** ersichtlich, wurde das Insulin in einem NSA/Insulin-Verhältnis von 0, 5, 10, 15, 20 und 30 getestet.

**Tabelle 17** Fluoreszenzmikroskopische Bilder ( $\lambda_{exc}=488\text{ nm}$ ;  $\lambda_{em}=505\text{-}525\text{ nm}$ ) von mit Anti-Insulin + Proinsulin IgG (FITC) inkubierten semi-IPN-PAAm-Hydrogelen (Geldicke: 2 mm; Gelgehalt: 7,5 %; Vernetzungsgrad: 117/1), in welche unterschiedlich stark NSA-modifiziertes Insulin integriert wurde. Neben dem Blindwert (Hydrogel ohne Insulin), werden mehrere Modifizierungsverhältnisse zwischen 0 und 30 (NSA/Insulin) dargestellt.

Protein: Insulin						
Blindwert	NSA/Insulin 0	NSA/Insulin 5	NSA/Insulin 10	NSA/Insulin 15	NSA/Insulin 20	NSA/Insulin 30
						

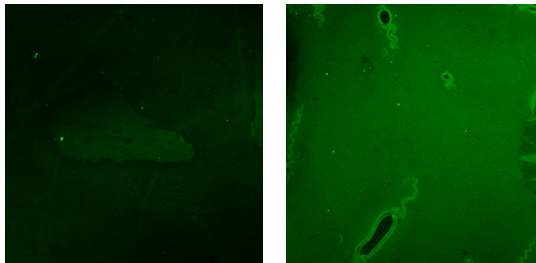
Um den Einfluss der NSA-Kopplung auf die Menge an intaktem und damit detektierbarem Insulin im Hydrogelverbund zu untersuchen wurden die Hydrogele mit FITC-markiertem Anti-Insulin + Proinsulin inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zu erkennen ist neben dem nicht fluoreszierenden Blindwert eine Zunahme der Fluoreszenz bis zu einem NSA/Insulin-Verhältnis von 10. Jedoch tritt bei diesem Verhältnis keine gleichmäßige Fluoreszenz auf, sondern es treten intensivere Bereiche, wie eine Art flockenartige Struktur, auf. Ab dem Verhältnis 15 tritt wieder eine gleichmäßige Fluoreszenz auf welche sich bis zu einem NSA/Insulin-Verhältnis von 30 wesentlich abschwächt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein

Verhältnis von 5-10 für die Modifizierung von Insulin durch NSA angestrebt. Interessant ist, dass für ein Verhältnis von 0 schon eine Fluoreszenz vorhanden ist.

### 5.2.3. Biokonjugation der Polyacrylamid/Alginat-Hybridhydrogele

Dass eine Biokonjugation mit den verwendeten Materialien auch im Falle der PAAm/Alginat-Hybridhydrogele erfolgreich umgesetzt werden kann, welche im weiteren Verlauf aufgrund der höheren mechanischen Belastbarkeit als Hydrogelmatrix für die Implantatbeschichtung Verwendung fanden, wurde mittels einer weiteren Versuchsreihe getestet.

Dargestellt sind in **Abbildung 34** ein nicht biokonjugiertes und ein mit Insulin und Anti-Insulin modifiziertes Hybridhydrogel. Dieses zeigt nach einer Inkubation mit einer 0,1 molaren Insulin-FITC Lösung in DPBS deutliche Fluoreszenz.



**Abbildung 34** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Insulin(FITC) inkubierten 10,4 %igen Polyacrylamid/Alginat-Hybridhydrogelen. Links dargestellt das Referenzhydrogel mit gekoppelten Antigen/Antikörperstrukturen (Insulin/Anti-Insulin), rechts dargestellt ein 10,4 %igen Polyacrylamid/Alginat-Hybridhydrogel mit Insulin/Anti-Insulin, ebenfalls inkubiert mit Insulin-(FITC).

### 5.3. Oberflächenmodifikation

Für die Generierung eines implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems liegt das Augenmerk neben der Wahl des Hydrogels und der Biokonjugation auf der Ankopplung der Hydrogele an eine Substratoberfläche als weiterem Punkt.

Hierfür wurde erst einmal die Grundlage für eine Ankopplung des Hydrogels gelegt. Die Funktionalisierung über Sauerstoffplasmaaktivierung stellt hierbei eine leicht realisierbare Methode zur Generierung von Hydroxylgruppen an der Substratoberfläche dar, welche so reaktiv sind, dass eine weitere Oberflächenmodifizierung ermöglicht wird. Im Folgenden wurde die Etablierung von endständigen Vinylgruppen über die Reaktion mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) und NSA einerseits und 3-Methacrylpropyltrimethoxysilan (MPTMS) andererseits vollzogen (**Abbildung 22**). Hieran sollte über radikalische Polymerisation

die direkte Kopplung von Acrylamidfaser an der Oberfläche ermöglicht werden, an welchen in einem folgenden Schritt das Hydrogelnetzwerk etabliert werden sollte (**Abbildung 23**). Dieses wurde einerseits über das Pipettierverfahren (PAAm-Hydrogele), andererseits durch das Aufbringen eines vorpräparierten Hydrogelkörpers (PAAm und PAAm/Alginat-Hybridhydrogele) über das Kleben mittels AAm/MBAA durchgeführt.

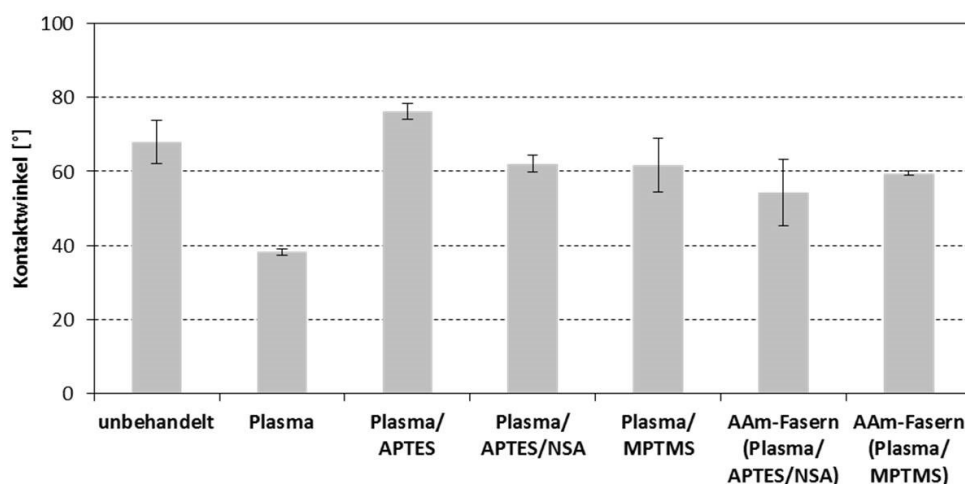
Für den Beleg einer erfolgreichen Umsetzung der Oberflächenmodifizierung wurden mehrere Methoden verwendet. Neben der Messung der Oberflächenhydrophilie mittels Kontaktwinkelbestimmung wurde die Oberflächenmorphologie über Rasterelektronenmikroskopie und Lichtmikroskopie sowie die Schichtdicke über konfokale Lasermikroskopie bestimmt.

Um außerdem die Haftfestigkeit des Hydrogels auf der Oberfläche zu untersuchen, wurden außerdem die Abschälkräfte ( $\text{N/mm}^2$ ) unterschiedlicher auf einem Glassubstrat etablierter Hydrogelbeschichtungen bestimmt.

Wie die Haftfestigkeitsuntersuchungen wurde ein Großteil der Untersuchungen auf Glassubstraten durchgeführt. Im Hinblick auf die Generierung eines stimulusresponsiven, implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems wurden die Untersuchungen teilweise jedoch auch auf 9 mm ( $\varnothing$ )-CrNi-Edelstahlsubstraten mit Kavitäten für den Wirkstoff durchgeführt um Freisetzungen zu ermöglichen.

### **5.3.1. Untersuchung der Oberflächenhydrophilie**

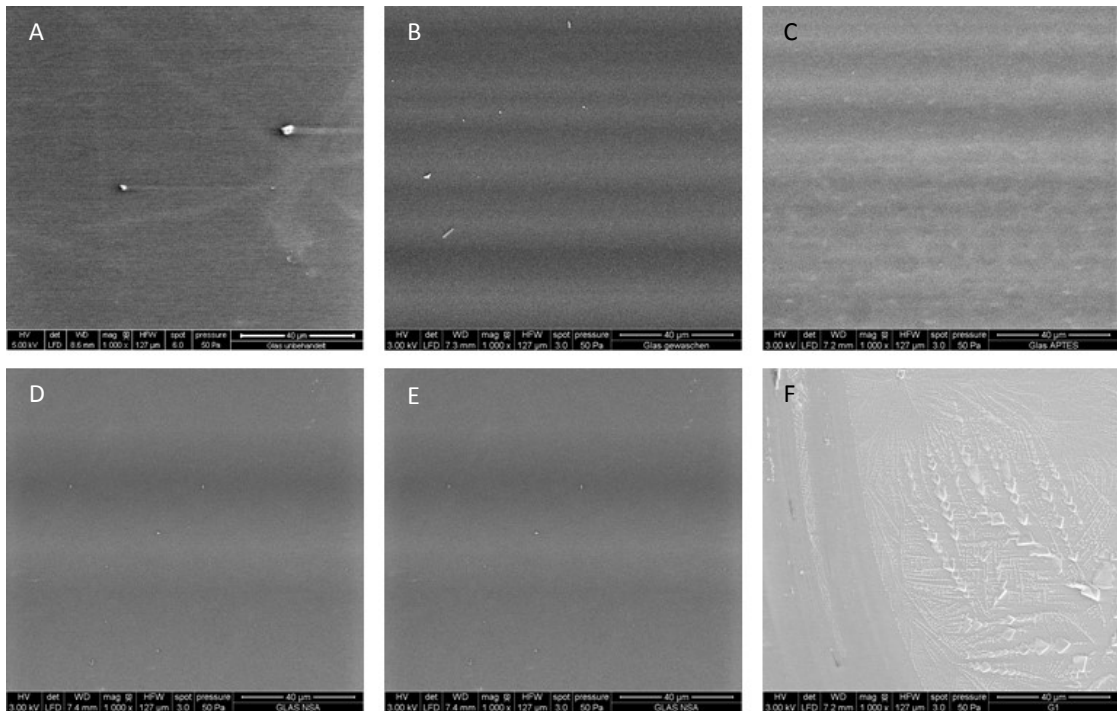
Die Änderung des Kontaktwinkels (vgl. **Kapitel 4.6.2**) stellt eine schnelle Variante des Nachweises der Oberflächenmodifikation dar. Mögliche chemische Änderungen der Oberfläche können so unkompliziert belegt werden. Wie aus **Abbildung 35** deutlich wird, nimmt der Kontaktwinkel der Oberfläche bei Plasmaaktivierung mit Sauerstoffplasma von  $67,9 \pm 8,7^\circ$  auf  $38,3 \pm 2,5^\circ$  ab. Bei der Silanisierung mittels APTES und MPTMS ist hingegen der gegenteilige Effekt zu beobachten. Der Kontaktwinkel nimmt wieder auf  $76,3 \pm 14,6^\circ$  (APTES) beziehungsweise  $61,7 \pm 8,6^\circ$  (MPTMS) zu. Modifiziert man die Aminogruppe des APTES zusätzlich mit NSA, so sinkt hier der Kontaktwinkel wieder auf  $62,1 \pm 4,8^\circ$  ab. Ein Trend der sich bei der Oberflächenmodifizierung mit AAm-Fasern auf  $54,3 \pm 4,6^\circ$  fortsetzt. Kontaktwinkel für Oberflächen mit einer Polyacrylamidbeschichtung konnten aufgrund der Quellung der Hydrogelmatrix nicht bestimmt werden.



**Abbildung 35** Kontaktwinkel von Wasser, bestimmt nach der Methode des liegenden Tropfens, unterschiedlich behandelter Glassubstrate. Neben dem unbehandelten Vergleichssubstrat sind die Kontaktwinkel von plasmaaktivierten, silanisierten (Plasma/APTES, Plasma/APTES/NSA und Plasma/MPTMS) und mit AAm-Fasern versehenen Proben (AAm-Fasern gekoppelt an Plasma/APTES/NSA- und Plasma/MPTMS-Oberflächen) dargestellt. Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens fünf Experimenten.

### 5.3.2. Oberflächenmorphologische Untersuchung

Zusätzlich zu den Kontaktwinkelmessungen der Oberflächen wurde über rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen die Veränderung der Oberflächenmorphologie verfolgt. In **Abbildung 36** dargestellt, erkennt man bei einem unbehandelten Glassubstrat (A) eine glatte Oberfläche mit einigen Verunreinigungen. Nach der Aktivierung durch ein O<sub>2</sub>-Plasma sind keine Änderungen erkennbar (B). Anders jedoch nach der Behandlung mit APTES. Hier sind kleine weiße Abscheidungen auf der Oberfläche zu erkennen (C), welche nach der weiteren Modifizierung der oberflächenständigen Aminogruppen mittels NSA wieder verschwunden sind (D). Die ebenso mit endständigen Vinylgruppen versehene MPTMS-funktionalisierte Oberfläche stellt sich wie die APTES/NSA-modifizierte Oberfläche dar (E). Unterschiede sind hier nicht auszumachen. Im Laufe der weiteren Modifizierung mit Acrylamid bilden sich deutlich erkennbare Strukturen an der Oberfläche aus. Das angeritzte Substrat (F, Ritzung in der linken Bildhälfte von oben nach unten verlaufend) lässt klare Unterschiede zur glatten Glasoberfläche erkennen, während der Rest der Oberfläche sich heller und rauer darstellt.



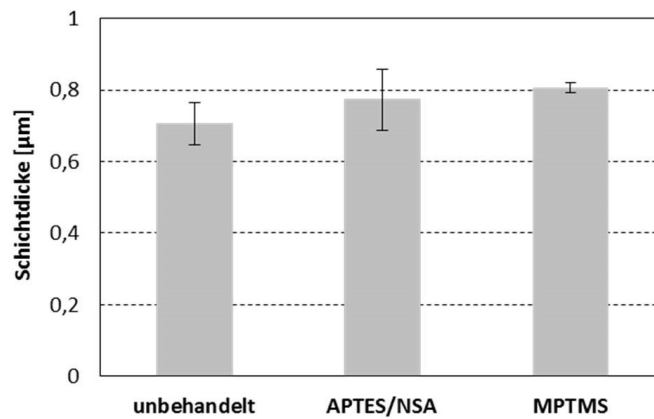
**Abbildung 36** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (1000x) zur Darstellung der oberflächenmorphologischen Veränderungen im Verlauf der Präparation: Unbehandeltes Glassubstrat (A), O<sub>2</sub>-Plasma aktiviertes Substrat (B), APTES (C) und APTES/NSA modifiziertes Substrat (D), MPTMS gekoppelte Oberfläche (E) sowie mit Polyacrylamid-Fasern versehene Oberfläche (F).

### 5.3.3. Schichtdickenbestimmung

Im Rahmen dieses Kapitels werden die Hydrogelbeschichtungen, welche auf die Glassubstrate beziehungsweise die Edelstahlsubstrate über chemische Kopplung aufgebracht wurden, bezüglich der Schichtdickenänderung betrachtet. Die Hydrogele wurden, nachdem die Oberflächenmodifikation durchgeführt worden war, entweder über das Pipettierverfahren aufgetragen, oder über Klebung vorpräparierter Hydrogele. Hierfür wurden, wie in der Einleitung des Kapitels beschrieben, zuerst Polyacrylamidanker auf die APTES/NSA und MPTMS-modifizierten Oberflächen aufgebracht.

#### 5.3.3.1. Schichtdickenbestimmung der generierten Polyacrylamid-Anker

Nach der Etablierung von endständigen Vinylgruppen auf den Substratoberflächen (vgl. **Kapitel 4.3, Abbildung 22**) erfolgte die Synthese von Polyacrylamidfäden an denselben (**Abbildung 23**). Die direkt an die Vinylgruppen polymerisierten Fäden erreichen sowohl bei unbehandelten Glassubstraten als auch APTES/NSA und MPTMS modifizierten Oberflächen Schichtdicken von etwa 0,75 µm (vgl. **Abbildung 37**).

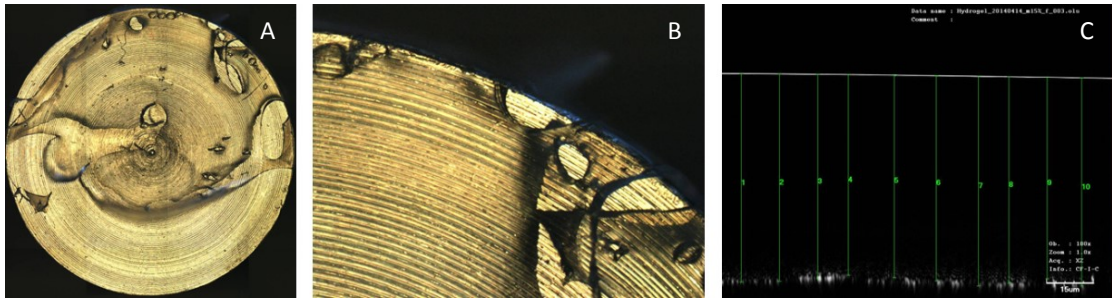


**Abbildung 37** Schichtdicke der aufgetragenen Polyacrylamidfasern auf unbehandelten Glassubstraten, auf Glasprobenkörpern mit APTES/NSA- sowie mit MPTMS-Modifizierung. Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens 10 Experimenten.

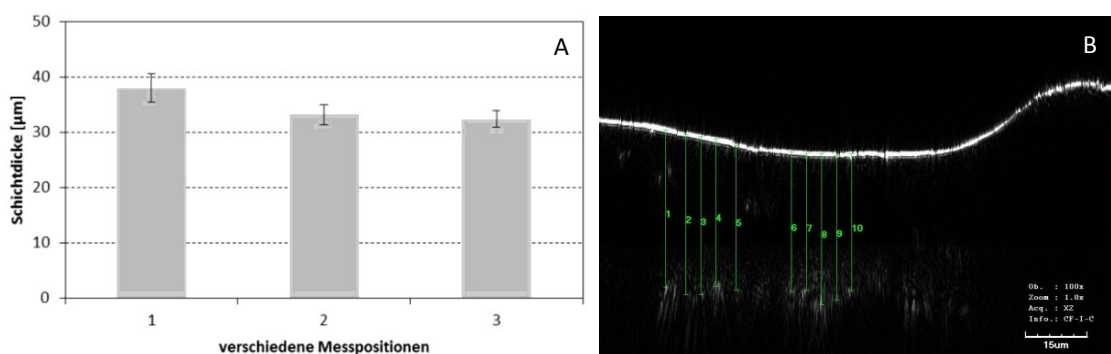
#### 5.3.3.2. Schichtdickenbestimmung von Hydrogelbeschichtungen, hergestellt über das Pipettierverfahren

Direkt im Anschluss an das Aufbringen der Polyacrylamidfasern auf die Plasma/MPTMS-modifizierten Oberflächen wurde über das Pipettierverfahren einerseits, und über das Aufkleben einer vorpräparierten Hydrogelbeschichtung – auf welches zu einem späteren Zeitpunkt eingegangen wird – andererseits, eine Beschichtung auf der Oberfläche etabliert.

Nachdem die Hydrogelbeschichtungen, welche wie in **Kapitel 4.3.3** beschrieben aufgebracht wurden, von den Glasabdeckungen befreit worden waren, traten, wie aus **Abbildung 38, A und B**, ersichtlich wird, starke Deformationen und Hydrogelabrisse auf, auch wenn teilweise noch intakte Bereiche vorlagen welche eine homogene Schichtdicke aufwiesen (vgl. **Abbildung 38, C**). Dennoch vollzogene Messungen wiesen, so wie in **Abbildung 39 (A und B)** erkennbar, Schwankungen bezüglich der Schichtdicke der Hydrogelbeschichtung auf. Diese lagen schon bei nahe beieinanderstehenden Messpunkten bei mehreren  $\mu\text{m}$ , wie in **Abbildung 39, (A)** dargestellt. So schwanken hier die Werte zwischen  $32,4 \pm 1,5 \mu\text{m}$  und  $38,0 \pm 2,6 \mu\text{m}$  im gequollenen Zustand (PAAm-Hydrogel, 15% (w/w), 117/1 (AAm/MBAA)). Zusätzlich treten hier auch, wie aus **Abbildung 38 (A), (B)** deutlich wird, komplette Hydrogelabrisse im Randbereich der Beschichtung auf.



**Abbildung 38** Übersichtsdarstellung (A) sowie Detailaufnahme (B) der pipettierten Geloberfläche einer gequollenen PAAm-Hydrogel-Beschichtung (Gelgehalt: 15 % (w/w), Vernetzungsgrad: 117/1) mittels Lichtmikroskopie. Schichtdickenmessung eines Messpunktes derselben Probe mittels konfokaler Lasermikroskopie (C).

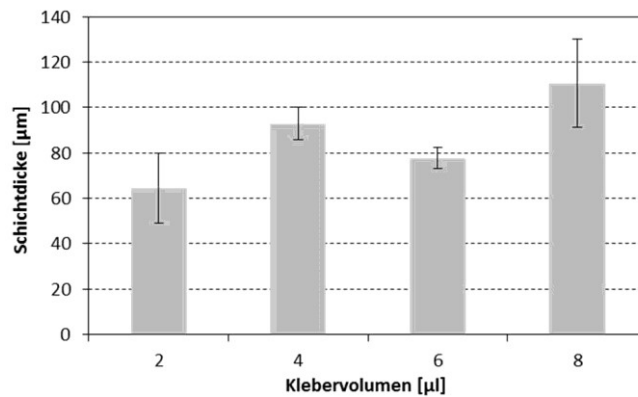


**Abbildung 39** Schichtdickenmessung (A) einer gequollenen PAAm-Hydrogel-Beschichtung (Gelgehalt: 15 % (w/w), Vernetzungsgrad: 117/1) von pipettierten Hydrogelen an drei verschiedenen Messpunkten (1,2,3). Balken geben den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens 10 Messungen je Messpunkt wieder. Schichtdickenmessung eines Messpunktes derselben Probe mittels konfokaler Lasermikroskopie (C).

### 5.3.3.3. Bestimmung des Klebervolumeneinflusses auf die Schichtdicke der durch Klebung präparierten Hydrogelbeschichtung

Für die Schichtdicke der Hydrogelbeschichtung eines implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems spielen neben den für die Vorpräparation der Hydrogele verwendeten Volumina auch die verwendeten Volumina des AAm/MBAA-haltigen Haftvermittlers eine Rolle, da dieser den Raum zwischen Substrat und Beschichtung ausfüllt und über seine eigene Quellung die Schichtdicke maßgeblich beeinflussen kann. Hierfür wurden die vorpräparierten Hydrogele (PAAm/Alginate-Hybride) mittels unterschiedlicher Haftvermittler-volumina von 2 µl, 4 µl, 6 µl und 8 µl auf modifizierten Edelstahlsubstraten von 9 mm Durchmesser (vgl. **Kapitel 4.4.2**) etabliert. Die Hydrogelbeschichtungen wurden folgend Hinblick auf die Veränderung der Schichtdicke bezüglich der unterschiedlichen Haftvermittlervolumina (vgl. **Kapitel 5.3.3**) im gequollenen Zustand getestet. Im Trend lässt sich eine

Zunahme der Schichtdicke im gequollenen Zustand von  $64,3 \pm 31,0 \mu\text{m}$  auf  $110,7 \pm 38,8 \mu\text{m}$  beobachten (vgl. **Abbildung 40**).

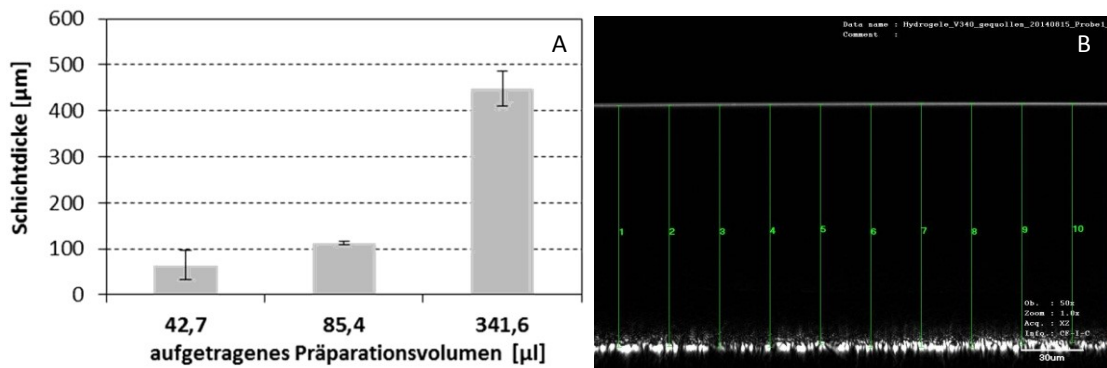


**Abbildung 40** Schichtdicke hydrogelpräparierter Edelstahlsubstrate im gequollenen Zustand für vorpräparierte PAAm/Alginat-Hybridhydrogele mit  $42,7 \mu\text{l}$  Polymerlösung/ $1440 \text{ mm}^2$ , aufgebracht mit unterschiedlichen Klebervolumina. Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens fünf Experimenten.

#### 5.3.3.4. Bestimmung des Volumeneinflusses im Rahmen der Vorpräparation der Hydrogele auf die Schichtdicke der Hydrogelbeschichtung

Die PAAm- und PAAm/Alginat-Hybrid-Hydrogele wurden mit unterschiedlichen Volumina auf Trägern einer Fläche von  $1440 \text{ mm}^2$  vorpräpariert. Aufgrund der Tatsache, dass PAAm-Hydrogele mechanisch zu instabil für die Handhabung bei geringen Schichtdicken waren, wurden ab hier vorzugsweise PAAm/Alginat-Hybridhydrogele verwendet.

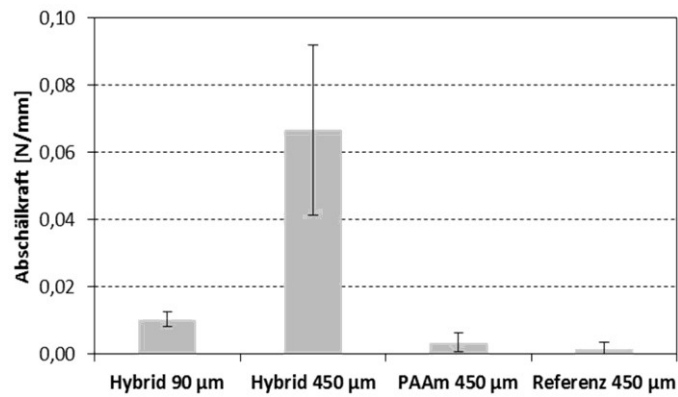
Für die Vorpräparation der Hydrogele im Rahmen der Bestimmung des Volumeneinflusses auf die Schichtdicke der Hydrogelbeschichtung wurden Volumina von  $42,7$  bis  $341,6 \mu\text{l}$  verwendet. Die Untersuchungen der mittels  $2 \mu\text{l}$  eines Haftvermittlers auf  $9 \text{ mm}$  ( $\varnothing$ )-CrNi-Edelstahlsubstrate aufgeklebten Hydrogele weisen im gequollenen Zustand mit zunehmender Steigerung des bei der Vorpräparation verwendeten Volumens von  $42,7$  auf  $341,6 \mu\text{l}$  eine Zunahme der Schichtdicke von  $64,3 \pm 31,0 \mu\text{m}$  auf  $448,7 \pm 38,4 \mu\text{m}$  auf (vgl. **Abbildung 41, (A)**). Die Schichten erscheinen, über die Fläche gesehen, homogen (vgl. Messpunkt der Probe: **Abbildung 41, B**).



**Abbildung 41** Schichtdicke der mit einem Klebervolumen (AAM/MBAA) von 2 µl/64 mm<sup>2</sup> auf 9 mm (ø)-CrNi-Edelstahlsubstraten aufgetragenen Hydrogelbeschichtung aus vorpräparierten Hydrogelen (PAAm/Alginat-Hybridhydrogel, 42,7-341,6 µl/1440 mm<sup>2</sup>) im gequollenen Zustand (A). (Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung von mindestens fünf Experimenten) Exemplarische Darstellung eines Messpunktes über CLSM für eine Probe mit 341,6 µl/1440 mm (B).

### 5.3.4. Bestimmung der Abschälkraft der aufgeklebten Hydrogelbeschichtungen

Neben der Integrität und der Schichtdicke der Hydrogelbeschichtung stellt die Haftung derselben einen wesentlichen Faktor bezüglich der Generierung eines implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems dar. Daher wurden im Hinblick auf die Testung einer erfolgreichen Verankerung der Hydrogele auf der Oberfläche, wie in **Kapitel 4.3** beschrieben, auch Haftfestigkeitsuntersuchungen (vgl. **Kapitel 4.6.4**) vorgenommen. Hierbei wurden, wie schon erwähnt, aus Gründen der mechanischen Stabilität vorwiegend PAAm/Alginat-Hybridhydrogele in verschiedenen Schichtdicken (vgl. **Kapitel 4.3.3**, **Kapitel 4.6.3**,) verwendet. Wie in **Abbildung 42** dargestellt zeigen, im Vergleich zu einer nicht über Haftvermittler aufgetragenen Referenz (PAAm/Alginat-Hybridhydrogel, aufgelegt) ( $0,002 \pm 0,002$  N/mm) sowie zusätzlich getesteter PAAm-Hydrogele (Gelgehalt: 15 % (w/w); Vernetzungsgrad: 117/1) einer Schichtdicke von 450 µm ( $0,005 \pm 0,002$  N/mm), die PAAm/Alginat-Hybridhydrogele einer Schichtdicke von 90 µm als auch jene einer Schichtdicke von 450 µm wesentlich höhere Werte für die Abschälkraft. Da die Referenzhydrogele für alle Proben durchschnittlich Werte unter 0,02 N aufwiesen, wird in dem Diagramm nur die Referenz eines Hybridhydrogels mit hoher Schichtdicke in DPBS repräsentativ dargestellt.



**Abbildung 42** Abschälkraft (N/mm) verschiedener mit Haftvermittler aufgetragenen PAAm/Alginat-Hybrid-Hydrogele (vgl. **Kapitel 4.3.3.3**) ohne den Zusatz von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sowie einem aufgeklebten PAAm-Hydrogel einer Schichtdicke von 450 µm und einer Referenz (aufgelegtes PAAm/Alginat-Hybridhydrogel einer Dicke von 450 µm) zum Vergleich.

Um einen möglichen Einfluss auf die Haftung durch die Bildung sogenannter „egg-box“-Strukturen [98] innerhalb des Hybridhydrogelverbundes infolge einer möglichen Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu untersuchen, wurden die Haftfestigkeitsuntersuchungen sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durchgeführt (vgl. **Tabelle 18**).

**Tabelle 18** Abschälkraft (N/mm) der mit Haftvermittler aufgetragenen PAAm/Alginat-Hybrid-Hydrogele unterschiedlicher Schichtdicke in An- und Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (vgl. **Kapitel 4.6.4**).

Hydrogelvariante Schichtdicke [µm]	Abschälkraft [N/mm] mit $\text{CaCl}_2$	Abschälkraft [N/mm] ohne $\text{CaCl}_2$
PAAm/Alginat-Hybridhydrogele 90 µm	0,010 ± 0,001	0,015 ± 0,002
PAAm/Alginat-Hybridhydrogele 450 µm	0,050 ± 0,026	0,067 ± 0,025

Hierbei weisen sowohl die Hydrogele einer Schichtdicke von 90 µm mit  $0,010 \pm 0,001$  N/mm (mit  $\text{CaCl}_2$ ) und  $0,015 \pm 0,002$  N/mm (ohne  $\text{CaCl}_2$ ) als auch diejenigen von 450 µm mit  $0,050 \pm 0,026$  N/mm (mit  $\text{CaCl}_2$ ) und  $0,067 \pm 0,025$  N/mm (ohne  $\text{CaCl}_2$ ) gleiche Werte auf.

#### 5.4. Stimulusinduzierte Freisetzung

Der letzte Meilenstein auf dem Weg zu einem stimulusresponsiven implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystem besteht in der Testung der stimulusresponsiven Funktion im nicht assoziierten Modus.

Hierbei wurden die gesammelten Erkenntnisse aus den **Kapiteln 5.1.** und **5.2.** auf die Testung eines stimulusresponsiven Hydrogels angewendet und dieses in der Folge als

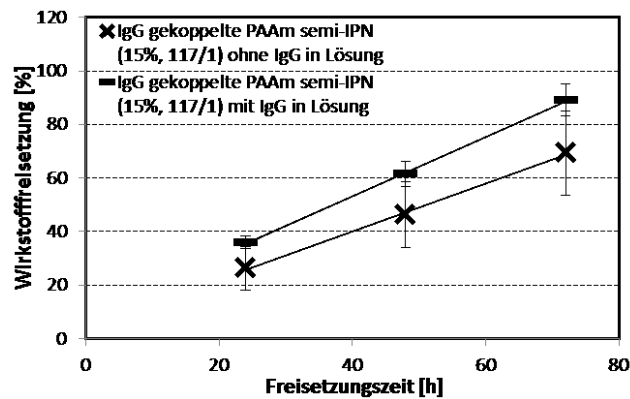
abschließender Schritt auf einem Modellsubstrat aufgebracht, um die Funktionalität des stimulusresponsiven implantatassoziierten Wirkstoff-freisetzungssystems zu testen. Hierfür wurde zuerst ein Maus IgG/Kaninchen Anti Maus IgG gekoppeltes PAAm-Hydrogel mit einem Gelgehalt von 15 % (w/w) und einem Vernetzungsgrad von 117/1 getestet. Aufgrund der Erkenntnisse bezüglich der stimulusresponsiven Funktion dieses Hydrogels (vgl. **Kapitel 5.4.1.**) sowie der unter **Kapitel 5.3.3.** angedeuteten Probleme hinsichtlich der mechanischen Stabilität hinsichtlich der Generierung eines implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems wurde für den Aufbau desselben auf ein PAAm/Alginat-Hybridhydrogel (Gelgehalt: 10,4 % (w/w); Insulin/Anti-Insulin als stimulusresponsive Funktion) zurückgegriffen und dieses vorher als stimulusresponsives Hydrogel getestet.

#### **5.4.1. Testung der stimulusinduzierten Wirkstofffreisetzung durch biokonjugierte Hydrogele**

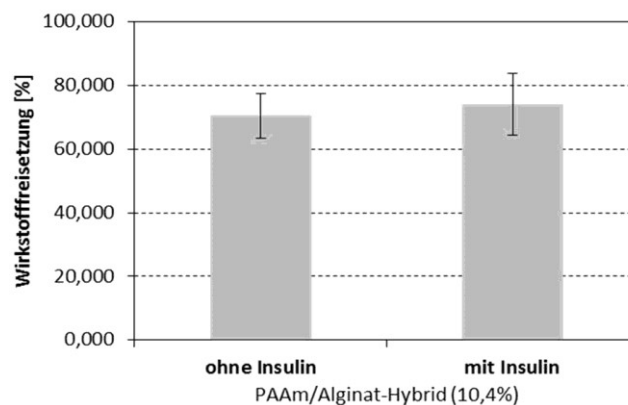
Im Hinblick auf die Generierung eines stimulusresponsiven implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems wurden biokonjugierte PAAm- und PAAm/Alginat-Hybrid-Hydrogele Freisetzungsversuchen sowohl in An- als auch in Abwesenheit des stimulierenden Biomoleküls unterzogen. Hierfür wurde für die PAAm-Matrix, wie unter **Kapitel 5.2.1.** beschrieben, ein Hydrogel mit einem Gelgehalt von 15 % (w/w) und einem Vernetzungsgrad von 117/1 getestet. Verwendet wurde als Modellwirkstoff BSA, welcher mittels BCA unter Berücksichtigung der eingesetzten Stimuluskonzentration vermessen wurde.

Bezüglich der Freisetzung von BSA durch stimulusresponsive semi-IPN PAAm-Hydrogele (Gelgehalt 15 % (w/w); Vernetzungsgrad: 117/1; Maus IgG/Kaninchen Anti Maus IgG als stimulusresponsive Funktion) wird eine leichte Zunahme der Freisetzungsrates beobachtet (vgl. **Abbildung 43**). So nimmt die Steigung von  $\Delta y/\Delta x = 0,90$  auf 1,11 zu, wodurch sich am Ende der Freisetzung in Anwesenheit des Stimulus – gegenüber der Freisetzung in Abwesenheit des Stimulus – ein von  $69,3 \pm 15,7$  % auf  $89,1 \pm 5,9$  % gesteigener Wert der Freisetzung ergibt.

Im Falle der Insulin/Anti-Insulin gekoppelten PAAm/Alginat-Hybridhydrogele sind hingegen kaum Unterschiede bei der Freisetzung zu erkennen. Die Werte liegen hier fast identisch bei  $70,5 \pm 7,1$  % (in Abwesenheit des Insulins als Stimulus) und  $74,1 \pm 9,6$  % (in Anwesenheit des Insulins) (vgl. **Abbildung 44**).



**Abbildung 43** Wirkstofffreisetzung über 72 Stunden von BSA durch IgG gekoppelte PAAm-Hydrogele (Gelgehalt: 15% (w/w); Vernetzungsgrad: 117/1; mit Maus IgG/Kaninchen Anti Maus IgG als stimulusresponsive Funktion) in Ab- und Anwesenheit von Maus IgG im Medium im Vergleich (Punkte zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von vier Experimenten).



**Abbildung 44** Permeation von BSA-FITC aus einem 10,4%igen (w/w) Insulin und Anti-Insulin gekoppelten PAAm/Alginate-Hybridhydrogel, in Anwesenheit und Abwesenheit des Stimulus (Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens 10 Experimenten).

#### 5.4.2. Stimulusinduzierte in-vitro Wirkstofffreisetzung durch eine implantat-assoziierte, biokonjugierte Hydrogelbeschichtung

Die Freisetzung aus implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystemen erfolgte – zur Simulation von Implantaten – aus medizinischen CrNi-Edelstahlsubstraten von 9 mm Durchmesser. Diese wurden wie unter **Kapitel 4.4** beschrieben präpariert. Trotz der Ergebnisse der vorhergehenden Studien (vgl. **Kapitel 5.4.1**) wurde statt des Maus IgG/Kaninchen Anti-Maus IgG-gekoppelten PAAm-Hydrogels auf ein PAAm/Alginate-Hybridhydrogel (Gelgehalt: 10,4 % (w/w); Insulin/Anti-Insulin als stimulusresponsive Funktion) zurückgegriffen. Begründen lässt sich dies mit den, für das biokonjugierte PAAm-Hydrogel, ebenfalls geringen Unterschieden, für welche jedoch aufgrund der wesentlich geringeren Schichtdicke ein noch geringerer Unterschied in der Freisetzung erwartet wurde, wie auch der Problematik der

mechanischen Stabilität der PAAm-Hydrogele in diesem Schichtdickenbereich während der Präparation. Hiernach wurden Präparate in 1500  $\mu$ l DPBS-Puffer überführt, welcher zum Teil Insulin enthielt. Wie im Falle der Freisetzung aus einfachen biokonjugierten Hydrogelkörpern erfolgte aufgrund des simultanen Auftretens von Stimulus- und Wirkstoffprotein die Quantifizierung mittels BSA-FITC über Fluoreszenzspektroskopie. In **Abbildung 45** ist eine solche Freisetzung zum Zeitpunkt der Probenentnahme  $t = 1$  Stunde dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die gelbliche Färbung des BSA-FITC in dem DPBS-Puffer.

Während Probe 1 in diesem Fall kein Hydrogelcover beinhaltet, sind die Proben 2 und 3 mit einem PAAm/Alginate-Hybridhydrogel ohne Biokonjugation versehen. Die Proben 4-7 wiederum beinhalteten in der Hydrogelbeschichtung Insulin/Anti-Insulin als stimulusresponsive Funktionen. Hierbei wurde den Proben 4 und 5 kein Insulin als Stimulus zugesetzt, während die Proben 6 und 7 Insulin ( $c = 0,1$  mg/ml) zugesetzt bekamen. Freisetzungszeitraum waren in dieser Studie 48 Stunden.

Zu erkennen ist auf dem Bild eine geringere Färbung der Proben 5-7. Dies korreliert mit einer, vor allem bei den Proben 6 und 7 ausgeprägten, starken Verfärbung im Bereich der zentralen, wirkstoffgefüllten Kavität. Ein Verhalten, welches bei den anderen Proben in dem Maße nicht auftritt. Hier tritt das BSA-FITC eher über den gesamten Metallkorpus verlaufend auf.



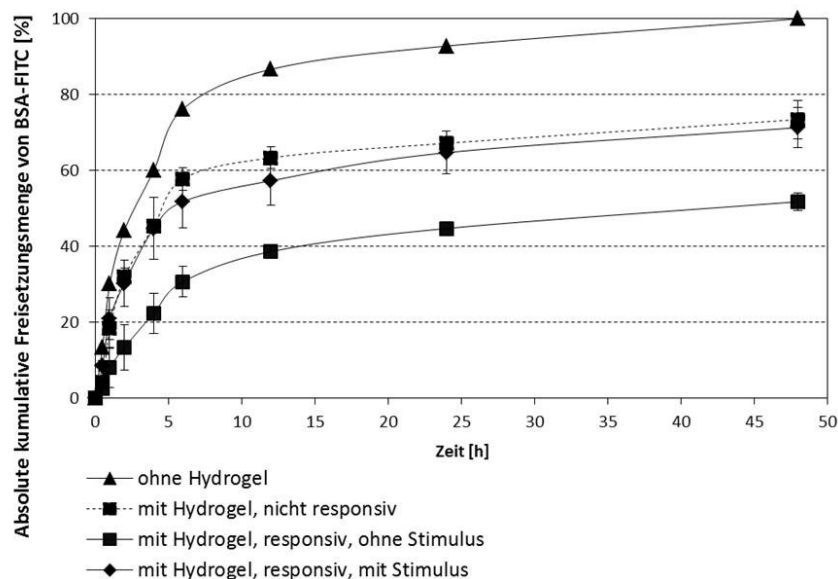
**Abbildung 45** Fotografische Aufnahme der in-vitro Freisetzung des BSA(FITC) aus mit unterschiedlichen Hybridhydrogelbeschichtungen versehenen CrNi-Edelstahlsubstraten von 9 mm Durchmesser zum Zeitpunkt  $t = 1$  Stunde. Probe 1: nicht hydrogelassoziertes Wirkstofffreisetzungssystem (WFS); 2-3: nicht stimulusresponsives hybridhydrogelassoziertes WFS; 4-5: stimulusresponsives hybridhydrogelassoziertes WFS ohne Stimulus; 6-7: stimulusresponsives hybridhydrogelassoziertes WFS mit Stimulus.

Im Hinblick auf die Freisetzung ergibt sich für die Unterschiede bezüglich der BSA-Freisetzung eine nicht ganz so starke Abweichung wie zwischen den Proben 1-5 und

6-7 in **Abbildung 45**. Anders als in den bisherigen Freisetzungsgrafiken wird diese hier nicht nur als kumulative Freisetzung über 48 Stunden mittels eines Balkendiagramm dargestellt, sondern zusätzlich der Verlauf der Freisetzung verdeutlicht.

Auffallend bei der Beurteilung des Freisetzungsverlaufes (**Abbildung 46**) ist die vor allem im Falle des Wirkstoffträgers ohne Hydrogelbeschichtung sowie des nicht responsiven und des stimulusinduzierten Wirkstofffreisetzungssystems auftretende Variante des „burst release“, durch welchen innerhalb der ersten 7 Stunden der Hauptteil der Freisetzung erfolgt. In den nächsten 40 Stunden erfolgt die Freisetzung durch alle Hydrogeltypen in derselben Geschwindigkeit. Lediglich im Falle der stimulusresponsiven Hydrogelbeschichtung, welche nicht durch Insulin in der Freisetzung getriggert wird, fällt die Freisetzung in den ersten Stunden geringer aus.

Durch die Unterschiede beim „burst release“ liegen die Freisetzungswerte des Hydrogels welches einem Stimulus ausgesetzt ist ( $41,6 \pm 4,4$  %) höher als diejenigen ohne Stimulus mit  $30,2 \pm 1,9$  %. Damit liegt der Wert nahe dem des unmodifizierten Hydrogels mit  $42,8 \pm 4,2$  %, welches damit 2/3 der Menge eines komplett unbeschichteten Hydrogels innerhalb der 48 Stunden des Experimentes freisetzt.



**Abbildung 46** Freisetzungsverlauf von BSA-FITC für verschiedene implantatassoziierte Wirkstofffreisetzungssysteme in Relation zu einem Wirkstoffträger ohne Hydrogelbeschichtung. Getestet wurden, über einen Zeitraum von 50 Stunden, eine nicht responsive PAAm/Alginate-Hybridhydrogelbeschichtung (10,4 % (w/w)) sowie eine responsive PAAm/Alginate-Hybridhydrogelbeschichtung (10,4 % (w/w), mit Insulin/Anti-Insulin als stimulusresponsive Funktion) in An- und Abwesenheit von Insulin als Stimulus.

## 6. Diskussion

Das Ziel der Arbeit ist die Generierung eines Modellsystems zur Wirkstofffreisetzung auf der Basis eines stimulusresponsiven, implantatassoziierten Hydrogels. Um den verschiedenen Herausforderungen der Erstellung einer stimulusresponsiven Hydrogelbeschichtung begegnen zu können, wurde die Arbeit in vier Teilgebiete aufgegliedert.

Neben der Charakterisierung der Permeabilität und mechanischen Belastbarkeit verschiedener Hydrogelverbünde, der Biokonjugation von Hydrogelen mit unterschiedlichen Antigen/Antikörper-Systemen, der Oberflächenmodifikation mittels unterschiedlicher Verankerungssysteme sowie deren mechanischer Testung über Haftfestigkeitsuntersuchungen, wird vor allem die Generierung eines implantatassoziierten, stimulusresponsiven Wirkstofffreisetzungssystems, als Kombination der genannten Teilaspekte, als Fokus der Arbeit betrachtet. Aus diesem Grund werden die Teilaspekte im Hinblick auf eine geringe Permeabilität ohne und hohe Permeabilität in Anwesenheit eines Stimulus geprüft. Hierfür wurde als Hydrogelbasis wurde, da in der Literatur schon bekannt, ein Polyacrylamid-Netzwerk mit gekoppelten Antigen/Antikörper-Crosslinkern gewählt [19–22]. Dieses wurde modifiziert und hinsichtlich der Möglichkeit einer Implantatassoziation unter Bewahrung der responsiven Funktion getestet.

Die Herausforderung liegt hierbei in der Etablierung eines Systems, welches einerseits flexibel genug für den Einbau der Sensorstrukturen (Antigen/Antikörper-Komplex) und andererseits vernetzt genug ist, um den Austritt des Wirkstoffes in Abwesenheit des Stimulus gerade so zu verhindern.

Als ein weiterer wesentlicher Punkt ist die Wahl eines geeigneten Stimulus von immanenter Bedeutung. Dieser sollte nach Möglichkeit kleiner sein als das vorgelegte Wirkstoffmolekül, solange es sich um Systeme ähnlicher Hydrophilie handelt.

### 6.1. Charakterisierung unmodifizierter Hydrogele

Die Charakterisierung der Hydrogele wurde über die Permeation von Proteinen unterschiedlicher hydrodynamischer Radien bezüglich unterschiedlicher Gelgehalte, Vernetzungsgrade und Gelarchitekturen durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung des eingesetzten Gelgehaltes im aufgequollenen Zustand während der Freisetzung sowie die Erfassung der mechanischen Kennwerte des Hydrogels wie etwa die Zugfestigkeit ( $\sigma_m$ ), die Bruchdehnung ( $\epsilon_B$ ) sowie dem E-Modul (E).

Für sich betrachtet, stellt die Permeation [132] eine Untersuchung bezüglich der größenabhängigen Durchlässigkeit der PAAm-Netzwerke dar. Ziel der Untersuchung ist die Sammlung von Informationen bezüglich der Beeinflussung der Freisetzung durch Änderung des Hydrogelgehalts, des Vernetzungsgrades des Hydrogels und der Hydrogelarchitektur und die Beurteilung der Stärke von deren Einfluss.

Informationen, welche zu der Gestaltung einer Beschichtung für ein stimulusresponsives, implantatassoziiertes Wirkstofffreisetzungssystem, welche trotz limitierter Schichtdicke einen ausreichenden Rückhalt des Wirkstoffes bei gleichzeitiger Möglichkeit der Etablierung eines Schaltmechanismus auf Antigen/Antikörperbasis erkennen lassen muss, nötig sind.

Durchgeführt wurden die Permeationsstudien, um keine ausgeprägte zusätzliche Permeationsbeeinflussung durch unterschiedliche Solvationstendenzen des Modellwirkstoffes während der Freisetzung zu erhalten, mit drei Proteinen, welche jedoch eine unterschiedliche Größe aufwiesen und damit einen Größenbereich von 7,5 nm (BSA, Molekülgröße: 66 kDa) über 5,0 nm (SPA, 42 kDa) bis 2,4 nm (Myoglobin, 17 kDa) abdecken [53–55].

Der Bereich, in welchem der Gelgehalt getestet wurde, bewegte sich, angelehnt an die Möglichkeiten der präparativen Umsetzung, von 7,5 bis 30 % (w/w). Das Hydrogel darf hierfür nicht zu hoch konzentriert – und damit zu hart und spröde sein – jedoch auch nicht so gering konzentriert, dass es für Testungen nicht mehr geeignet ist – da auch hier eine sehr schnelle Permeation des Wirkstoffes erwartet werden kann.

Generell sollte bei der folgenden Diskussion im Auge behalten werden dass, wie in **Kapitel 5.1.4.** beschrieben, der präparativ eingesetzte Gelgehalt nicht gleichbedeutend mit dem Gelgehalt im gequollenen Zustand während der Freisetzung ist. Wie aus **Tabelle 13** hervorgeht, sinken die Polymeranteile im Hydrogel im Laufe der Quellung für jedes Hydrogel. Hieraus ergibt sich für die verwendeten Polymermassenanteile von maximal 30 % (w/w), dass im Rahmen der eigentlichen Studie Gelgehalte von maximal 10 % (w/w) erreicht werden – gleichbedeutend mit einem sehr stark ausgeprägten Quellungseffekt. Dieses gilt, wie zu erkennen sowohl für semi-IPN-Hydrogele wie auch konventionelle Systeme. Dennoch wurden der besseren Übersicht wegen, in der Nomenklatur dieser Arbeit, aus Kontinuitätsgründen auch weiterhin die präparativ eingesetzten Gelgehalte beibehalten.

Generell lässt sich sagen, dass die Freisetzung eines Wirkstoffes aus einem Hydrogel vor allem von der Porosität, der Porengröße, der Wirkstoffgröße und der Wechselwirkungen des Wirkstoffes mit dem Hydrogel abhängt, wobei vor allem die Porosität und die Porengröße von dem Gelgehalt, der Gelarchitektur und Crosslinkerdichte beeinflusst werden [63].

Betrachtet man die Ergebnisse der Freisetzungsstudie, so ergeben sich vier wesentliche Erkenntnisse:

Der *Gelgehalt, Massenanteil an Polymer im Hydrogel*, ist einer der bestimmenden Faktoren der Freisetzung. Bei Schichtdicken von 2 mm, welche während der Versuche verwendet wurde, ergeben sich hier sehr starke Unterschiede für die Permeation eines Biomoleküls in einer festgelegten Zeitspanne (vgl. **Abbildung 27**, **Abbildung 29**). Diese Unterschiede sind stark ausgeprägt und zeigen für alle verwendeten Systeme (konventionell, semi-IPN, Vernetzungsgrad, BSA, Protein A, Myoglobin) bei steigendem Gelgehalt eine Abnahme der Permeation.

Der Effekt tritt in Kombination mit anderen die Permeation beeinflussenden Faktoren, wie etwa der *Molekülgröße* als Zweitem wesentlichen die Permeation beeinflussenden Faktor, in unterschiedlich starker Ausprägung auf.

So sind die Unterschiede in der Freisetzung, wie aus **Abbildung 27** deutlich wird, für BSA und Protein A wesentlich ausgeprägter als für Myoglobin. Für beide Proteine ergibt sich ein sprunghafter Anstieg der Permeation zwischen einem 15 %igen und einem 7,5 %igen (w/w) Hydrogel. Dies lässt den Schluss zu, dass sowohl für die Freisetzung von BSA als auch von Protein A unterhalb eines Gelgehaltes von 15 % die Porengröße und Porosität des Hydrogels so groß wird, dass keine starken Wechselwirkungen mit dem Netzwerk auftreten können. Ein Trend welcher sich bereits bei 15 %igen (w/w) Hydrogelen, mit einer gegenüber der zwischen einem 30 %igen (w/w) und 22,5 %igen (w/w) Hydrogel überproportional ansteigenden Zunahme der Permeation, beginnt abzuzeichnen (vgl. **Abbildung 27**).

Obwohl auch die hochprozentigen Hydrogele (30 %, 22,5 % (beide w/w)) im gequollenen Zustand nur einen geringfügig höheren Polymermassenanteil aufweisen, tritt das Wasser hier offenbar oft in sogenannten „dead ends“ auf. Hierbei handelt es sich um Bereiche, welche einerseits aufgrund des geringen Durchmessers die

Wirkstoffmoleküle nicht permeieren lassen können, während sich andererseits genug Wasser einlagern kann [63].

Dies könnte ein Grund sein, warum dieses Verhalten für Myoglobin, den kleinsten verwendeten Vertreter in einem solch ausgeprägten Zustand nicht beobachtet wird. So ist zwischen einem 15 %igen und einem 7,5 %igen (w/w) PAAm-Hydrogel lediglich eine Zunahme der Freisetzung von Myoglobin von  $80,7 \pm 4,8 \%$  auf  $86,3 \pm 7,3 \%$  zu beobachten. Dies lässt den Schluss zu, dass es in diesem Gelgehaltbereich aufgrund der geringen Molekülgröße zu keiner ausgeprägten Freisetzungseinschränkung durch die Dichte des verwendeten Netzwerkes kommen kann.

Diese Unterschiede der Freisetzung, zwischen BSA/Protein A einerseits und Myoglobin andererseits, machen deutlich, wie sehr die Freisetzungparameter miteinander verwoben sind. Gerade die unterschiedlichen Freisetzungseigenschaften der größeren Proteine ergeben im Hinblick auf die starke Zunahme der Freisetzung ab einem Gelgehalt von 15 % (w/w) im Zusammenspiel mit der schwach ausgeprägten Steigerung der Freisetzung von Myoglobin qualitative Hinweise bezüglich der Porenweite und Porosität des Hydrogels.

So scheinen hydrophilere Moleküle in einem Größenbereich oberhalb von 42000 Da starker Beeinflussungen durch das Netzwerk ausgesetzt – welche zu einer Verlangsamung der Freisetzung beitragen können.

Neben rein sterischen Gründen lassen sich hier Wasserstoffbrückenbindungen, ionischen Wechselwirkungen oder Van-der-Waals-Kräfte als physikalische Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten des Proteins sowie dem Hydrogel vermuten (vgl. **Abbildung 8**).

Interessanterweise zeigen die verschiedenen *Vernetzungsgrade* (vgl. **Abbildung 29**) sowie die *Gelarchitektur* (vgl. **Abbildung 12**) als Punkte drei und vier einen wesentlich *geringeren Einfluss* auf die Freisetzung. Erwartet worden war eine Steigerung der Freisetzung mit abnehmender Crosslinkermenge [63]. Dies konnte aber weder durch die hierfür durchgeführten Versuchsreihen belegt werden (vgl. **Abbildung 29**), noch indirekt im Verlaufe der Testung der unterschiedlichen Gelarchitekturen.

Vielmehr ergeben sich für beide genannten Parameter keine Unterschiede. Dies lässt die Vermutung zu, dass in dem aus Stabilitäts- und Synthesegründen getesteten Bereich von 58/1 und 117/1 (sowie auch hier nicht dargestellten Untersuchungen im Bereich von 234/1 AAm/MBAA) bezüglich der Interaktionen zu den verwendeten Proteinen keine Unterschiede in den Wechselwirkungen des Gelkörpers auftreten. Dieses Ergebnis lässt sich auch mit Werten der schon erwähnten Karl-Fischer-Titration untermauern. So wirkt sich die erhöhte Crosslinkerdichte nicht durch eine geringere Quellung des Netzwerkes aus. Dies lässt den Schluss zu, dass die Porengröße sich bei einer Variation des Vernetzungsgrades von 58/1 auf 117/1 (AAm/MBAA) nicht ändert (vgl. **Tabelle 13**).

Als weiteren Punkt, welcher für die Charakterisierung des Hydrogelnetzwerkes als Beschichtungsmatrix von Bedeutung ist, kommt den mechanischen Studien für die Generierung eines implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems eine wesentliche Bedeutung zu.

Hauptsächlich abhängig vom Gelgehalt ist die Steifigkeit des Materials. Diese führt zu einem schnellen Kollaps des Hydrogels bei mechanischen Belastungen. Daher können Hydrogele eines hohen Gelgehaltes keine Alternative für die Bildung von Implantatbeschichtungen darstellen. Ein Punkt welcher sowohl für dilatierbare Systeme, für welche diese Daten auch aufgrund der Bruchdehnung interessant sind, als auch für nicht dilatierbare Systeme gilt. Gele eines geringeren Gelgehaltes zeigen eine höhere Flexibilität wie es in **Abbildung 31**, **Abbildung 32** und **Tabelle 14** anhand der Kenngrößen des E-Moduls ( $E$ ), der Bruchdehnung ( $\epsilon_B$ ) und der Zugfestigkeit ( $\sigma_m$ ) dargestellt ist. Einhergehend mit dieser Tatsache ist eine steigende Empfindlichkeit der Hydrogele bezüglich des mechanischen Einflusses bei abnehmendem Gelgehalt. Dies ist der Grund, warum diese Art der Hydrogelbeschichtung für Implantate, welche einer stärkeren Deformation unterworfen werden können, nicht infrage kommen. Grund ist, dass hier zwar flexible aber mechanisch belastbare Beschichtungen benötigt werden. Dies führt zwangsläufig zu der Verwendung von Hydrogelen eines mittleren Gelgehaltes für dilatierbare Implantate. Hydrogele eines geringeren Gelgehaltes können allerdings im Falle von nicht-dilatierbaren Systemen, welche keinem mechanischen Stress ausgesetzt sind, verwendet werden.

Die Ergebnisse für die Versuchsreihe der PAAm-Hydrogele mit einem Vernetzungsgrad von 117/1 zeigen für das 15 %ige (w/w) Hydrogel unter der

Annahme, dass 30 %ige Hydrogele eine zu geringe Bruchdehnung und 7,5 %ige Hydrogele zu wenig mechanische Stabilität aufweisen, Werte, welche gerade auch im Hinblick auf die Ergebnisse der Permeationsstudie für eine Beschichtung geeignet erscheinen. Das System wurde daher wie im Falle der Biokonjugation (vgl. **Kapitel 0**) als geeignet für eine Oberflächenmodifizierung angesehen. Da die Werte für semi-IPN und konventionelle Hydrogele sowie für die zwei getesteten Vernetzungsgrade keine großen Unterschiede aufweisen wurde, wie im Falle der Biokonjugation, auf ein 117/1 semi-IPN-Hydrogel zurückgegriffen.

Spätere Untersuchungen im Rahmen der Generierung eines implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems zeigten, aufgrund der zu erreichenden geringen Schichtdicken, Probleme hinsichtlich der mechanischen Stabilität des Polyacrylamidhydrogels (Gelarchitektur: semi-IPN; Gelgehalt: 15 % (w/w); Vernetzungsgrad: 117/1). Aus diesem Grund wurde die Matrix um ein 10,4 %iges (w/w) PAAm/Alginat-Hybridhydrogel erweitert und die mechanischen Kennwerte auch für diesen Hydrogeltyp aufgenommen (vgl. **Abbildung 32**). Die Werte hierfür lagen im Bereich der 7,5-15 %igen (w/w) PAAm-Hydrogele. Die erhöhten Werte der Bruchdehnung, welche bei etwa 300 % liegen, geben einen Hinweis auf die leicht erhöhte Dehnbarkeit der Hybrid-Hydrogele [99] gegenüber den vermessenen PAAm-Hydrogelen.

Der Grund hierfür liegt an der Kombination aus Bereichen vorwiegend ionischer Prägung (Alginat) als auch Bereichen mit verstärkt kovalentem Bindungsanteil (Acrylamid) [99].

Unter der Prämisse der Bewahrung einer möglichst großen Flexibilität der PAAm-Netzwerke, vor allem bezüglich des Einbaus der Biomoleküle, ergab sich Notwendigkeit der Verwendung der Hydrogele des geringeren Vernetzungsgrades für die Testung des Einbaues der Antigene und Antikörper.

Weiterhin empfahl sich bezüglich des Gelgehaltes die Verwendung eines 15 %igen PAAm-Hydrogels als Basis für den Einbau der stimulusresponsiven Antigen/Antikörper-Strukturen. Begründen lässt sich dies mit der starken Zunahme der Freisetzung unterhalb dieses Gelgehaltes und damit der noch gegebenen akzeptablen Freisetzungskinetik und den noch vorhandenen verwendbaren mechanischen Eigenschaften (vgl. **Kapitel 5.1.5**). Die bevorzugte Verwendung eines

semi-IPN Hydrogels gegenüber einem konventionellen Netzwerk lässt sich über die gesammelten Ergebnisse nicht begründen. Jedoch kann man bei dem Einbau der Antikörper in das Fasersystem und des korrespondierenden Antigens in das Netzwerk des semi-IPN Hydrogels davon ausgehen, dass die gekoppelten Biomoleküle trotz Ihrer Affinität zueinander einen größeren Bewegungsspielraum zueinander haben, als wenn sie beide gekoppelt in einem konventionellen Netzwerk vorliegen würden [20,22].

## **6.2. Biokonjugation der verwendeten Hydrogele**

Als eine der wesentlichen Anforderungen an ein solches System wird, wie zu Beginn des Kapitels schon erwähnt, die Verwendung eines – gegenüber dem Wirkstoff – kleineren Stimulus angesehen. Um auf die Arbeiten nach Miyata et al. [22] jedoch aufbauen zu können wurde, trotz der Verwendung von BSA als größtes Modellwirkstoffmolekül (66 kDa), zu Anfang auf ein Maus IgG und Kaninchen Anti-Maus IgG gekoppeltes Hydrogel zurückgegriffen. Dies lag einerseits an der hohen Stabilität der verwendeten Antikörper und andererseits an den massiven Veränderungen, wie der Reduzierung der Schichtdicke, dem Anpassen des Crosslinkeranteils sowie des Gelgehaltes, welchen das System von Miyata et al. außerdem schon unterzogen war, um eine mögliche Implantatbeschichtung zu generieren. Aufgrund der veränderten Gelgehalte und AAm/MBAA-Verhältnisse mit welchen gearbeitet wurde, wurden erst einmal Tests bezüglich einer möglichen Detektion der Antikörper durchgeführt. In diesem Rahmen wurden 15 %ige (w/w) 117/1 (AAm/MBAA)-semi-IPN-Hydrogele welche gekoppelte Maus IgG beinhalteten mit FITC-markierten Ziege Anti-Maus IgG umgesetzt. Hierbei zeigte sich, dass ein ausreichender Nachweis des gebundenen Maus IgG, selbst in einer Inkubationszeit von 2 Stunden, nicht erbracht werden konnte. Alternativ wurde dieser Versuch mit 7,5 %igen (w/w) Hydrogelen derselben Gelarchitektur und desselben Vernetzungsgrades durchgeführt.

Das hieraus resultierende positive Ergebnis bestätigen die erfolgreiche Integration der NSA-modifizierten Biomoleküle, Maus IgG sowie des zugehörigen Antikörpers Kaninchen Anti-Maus IgG, in das Hydrogelnetzwerk, geben aber auch Hinweise hinsichtlich einer möglichen Verwendung des Maus IgG als Stimulus.

So muss ein Molekül der Größe von 155000 Da wie ein Maus IgG bei diesem Gelgehalt einen längeren Zeitraum vorliegen um eine ausreichende Permeation in das Hydrogel zu erreichen. Dies ist jedoch auch gleichbedeutend mit einer relativ

langsamen Antwort des Systems auf diesen Stimulus, wodurch bei einem kleineren Wirkstoffmolekül bestenfalls eine Beschleunigung der Freisetzung erreicht werden kann [132] (wie auch aus **Abbildung 43** deutlich wird).

Weitere Studien wurden bezüglich der Antigen/Antikörper-Konzentration im Hydrogel durchgeführt. Wie aus **Tabelle 15** und **Tabelle 16** deutlich wird, lässt sich eine Steigerung der Konzentration der Antikörper deutlich nachweisen. Neben der Quantifizierung der Rückstrahlintensität über Fluoreszenzmikroskopie (region of interest) konnte dies auch über BCA belegt werden.

Dies gilt sowohl für den Einzelnachweis von gekoppeltem Maus IgG oder Kaninchen Anti-Maus IgG als auch den Simultannachweis von Maus IgG neben Kaninchen Anti-Maus IgG. Interessant sind einerseits die geringere Fluoreszenz-intensität der mit Ziege Anti-Kaninchen (FITC) inkubierten Proben und andererseits die im Falle des Kaninchen Anti-Maus IgG wesentlich geringer ausfallenden Werte der BCA-Quantifizierung.

Dies kann möglicherweise durch eine, im Rahmen der Synthese, geringer ausfallende Modifizierung des Hydrogels mit Kaninchen Anti-Maus IgG bedingt sein. So stellen sich einerseits die Frage ob in der Antikörperlösung noch genug intakter Antikörper vorlag, andererseits die Fragen ob die Modifizierung des Antikörpers mit Acrylatresten ordentlich erfolgt ist, oder der Antikörper weniger reaktive Gruppen für eine Modifizierung vorliegen hat als es im Maus IgG der Fall ist.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die geringere Fluoreszenzintensität kann in einer reduzierten Aktivität des FITC-markierten Antikörpers begründet sein, was allerdings nicht die simultan auftretenden wesentlich geringeren Werte im Rahmen der Quantifizierung über BCA-Werten erklären kann, welche eigentlich für eine geringere Reduktivität der Proteine sprechen, oder aber ebenfalls einen geringeren Anteil an Protein.

Interessant ist in diese Falle weiterhin, dass die Ergebnisse für die Antigen/Antikörperbestimmung eines mit Maus IgG und Kaninchen Anti-Maus IgG gekoppelten Hydrogels ähnliche Werte ergeben wie die Summe der einzeln modifizierten Systeme in welchen nur Maus IgG oder Kaninchen Anti-Maus IgG gekoppelt vorliegt. Dies bedeutet, dass eine Quantifizierung der Antigen/Antikörpermenge im Hydrogel auch simultan durchführbar ist.

Ein weiterer Punkt, welcher im Rahmen der Biokonjugation untersucht wurde, war die Biokonjugation des Hydrogels mit verschieden stark NSA-modifizierten Biomolekülen. Wie Shoemaker et al. [118] darlegt, sinkt die Affinität der NSA-modifizierten Antigene im Vergleich zu den unmodifizierten Antikörpern mit einer steigenden Anzahl an Acrylatresten um bis zu 3 % je Rest.

Hierbei benötigt man allein für die Etablierung eines Acrylatrestes ein NSA/AK-Verhältnis von 6, während für 7 Acrylatreste bereits ein 30-facher Überschuss an NSA benötigt wird [22].

Um zu testen ob sich dieses, auch bei der Verwendung eines Biomoleküls von  $\sim 6000$  Da, bestätigen lässt, wurden im Fall der Verwendung von Insulin im Crosslinkersystem aus Insulin/Anti-Insulin nochmals gesondert Untersuchungen durchgeführt, da es sich bei Insulin um ein – im Verhältnis – relativ kleines Protein handelt und die Modifizierung daher größere Auswirkungen vermuten lassen.

In **Tabelle 17** sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt. Durchgeführt über die affinitätsgesteuerte Kopplung von fluoreszenzmarkiertem Anti-Insulin an das im Hydrogelnetzwerk gekoppelte Insulin zeigt das Netzwerk interessanterweise schon im unmodifizierten Zustand eine Fluoreszenz, was gleichbedeutend mit einer Kopplung des Insulins in das Hydrogelnetzwerk – ohne Modifizierung mit einem Acrylatrest – ist. Eine einfache adsorptive Einlagerung kann hier ausgeschlossen werden, da die Fluoreszenz anderenfalls im Blindwert ebenfalls aufgetreten wäre. Dies bedeutet, dass die radikalische Synthese, nicht selektiv an -C-C- Doppelbindungen abläuft, sondern auch Seitenketten des Insulins im geringen Maße in die Reaktion eingreifen.

Deutlicher ist die Biokonjugation im Falle eines NSA/Insulin-Verhältnisses von 5 ausgeprägt. Nach Miyata et al. [22] ist dies gleichbedeutend mit einem Modifizierungsverhältnis von NSA/Protein  $\sim 1$  und belegt den erfolgreichen Verlauf der Reaktion. Erhöht man das Verhältnis auf 10/1 (NSA/Insulin), so steigert sich die Intensität der Fluoreszenz abermals. Jedoch kommt es hier im Hydrogelverbund zu einer stark inhomogenen Ausprägung der Fluoreszenz. Möglicherweise könnte dieses Verhalten auf eine mehrfache, aber nicht zu ausgeprägte Modifizierung des Insulins hinweisen, welches hierdurch im Laufe der Kettenreaktion zu Verklumpungen neigen könnte.

Ein Faktum, welches sich bei weiter steigender Modifizierung möglicherweise durch die sinkende Affinität zum FITC-markierten Anti-Insulin nicht mehr belegen lässt.

Wie nach Shoemaker et al. [118] zu erwarten, sinkt die Fluoreszenz mit einem weiter steigenden NSA/Insulin-Verhältnis (auf 15, 20 und 30, vgl. **Tabelle 17**) ab, wodurch belegt ist, dass eine geringe Anzahl an Acrylatresten die Kopplung des Antikörpers an das Insulin nicht nachhaltig stört. Weiterhin wird hierdurch belegt, dass zwischen Insulins und Anti-Insulin nach der Modifizierung noch eine Affinität vorhanden ist, wodurch eine Responsivität möglich sein kann.

Wie schon unter **Kapitel 6.1.** angesprochen wurde im Laufe der Untersuchungen deutlich, dass das PAAm-System für sehr dünne Beschichtungen nicht die nötige mechanische Stabilität während der Präparation aufweist. Daher wurde im Rahmen der Generierung des implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems zusätzlich eine Studie durchgeführt, welche die Möglichkeit der Etablierung von Antigen-Antikörperfunktionen in ein PAAm/Alginate-Hybridhydrogel belegen sollte. Das verwendete Hybridhydrogel wurde hierbei auf erfolgreiche Integration des Insulins bzw. des Anti-Insulins getestet. Der erfolgreiche Einbau konnte über eine Markierung mittels FITC-markierten Antikörpern belegt werden (vgl. **Abbildung 34**).

### 6.3. Oberflächenmodifikation

Einer weiterer wichtiger Punkt auf dem Weg zu der Generierung eines implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems ist die Ankopplung des Hydrogels an die Substratoberfläche. Wie in **Abbildung 22** und **Abbildung 23** dargestellt, erfolgte die Ankopplung der Hydrogelbeschichtung in mehreren Schritten. So erfolgte eine erste Funktionalisierung über die Verwendung einer Sauerstoffplasmaaktivierung. An die hierbei auf der Substratoberfläche etablierten Hydroxylgruppen an der Substratoberfläche konnten über Reaktion mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) und NSA einerseits und 3-Methacrylpropyltrimethoxysilan (MPTMS) andererseits endständige Vinyl-gruppen erzeugt werden. Diese stellten die Basis für die über eine radikalische Polymerisation erfolgte Bildung von PAAm-Fasern an der Oberfläche dar, an welche das Hydrogelnetzwerk aufgebracht werden konnte.

Um eine schnelle Beurteilung der Modifizierung zu erhalten, wurde auf Kontaktwinkelmessungen zurückgegriffen (vgl. **Kapitel 4.6.2.**). Die Ergebnisse bezüglich der zunehmenden Hydrophilie nach der Plasmaaktivierung geben hier sehr schön die Aktivierung der Oberfläche mit Hydroxylgruppen wieder, wodurch sich eine

erhöhte Benetzbarkeit der Oberfläche ergibt (vgl. **Abbildung 35**). In Folge der weiteren Aktivierung mittels Silanisierung über ein APTES/NSA und ein MPTMS System verschiebt sich die Eigenschaft der Oberfläche aufgrund der endständigen Vinylgruppen auf der Substratoberfläche in einen hydrophoberen Bereich. Erfolgt eine weitere Behandlung mittels AAm bzw. AAm/MBAA-Ankopplungen an der Oberfläche, so stellt sich die Messung aufgrund der nunmehrigen entstehenden Quellungseigenschaften der Oberfläche im zunehmenden Maß als problematisch dar. So ergibt sich für eine Modifizierung mit AAm-Fasern noch eine relativ geringe Änderung der Oberflächenhydrophilie, während eine Messung des aufgetragenen AAm/MBAA-Hydrogels mit dem verwendeten System nicht mehr durchführbar ist.

Sehr schön spiegeln sich diese Ergebnisse auch in den Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (vgl. **Abbildung 36**) sowie der lasergestützten Schichtdickenbestimmung (vgl. **Abbildung 37**, **Abbildung 38**, **Abbildung 39**) wieder. So sind bis zum präparativen Aufbringen der Hydrogelbeschichtung (**Abbildung 36, F**) erwartungsgemäß rasterelektronenmikroskopisch keine wesentlichen Änderungen zu beobachten, was sich auch für den Fall der AAm-Fasern bestätigt. Lediglich nach der Modifizierung mittels APTES ergeben sich helle, nebelartige Strukturen, welche aber in Folge der anschließenden NSA-Funktionalisierung wieder verschwunden sind, wodurch von Salzabscheidungen von DPBS ausgegangen werden kann.

Die Hydrogelbeschichtung wiederum ist durch eine herbeigeführte Beschädigung leicht zu identifizieren. Das Hydrogel erscheint infolgedessen heller, und an einigen Stellen mit aufgeworfenen Strukturen, als das darunter zum Vorschein kommende Glas.

Die Unterschiede zwischen der nur mit AAm-Fasern und der weiterführend mit AAm/MBAA präparierten Probe werden nochmals im Vergleich der **Abbildung 37** zur **Abbildung 39** deutlich. Eine signifikante Schichtdickenveränderung von 0,75 auf etwa 35  $\mu\text{m}$  belegt die wesentlich verbesserten Quellungseigenschaften des dreidimensionalen AAm/MBAA-Netzwerkes gegenüber den praktisch zweidimensional vorliegenden PAAm-Fasern. Da bei der Oberflächenmodifizierung, weder oberflächenmorphologisch noch über den Kontaktwinkel Unterschiede bezüglich eines Systems auf APTES/NSA bzw. MPTMS-Basis festzustellen waren,

außerdem bei der Ankopplung der PAAm-Fasern auch keine großen Abweichungen zwischen den beiden Systemen auftraten, wurde das System in der Folge auf eine alleinige Kopplung über MPTMS umgestellt, da die „Einschrittsynthese“ gegenüber der „Zweischrittkopplung“ über APTES/NSA in der praktischen Umsetzung von wesentlichem Vorteil war.

Was an den Ergebnissen der Schichtdickenbestimmung allerdings auch deutlich wird, sind die Herausforderungen, welche in der Verwendung des Pipettierverfahrens zur Etablierung des Hydrogels auf der Oberfläche liegen. Die aus **Abbildung 38** deutlich hervorgehende Inhomogenität der Schichtdicke ist vor allem auf die präparative Abdeckung und letztliche Ablösung des während der Synthese aufliegenden Schutzglases zurückzuführen. Durch die Adsorptionskräfte des Hydrogels an der Glasoberfläche kam es häufig zu einem teilweisen Abriss der Hydrogelbeschichtung, infolgedessen das Verfahren auf die Klebung vorpräparierter Hydrogel für die Generierung von Hydrogelbeschichtungen abgeändert wurde.

Wie aus **Abbildung 41** ersichtlich wird, lässt sich die Schichtdicke der Hydrogelbeschichtung auch im Rahmen der Vorpräparation der Hydrogele sehr gut einstellen. So können mit geringen Volumina über eine großflächige Präparation homogene sehr dünne Schichtdicken erreicht werden, welche in einem linearen Zusammenhang mit den eingesetzten Präparationsvolumina stehen. Über dieses Verfahren können Werte von unterhalb 100  $\mu\text{m}$  erreicht und verarbeitet werden. Als präparative Herausforderung stellen sich in diesem Verfahren allerdings die sofortige Reaktion der Hydrogele bezüglich erhöhter Luftfeuchtigkeit und die geringe Stabilität der verwendeten Hydrogele dar.

Diese limitierte Stabilität war der Anlass dafür, ein System zu etablieren, welches bessere Eigenschaften im Handling aufwies um eine einfacher reproduzierbare Präparation zu ermöglichen.

Als System wurden aufgrund besserer mechanischer Eigenschaften PAAm/Alginate-Hybridhydrogele etabliert und folgend weitergehend untersucht [97–99]. Im Falle der Präparation dünner Hydrogelbeschichtungen auf 9 mm-CrNi-Edelstahlsubstraten wurden Versuche zur weiteren Reduktion der Schichtdicke unternommen. Hierbei erwies sich das Klebervolumen aus AAm/MBAA (vgl. **Kapitel 4.6.3**) im Falle der

Verwendung vorpräparierter Hydrogele als ein wesentlicher Faktor. Wie aus **Abbildung 40** hervorgeht steigt die Schichtdicke der Beschichtung im gequollenen Zustand bei einer Steigerung des Klebervolumens von 2 auf 8  $\mu\text{l}$  auf nahezu das Doppelte.

Zu Gewährleistung einer guten Haftung wurden daher für 9 mm ( $\varnothing$ ) Substrate eine komplette Benetzung des Raumes zwischen Hydrogel und Edelstahlsubstrat vorausgesetzt. Dies konnte über die Verwendung eines Volumens von 4  $\mu\text{l}$  erreicht werden. Daher wurde präparativ unter Verwendung dieses Volumens weiter gearbeitet, um Schichtdicken um 100  $\mu\text{m}$  gewährleisten zu können.

Um die Haftung der verwendeten Hydrogelbeschichtungen auf der Substratoberfläche zu belegen, also die Notwendigkeit der Oberflächen-modifikation zu untermauern, wurden die Hydrogelbeschichtungen zweier unterschiedlicher Geltypen (PAAm, 15 % (w/w), 117/1; PAAm/Alginat-Hybrid, 10,4 % (w/w)) mittels Bestimmung der Abschälkraft getestet. Dies erfolgte, soweit möglich, für zwei verschiedene Schichtdicken. Hierbei konnten für eine 450  $\mu\text{m}$  dicke Hydrogelbeschichtung wesentlich höhere Abschälkräfte gemessen werden als für die 90  $\mu\text{m}$  dicken Hydrogelbeschichtungen. Begründen lässt sich dies wahrscheinlich mit einer tieferen Durchdringung des Netzwerkes durch die zum Kleben verwendete Lösung aus AAm/MBAA, sowie teilweise Abrisse, vor allem der 90  $\mu\text{m}$  dicken Beschichtung, bevor es zu einem Abschälen der Proben kam. Über die tiefere Durchdringung kann sich eine bessere Haftung ergeben. Diese fällt daher offenbar, wie in **Abbildung 42** dargestellt, für die 450  $\mu\text{m}$  dicken Hydrogelbeschichtungen wesentlich größer aus.

Wie bei den Zugversuchen stellt sich das Hybridhydrogel, auch in der Oberflächenanknüpfung, als stabiler dar. In Kombination mit den Ergebnissen der Oberflächenmodifizierung, der erhöhten Stabilität des Polyacrylamid/Alginat-Hybridhydrogelverbundes gegenüber dem PAAm-Hydrogel und einer ebenfalls erfolgreichen Biokonjugation wurde das Hybridhydrogel als Grundlage des implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems auf Insulin/Anti-Insulin-Basis verwendet.

#### 6.4. Stimulierte Freisetzung und implantatassoziiertes Wirkstofffreisetzungssystem

Vorgestellt werden hier zwei stimulusresponsive Hydrogele, welche in der Freisetzungskammer auf die Funktionalität hin untersucht werden sollten. Bei dem ersten System handelt es sich um eine Variante eines PAAm-Hydrogels mit einer Kombination aus Maus IgG und Kaninchen Anti-Maus IgG als stimulusresponsive Funktion. Bei der zweiten Variante handelt es sich um ein PAAm/Alginate-Hybridhydrogel mit Insulin und Anti-Insulin als stimulusresponsive Faktoren.

Im ersten Fall wurde BSA als Modellwirkstoff und Maus IgG als Stimulus verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass eine leichte Steigerung der BSA Freisetzung in Anwesenheit eines Stimulus erfolgt. Aus **Abbildung 43** geht hervor, dass mit Anwesenheit des Stimulus eine Steigerung der Freisetzung einhergeht. Dieses gilt nicht nur für die initiale Phase der Freisetzung, sondern über den ganzen Zeitrahmen der Freisetzung von 72 Stunden gesehen. Allerdings muss erwähnt werden, dass die kumulative Freisetzung aus dem biokonjugierten Netzwerk doppelt so hoch ausfällt wie die Freisetzung aus dem nicht modifizierten semi-IPN Hydrogel in Abwesenheit des Stimulus. Ein weiterer Nachteil, welcher auf dem System nach Miyata et al. beruht, ist in diesem Fall die Verwendung von BSA als Modellwirkstoff und dem größeren Stimulus Maus IgG. Da eine Penetration des Hydrogels durch den Stimulus gewährleistet sein muss, garantiert diese Voraussetzung gleichzeitig die permanente Freisetzung des kleineren Wirkstoffmoleküls BSA. In weiterführender Schlussfolgerung ergibt sich hieraus, dass durch Anwesenheit bzw. Abwesenheit des Stimulus kein „on-off“-Mechanismus, vielmehr nur eine Beschleunigung oder Verlangsamung der Freisetzung zu erreichen ist.

Als Schlussfolgerung für eine Modifizierung des Systems erschließen sich folgende Punkte:

1. Im Falle der Beibehaltung des Modellwirkstoffes muss eine größenmäßige Anpassung des Stimulus erfolgen, dieser also kleiner werden, oder das Wirkstoffmolekül größer.
2. Um eine nur durch Biokonjugation gleichermaßen gesteigerte Freisetzung des Hydrogels zu verhindern, muss entweder das Hydrogel verändert werden oder,
3. die responsive Funktion, also das Antigen/Antikörper-Paar verkleinert werden.

Diese Veränderungen sollen über eine geringere Porengröße das Ziel erreichen, in Abwesenheit des Stimulus eine Permeation des Wirkstoffes zu verhindern.

Umgesetzt wurden diese Punkte bei der Generierung eines weiteren Freisetzungssystems. In diesem wurde Insulin als Antigen und Stimulismolekül verwendet. Von den sich, aus der oben beschriebenen stimulusinduzierten Freisetzung, ergebenden Forderungen wurde hiermit die Erste umfassend und gleichzeitig die Dritte teilweise erfüllt. Im Rahmen der Verwendung von Insulin/Anti-Insulin wurde das Antigen einer wesentlichen Größenreduktion von 155000 Da auf 6000 Da unterzogen.

Durch die Haftfestigkeitsuntersuchungen, Zugversuche sowie Machbarkeitsversuche bezüglich der Beschichtung wurde zusätzlich ein PAAm/Alginate-Hybridhydrogel als alternatives Hydrogel für ein implantatassoziiertes Wirkstofffreisetzungssystem etabliert, auch wenn das Hydrogel anders als im Falle der PAAm-Matrix noch keiner weiterreichenden Untersuchung unterschiedlicher Hydrogelparameter unterzogen wurde.

Interessant ist in dem Zusammenhang, dass die Freisetzung der stimulusresponsiven Hydrogele, handele es sich nun um das PAAm-Hydrogel mit Maus IgG/ Kaninchen Anti-Maus IgG einerseits, oder das PAAm/Alginate-Hybridhydrogel mit Insulin/Anti-Insulin andererseits, im nicht stimulierten Fall und stimulierten Fall ähnliche (vgl. **Abbildung 43**) oder gleiche Freisetzungswerte aufweisen (vgl. **Abbildung 44**).

Betrachtet man die Steigerung der Freisetzung im Falle der Anwesenheit des Stimulus für beide Hydrogele, so muss man feststellen, dass die Erwartungen bezüglich einer besseren Schaltbarkeit des Hydrogels durch Anwesenheit eines kleineren Stimulus im Hinblick auf das Insulin gekoppelte Netzwerk nicht erfüllt werden konnten. So ergeben sich sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit des Stimulus identische Freisetzungswerte.

Interessant ist auch, dass im Falle der Anwesenheit eines Stimulus (*hier*: Insulin) bei der Umsetzung eines implantatassoziierten Freisetzungssystems (vgl. **Abbildung 45** und für die Freisetzung **Abbildung 46**) keine Zunahme der Freisetzung über einen bestimmten Zeitabschnitt zu beobachten ist, sondern lediglich in der Anfangsphase eine erhöhte Freisetzung zu beobachten ist.

Andererseits weißt die Freisetzung durch das responsive, nicht stimulusgetriggerte System als einziges der gezeigten Systeme einen wesentlich geringeren „burst release“ auf. Eine Möglichkeit scheint hier also eine Verlangsamung der Freisetzung durch Einbau schaltbarer Crosslinker zu sein. Eine These, welche sich durch die identische Freisetzung des responsiven, stimulusgetriggerten und des nicht responsiven Hydrogels zu erhärten scheint, wenn man eine lösungskontrollierte Freisetzung postuliert, was heißt, dass lediglich der „burst release“ durch die Triggerung unterschiedlich hoch ausfällt. Dies kann daran liegen, dass die initial gelöste Wirkstoffmenge oberflächennah gut mobilisierbar ist, in der Folge aber aus den Kavitäten nur noch geringe Menge austreten, welches aber in der Größenordnung keinen Unterschied bei der Freisetzung macht, weswegen die anschließende Freisetzung diffusionskontrolliert abläuft.

Betrachtet man diese Verlangsamung allerdings nicht als repräsentativ, was auf die präparativen Herausforderungen und hierbei auftretende Fehler im System möglich ist, so ergibt sich hier ein anderes Szenario: So werden, belegt durch **Abbildung 45**, bereits nach kurzer Zeit teilweise großflächige Wirkstoffpermeationen, auch weit entfernt von der beladenen Kavität (vgl. **Abbildung 17**, beladen mit Wirkstoff war lediglich die zentrale Kavität) deutlich. Die starke initiale Freisetzung, vergleichbar mit einem „burst release“, ist in allen Fällen sehr wahrscheinlich auf Verunreinigungen außerhalb der Kavitäten, sowie einer schnellen Ausschwemmung der oberflächennahen Wirkstoffanteile im Rahmen der Quellung zu erklären. Dies belegt allerdings gleichzeitig, dass der Stimulus in diesem Fall *keinen* Einfluss auf die Freisetzung nimmt, da sonst auch eine stärkere Freisetzung über die Zeit zu beobachten wäre. Ein Faktum, welches jedoch nicht zu beobachten ist.

Vielmehr stellt sich diese für alle Systeme gleich dar, sei es nun für ein Freisetzungssystem ohne Hydrogelbeschichtung, mit Hydrogelbeschichtung oder mit biokonjugierter Hydrogelbeschichtung im Falle der An- bzw. Abwesenheit eines Stimulus, so wie aus **Abbildung 46** deutlich hervorgeht.

Welches der beiden Szenarien wirklich zutrifft, müssen weitere Untersuchungen klären helfen.

Aufgrund der anderweitigen Studienergebnisse wie des Vergleiches mit dem Maus IgG/Kaninchen Anti-Maus IgG gekoppelten System welches, wie schon erwähnt, lediglich eine schwache Steigerung der Freisetzung aufweist (vgl. **Abbildung 43**) und

der identischen Freisetzung aus Insulin/Anti-Insulin gekoppelten Hydrogelen in An- und Abwesenheit eines Stimulus, scheinen die Unterschiede hier allerdings eher als eine Frage der Präparation und der Diffusion zu beurteilen zu sein.

So wird bei der Variante des implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems ein wesentlich geringerer Bereich des Hydrogels für die Permeation verwendet. Obwohl die Probe mit 9 mm Durchmesser einen fast ebenso großen Durchmesser aufweist wie die verwendeten Hydrogelstanzen für die nicht oberflächen-gekoppelte Freisetzung, so ist hiervon lediglich ein Bereich von unter einem Millimeter im Durchmesser, direkt über der beladenen Kavität, für die Freisetzung von Bedeutung. Hierdurch kommt es gewissermaßen zu einer lokalen Verlangsamung der Freisetzung durch den langsamen Ausgleich der Konzentrationsunterschiede. Eine teilweise beobachtete Lösung des als Wirkstoff verwendeten Proteins unterhalb der Hydrogelbeschichtung, begünstigt durch osmotische Prozesse, und hieraus resultierende Blasen stützen diese These.

Durch die Klebung ist die Dichte des Netzwerkes um die Kavitäten außerdem wesentlich ausgeprägter als direkt oberhalb der Kavität, wo lediglich ein Netzwerk aus dem ursprünglich vorpräparierten Hydrogel vorliegt. Dieses führt zu einer bevorzugten Diffusion im Bereich der Kavitäten, da die Diffusion hier einfacher durch das nicht so dichte Netzwerk erfolgen kann.

Im Gegensatz dazu ist die Möglichkeit der gleichmäßigen Diffusion im nicht implantatassoziierten Hydrogelverbund über den kompletten Hydrogelkörper hinweg gegeben. Hierdurch ergibt sich, wie dargelegt, ein anderes Verhalten bezüglich der Freisetzung, da keine derart stark fokussierte Kanalisation des Wirkstoffes stattfindet, was eine gleichbedeutend mit einer stetigen Freisetzung, bestimmt nur von dem Diffusionsverhalten und nicht der Mobilisierung des Wirkstoffes, zu beobachten ist.

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Studie wurden wesentliche Punkte auf dem Weg der Umsetzung eines implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems abgehandelt. Auf der Basis von Untersuchungen von Miyata et al. wurden für diesen Zweck möglicherweise geeignete Geleigenschaften (Gelgehalt, Vernetzungsgrad, Gelarchitektur) eines Polyacrylamidnetzwerkes auf ihren Einfluss bezüglich der Wirkstofffreisetzung getestet. Um nicht nur bezüglich einer Wirkstoffgröße, sondern einen Größenbereich Ergebnisse zu erhalten, wurden die Hydrogele anhand verschiedener Proteine, namentlich BSA, Protein A und Myoglobin, getestet.

Hierdurch konnte das Netzwerk über einen Größenbereich von 2,4 bis 7,5 nm auf die Permeation von ähnlich hydrophilen Stoffen getestet und das Hydrogel anhand der Ergebnisse beurteilt werden. Diese Versuche, welche in einer speziell designten Freisetzungskammer durchgeführt wurden (**Abbildung 24**), hatten das Ziel eine geeignete PAAm-Hydrogelbasis für die Integration von Antigen/Antikörper-Crosslinkern als stimulusresponsive Funktionen zu bestimmen.

Zu dieser Basis, welche einerseits flexibel genug sein sollte um eine Biokonjugation zu ermöglichen, andererseits eine so hohe Dichte aufweisen sollte um eine Freisetzung ohne Stimulierung nicht zu ermöglichen, wurde bezüglich der Erkenntnisse aus den Versuchen der Freisetzungsmatrix ein 15 %iges, 117/1 (AAm/MBAA) semi-IPN Hydrogel bestimmt. Hierbei sollte durch die Wahl der Gelarchitektur eines semi-IPN-Hydrogels ein möglichst flexibles Verhalten des Schaltmechanismus gewährleistet werden [132].

Um ein stimulusresponsives Wirkstofffreisetzungssystem zu generieren, erfolgte im nächsten Schritt die Integration der bioresponsiven Funktionen, also der Antigene und Antikörper, in das Polyacrylamidnetzwerk [22].

Auf der Basis der Kopplung über Acrylatreste in das Netzwerk sollten so die in der Quartärstruktur strukturell erhaltenen Biomoleküle in das Netzwerk integriert werden. Hierfür konnte der Nachweis über die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern geführt werden. Neben dem Einbau unterschiedlicher Antigen/Antikörpermengen wurde hierbei außerdem der Einfluss der Modifizierung mittels Acrylatresten auf die Nachweisbarkeit des gekoppelten Biomoleküls belegt. Ein Verhalten was den zusätzlichen Schluss erlaubt, dass die Affinität des nachgewiesenen Biomoleküls zum korrespondierenden hydrogelgekoppelten Antigen bzw. Antikörper nicht wesentlich herabgesetzt wird.

Um ein implantatassoziiertes Wirkstofffreisetzungssystem zu erhalten, wurde neben der Grundlage des Hydrogels als zweite wichtige Säule des Konzeptes eine Oberflächenmodifizierung durchgeführt. In diesem Rahmen erfolgte die Oberflächenmodifizierung mittels einer Hydrogelbeschichtung in einem Mehrstufenprozess. So konnte das Substrat über die Verwendung eines Sauerstoffplasmas erfolgreich mit Hydroxylgruppen funktionalisiert werden, um die folgenden Prozesse zu ermöglichen. So erfolgte im Anschluss an die Funktionalisierung mittels Sauerstoffplasma die Etablierung von endständigen Vinylgruppen über die Systeme APTES/NSA und MPTMS als Basis für das Hydrogel. In einem ersten Schritt wurden an die endständigen Vinylgruppen des MPTMS PAAm-Fasern polymerisiert. An diese konnten im Folgeschritt erfolgreich PAAm-Netzwerke unterschiedlicher Schichtdicken aufgebracht werden.

Um die Beschichtung jedoch in einem für Implantate anwendbaren Rahmen zu erhalten, wurden, wie oben erwähnt, Schichtdicken von unter 100 µm angestrebt. Die Etablierung des Hydrogels erfolgte hierbei neben der Testung des Pipettierverfahrens auch über die Klebung unterschiedlich starker vorpräparierter Hydrogele zur Untersuchung des Einflusses des Klebervolumens auf die Schichtdicke. Hierbei kam es zusätzlich aufgrund der präparativen Handhabung zur Einführung eines PAAm/Alginate-Hybridhydrogels neben dem bisher verwendeten PAAm-Netzwerken. Über diese Modifizierung konnte eine erfolgreiche Reduktion der Schichtdicke der Hydrogelbeschichtung auf der Oberfläche durchgeführt werden, wobei die Werte unterhalb von 100 µm lagen.

Mittels Bestimmung der Abschälkraft wurde zusätzlich die Haftung des Hydrogels auf Modellsubstraten belegt.

Als weiterer zielführender Baustein wurde das Hydrogel, noch nicht auf der Oberfläche etabliert, auf seine Schaltbarkeit hin untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass ein biokonjugiertes Hydrogel eine wesentlich höhere Durchlässigkeit aufweist, als die nicht biokonjugierten Hydrogele, anhand derer das zu verwendende Hydrogel festgelegt wurde.

Die zwei verwendeten Systeme zeigen im Falle des Maus IgG/Kaninchen Anti-Maus IgG gekoppelten PAAm-Netzwerkes eine positive Reaktion bezüglich der Schaltbarkeit des Netzwerkes. Aufgrund der geringen Schichtdicke sowie der Größe

des verwendeten Stimulus und Wirkstoffmoleküls ist die Stimulierung jedoch lediglich mit einer leichten Beschleunigung der Freisetzung zu belegen.

Aufgrund der Ergebnisse wurde das System im Anschluss einer kompletten Modifizierung unterworfen. Neben der Veränderung der responsiven Funktion auf eine Insulin/Anti-Insulin (Antigen/Antikörper)-Paarung, welche vor allem aufgrund der wesentlich geringeren Größe des verwendeten Stimulus erfolgte, wurde auch das Hydrogelnetzwerk im Hinblick auf die Oberflächenmodifizierung für ein implantatassoziiertes Wirkstofffreisetzungssystem verändert. Hier wurde statt eines PAAm-Hydrogels nun ein PAAm/Alginat-Hybridhydrogel verwendet. Die Ergebnisse der nicht-implantatassoziierten Freisetzung negieren eine Beeinflussung der Freisetzung durch den Stimulus.

Auch eine folgende Studie bezüglich der Beeinflussung eines implantat-assoziierten Wirkstofffreisetzungssystems durch einen Stimulus ergab keine positiven Ergebnisse, sodass sich als Fazit ein zwiegespaltenes Ergebnis bezüglich des Prozesses zur Etablierung eines implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems ergibt.

Während die Etablierung eines Netzwerkes, die Biokonjugation sowie die Oberflächenmodifikation durchaus zufriedenstellende Ergebnisse ergaben, so erwies sich der Hauptfokus der Arbeit, nämlich die Zusammenführung dieser Teilergebnisse zu einem stimulusresponsiven, implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystem als Modellsystem erst einmal als eine zu weit führende Herausforderung, welche im Rahmen dieser Arbeit keiner zufriedenstellenden Lösung zugeführt werden konnte.

Ansatzpunkte für eine erfolgsversprechende Variation gibt es viele, auch wenn man bei der größten Herausforderung eines solchen Systems, nämlich einer Schichtdicke unterhalb von 100  $\mu\text{m}$ , keine Variation zulassen kann.

So stellt bei einer Etablierung einer *in vivo* verwendbaren Beschichtung die in diesem Modellsystem verwendete Hydrogelmatrix eine Herausforderung dar. Zwar war das Ziel dieser Arbeit die Generierung eines Modellsystems auf Polyacrylamidbasis, allerdings muss festgestellt werden, dass für eine mögliche *in vivo* Verwendung eine neue, biokompatible Matrix etabliert werden muss. Hierfür kann die Verwendung des PAAm/Alginat-Hybridhydrogels bereits eine Grundlage darstellen, wenn man die

Verwendung anderer Polysaccharide wie Hyaluronsäure als Hydrogelmatrix in Betracht ziehen würde.

Im Rahmen dieser Untersuchung muss auch ein geeignetes Antikörper/Antigensystem etabliert werden. Zwar weisen die Untersuchungen von Miyata et al. [19–22] sowie eigene Ergebnisse (vgl. **Abbildung 43**) auf die Möglichkeit einer stimulusinduzierten Freisetzung hin, jedoch bisher nur für physiologisch nicht relevante Biomoleküle. Eine Möglichkeit hier einen Schritt in Richtung einer wirklich schaltbaren Hydrogelmatrix, auch in diesem Schichtdickenbereich zu machen, wäre die Verwendung von Aptameren [133]. Da es sich bei Aptameren um kurzkettige Nucleotide oder Peptidsequenzen handelt, welche sogar niedermolekulare Stoffe wie Aminosäuren oder auch Virusbestandteile ähnlich stark wie Antikörper binden können [133], ergibt sich hierdurch die Möglichkeit selbst kleine Zielmoleküle als Target zu verwenden. Ein wesentlicher Vorteil ist auf Grund der Größe der Aptamere und zugehörigen Bindungspartner allerdings auch die Möglichkeit einer wesentlich engmaschigeren Verwendung des Hydrogels als es für bei Antigen/Antikörper-Crosslinkern möglich ist. Ob ein Affinitätsverlust in Folge der Modifizierung im Hydrogel zu erwarten wäre, müsste hier allerdings noch getestet werden.

Bei einer Veränderung des Hydrogeltyps müsste folgend allerdings auch die Ankopplung des Hydrogels sowie die Biokompatibilität der Hydrogele nochmals untersucht werden. Diese zeigte für die getesteten Systeme (namentlich: semi-IPN PAAm-Hydrogele (7,5% (w/w), 117/1 (gekoppelt ohne und mit Insulin) sowie ein PAAm/Alginat-Hybridhydrogel) geringe Biokompatibilitätswerte und bedarf weiterer Untersuchungen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass eine Kopplung mit Protein (hier: Insulin) offenbar eine Verbesserung der Biokompatibilität mit sich bringt.

So ist aus Schlussbemerkung festzuhalten, dass im Rahmen dieser Arbeit die Grundlagen zur Generierung eines stimulusresponsiven, implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems gelegt werden konnten. So wurden die Methodiken der Netzwerksynthese, ihrer Charakterisierung, der Synthese auf Implantatoberflächen wie auch der Wirkstoffinkorporation etabliert. Auf Grund des großen Rahmens an Variationen sind jedoch bis zu einer erfolgreichen Etablierung einer solchen Beschichtung noch einige Untersuchungen durchzuführen.

## Anhang

### III. Literaturverzeichnis

- [1] Johann Wolfgang von Goethe, Götz von Berlichingen, available at [www.digbib.org/Johann\\_Wolfgang\\_von\\_Goethe\\_1749/Goetz\\_von\\_Berlichingen](http://www.digbib.org/Johann_Wolfgang_von_Goethe_1749/Goetz_von_Berlichingen) (accessed on February 6, 2014).
- [2] Die Welt (15 February 2011).
- [3] Scinexx (14 February 2011).
- [4] Der Spiegel (28 July 2007).
- [5] J. Finch, The ancient origins of prosthetic medicine, *Lancet* 377 (2011) 548–549.
- [6] W.A. Wagle, Toe prosthesis in an Egyptian human mummy, *American Journal of Roentgenology* 162 (1994) 999–1000.
- [7] M.J. Becker, Etruscan Gold Dental Appliances: Three Newly "Discovered" Examples, *American Journal of Archaeology* 103 (1999) 103–111.
- [8] A.G. Carmichael, *Medizin in Literatur und Kunst*, Könnemann, Köln, 1994.
- [9] E. Wintermantel, S.-W. Ha, *Medizintechnik: Life Science Engineering ; Interdisziplinarität, Biokompatibilität, Technologien, Implantate, Diagnostik, Werkstoffe, Zertifizierung, Business/* Erich Wintermantel; Suk-Woo Ha, 5th ed., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2009.
- [10] K. Sternberg, S. Kramer, C. Nischan, N. Grabow, T. Langer, G. Hennighausen, K.-P. Schmitz, In vitro study of drug-eluting stent coatings based on poly(l-lactide) incorporating cyclosporine A – drug release, polymer degradation and mechanical integrity, *J Mater Sci: Mater Med* 18 (2007) 1423-1432.
- [11] P. Lanzer, K. Sternberg, K.-P. Schmitz, F. Kolodgie, G. Nakazawa, R. Virmani, Drug-Eluting Coronary Stent Very Late Thrombosis Revisited, *Herz* 33 (2008) 334-342.
- [12] A. Bohl, H.W. Rohm, P. Ceschi, G. Paasche, A. Hahn, S. Barcikowski, T. Lenarz, T. Stöver, H.-W. Pau, K.-P. Schmitz, K. Sternberg, Development of a specially tailored local drug delivery system for the prevention of fibrosis after insertion of cochlear implants into the inner ear, *J Mater Sci: Mater Med* 23 (2012) 2151–2162.
- [13] K. Sternberg, S. Petersen, N. Grabow, V. Senz, H.M. zu Schwabedissen, H.K. Kroemer, K.-P. Schmitz, Implant-associated local drug delivery systems based on biodegradable polymers: customized designs for different medical applications, *Biomed Tech (Berl)* 58 (2013) 417–427.

- [14] P. Wu, D.W. Grainger, Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis, *Biomaterials* 27 (2006) 2450–2467.
- [15] S.P. Schwarzacher, Neue Therapieansätze zur Korrektur der Endothelfunktion nach Ballondilatation, *Journal für Kardiologie-Austrian Journal of Cardiology* 7 (2000) 14–17.
- [16] C. Goshgarian, A. Alwaki, A. Lugo, T. Abdelhak, Nafcillin® and Rifampin® Therapy for MSSA Ventriculitis Associated With CSF Shunt; A Case Report (P3.310), *Neurology* 82 (2014) P3.310.
- [17] van de Belt, H, D. Neut, Uges, D. R. A, W. Schenk, van Horn, J. R, van der Mei, H. C, H.J. Busscher, Surface roughness, porosity and wettability of gentamicin-loaded bone cements and their antibiotic release, *Biomaterials* 21 (2000) 1981–1987.
- [18] N.A. Peppas, B.V. Slaughter, M.A. Kancelberger, 9.20 - Hydrogels, in: Editors-in-Chief: Krzysztof Matyjaszewski, Martin Möller (Eds.), *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, Elsevier, Amsterdam, 2012, pp. 385–395.
- [19] T. Miyata, N. Asami, T. Uragami, A reversibly antigen-responsive hydrogel, *Nature* 399 (1999) 766–769.
- [20] T. Miyata, T. Uragami, K. Nakamae, Biomolecule-sensitive hydrogels, *Recent Developments in Hydrogels* 54 (2002) 79–98.
- [21] T. Miyata, N. Asami, K. Okawa, T. Uragami, Rapid response of a poly(acrylamide) hydrogel having a semi-interpenetrating polymer network structure, *Polym. Adv. Technol.* 17 (2006) 794–797.
- [22] T. Miyata, N. Asami, T. Uragami, Structural design of stimuli-responsive bioconjugated hydrogels that respond to a target antigen, *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* 47 (2009) 2144–2157.
- [23] Yie W. Chien, Senshang Lin, Drug Delivery: Controlled Release, in: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Third Edition, Taylor & Francis, 2013, pp. 1082–1103.
- [24] W. Forth, Forth/Henschler/Rummel/Förstermann/Starke, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker*, 8th ed., Urban & Fischer, München [u.a.], 2001.
- [25] D. Steinhilber, H.J. Roth, M. Schubert-Zsilavecz, Steinhilber-Schubert-Zsilavecz-Roth ..., *Medizinische Chemie: Targets und Arzneistoffe ; 157 Tabellen*, Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart, 2005.

- [26] N.X. Wang, H.A. von Recum, Affinity-Based Drug Delivery, *Macromol. Biosci.* 11 (2011) 321–332.
- [27] V.V. Ranade, J.B. Cannon, *Drug delivery systems*, 3rd ed., CRC Press, Boca Raton [u.a.], 2011.
- [28] A. Hentrich, *Herstellung von polymeren Stents als Drug-delivery-Systeme durch Tauchen aus der Polymerlösung*, Univ.-Verl. der TU, Berlin, 2005.
- [29] L.T. Fan, S.K. Singh, *Controlled Release: A Quantitative Treatment*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1989.
- [30] Craig, Duncan Q. M, The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers, *International Journal of Pharmaceutics* 231 (2002) 131–144.
- [31] M. Hombreiro-Pérez, J. Siepmann, C. Zinutti, A. Lamprecht, N. Ubrich, M. Hoffman, R. Bodmeier, P. Maincent, Non-degradable microparticles containing a hydrophilic and/or a lipophilic drug: preparation, characterization and drug release modeling, *Journal of Controlled Release* 88 (2003) 413–428.
- [32] K.H. Bauer, K.-H. Frömming, C. Führer, H. Egermann, *Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie*, 6th ed., Wissenschaftliche Verlagsges, Stuttgart, 1999.
- [33] T. Freier, C. Kunze, C. Nischan, S. Kramer, K. Sternberg, M. Saß, U.T. Hopt, K.-P. Schmitz, In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate), *Biomaterials* 23 (2002) 2649–2657.
- [34] D.N. Theodorou, Molecular simulations of sorption and diffusion in amorphous polymers, *PLASTICS ENGINEERING-NEW YORK-* 32 (1996) 67–142.
- [35] C.-D. Herzfeldt, J. Kreuter, *Kinetik*, pp. 387–583.
- [36] G.C. Charalambopoulou, E.S. Kikkinides, K.G. Papadokostaki, A.K. Stubos, A.T. Papaioannou, Numerical and experimental investigation of the diffusional release of a dispersed solute from polymeric multilaminate matrices, *Journal of Controlled Release* 70 (2001) 309–319.
- [37] L.S. Nair, C.T. Laurencin, Biodegradable polymers as biomaterials, *Polymers in Biomedical Applications* 32 (2007) 762–798.
- [38] O. Pillai, R. Panchagnula, Polymers in drug delivery, *Current opinion in chemical biology* 5 (2001) 447–451.
- [39] Y. Qiu, K. Park, Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, Most cited papers in the history of advanced drug delivery reviews: A tribute to the 25<sup>th</sup> anniversary of the journal 64 (2012) 49–60.

- [40] K. Wulf, M. Teske, M. Löbner, F. Luderer, K.-P. Schmitz, K. Sternberg, Surface functionalization of poly( $\epsilon$ -caprolactone) improves its biocompatibility as scaffold material for bioartificial vessel prostheses, *J. Biomed. Mater. Res.* 98 (2011) 89–100.
- [41] D.F. Stamatialis, B.J. Papenburg, M. Gironés, S. Saiful, S.N.M. Bettahalli, S. Schmitmeier, M. Wessling, Medical applications of membranes: drug delivery, artificial organs and tissue engineering, *Journal of Membrane Science* 308 (2008) 1–34.
- [42] J.J. Kim, K. Park, Modulated insulin delivery from glucose-sensitive hydrogel dosage forms, *Journal of Controlled Release* 77 (2001) 39–47.
- [43] S.K. Deo, E.A. Moschou, S.F. Peteu, L.G. Bachas, S. Daunert, P.E. Eisenhardt, M.J. Madou, Peer reviewed: Responsive drug delivery systems, *Analytical chemistry* 75 (2003) 206 A-213 A.
- [44] O. WICHTERLE, D. LÍM, Hydrophilic Gels for Biological Use, *Nature* 185 (1960) 117–118.
- [45] S.C. Lee, I.K. Kwon, K. Park, Hydrogels for delivery of bioactive agents: A historical perspective, *Advanced Drug Delivery: Perspectives and Prospects* 65 (2013) 17–20.
- [46] W. Heitz, W. Krappitz, C. Stützel-Bilbao, B. Neumann, Synthese und eigenschaften von polymeren hydrogelen, *Angew. Makromol. Chemie* 123 (1984) 147–173.
- [47] A. Burger, C. Hunnius, Hunnius pharmazeutisches Wörterbuch, 7th ed., De Gruyter, Berlin [u.a.], 1993.
- [48] N.A. Peppas, J.Z. Hilt, A. Khademhosseini, R. Langer, Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology, *Adv. Mater.* 18 (2006) 1345–1360.
- [49] N.A. Peppas, Hydrogels and drug delivery, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2 (1997) 531–537.
- [50] J. Thiel, G. Maurer, J.M. Prausnitz, Hydrogele: Verwendungsmöglichkeiten und thermodynamische Eigenschaften, *Chemie Ingenieur Technik* 67 (1995) 1567–1583.
- [51] R.M. Ottenbrite, S.J. Huang, K. Park, Hydrogels and biodegradable polymers for bioapplications, American Chemical Society, Washington, D.C, 1996.
- [52] Z. Liu, Y. Miao, Z. Wang, G. Yin, Synthesis and characterization of a novel super-absorbent based on chemically modified pulverized wheat straw and acrylic acid, *Carbohydrate Polymers* 77 (2009) 131–135.

- [53] T. Nishikawa, K. Akiyoshi, J. Sunamoto, Macromolecular Complexation between Bovine Serum Albumin and the Self-Assembled Hydrogel Nanoparticle of Hydrophobized Polysaccharides, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 6110–6115.
- [54] I. Björk, B.-Å. Petersson, J. Sjöquist, Some Physicochemical Properties of Protein A from *Staphylococcus aureus*, *European Journal of Biochemistry* 29 (1972) 579–584.
- [55] Y. Walbroehl, J.W. Jorgenson, Capillary zone electrophoresis for the determination of electrophoretic mobilities and diffusion coefficients of proteins, *J. Micro. Sep.* 1 (1989) 41–45.
- [56] R. Heidi, T. Patricia-Ann, Der Merwe Thilo Lothar, V., Controlled release products, Google Patents, 1997, available at <http://www.google.com.ar/patents/WO1997006787A2?cl=pt-PT>.
- [57] R.F. Ofstead, C.I. Poser, Semicrystalline Poly(vinyl alcohol) Hydrogels, pp. 61–72.
- [58] R.S. Harland, N.A. Peppas, Solute diffusion in swollen membranes VII. Diffusion in semicrystalline networks, *Colloid & Polymer Sci* 267 (1989) 218–225.
- [59] E.M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications, *Journal of Advanced Research*.
- [60] A.D. Jenkins, P. Kratochvil, R.F. Stepto, U.W. Suter, Glossary of basic terms in polymer science (IUPAC Recommendations 1996), *Pure and applied chemistry* 68 (1996) 2287–2311.
- [61] A.K. Gaharwar, N.A. Peppas, A. Khademhosseini, Nanocomposite hydrogels for biomedical applications, *Biotechnology and bioengineering* 111 (2014) 441–453.
- [62] M. Friedman, Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 4504–4526.
- [63] A.S. Hoffman, Hydrogels for biomedical applications, *Advanced drug delivery reviews* 54 (2002) 3–12.
- [64] E. Dickinson, Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers, 9th International Hydrocolloids Conference 23 (2009) 1473–1482.
- [65] H.H. Tønnesen, J. Karlsen, Alginate in drug delivery systems, *Drug Development and Industrial Pharmacy* 28 (2002) 621–630.
- [66] A. Imeson (Ed.), *Thickening and Gelling Agents for Food*, Springer US, Boston, MA, s.l, 1992.
- [67] S.B. Cohen, C.M. Meirisch, H.A. Wilson, D.R. Diduch, The use of absorbable copolymer pads with alginate and cells for articular cartilage repair in rabbits, *Biomaterials* 24 (2003) 2653–2660.

- [68] D. Kershaw, Mahoney, Peter Michael John, Alginate wound dressings, Google Patents, 1999.
- [69] W. Paul, C.P. Sharma, Chitosan and alginate wound dressings: a short review, *Trends Biomater Artif Organs* 18 (2004) 18–23.
- [70] W. Cook, Alginate dental impression materials: chemistry, structure, and properties, *Journal of biomedical materials research* 20 (1986) 1–24.
- [71] W.H. Thomin, G. Heuten, Spezielle Fragen bei der Anwendung von Stärke in der Papierindustrie, *Starch/Stärke* 26 (1974) 301–307.
- [72] F.W. Bai, W.A. Anderson, M. Moo-Young, Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks, *Biotechnology advances* 26 (2008) 89–105.
- [73] S. Taylor, R.H. Walter, The chemistry and technology of pectin, Academic Press, 1992.
- [74] K. Itoh, M. Yahaba, A. Takahashi, R. Tsuruya, S. Miyazaki, M. Dairaku, M. Togashi, R. Mikami, D. Attwood, In situ gelling xyloglucan/pectin formulations for oral sustained drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics* 356 (2008) 95–101.
- [75] M. Holtzhauer, *Biochemische Labormethoden: Mit 79 Tabellen*, 3rd ed., Springer, Berlin [u.a.], 1997.
- [76] 12: Final Report on the Safety Assessment of Polyacrylamide, *Int. J. of Toxicology* 10 (1991) 193–203.
- [77] A. Pourjavadi, G.R. Mahdavinia, Superabsorbency, pH-Sensitivity and Swelling Kinetics of Partially Hydrolyzed Chitosan-g-poly (Acrylamide) Hydrogels, *Turkish Journal of Chemistry* 30 (2006) 595.
- [78] H.A. Abd El-Rehim, Swelling of radiation crosslinked acrylamide-based microgels and their potential applications, *Radiation Physics and Chemistry* 74 (2005) 111–117.
- [79] Maitin BK (Ed.), *Performance analysis of several polyacrylamide floods in North German oil fields*, Society of Petroleum Engineers, 1992.
- [80] A. Göthlich, S. Koltzenburg, G. Schornick, Funktionale Polymere im Alltag: Vielseitig, *Chemie in unserer Zeit* 39 (2005) 262–273.
- [81] R. Sokiranski, J. Görich, H. Ahlen, N. Rilinger, J. Vogel, H.-J. Brambs (Eds.), *Superselektive Embolisation von Tumorknoten in Einzelniere bei inoperablen Patienten*, © Georg Thieme Verlag Stuttgart· New York, 1996.

- [82] C.E. Schildknecht, Polyvinyl alcohol, properties and applications, CA Finch, Wiley, New York, 1973. 622 pp. \$37.50, Wiley Online Library, 1974.
- [83] M. Hua, C.C. Lau, I.K. Hui, J. Li, Limit analysis on surface roughness and dimensional accuracy of spray metallic crust for rapid tooling production by metal arc spraying process, *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology* 23 (2004) 720–731.
- [84] C.C. DeMerlis, Schoneker, Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA), *Food and Chemical Toxicology* 41 (2003) 319–326.
- [85] T. Schuman, M. Wikström, M. Rigdahl, Coating of surface-modified papers with poly (vinyl alcohol), *Surface and Coatings Technology* 183 (2004) 96–105.
- [86] M.A. LEMP, Artificial tear solutions, *International ophthalmology clinics* 13 (1973) 221–230.
- [87] M. Dreifus, Pioneer Works in Soft Contact Lens Equipment, *Eye & Contact Lens* 1 (1975) 131–140.
- [88] G.J. Bruin, J.P. Chang, R.H. Kuhlman, K. Zegers, J.C. Kraak, H. Poppe, Capillary zone electrophoretic separations of proteins in polyethylene glycol-modified capillaries, *Journal of Chromatography A* 471 (1989) 429–436.
- [89] J. Yang, M.H. Shen, Polyethylene glycol-mediated cell fusion, in: *Nuclear Reprogramming*, Springer, 2006, pp. 59–66.
- [90] J.E. Suarez, K.F. Chater, Polyethylene glycol-assisted transfection of *Streptomyces* protoplasts, *Journal of bacteriology* 142 (1980) 8–14.
- [91] A. Laghi, Contrast enhanced magnetic resonance imaging of the terminal ileum in children with Crohn's disease, *Gut* 52 (2003) 393–397.
- [92] L. Lazzarini, M. Laurenzi Tabasso, *Il restauro della pietra*, Antonio Milani, Padova, 1986.
- [93] S. Zalipsky, C. Gilon, A. Zilkha, Attachment of drugs to polyethylene glycols, *European Polymer Journal* 19 (1983) 1177–1183.
- [94] D.L. Hern, J.A. Hubbell, Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing, *Journal of biomedical materials research* 39 (1998) 266–276.
- [95] R.P. Sebra, K.S. Masters, C.N. Bowman, K.S. Anseth, Surface Grafted Antibodies: Controlled Architecture Permits Enhanced Antigen Detection, *Langmuir* 21 (2005) 10907–10911.

- [96] H. Otsuka, Y. Nagasaki, K. Kataoka, PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications, *Biomedical Micro- and Nano-technology* 55 (2003) 403–419.
- [97] H. Omidian, J.G. Rocca, K. Park, Elastic, Superporous Hydrogel Hybrids of Polyacrylamide and Sodium Alginate, *Macromol. Biosci.* 6 (2006) 703–710.
- [98] J.-Y. Sun, X. Zhao, W.R.K. Illeperuma, O. Chaudhuri, K.H. Oh, D.J. Mooney, J.J. Vlassak, Z. Suo, Highly stretchable and tough hydrogels, *Nature* 489 (2012) 133–136.
- [99] C.H. Yang, M.X. Wang, H. Haider, J.H. Yang, J.-Y. Sun, Y.M. Chen, J. Zhou, Z. Suo, Strengthening Alginate/Polyacrylamide Hydrogels Using Various Multivalent Cations, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5 (2013) 10418–10422.
- [100] D.E. Owens, Y. Jian, J.E. Fang, B.V. Slaughter, Y.-H. Chen, N.A. Peppas, Thermally Responsive Swelling Properties of Polyacrylamide/Poly(acrylic acid) Interpenetrating Polymer Network Nanoparticles, *Macromolecules* 40 (2007) 7306–7310.
- [101] M. Caldorera-Moore, N. Guimard, L. Shi, K. Roy, Designer nanoparticles: incorporating size, shape and triggered release into nanoscale drug carriers, *Expert Opin. Drug Deliv.* 7 (2010) 479–495.
- [102] S. Petersen, I. Minrath, S. Kaule, J. Köcher, K.-P. Schmitz, K. Sternberg, Development and in Vitro Characterization of Photochemically Crosslinked Polyvinylpyrrolidone Coatings for Drug-Coated Balloons, *Coatings* 3 (2013) 253–267.
- [103] G. D’Errico, M. de Lellis, G. Mangiapia, A. Tedeschi, O. Ortona, S. Fusco, A. Borzacchiello, L. Ambrosio, Structural and mechanical properties of UV-photo-cross-linked poly (N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels, *Biomacromolecules* 9 (2007) 231–240.
- [104] A.D. McNaught, *Compendium of chemical terminology*, Blackwell Science Oxford, 1997.
- [105] P. Matricardi, C. Di Meo, T. Coviello, W.E. Hennink, F. Alhaique, Interpenetrating Polymer Networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering, *Polysaccharide-based systems in drug and gene delivery* 65 (2013) 1172–1187.

- [106] J.W. Lee, S.Y. Kim, S.S. Kim, Y.M. Lee, K.H. Lee, S.J. Kim, Synthesis and characteristics of interpenetrating polymer network hydrogel composed of chitosan and poly(acrylic acid), *J. Appl. Polym. Sci.* 73 (1999) 113–120.
- [107] A. Bajpai, J. Bajpai, S. Shukla, Water sorption through a semi-interpenetrating polymer network (IPN) with hydrophilic and hydrophobic chains, *Reactive and Functional Polymers* 50 (2002) 9–21.
- [108] S.-P. Zhao, D. Ma, L.-M. Zhang, New Semi-Interpenetrating Network Hydrogels: Synthesis, Characterization and Properties, *Macromol. Biosci.* 6 (2006) 445–451.
- [109] H. Park, K. Park, W.S.W. Shalaby, *Biodegradable hydrogels for drug delivery*, CRC Press, 2011.
- [110] A. Faller, M. Schünke, *Der Körper des Menschen: Einführung in Bau und Funktion*, 13th ed., Thieme, Stuttgart [u.a.], 1999.
- [111] K. Ishihara, M. Kobayashi, N. Ishimaru, I. Shinohara, Glucose Induced Permeation Control of Insulin through a Complex Membrane Consisting of Immobilized Glucose Oxidase and a Poly(amine), *Polym J* 16 (1984) 625–631.
- [112] G. Albin, T.A. Horbett, B.D. Ratner, Glucose sensitive membranes for controlled delivery of insulin: Insulin transport studies, *Journal of Controlled Release* 2 (1985) 153–164.
- [113] J. Kost, T.A. Horbett, B.D. Ratner, M. Singh, Glucose-sensitive membranes containing glucose oxidase: Activity, swelling, and permeability studies, *J. Biomed. Mater. Res.* 19 (1985) 1117–1133.
- [114] H. Ghandehari, P. Kopečková, J. Kopeček, In vitro degradation of pH-sensitive hydrogels containing aromatic azo bonds, *Biomaterials* 18 (1997) 861–872.
- [115] E.O. Akala, P. Kopečková, J. Kopeček, Novel pH-sensitive hydrogels with adjustable swelling kinetics, *Biomaterials* 19 (1998) 1037–1047.
- [116] J. Kost, R. Langer, Responsive polymeric delivery systems, Special issue dedicated to Dr. Eric Tomlinson, *Advanced Drug Delivery Reviews, A Selection of the Most Highly Cited Articles, 1991-1998* 46 (2001) 125–148.
- [117] Y. Suzuki, M. Tanihara, Y. Nishimura, K. Suzuki, Y. Kakimaru, Y. Shimizu, A new drug delivery system with controlled release of antibiotic only in the presence of infection, *J. Biomed. Mater. Res.* 42 (1998) 112–116.
- [118] S.G. Shoemaker, A.S. Hoffman, J.H. Priest, Synthesis and properties of vinyl monomer/enzyme conjugates, *Appl Biochem Biotechnol* 15 (1987) 11–24.

- [119] H.J. van der Linden, S. Herber, W. Olthuis, P. Bergveld, Stimulus-sensitive hydrogels and their applications in chemical (micro)analysis, *Analyst* 128 (2003) 325–331.
- [120] X. Feng, X. Guo, K. Qiu, Studies on the initiation mechanism of persulfate/aliphatic secondary amine system in vinyl polymerization, *Polymer Bulletin* 18 (1987).
- [121] I. Minrath, S. Petersen, K.P. Schmitz, K. Sternberg, Continuative Studies for Inserting Stimulus-Responsive Functions in Hydrogels for Local Drug Delivery, *Biomed Tech (Berl)* (2013).
- [122] L. Gao, S. Liu, Cross-Linked Polyacrylamide Coating for Capillary Isoelectric Focusing, *Anal. Chem.* 76 (2004) 7179–7186.
- [123] I. Minrath, O. Sahmel, R.L. Weiß, K.P. Schmitz, K. Sternberg, S. Petersen, Linker-mediated attachment of switchable, drug delivering hydrogels to structured surfaces; Track A: Biomaterials and Biocompatibility, *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik* 59 (2014) 101–103.
- [124] I.P.M. Minrath, S. Petersen, K.-P. Schmitz, K. Sternberg, Drug permeation studies of hydrogels usable for stimulus-induced local drug delivery systems, *Biomed Tech (Berl)* (2012).
- [125] C. Wischke, H.-H. Borchert, Fluorescein isothiocyanate labelled bovine serum albumin (FITC-BSA) as a model protein drug: opportunities and drawbacks, *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences* 61 (2006) 770–774.
- [126] J. Ohnsorge, R. Holm, *Rasterelektronenmikroskopie: Eine Einführung für Mediziner und Biologen*, Thieme, Stuttgart, 1973.
- [127] M. Teske, Nass-und plasmachemische Oberflächenmodifizierung biodegradierbarer, polymerer Implantatwerkstoffe unter Immobilisierung von Wirkstoffen zur Optimierung der Zelle-Implantat-Interaktion.
- [128] D.Y. Kwok, C.N. Lam, A. Li, A. Leung, R. Wu, E. Mok, A.W. Neumann, Measuring and interpreting contact angles: a complex issue, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 142 (1998) 219–235.
- [129] N. Kanani, *Galvanotechnik: Grundlagen, Verfahren, Praxis*, Hanser, München, 2000.
- [130] C. Kamseder, *Konfokale Mikroskopie: Seminarvortrag*, Regensburg, WS 2003/2004.
- [131] C. Derks, *Konfokale Mikroskopie*, Osnabrück, 2007.
- [132] I. Minrath, D. Arbeiter, K.-P. Schmitz, K. Sternberg, S. Petersen, In vitro characterization of polyacrylamide hydrogels for application as implant coating for stimulus-responsive local drug delivery, *Polym. Adv. Technol.* (2014) n/a.

- [133] E. Friedrichs, F.C. Simmel, Controlling DNA polymerization with a switchable aptamer, *Chembiochem* 8 (2007) 1662–1666.

#### IV. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1** Beinamputation (Serratura), 1517 kolorierter Holzschnitt auf wiederverwendetem Papier, 20 x 12,7 cm. Johann Wechtlin, aus Hans von Gersdorffs "Feldbuch der Wundarztney", SmithKline Beckman Corporation Fund, Philadelphia Museum of Art [8].....2
- Abbildung 2** Transplantation eines Beines durch die Heiligen Cosmas und Damian, um 1500. Altarbild aus Schwaben, 106 x 63 cm. Württembergisches Landesmuseum, Stuttgart [8].....2
- Abbildung 3** Schematische Darstellung der Akkumulation eines Wirkstoffes infolge mehrfacher Verabreichungen ( $A_1, A_2, \dots$ ) bis zum Einstellen eines Fließgleichgewichtes („steady state“) [24]. Dem gegenüber dargestellt ist das ideale Wirkstofffreisetzungsprofil (B) [23]..... 5
- Abbildung 4** Einteilung von DDS in verschiedene Freisetzungsklassen [27]. Bei den vom Prinzip der Arbeit nahestehenden Klassen handelt es sich um die diffusionskontrollierten, die lösungsmittelaktivierten sowie die chemisch kontrollierten Wirkstofffreisetzungssysteme. Mit Rot unterlegt sind außerdem die durch Magnetismus kontrollierten Systeme dargestellt, auf welche infolge zu weiter thematischer Abweichung nicht weiter eingegangen wird..... 6
- Abbildung 5** Idealisiertes Wirkstofffreisetzungsprofil eines Membransystems gegenüber dem eines Matrixsystems (links) und Aufbau dieser Systeme (rechts) [28]..... 8
- Abbildung 6** Verschiedene Stimulusarten, auf welche Hydrogele stimulusinduzierter Wirkstoff-freisetzung reagieren können [39]..... 11
- Abbildung 7** Prinzip der Quellung in Anwesenheit bzw. Abwesenheit eines wässrigen Mediums..... 13
- Abbildung 8** Exemplarische Darstellung möglicher Wechselwirkungen innerhalb eines Hydrogelverbundes [56]..... 14
- Abbildung 9** Reaktionsprodukte des mutagen wirkenden Acrylamids (in vitro) sowie dem Metaboliten Glycidamid (in vivo) mit den elektronenreichen DNA-Bausteinen Adenin, Guanin und Cytosin [62].....15
- Abbildung 10** Polyacrylamid/Alginat-Hybridgel [98]. Schema eines Alginathydrogels (a) mit der chemischen Struktur der alternierenden  $\alpha$ -L-Glucuronsäure- und  $\beta$ -D-

Mannuronsäure-Bausteine ( $a^1$ ) sowie der mit  $Ca^{2+}$ -Ionen entstehenden Eggbox-Struktur ( $a^2$ ). Unter (b) dargestellt ist neben der schematischen Darstellung die chemische Formel von Polyacrylamid ( $b^1$ ). Rechts dargestellt ist neben der schematischen Darstellung des Hybridgels (c) auch ein Ausschnitt der chemischen Struktur des Netzwerkes ( $c^1$ )..... 17

**Abbildung 11** Mögliche Aufgliederung von Hydrogelen in verschiedene Unterkategorien [18].....18

**Abbildung 12** Konventionelles Netzwerk (a). Verschränkt man in dieses Netzwerk lineare Polymerfasern, so erhält man ein semi-interpenetrating-Network (b). Unter (c) dargestellt liegt der verwendete Fall eines interpenetrating Network..... 19

**Abbildung 13** Freisetzung von Insulin aus einem potenziellen Freisetzungssystem. In diesem Freisetzungssystem wird ein Glukoseoxidase (rot) gekoppeltes Polyacrylamidhydrogel (blaue Faserstruktur) als Sensor- und Quellungsmatrix verwendet [111]. Eindringende Glukose (a) (blaue Dreiecke) wird durch die gebundene Glukoseoxidase zu Glukonsäure (grüne Dreiecke) umgewandelt (b), wobei als Nebenprodukt Protonen entstehen. Durch den sinkenden pH-Wert kommt es zu einem Quellen des Hydrogels und einer Freisetzung des Insulins (c) (grüne Ellipsen).....21

**Abbildung 14** Links: Varianten von pH-Wert gesteuerten Hydrogelen. Rechts: Dickdarmspezifisches Wirkstofffreisetzungssystem. Die in der stark sauren Magen Umgebung protoniert vorliegende PAA wird folgend bei steigendem pH-Wert deprotoniert und beginnt zu quellen. Die Wirkstofffreisetzung erfolgt jedoch erst im Dickdarmbereich durch die Degradation des Systems über eine Azoreduktase [39].....22

**Abbildung 15** Linke Seite: Crosslinkerdichte eines Gels mit eingelagerten Antikörpern (a) im Vergleich zu einem semi-IPN Hydrogel (b). Zu sehen ist, dass sich die Dichte an Crosslinkern in dem semi-IPN-Hydrogel wesentlich stärker an dem zugegeben Antigen orientiert als diejenige des Gels mit eingelagerten Antikörpern [22]. Rechte Seite: Reversibles Quellverhalten und antigen-gesteuertes Permeationsverhalten eines semi-IPN-Hydrogels. Gezeigt werden die Wechsel im Quellverhalten von Polyacrylamid (weiße Punkte) und von Antigen-Antikörper-funktionalisierten Gelen (schwarze Punkte) in

Abhängigkeit des frei vorliegenden Antigens. Des Weiteren ist das Permeationsprofil des Modellwirkstoffes Hämoglobin ebenfalls als Funktion des frei vorliegenden Antigens dargestellt [19].....	24
<b>Abbildung 16</b> Übersichtsgrafik der Arbeitspunkte.....	25
<b>Abbildung 17</b> Schematische Darstellung des stimulusresponsiven implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems auf Basis eines Alginat/Polyacrylamid-Hybridhydrogels mit gekoppelten Insulin/Anti-Insulin-Crosslinkerstrukturen und in die Kavitäten eingebrachtem BSA-FITC als Modellwirkstoff (A) im geschlossenen Zustand (links) und nach Zugabe des Stimulus im freisetzenden Zustand (rechts). Verwendet wurden 9 mm CrNi-Edelstahl-Plättchen (B, Vorderseite; C, Rückseite) mit 0,8 mm Bohrungen. Schematische Darstellung (D).....	26
<b>Abbildung 18</b> Mögliche Variante der Initiation der radikalischen Polymerisationsreaktion durch TEMED und APS (A) mit Zwischenstufen bis zur Bildung möglicher Radikale (1),(2),(3). (B): Eine der möglichen Varianten des Kettenstarts durch ein freies Methylradikal des TEMED [120].....	29
<b>Abbildung 19</b> Modifizierung der verwendeten Proteine (Maus IgG/Insulin als Antigen bzw. Kaninchen Anti Maus IgG/ Anti-Insulin IgG als Antikörper) über Bildung eines Amides mittels der Verwendung von N-Succinimidylacrylat (NSA) [19,118].....	31
<b>Abbildung 20</b> Copolymerisation des modifizierten Antikörpers mit Acrylamid in der ersten Stufe zur Synthese der biokonjugierten semi-IPN-Hydrogele [19,118].....	33
<b>Abbildung 21</b> Einführen der biokonjugierten Polyacrylamidfasern in ein biokonjugiertes Polyacrylamidnetzwerk zur Generierung eines biokonjugierten semi-IPN-Netzwerkes [19,118].....	33
<b>Abbildung 22</b> Modifizierung der Substratoberfläche mit Niederdrucksauerstoffplasma (a). An die entstandenen Hydroxylgruppen wurden über eine Umsetzung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) und eine folgende Umsetzung mit N-Succinimidylacrylat (NSA) (b) oder alternativ mit 3-Methacrylpropyltrimethoxysilan (MPTMS) (b) endständige Vinylgruppen erzeugt.....	35

<b>Abbildung 23</b>	Schematischer Aufbau der Hydrogelbeschichtung. Auf die MPTMS-Gruppen (grün) werden in einer Copolymerisation AAm-Fasern aufpolymerisiert und in der Folge AAm/MBAA (blau) zu einem Netzwerk in die bereits bestehende Faserstruktur copolymerisiert.....	36
<b>Abbildung 24</b>	Dem Kammeraufbau zugrunde liegende Idee und die sich daraus ergebende Umsetzung in TEFLON/PET Ausführung.....	41
<b>Abbildung 25</b>	Komplexbildung des reduzierten, nun einwertigen, $\text{Cu}^+$ -Ions mit jeweils zwei Bicinchoninsäuremolekülen. Der entstehende violette Komplex wird spektrometrisch bei 560 nm detektiert.....	43
<b>Abbildung 26</b>	Darstellung (Fotografisch und schematisch) eines Zugversuches mit einem Schulterstab (Gelgehalt: 15%, 117/1(AAm/ MBAA), semi-IPN) (A) und einer Haftfestigkeitsmessung (B)(Alginat/PAAm-Hybrid Hydrogel).....	48
<b>Abbildung 27</b>	Permeation der Modellwirkstoffe (BSA, Protein A und Myoglobin) durch PAAm Hydrogele (Dicke: 2 mm; Vernetzungsgrad: 117/1 (AAm/MBAA); Gelarchitektur: semi-IPN) in Abhängigkeit eines Gelgehaltes zwischen 7,5 und 30 %. Die Permeation wird dargestellt in [%] des freigesetzten Modellwirkstoffes nach 72 Stunden. Balken zeigen den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von mindestens vier Experimenten.....	51
<b>Abbildung 28</b>	Permeation der Modellwirkstoffe BSA, Protein A und Myoglobin durch PAAm Hydrogele (Dicke: 2 mm; Gelgehalt: 7,5 %, 15 %, 22,5 %, 30 %; Vernetzungsgrad: 117/1 (AAm/MBAA); Gelarchitektur: semi-IPN). Die Permeation wird dargestellt in [%] des freigesetzten Modellwirkstoffes nach 72 Stunden. Balken zeigen den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von mindestens vier Experimenten.....	52
<b>Abbildung 29</b>	Permeation des Modellwirkstoffes BSA durch semi-IPN-PAAm Hydrogele unterschiedlicher Vernetzungsgrade (Dicke: 2 mm; Gelgehalte: 7,5 %, 15 %, 22,5 % und 30 %; Gelarchitektur: semi-IPN). Die Permeation wird dargestellt in [%] des freigesetzten Modellwirkstoffes nach 72 Stunden. Balken zeigen den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von mindestens vier Experimenten...	52
<b>Abbildung 30</b>	Permeation der Modellwirkstoffe (BSA, Protein A und Myoglobin) durch PAAm Hydrogele unterschiedlicher Gelarchitektur (Dicke: 2 mm; Gelgehalt: 15 %; Vernetzungsgrad: 117/1). Permeation wird dargestellt in [%] des	

freigesetzten Modellwirkstoffes nach 72 Stunden. Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens vier Experimenten..... 53

**Abbildung 31** Bruchdehnung (A), Zugfestigkeit (B) und E-Modul (C) eines semi-IPN-PAAm-Hydrogels eines Vernetzungsgrades von 117/1 unterschiedlicher Gelgehalte nach ISO 527-4. Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens drei Experimenten..... 55

**Abbildung 32** Vergleichende Darstellung der Zugfestigkeit und des E-Moduls (A) sowie der Bruchdehnung (B) des PAAm/Alginat-Hybridhydrogels mit einem 7,5 und einem 15 %igen PAAm-Hydrogel (Vernetzungsgrad 117/1; Gelarchitektur: semi-IPN) nach ISO 527-4. Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens drei Experimenten..... 57

**Abbildung 33** BCA-Messung von Maus IgG, Kaninchen Anti-Maus IgG und Maus IgG/Kaninchen Anti-Maus IgG gekoppelten semi-IPN-PAAm-Hydrogelen (Geldicke: 2 mm; Gelgehalt: 7,5 %; Vernetzungsgrad: 117/1). Aufgetragen sind einerseits die für die einzelnen Proteine erhaltenen [ $\mu$ g]-Werte bezogen auf die jeweils je Protein eingesetzten Mengen (Maus IgG und Kaninchen Anti-Maus IgG) als aufsummierte Einzelmessung und andererseits die Werte [ $\mu$ g] der direkt vermessenen Kombination beider Proteine (Maus IgG/Kaninchen Anti-Maus IgG).....61

**Abbildung 34** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Insulin(FITC) inkubierten 10,4 %igen Polyacrylamid/Alginat-Hybridhydrogelen. Links dargestellt das Referenzhydrogel mit gekoppelten Antigen/Antikörperstrukturen (Insulin/Anti-Insulin), rechts dargestellt ein 10,4 %igen Polyacrylamid/Alginat-Hybridhydrogel mit Insulin/Anti-Insulin, ebenfalls inkubiert mit Insulin-(FITC)..... 63

**Abbildung 35** Kontaktwinkel von Wasser, bestimmt nach der Methode des liegenden Tropfens, unterschiedlich behandelte Glassubstrate. Neben dem unbehandelten Vergleichssubstrat sind die Kontaktwinkel von plasmaaktivierten, silaniserten (Plasma/APTES, Plasma/APTES/NSA und Plasma/MPTMS) und mit AAm-Fasern versehenen Proben (AAm-Fasern gekoppelt an Plasma/APTES/NSA- und Plasma/MPTMS-Oberflächen)

dargestellt. Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens fünf Experimenten..... 65

**Abbildung 36** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (1000x) zur Darstellung der oberflächenmorphologischen Veränderungen im Verlauf der Präparation: Unbehandeltes Glassubstrat (A), O<sub>2</sub>-Plasma aktiviertes Substrat (B), APTES (C) und APTES/NSA modifiziertes Substrat (D), MPTMS gekoppelte Oberfläche (E) sowie mit Polyacrylamid-Fasern versehene Oberfläche (F)... 66

**Abbildung 37** Schichtdicke der aufgetragenen Polyacrylamidfaser auf unbehandelten Glassubstraten, auf Glasprobenkörpern mit APTES/NSA- sowie mit MPTMS-Modifizierung. Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens 10 Experimenten..... 67

**Abbildung 38** Übersichtsdarstellung (A) sowie Detailaufnahme (B) der pipettierten Geloberfläche einer gequollenen PAAm-Hydrogel-Beschichtung (Gelgehalt: 15 % Vernetzungsgrad: 117/1) mittels Lichtmikroskopie. Schichtdickenmessung eines Messpunktes derselben Probe mittels konfokaler Lasermikroskopie (C)..... 67

**Abbildung 39** Schichtdickenmessung (A) einer gequollenen PAAm-Hydrogel-Beschichtung (Gelgehalt: 15 % Vernetzungsgrad: 117/1) von pipettierten Hydrogelen an drei verschiedenen Messpunkten (1,2,3). Balken geben den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens 10 Messungen je Messpunkt wieder. Schichtdickenmessung eines Messpunktes derselben Probe mittels konfokaler Lasermikroskopie (C)..... 68

**Abbildung 40** Schichtdicke hydrogelpräparierter Edelstahlsubstrate im gequollenen Zustand für vorpräparierte PAAm/Alginate-Hybridhydrogele mit 42,7  $\mu$ l Polymerlösung/1440 mm<sup>2</sup>, aufgebracht mit unterschiedlichen Klebervolumina. Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens fünf Experimenten..... 69

**Abbildung 41** Schichtdicke der mit einem Klebervolumen (AAm/MBAA) von 2  $\mu$ l/64 mm<sup>2</sup> auf 9 mm ( $\varnothing$ )-CrNi-Edelstahlsubstraten aufgetragenen Hydrogelbeschichtung aus vorpräparierten Hydrogelen (PAAm/Alginate-Hybridhydrogel, 42,7-341,6  $\mu$ l/1440 mm<sup>2</sup>) im gequollenen Zustand (A). (Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens fünf Experimenten)

Exemplarische Darstellung eines Messpunktes über konfokale Laserscanning-Mikroskopie für eine Probe mit 341,6 µl/1440 mm (B).....	70
<b>Abbildung 42</b> Abschälkraft (N/mm) verschiedener mit Haftvermittler aufgetragenen PAAm/Alginat-Hybrid-Hydrogele (vgl. <b>Kapitel 4.3.3.3</b> ) ohne den Zusatz von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sowie einem aufgetragenen PAAm-Hydrogel einer Schichtdicke von 450 µm und einer Referenz (aufgetragenes PAAm/Alginat-Hybridhydrogel einer Dicke von 450 µm) zum Vergleich.....	71
<b>Abbildung 43</b> Wirkstofffreisetzung über 72 Stunden von BSA durch IgG gekoppelte PAAm-Hydrogele (Gelgehalt: 15%; Vernetzungsgrad: 117/1; mit Maus IgG/Kaninchen Anti Maus IgG als stimulusresponsive Funktion) in Ab- und Anwesenheit von Maus IgG im Medium im Vergleich (Punkte zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung von vier Experimenten).....	73
<b>Abbildung 44</b> Permeation von BSA-FITC aus einem 10,4%igen Insulin und Anti-Insulin gekoppelten PAAm/Alginat-Hybridhydrogel, in Anwesenheit und Abwesenheit des Stimulus (Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung von mindestens 10 Experimenten).....	73
<b>Abbildung 45</b> Fotografische Aufnahme der in-vitro Freisetzung des BSA(FITC) aus mit unterschiedlichen Hybridhydrogelbeschichtungen versehenen CrNi-Edelstahlsubstraten von 9 mm Durchmesser zum Zeitpunkt t = 1h. Probe 1: nicht hydrogelassoziiertes Wirkstofffreisetzungssystem (WFS); 2-3: nicht stimulusresponsives hybridhydrogelassoziiertes WFS; 4-5: stimulusresponsives hybridhydrogelassoziiertes WFS ohne Stimulus; 6-7: stimulusresponsives hybridhydrogelassoziiertes WFS mit Stimulus.....	74
<b>Abbildung 46</b> Freisetzungsvorgang von BSA-FITC für verschiedene implantatassoziierte Wirkstofffreisetzungssysteme in Relation zu einem Wirkstoffträger ohne Hydrogelbeschichtung. Getestet wurden, über einen Zeitraum von 50 Stunden, eine nicht responsive PAAm/Alginat-Hybridhydrogelbeschichtung (10,4 %) sowie eine responsive PAAm/Alginat-Hybridhydrogel-beschichtung (10,4 %, mit Insulin/Anti-Insulin als stimulusresponsive Funktion) in An- und Abwesenheit von Insulin als Stimulus.....	75

## V. Tabellen- und Formelverzeichnis

### Tabellen

<b>Tabelle 1</b>	Beispiele von verschiedenen verwendeten Wirkstofffreisetzungssystemen (LDD) und deren Zielaufgaben anhand des zu heilenden Krankheitsbildes – sowie Beispiele für auf dem Markt befindliche Produkte.....	3
<b>Tabelle 2</b>	Beispiele natürlicher und künstlicher Hydrogele [18,49,63].....	15/16
<b>Tabelle 3</b>	Aufgliederung verschiedener Stimuli nach externer und interner Steuerung.	19
<b>Tabelle 4</b>	Überblick über die für die Herstellung der konventionellen Polyacrylamidhydrogele unterschiedlichen Gelgehaltes und Vernetzungsgrades verwendeten Volumina von 30%, 58/1 (AAm/MBAA in DPBS), 30% (AAm in DPBS) und DPBS.....	28
<b>Tabelle 5</b>	Die Synthese von semi-IPN-Hydrogelen basiert auf der Verwendung unterschiedlicher Acrylamid bzw. Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid-Monomer Lösungen. Die Werte der Konzentrationen, für die im Rahmen der Präparation angesetzten Lösungen, werden folgend für 58/1 und 117/1 (AAm/MBAA)-Verhältnisse in Stufe 1 als auch Stufe 2 dargestellt.....	29
<b>Tabelle 6</b>	Die Mischverhältnisse der in <b>Tabelle 5</b> dargestellten Lösungen mit DPBS-Puffer für die Synthese von semi-IPN-Hydrogelen unterschiedlicher Gelgehalte.....	30
<b>Tabelle 7</b>	Verwendete Volumina einer NSA-Lösung (10 mg/ml in DPBS) für die unterschiedlichen NSA-Modifizierungsverhältnisse des Insulins (100 µg, 2mg/ml).....	32
<b>Tabelle 8</b>	Verwendete Volumina der Proteinlösung an Insulin bzw. Anti-Insulin in DPBS sowie das über unterschiedliche NSA-Lösungsvolumina eingestellte Verhältnis aus NSA/Insulin bzw. NSA/Anti-Insulin.....	32
<b>Tabelle 9</b>	Synthese der biokonjugierten Maus IgG/Anti-Maus IgG-gekoppelten Hydrogele unterschiedlicher Konzentrationsverhältnisse von AG/AK in einem 7,5 %igen 117/1(AAm/MBAA-Hydrogel).....	34
<b>Tabelle 10</b>	Menge an eingebrachtem Antigen/Antikörper in die verschiedenen Hydrogelverbünde.....	35

<b>Tabelle 11</b>	Die verschiedenen für eine Fläche von 75 mm <sup>2</sup> verwendeten Klebervolumina im Kontext der Haftvermittlung der auf der Oberfläche aufgetragenen Hydrogelvarianten.....	38
<b>Tabelle 12</b>	Verwendete Lösungen und Volumina bei Präparation von stimulusresponsiven, implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystemen auf der Basis von biokonjugierten PAAm und Alginat/PAAm-Hybridhydrogelen.....	40
<b>Tabelle 13</b>	Messergebnisse der Karl-Fischer-Titration zur Bestimmung des Wassergehaltes von semi-IPN-Hydrogelen aller getesteten Gelgehalte sowie der unterschiedliche Crosslinker Verhältnisse von 58/1 bzw. 117/1. Zusätzlich sind neben den Werten der semi-IPN-Hydrogelen die Werte des konventionellen 15%igen Hydrogels dargestellt.....	54
<b>Tabelle 14</b>	Bruchdehnung, Zugfestigkeit und elastischer Modul von konventionellen und semi-IPN Hydrogelen unterschiedlicher Hydrogelgehalte, Gelarchitekturen und Vernetzungsverhältnissen von 58/1 und 117/1 [w/w] nach ISO 527-4. Dargestellt sind Werte $\pm$ Standardabweichung von mindestens drei Experimenten.....	56
<b>Tabelle 15</b>	Fluoreszenzaufnahmen der „region of interest“(ROI) (1450 $\mu$ m $\times$ 1400 $\mu$ m) von Maus IgG/Kaninchen Anti-Maus IgG biokonjugierten semi-IPN-PAAm-Hydrogelen (Geldicke: 2 mm; Gelgehalt: 7,5 %; Vernetzungsgrad: 117/1), 2 Stunden mit Ziege Anti-Maus IgG (FITC) bzw. Ziege Anti-Kaninchen IgG (FITC) inkubiert. Aufnahmen erfolgten über Fluoreszenzmikroskopie ( $\lambda_{exc}$ =488 nm; $\lambda_{em}$ =505-525 nm). Die relative Rückstrahlintensität dieser Hydrogele, bedingt über die FITC-Markierung, wurde für die Quantifizierung, wie in <b>Tabelle 16</b> dargestellt, verwendet.....	59
<b>Tabelle 16</b>	Relative Lichtintensität (0 $\mu$ g Protein = 1) einer definierten Region der Fluoreszenzaufnahmen (ROI = region of interest) der mit Maus IgG bzw. Kaninchen Anti-Maus IgG biokonjugierten semi-IPN-PAAm-Hydrogele (Dicke: 2 mm; Gelgehalt: 7,5 %; Vernetzungsgrad: 117/1), gemessen mittels Fluoreszenzmikroskopie ( $\lambda_{exc}$ =488 nm; $\lambda_{em}$ =505-525 nm). Inkubation erfolgte mit FITC-markierten Sekundärantikörpern (Ziege Anti-Maus IgG/Ziege Anti-Kaninchen IgG).....	60

<b>Tabelle 17</b>	Fluoreszenzmikroskopische Bilder ( $\lambda_{\text{exc}}=488 \text{ nm}$ ; $\lambda_{\text{em}}=505\text{-}525 \text{ nm}$ ) von mit Anti-Insulin + Proinsulin IgG (FITC) inkubierten semi-IPN-PAAm-Hydrogelen (Geldicke: 2 mm; Gelgehalt: 7,5 %; Vernetzungsgrad: 117/1), in welche unterschiedlich stark NSA-modifiziertes Insulin integriert wurde. Neben dem Blindwert (Hydrogel ohne Insulin), werden mehrere Modifizierungsverhältnisse zwischen 0 und 30 (NSA/Insulin) dargestellt... 62
<b>Tabelle 18</b>	Abschälkraft (N/mm) der mit Haftvermittler aufgetragenen PAAm/Alginate-Hybrid-Hydrogele unterschiedlicher Schichtdicke in An- und Abwesenheit von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (vgl. <b>Kapitel 4.6.4</b> )..... 71

## Formeln

<b>Formel 1</b>	1. Ficksches Gesetz. Die Teilchenstromdichte $J$ ist proportional dem negativen Konzentrationsgradienten $dc/dx$ entgegen der Diffusionsrichtung. Der Proportionalitätsfaktor ist der Diffusionskoeffizient $D$ .....7
-----------------	--