

"Oberflächenmodifizierung von Polyvinylidenfluorid zur Minimierung der Proteinadsorption"

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
genemigte Dissertation

vorgelegt von
Diplom-Ingenieurin (HR)
Zahida Ademovic
aus Odzak,
Bosnien-Herzegowina

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Hartwig Höcker
 Privatdozentin Dr. rer. nat. Doris Klee

Tag der mündlichen Prüfung: 13. September 2002

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. rer. nat. Hartwig Höcker am Lehrstuhl für Textilchemie und Makromolekulare Chemie der Rheinisch-Westfälisch-Technischen Hochschule, Aachen in der Zeit von Mai 1999 bis September 2002 durchgeführt.

Mein besonderer dank gilt Herrn Professor Dr. rer. nat. Hartwig Höcker für die hochinteressante Aufgabestellung sowie die wissenschaftliche und persönliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. Doris Klee danke ich für ihr großes Engagement, die wissenschaftliche Betreuung und die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ein Riesendank gilt den Jochen Salber und Stephen Wohlert sowie Barbara Dittrich und Georg Plum für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Der gesamten Arbeitsgruppe Biomaterialien möchte ich für viele Diskussionen, immense Hilfsbereitschaft und immer freundliche Atmosphäre danken. Herzlichen Allen Mitarbeitern des Deutschen Wollforschungsinstituts danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und eine schöne Zeit.

Mojim dragim roditeljima i mome bratu

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Polymere als Biomaterialien	1
1.2	Polyvinylidenfluorid als Biomaterial.....	4
1.2.1	<i>Chemical Vapour Deposition</i> zur Funktionalisierung von Materialoberflächen..	5
1.2.2	Plasmaaktivierung zur Modifizierung von Materialoberflächen	6
1.3	Der Einfluss von Proteinadsorptionsprozessen auf die Biokompatibilität	7
1.3.1	Minimierung der Biofilmbildung.....	10
1.4	Hydrophile Polymere zur Minimierung der Proteinadsorption an Oberflächen...	11
1.4.1	Einsatz von Polyethylenglykolen zur Reduzierung von Proteinadsorption.....	11
1.4.2	Einsatz von Polysacchariden zur Reduzierung von Proteinadsorption	14
2	Problemstellung.....	16
3	Funktionalisierung von PVDF durch Oberflächenmodifizierung	20
3.1	Das Grundpolymer Polyvinylidenfluorid	20
3.1.1	Thermische Eigenschaften von PVDF	23
3.1.2	Schwingungsspektroskopische Messungen an PVDF-Materialien	26
3.1.3	Röntgenphotoelektronenspektroskopische Messungen an PVDF-Folie.....	29
3.2	Oberflächenmodifizierung von PVDF durch CVD-Polymerisation von 4-Amino-[2.2]-paracyclophan	31
3.2.1	Schwingungsspektroskopische Messungen an PVDF-Amino-ppx-Oberflächen .	33
3.2.2	XPS-Messungen an PVDF-Amino-ppx-Oberflächen.....	34
3.3	Immobilisierung von Polyethylenglykolen und Polysacchariden an PVDF- Amino-ppx-Oberflächen	36
3.3.1	Immobilisierung von mPEG-ald an PVDF-Amino-ppx-Oberflächen	36

3.3.1.1	Nachweis von mPEG-ald auf PVDF-Amino-ppx mittels XPS.....	37
3.3.2	Immobilisierung von Polysacchariden an PVDF-Amino-ppx-Oberflächen.....	39
3.3.2.1	Nachweis von Dextran und Hydroxyethylstärke auf PVDF-Amino-ppx mittels XPS	43
3.4	Oberflächenmodifizierung von PVDF durch Plasmabehandlung.....	45
3.4.1	XPS-Messungen an mit Argonplasma aktivierten PVDF-Oberflächen.....	45
3.4.2	Thermisch-induzierte Pfropfcopolymerisation von Acrylsäure auf plasma-aktivierten PVDF-Oberflächen	49
3.4.2.1	Schwingungsspektroskopische Messungen an PVDF-PAAc-Oberflächen.....	50
3.4.2.2	XPS-Messungen an PVDF-PAAc-Oberflächen	51
3.5	Immobilisierung von Polyethylenglykolen und Polysacchariden an mit PAAc modifizierten PVDF-Oberflächen.....	53
3.5.1	Immobilisierung von Polyethylenimin an aktivierten PVDF-PAAc-Oberflächen.....	54
3.5.1.1	Nachweis der PEI-Immobilisierung an PVDF-PAAc-Oberflächen mittels XPS .	55
3.5.2	Immobilisierung von mPEG-ald an PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen.....	56
3.5.2.1	Nachweis der mPEG-ald-Immobilisierung an PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen mittels XPS	56
3.5.3	Immobilisierung von carboxymethylierten Polysacchariden an mit PAAc-PEI modifizierten PVDF-Oberflächen.....	59
3.5.3.1	Nachweis der carboxymethylierten Polysaccharide nach Immobilisierung auf PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen mittels XPS.....	60
3.6	Immobilisierung von mPEG-aminen an Polyacrylsäure-modifizierten PVDF-Oberflächen.....	62
3.6.1	Nachweis der immobilisierten mPEG-amine an PVDF-PAAc-Oberflächen	63
3.7	Untersuchungen zum Benetzungsverhalten der modifizierten PVDF-Oberflächen.....	66

3.7.1	Dynamische Kontaktwinkelmessungen an PVDF-Amino-ppx vor und nach Immobilisierung proteinabweisender Schichten.....	66
3.7.2	Dynamische Kontaktwinkelmessungen an PVDF-PAAc vor und nach Immobilisierung von AEE und mPEG-aminen	68
3.7.3	Dynamische Kontaktwinkelmessungen an PVDF-PAAc-PEI vor und nach Immobilisierung proteinabweisender Schichten.....	70
3.8	Oberflächentopographie der modifizierten Oberflächen	72
3.9	Proteinadsorptionsprozesse als Schlüssel zur Biokompatibilität.....	78
3.9.1	Die Auswahl von Modelproteinen zur Untersuchung ihres Adsorptionsverhaltens auf PVDF-Oberflächen vor und nach Modifizierung	80
3.9.2	Untersuchung der Proteinadsorption auf Biomaterialoberflächen mittels <i>Surface</i> -MALDI-TOF-MS	82
3.9.2.1	Untersuchung der Adsorption von Lysozym auf PVDF- und modifizierten PVDF-Oberflächen mittels <i>Surface</i> -MALDI-TOF-MS	84
3.9.2.2	Untersuchung der Adsorption von Schweineinsulin auf PVDF- und modifizierten PVDF-Oberflächen mittels <i>Surface</i> -MALDI-TOF-MS	96
3.9.3	Untersuchung der Adsorption von Insulin und Fibronectin auf Biomaterialoberflächen mittels <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>	108
3.9.4	Untersuchung der Adsorption von Lysozym, Insulin und Fibronectin mittels radioaktiver Markierung	113
4	In-vitro Biokompatibilitätsuntersuchungen.....	120
5	Experimenteller Teil	124
5.1	Instrumentelle Analytik	124
5.1.1	Differentialkalorimetrie (DSC).....	124
5.1.2	Infrarotspektroskopie in abgeschwächter Totalreflexion (IR-ATR)	124
5.1.3	Raman-Spektroskopie	124
5.1.4	Kontaktwinkelmessung nach der <i>Wilhelmy-Platte</i> -Methode	125

5.1.5	Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS).....	125
5.1.6	Restgasmassenspektroskopie	126
5.1.7	Rasterkraftmikroskopie (AFM)	126
5.1.8	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i> (MALDI-TOF-MS)	127
5.1.9	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	128
5.1.10	Radioaktive Proteinmarkierung	130
5.1.11	Bestimmung von Carboxylgruppen mittels Toluidinblau.....	131
5.2	Chemikalien und Probenpräparation.....	132
5.2.1	Chemikalien	132
5.2.2	Proteine und Antikörper.....	132
5.2.3	Herstellung der PVDF-Folien	133
5.2.4	Herstellung von carboxymethylierter Hydroxyethylstärke (CM-HES).....	133
5.3	Oberflächenmodifizierungen	134
5.3.1	CVD-Polymerisation zur Funktionalisierung von PVDF-Oberflächen.....	134
5.3.1.1	Reaktion der Amino-ppx-funktionalisierten Oberflächen mit mPEG-ald	134
5.3.1.2	Reaktion der Amino-ppx-funktionalisierten Oberflächen mit Polysacchariden...	135
5.3.2	Plasmabehandlung	135
5.3.3	Thermisch initiierte Pfcopolymerisation von Acrylsäure	136
5.3.4	Reaktion der PAAc-funktionalisierten Oberflächen mit PEI.....	136
5.3.4.1	Reaktion der PEI-funktionalisierten Oberflächen mit mPEG-ald	136
5.3.4.2	Reaktion der PEI-funktionalisierten Oberflächen mit carboxymethylierten Polysacchariden	137
5.3.5	Reaktion der PAAc-funktionalisierten Oberflächen mit mPEG-amin.....	137
5.4	Untersuchung der Zelladhäsion	137

6	Anhang	139
7	Literaturverzeichniss	144

Abkürzungsverzeichnis

AAc	Acrylsäure
Abb.	Abbildung
ABTS	Diammonium-2-2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat)
AEE	2-(2-Aminoethoxy)-ethanol
AFM	<i>atomic force microscopy</i>
AK	Antikörper
Amino-ppx	Polyamino- <i>p</i> -xylylen- <i>co</i> -poly- <i>p</i> -xylylen
ATR	abgeschwächte Totalreflexion
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CCD	ladungsgekoppeltes Halbleiterbauelement (<i>charged coupled device</i>)
COOH-Dex	carboxymethyliertes Dextran
COOH-HES	carboxymethylierte Hydroxyethylstärke
cpm	<i>counts per minute</i>
CVD	<i>chemical vapour deposition</i>
Dex	Dextran
DSC	Differentialkalorimetrie
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EO _n -PO _m -EO _n	Ethylenoxid-Propylenoxid-Ethylenoxid Triblockcopolymer
et al.	und Mitarbeiter
Fa.	Firma
FDA	<i>federal drug and food administration</i>
Fn	Fibronectin
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
Gl.	Gleichung
HBW	Halbwertsbreite
HDI	Hexamethylendiisocyanat
HEG	Hydroxyethylglycoseeinheit
HES	Hydroxyethylstärke
Ins	Insulin
IRE	internes Reflexionselement
Lyz	Lysozym
L 929	permanente Zelllinie einer Fibroblastenzelle der Maus
M _w	Gewichtsmittel des Molekulargewichts
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Flugzeit-Massenspektrometrie (<i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>)
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
mPEG-ald	Methoxy-terminierter-Polyethylenglykol-aldehyd
mPEG-amin	Methoxy-terminiertes-Polyethylenglykol-amin
OD	optische Dichte
PAAc	Polyacrylsäure

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PEI	Polyethylenimin
pcp	[2.2]-paracyclophan
PEG	Polyethylenglykol
ppx	Poly- <i>p</i> -xylylen
PVC	Polyvinylchlorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT	Raumtemperatur
SAM	<i>self-assembled monolayers</i>
sccm	Standardkubikzentimeter
Surface-MALDI- TOF-MS	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in surface mode</i>
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TCPS	<i>tissue culture polystyrene</i> , Gewebekulturpolystyrol
UV	Ultraviolett
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie (<i>X-ray photoelektron spectroscopy</i>)

Zusammenfassung

Die Biokompatibilität eines Implantats wird maßgeblich durch dessen Wechselwirkungen mit dem umgebenden Medium des Wirts bestimmt. Hierunter ist nicht nur der Kontakt zu ortständigen Bindegewebszellen und frei beweglichen Zellen des Abwehrsystems zu verstehen, sondern insbesondere die Wechselwirkungen mit den Substanzen der Extrazellulärmatrix, der interstitiellen Flüssigkeit sowie der Bestandteile des Blutes. Zu diesen Substanzen zählen vor allem Proteine bzw. Glykoproteine. Die Kontrolle der Art, Menge und Konformation von Proteinen auf der Biomaterialoberfläche ist eine wichtige Voraussetzung für die Herstellung biokompatibler Materialien wie sie beispielweise für Prothesen, Implantate, Katheter und Kontaktlinsen benötigt werden. Diese Proteinschicht determiniert die nachfolgenden Reaktionen des Körpers und ist für die Biokompatibilität entscheidend, da die Zellen nicht das unterliegende Material, sondern eine mit Proteinen beschichtete Oberfläche erkennen.

Die unspezifische Adsorption von Proteinen und anderen Biomolekülen auf Materialoberflächen ist ein Problem, das Medizinprodukten, biochemischen Prozessen, Biodiagnostika und der Bioanalytik gemeinsam ist. Diese Ablagerungen biologischen Materials werden vom lebenden System als Fremdkörper erkannt. Das verursacht eine Reihe von nachteiligen biologischen Reaktionen, die die Leistung eines Implantats beeinträchtigen oder sogar im Falle der Verstopfung kleinlumiger Blutkapillaren zu lebensbedrohlichen Situationen führen können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Entwicklung von Oberflächenbeschichtungen, die eine unspezifische Proteinanlagerung und die damit verbundene Zelladhäsion verringern oder vollständig unterbinden und so die Körperverträglichkeit des Materials verbessern. Als Basispolymer wurde das nicht resorbierbare Polyvinylidenfluorid (PVDF) eingesetzt. Zur Ausstattung der PVDF-Oberflächen mit proteinabweisender Schichten mussten diese zunächst mit funktionellen Gruppen versehen werden. Hierzu wurden zwei verschiedene Oberflächenmodifizierungsverfahren eingesetzt. Im ersten Verfahren wurde mit Hilfe der *Chemical Vapour Deposition* (CVD) auf den PVDF-Oberflächen 4-Amino-[2.2]-paracyclophan zu Amino-poly-*p*-xylylen (Amino-ppx) polymerisiert. Im zweiten Verfahren wurden mit Hilfe eines Argonplasmas die PVDF-Oberflächen aktiviert und anschließend Acrylsäure pfropfcopolymerisiert. Die auf diese Weise funktionalisierten PVDF-Oberflächen wurden in

weiteren Reaktionsschritten mit verschiedenen Polymeren auf Polyethylenglykol- bzw. Polysaccharid-Basis modifiziert. Diese Polymere zeichnen sich durch eine geringe unspezifische Wechselwirkung mit Proteinen und Zellen aus.

Das als Basispolymer eingesetzte PVDF-Granulat wurde zu Folien und Filament verarbeitet. Mit Hilfe der Differentialkalorimetrie (DSC) wurden von allen aufgeführten Aufmachungsformen des PVDF Schmelzpunkt und Schmelzwärme bestimmt. Hierbei wurde für das Granulat ein Schmelzpunkt von 176°C und für die Folie ein Schmelzpunkt von 172°C detektiert. Dies deutet darauf hin, dass das PVDF in Granulat- und Folienform in der α -Modifikation vorliegt. In dieser Modifikation wechselt sich die trans-Konformation mit den gauche-minus- bzw. gauche-plus-Konformation (tg^-tg^+) ab. Im Gegensatz dazu wurde im Falle des Filaments außer bei 174°C ein zweiter Schmelzpunkt bei 182°C gemessen, der für die β -Modifikation des PVDF charakteristisch ist. In dieser Modifikation liegen die PVDF-Ketten in einer all-trans-Konformation (all- t) mit einem parallelen Dipolmoment vor. Diese thermoanalytischen Ergebnisse wurden durch infrarot- und Raman-spektroskopische Untersuchungen bestätigt.

Die für die Beschichtung von Metalloberflächen etablierte CVD-Polymerisation wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig zur Beschichtung von Polymeroberflächen eingesetzt. Die CVD-Polymerisation von 4-Amino-[2.2]-paracyclophan führte zur Generierung von Aminogruppen auf PVDF-Oberflächen (PVDF-Amino-ppx). Mit Hilfe der Infrarotspektroskopie im Modus der abgeschwächten Totalreflexion (IR-ATR) und der Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) wurde die erfolgreiche Beschichtung der PVDF-Oberflächen mit Amino-ppx nachgewiesen.

An den primären aromatischen Aminogruppen der Amino-ppx-Schicht wurden mit Hilfe einer reduktiven Aminierung methoxyterminierte-PEG-aldehyde (mPEG-ald) mit unterschiedlichen mittleren Molekulargewichten (5000 bzw. 30000) immobilisiert. Als Reduktionsmittel der intermediär gebildeten Schiffchen Basen wurde Natriumcyanborhydrid eingesetzt. Neben der Variation der Kettenlängen der zu koppelnden mPEGs wurden verschiedene Kopplungsbedingungen zur Erzielung unterschiedlicher Kopplungsdichten (Temperatur und

Kaliumsulfatkonzentration) angewendet und hinsichtlich ihrer Wirkung auf protein- und zellabweisende Eigenschaften untersucht.

Die erfolgreiche Modifizierung der PVDF-Amino-ppx-Oberflächen wurde durch die Bestimmung der Oberflächen-Elementzusammensetzung mit Hilfe der XPS untersucht. Eine Erniedrigung des Stickstoff- und eine gleichzeitige Erhöhung des Sauerstoffgehalts deutet auf eine Modifizierung der Oberfläche mit mPEG-aldehyden hin. Außerdem zeigte sich in den hochaufgelösten C1s-Spektren der mit mPEG-aldehyden modifizierten Oberflächen eine Intensitätszunahme der für Etherkohlenstoff charakteristischen Photolinie sowie eine Intensitätsabnahme der Photolinie für aliphatischen Kohlenstoff. In Ergänzung hierzu lieferten die Sauerstoff zu Kohlenstoff (O/C)-Verhältnisse mit zunehmender Reaktionstemperatur und Salzkonzentration erhöhte Werte. Diese Effekte sind bei den mPEG-aldehyden, die unter *cloud point* Bedingungen (60°C und 0,6 M Kaliumsulfat) gekoppelt wurden, am stärksten ausgeprägt.

Die Anbindung der Polysaccharide (Dextran und Hydroxyethylstärke (HES)) an PVDF-Amino-ppx-Oberflächen erfolgte mit Hilfe von Hexamethyldiisocyanat (HDI) als bifunktionellem Kupplungsreagenz. Mittels XPS wurde die erfolgreiche Kopplung von HES an HDI-aktivierten PVDF-Amino-ppx-Oberflächen durch einen deutlichen Anstieg der $\underline{\text{C}}\text{-O}$ - und der $\text{O}\text{-}\underline{\text{C}}\text{-O}$ (Acetal)-Komponente nachgewiesen.

Zur Initiierung einer Pfropfcopolymerisation von Acrylsäure auf PVDF-Oberflächen (PVDF-PAAc) wurden durch Belüftung im Anschluss an die Argonplasmaaktivierung auf den Oberflächen Hydroperoxide erzeugt, die mittels XPS durch eine Zunahme des Sauerstoffanteils und eine Abnahme des Fluorgehalts nachgewiesen wurden. Durch eine Restgasanalyse während der Argonplasmaaktivierung von PVDF-Oberflächen konnte der Nachweis erbracht werden, dass weder Fluor noch fluorhaltige Verbindungen die Oberflächen verlassen.

Die argonplasmainduzierte Pfropfcopolymerisation von Acrylsäure erzeugte eine carboxylgruppenhaltige Schicht auf PVDF-Oberflächen. Die generierte PAAc-Schicht wurde mittels IR-ATR-Spektroskopie anhand der scharfen und intensitätsstarken Adsorptionsbande bei 1700 cm^{-1} (C=O-Valenzschwingung) sowie der verbreiterten Adsorptionsbande zwischen 3600 und 3200 cm^{-1} (H-O-Valenzschwingung) nachgewiesen. Mittels XPS wurde nach Acrylsäurepfropfung kein Fluor detektiert. Stattdessen zeigte sich in den hochaufgelösten C1s-Spektren eine neue Photolinie bei $289,1\text{ eV}$, die für Kohlenstoff in Carboxylgruppen

charakteristisch ist. Mittels Toluidinblau-Färbung wurde eine Carboxylgruppenkonzentration von $1,4 \times 10^{-8} \pm 0,13 \times 10^{-8}$ mol/cm² bestimmt.

Mit Hilfe des Carbodiimid-Verfahrens (EDC/NHS) wurden an die Carboxylgruppen der PAAc-Schicht Polyethyleniminketten (PEI) gebunden. Durch diese Verfahrensweise wurde relativ zur CVD-Methode eine höhere Aminogruppendichte erzielt. Diese primären aliphatischen Aminogruppen dienen einer anschließenden kovalenten Kopplung von mPEG-aldehyden (5000 bzw. 30000). Die erzeugten PEI-Schichten wurden wiederum mittels IR-ATR-Spektroskopie und XPS nachgewiesen.

Nach der Kopplung von mPEG-aldehyden auf PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen wurde in den hochaufgelösten C1s-Spektren eine Intensitätszunahme der C-O-Photolinie (Etherkohlenstoff) und eine Intensitätsabnahme der C-C-Photolinie (aliphatischer Kohlenstoff) detektiert. Dieser Effekt war für mPEG-ald 5000, das unter *cloud point* Bedingungen gekoppelt wurde, am deutlichsten ausgeprägt. Im Vergleich zu den Ergebnissen, die bei der Kopplung der mPEG-aldehyde auf Amino-ppx-Schichten erhalten wurden, zeigte sich bei der Kopplung der mPEG-aldehyde auf PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen ein wesentlich höheres O/C-Verhältnis, ein Ergebnis, das die postulierte höhere Kopplungsdichte bestätigt.

In Ergänzung hierzu wurden die carboxymethylierten Polysaccharide Dextran (COOH-Dex) und Hydroxyethylstärke (COOH-HES), die durch unterschiedliche Carboxymethylierungsgrade charakterisiert waren, an PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen mittels EDC/NHS-Verfahren immobilisiert. Die erfolgreiche Kopplung dieser Moleküle wurde jeweils durch die Kohlenstoff- und Stickstoffabnahme und die Sauerstoffzunahme mittels XPS nachgewiesen.

Eine weitere Möglichkeit zur Immobilisierung von PEGs an PVDF-PAAc-Oberflächen ohne PEI-Zwischenschicht besteht in der Kopplung aminoterminierter mPEGs (mPEG-amin 5000 bzw. 20000). Im Vergleich zu diesen langen PEG-Ketten wurde außerdem der Einfluss der wesentlich kürzeren Ethylenoxid-Einheiten des 2-(2-Aminoethoxy)-ethanols (AEE) auf die Proteinadsorption untersucht. Die Immobilisierung von mPEG-aminen bzw. von AEE an PVDF-PAAc-Oberflächen erfolgte mit Hilfe des EDC/NHS-Verfahrens. Eine Bestätigung der erfolgreichen Kopplung der mPEG-amine wurde durch einen Anstieg des Sauerstoff- und

Stickstoffgehalts und eine Abnahme des Kohlenstoffgehalts in den XPS-Spektren geliefert. Außerdem nahm die Intensität der C-O Photolinie mit wachsender Kettenlänge zu.

Zur Charakterisierung der einzelnen modifizierten Oberflächen bezüglich ihres protein- und zellabweisenden Charakters wurden zunächst Kontaktwinkelmessungen nach der *Wilhelmy-Platten*-Methode vorgenommen. Außer der Bestimmung ihres Benetzungsverhaltens wurden rasterkraftmikroskopische Untersuchungen (AFM) zur topographischen Charakterisierung durchgeführt.

Aus den Kontaktwinkelmessungen geht hervor, dass im Gegensatz zu den relativ hydrophoben PVDF- und PVDF-Amino-ppx-Oberflächen alle mit mPEGs bzw. Polysacchariden modifizierten Oberflächen eine ausgesprochen starke Hydrophilie aufweisen. In Ergänzung hierzu zeigt sich in den AFM-Aufnahmen aller hydrophilierten Oberflächen eine deutlich sichtbare Änderung der Oberflächentopographie verglichen mit den unmodifizierten PVDF-Oberflächen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde das Adsorptionsverhalten der Proteine Insulin, Lysozym und Fibronectin untersucht. Die ausgesuchten Proteine unterscheiden sich bezüglich ihres Molekulargewichts und isoelektrischen Punktes.

Mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation-Flugzeit-Massenspektrometrie (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*, MALDI-TOF-MS) im *Surface*-Modus wurde das Adsorptionsverhalten von Lysozym und Insulin auf PVDF-Oberflächen vor und nach der Modifizierung untersucht. Dabei zeigte sich, dass durch eine Immobilisierung sowohl von mPEG-ald als auch von Polysacchariden auf PVDF-Amino-ppx-Oberflächen eine Adsorptionsresistenz für Insulin nicht erzielt werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde in den *Surface*-MALDI-Spektren der PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, die mit mPEG-ald 5000 und 30000 bzw. mPEG-amin 5000 und 2000 unter *cloud point* Bedingungen modifiziert wurden, weder adsorbiertes Lysozym noch adsorbiertes Insulin detektiert. Dieses Ergebnis zeigte sich ebenfalls für die entsprechenden Oberflächen, die mit COOH-Dex 3:4 und COOH-HES 1:7 modifiziert waren.

In Ergänzung zu den *Surface*-MALDI-Untersuchungen wurde das Adsorptionsverhalten von Fibronectin und Insulin mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) analysiert. Dabei zeigten diese Proteine auf den PVDF-Amino-ppx- und PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, die mit

mPEG-aldehyden unter *cloud point* Bedingungen modifiziert waren bzw. auf den PVDF-PAAc-Oberflächen, die mit mPEG-aminen unter *cloud point* Bedingungen modifiziert waren, die niedrigste Adsorption für Fibronectin und Insulin. Die relative O.D. lag auf diesen Oberflächen für Fibronectin zwischen 10% und 15% und für Insulin zwischen 12% und 25% im Vergleich zu *tissue culture polystyrene* (TCPS). Eine ebenfalls niedrige relative O.D. wurde für das Adsorptionsverhalten beider Proteine auf den PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, die mit COOH-Dextran 1:24 und COOH-HES 1:40 modifiziert werden, erzielt. Hier betrug die relative O.D. zwischen 14 und 19%.

Zur quantitativen Erfassung der adsorbierten Mengen an Fibronectin, Lysozym und Insulin wurden die mit radioaktivem ^{125}I markierte Proteine adsorbiert. Auch diese Untersuchungen zeigten eine signifikante Abnahme der Proteinadsorption auf den modifizierten Oberflächen relativ zu unmodifiziertem PVDF und TCPS.

Abschließend wurde das zellabweisende Verhalten der modifizierten PVDF-Oberflächen mittels *in-vitro* Zelltests beurteilt. Hierzu wurden Mausfibroblasten der Zelllinie L 929 auf die entsprechenden Oberflächen ausgesät und deren Zellmorphologie nach 24 h mittels Hämalaun-Färbung mikroskopisch dokumentiert. Die PVDF-Oberflächen, die mit mPEGs unter *cloud point* Bedingungen bzw. mit carboxymethylierten Polysacchariden modifiziert waren, zeigten ein deutlich zellabweisendes Verhalten.

Aus den Ergebnissen wird die Schlussfolgerung gezogen, dass eine erfolgreiche Abweisung komplexer Proteingemische und von den Zellen nur durch stark hydrophile und elektrostatisch neutrale Oberflächen erzielt werden kann. Außer der Hydrophilie und der elektrischen Neutralität spielt insbesondere die Pfropfungsdichte sowie die Kettenlänge der polymeren Moleküle eine große Bedeutung.

Summary

The biocompatibility of an implant is determined considerably by its interactions with the surrounding medium of the host. This includes not only the contact to locale connective tissue and free loose cells of the defence system, but in particular the interactions with the substances of the extracellular matrix, the interstitial liquid as well as the constituents of the blood. To these substances belongs primarily proteins or glycoproteins. The control of the type, amount and conformation of proteins adsorbed on the biomaterial surface is an important requirement for the production of biocompatible materials like prostheses, implants, catheters and contact lenses. This protein layer determines the following body reactions and is crucial for the biocompatibility. The cells do not recognise the underlying material but one with proteins coated surface. The nonspecific adsorption of proteins and other biomolecules on material surfaces is a problem, which is common for medical products, biochemical processes, biodiagnostic and bioanalytics. These deposits of biological material are detected by the living system as foreign bodies. That causes a set of unfavourable biological reactions, which can impair efficiency of implants or even lead to life-threatening situations in the case of the occlusion of small-diameter blood capillaries.

Therefore the goal of this work was the development of surface coatings, which reduce or completely prevent a nonspecific protein accumulation and the subsequent cell adhesion and thus improve the biocompatibility of the material. The polyvinylidene fluoride (PVDF) was used as the base polymer. This polymer is non-degradable. To provide PVDF surfaces with protein-rejecting layers functional groups had to be created on the surface first. For this functionalisation two different surface modification procedures were used. The first procedure was performed by the chemical vapour deposition (CVD) polymerisation of 4-amino-[2.2]-paracyclophanes to amino-poly-*p*-xylylene (amino-ppx) on the PVDF surfaces. The second procedure was carried out by the surfaces activation by means of an argon plasma following a graftcopolymerisation of acrylic acid. In further reaction steps the functionalised PVDF surfaces were modified with different polymers on polyethylene glycol or polysaccharide basis. These polymers show a low non-specific interaction with proteins and cells.

The PVDF granulate, used as base polymer, was processed to films and filaments. Melting point and heat of fusion were determined by differential scanning calorimetry (DSC). The melting

point of PVDF granulate was detected at 176°C and for the films at 172°C. This points out that the PVDF is presented in the α -modification in granulate and film form. In this modification the trans-conformation alternates with the gauche-minus- and gauche-plus-conformation (tg^-tg^+). Filament as compared to film and granulate show two melting points, one at 174°C, the other at 182°C. The second melting point is characteristic for the β -modification of the PVDF. In this modification, the PVDF chains are presented in an all trans-conformation (all- t) with a parallel dipole moment. These thermoanalytical results were confirmed by means of infrared- and Raman-spectroscopic investigations.

The CVD polymerisation is established for the coating of metal surfaces. In this work, CVD was used for the first time for the coating of polymer surfaces. The CVD polymerisation of 4-amino-[2.2]-paracyclophanes led to the generation of amino groups on PVDF surfaces (PVDF-amino-ppx). The successful coating of the PVDF surfaces with amino-ppx was proved by means of attenuated total reflection infrared spectroscopy (IR-ATR) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).

Methoxyterminated PEG-aldehydes (mPEG-ald) with different average molecular weights (5000 and 30000 respectively) were immobilized at the primary aromatic amino groups of the amino-ppx layer using a reductive amination procedure. Sodium cyanoborohydride was used as a reducing agent of the intermediately formed Schiff's base. In addition to the variation of the chain lengths of the mPEGs, different coupling conditions were applied (temperature and potassium sulfate concentration) to achieve different coupling densities. Their characteristics were examined regarding protein- and cell-rejecting effects.

The successful modification of the PVDF-Amino-ppx surfaces were determined by means of the surface elemental analysis using XPS. A decrease of the nitrogen content and at the same time a increase of the oxygen content demonstrated a modification of the surface with mPEG-aldehydes. Additionally in the high-resolved C1s-spectra the successful modification with mPEG-aldehydes was proven in an increase of the intensity of photoline characteristic for ether carbon as well as a decrease of the intensity of the photoline for aliphatic carbon. In addition, oxygen to carbon (O/C) ratios provided increased values with increasing reaction temperature and salt concentration. These effects are most strongly obvious for the mPEG-aldehydes coupled under cloud point conditions (60°C and 0.6 M potassium sulfate).

The binding of the polysaccharides (dextran and hydroxyethylstarch (HES)) at PVDF-amino-ppx-surfaces was performed using hexamethylenediisocyanate (HDI) as bifunctional coupling reagent. The successful coupling of HES at HDI activated PVDF-Amino-ppx-surfaces was demonstrated by an increase of $\underline{\text{C}}\text{-O-}$ and O-C-O (acetal) photoline by means of XPS.

A graftcopolymerisation of acrylic acid on PVDF surfaces (PVDF-PAAc) was started by surfaces hydroxyperoxides on the surface. They were produced by the argon plasma activation of the PVDF surface and subsequent ventilation. Surfaces hydroxyperoxides were proven by means of XPS by an increase of the oxygen content and a reduction of the fluorine content. By means of residual gas analysis was demonstrated that during the argon plasma activation of PVDF surfaces neither fluorine nor fluorine containing compounds leave the surfaces. The argon-plasma-induced graftcopolymerisation of acrylic acid produced a layer on PVDF surfaces containing carboxyl groups. The generated PAAc layer was verified using IR-ATR-spectroscopy on the basis of the distinctive and intensity strong adsorption band at 1700 cm^{-1} (C=O valence vibration) as well as the broad adsorption band between 3600 and 3200 cm^{-1} (H-O- valence vibration). By means of XPS no fluorine was detected after acrylic acid grafting. Instead of fluorine photo line in the C1s -spectra a new photo line was evidenced at 289.1 eV which is characteristic of carbon in carboxyl groups. A concentration of carboxyl group was determined to be $1.4 \times 10^{-8} \pm 0.13 \times 10^{-8}\text{ mol/cm}^2$ using toluidinblue staining.

By means of the carbodiimid method (EDC/NHS) polyethylenimine (PEI) was coupled to the carboxyl groups of the PAAc-layer. By this procedure a higher amino group density was obtained compared to the CVD method. These primary aliphatic amino groups served for the following covalent coupling of mPEG-aldehydes (5000 or 30000). The produced PEI layer was proven by means of XPS.

After the coupling of mPEG-aldehydes on PVDF-PAAc-PEI surfaces in the C1s -spektra was detected an increase of intensity of the $\underline{\text{C}}\text{-O-}$ photoline (ethercarbon) and decrease of intensity of the $\underline{\text{C}}\text{-C-}$ photoline (aliphatic carbon). This effect was most obviously for mPEG-ald 5000 coupled under cloud point conditions. Compared to the results obtained with the coupling of the mPEG-aldehydes on amino-ppx layers, a substantially higher O/C ratio was shown. That result confirmed the postulated higher coupling density obtained for the coupling of the mPEG-aldehydes to PVDF-PAAc-PEI surfaces.

In addition, the carboxymethylated polysaccharides dextran (COOH-DEX) and hydroxyethylstarch (COOH-HES), which were characterised by different carboxymethylated rate, were immobilised at PVDF-PAAc-PEI surfaces by means of EDC/NHS method. The successful coupling of these molecules was proven by means of XPS through carbon and nitrogen decrease content and the oxygen increase content.

A further possibility for the immobilisation of PEGs on PVDF-PAAc surfaces without a PEI intermediate layer exists in the coupling of aminoterminated mPEGs (mPEG-amine 5000 or 20000). Additionally, in comparison to these long PEG-chains, the influence of the substantial shorter ethyloxide units of the 2-(2-Aminoethoxy)-ethanol (AEE) was examined for the protein adsorption. The immobilisation of both mPEG-amines and AEE respectively at PVDF-PAAc-surfaces took place by the EDC/NHS procedure. The successful coupling of the mPEG-amines was confirmed by a rise of the oxygen and nitrogen content and a reduction of the carbon content in the XPS spectra. Additionally the intensity of C-O-photoline increased with increasing chain length.

For the characterisation of the individual modified surfaces, regarding to their protein and cell rejecting character, the contact angles were measured according to the Wilhelmy plate method. Furthermore, atomic force microscopic investigations (AFM) were carried out for a topographic characterisation. From the contact angle measurements follows that, in contrast to relatively hydrophobic PVDF and PVDF-Amino-ppx surfaces, all mPEGs or polysaccharides modified surfaces expressed strong hydrophilic character. Additionally, it is possible to see the modification of the surface topography of all hydrophilic surfaces in the AFM, compared to the unmodified PVDF surfaces.

In a further investigation, the adsorption behaviour of the proteins insulin, lysozym and fibronectin was examined. The selected proteins differ concerning their molecular weight and their isoelectrical point. The adsorption behaviour of both lysozym and insulin respectively, was examined by means of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) in the surface mode on PVDF surfaces before and after modification. It was shown that adsorption resistance for insulin, by means of immobilization of both, mPEG-ald and polysaccharides, on PVDF-Amino-ppx surfaces could not be obtained. In contrast to it, neither adsorbed lysozym nor adsorbed insulin were detected in the Surface-

MALDI-spectra of the PVDF-PAAc-PEI surfaces, which were modified under cloud point conditions with mPEG-ald 5000 and 30000 or mPEG-amine 5000 and 2000. Similar results were obtained for the surfaces, which were modified with COOH-Dex 3:4 and COOH-HES 1:7. Additionally to the Surface-MALDI investigations, the adsorption behaviour of fibronectin and insulin was analysed by means of Enzymes Linked Immunosorbent Assay (ELISA). These proteins showed the lowest adsorption on the PVDF-Amino-ppx and PVDF-PAAc-PEI surfaces, which were modified with mPEG-aldehydes under cloud point conditions. Also, the low adsorption was detected on the PVDF-PAAc surfaces, which were modified under cloud point conditions with mPEG-amines. The relative average value of optical density (O.D.) on these surfaces was between 10% and 15% for fibronectin and between 12% and 25% for insulin, compared to tissue culture polystyrene (TCPS). Similarly, low relative O.D. was obtained for the adsorption behaviour of those both proteins on the PVDF-PAAc-PEI surfaces, which were modified with COOH-Dextran 1:24 and COOH-HES 1:40. The relative O.D. was determined between 14 and 19%.

For the quantitative determination of the adsorbed amount of fibronectin, lysozym and insulin these proteins were marked with radioactive 125 Iod and adsorbed on the surfaces. Also these investigations showed a significant reduction of the protein adsorption on the modified surfaces relative to unmodified PVDF and TCPS.

Finally, the cell rejecting behaviour of the modified PVDF surfaces was estimated by means of *in-vitro* cell tests. Mouse fibroblasts of the cell line L 929 were sown on the appropriate surfaces and their cell morphology were documented microscopically after 24 h by means of hemalum staining. The PVDF surfaces, which were modified with both mPEGs under cloud point conditions, and with carboxymethylated polysaccharides respectively, showed an obvious cell rejecting behaviour.

From these results is concluded that a successful rejection of complex protein mixtures and the cells can be obtained only by strongly hydrophilic and electrostatic neutral surfaces. In addition, the grafting density as well as the chain length of the polymer molecules are also of a great importance.

1 Einleitung

1.1 Polymere als Biomaterialien

Unter dem Begriff „Biomaterial“ werden in der Medizintechnik natürliche oder synthetische Werkstoffe, die in Kontakt mit lebendem Gewebe und/oder biologischen Flüssigkeiten gelangen und zur Behandlung, Vergrößerung oder zum Ersatz von Gewebe, Organen oder Körperfunktionen verwendet werden, verstanden¹. Ein Biomaterial muss sich mit den Zellen, Geweben und lasttragenden Strukturen des Körpers auf Dauer problemlos vertragen, d.h. biokompatibel sein. Die Definition der Biokompatibilität spiegelt den Respekt vor den komplexen Reaktionen des Körpers auf das eingebrachte Fremdmaterial wider: *the ability of a material to perform with an appropriate host response in a specific application*¹ (die Fähigkeit eines Materials, bei einem spezifischen Einsatz eine angemessene Reaktion des Körpers zu erzielen). In dieser Definition werden vor allem die aktiven Wechselwirkungen zwischen Biomaterial und Organismus betont.

Jedes Implantat ruft im Empfängergewebe eine Reaktion hervor, die hauptsächlich an der Grenzfläche zwischen Implantat und Gewebe auftritt. Die Biokompatibilität wird vorwiegend durch die Oberflächeneigenschaften des Implantats bestimmt. Die fortschreitende Einsicht in die Bedeutung der Grenzfläche Biomaterial/Gewebe bzw. Biomaterial/Blut für das klinische Ergebnis führte zusätzlich zur Entwicklung und Anwendung verschiedener Methoden zur Oberflächenmodifizierung mittels nasschemischer Techniken² oder mit Hilfe energiereicher Strahlung³. Die vielfältigen Konzepte zur Verbesserung der Biokompatibilität durch Oberflächenmodifizierung reichen von Funktionalisierungen zur Minimierung der Grenzflächenreaktionen⁴ über die Immobilisierung biologisch aktiver Substanzen⁵ bis hin zum Aufbau von Hybridorganen⁶.

Die erste Generation der Implantate verursachte ausgeprägte Fremdkörper- oder Entzündungsreaktionen mit einer Überexpression an Bindegewebssubstanzen bis hin zur Einkapselung und werden daher heute nicht mehr verwendet. Die zweite, heute noch gebräuchliche Generation von biokompatiblen Materialien besteht aus inerten Materialien, die

sich im Körper weitgehend neutral verhalten, keinen Abbaureaktionen unterliegen und auch auf den Stoffwechsel keinen bedeutenden Einfluss ausüben. Biokompatible Materialien der dritten Generation sollen ortsständiges Gewebe zum Wachstum anregen und bestimmte Stoffwechselreaktionen hervorrufen. Daher werden sie auch als bioaktiv bezeichnet. Bei der vierten gegenwärtig intensiv erforschten Generation handelt es sich um Zell-Werkstoff-Verbunde, bei denen Zellen oder Gewebe sowie Material zusammen verarbeitet werden⁷.

Die für den Einsatz in der Medizin als Biomaterialien verwendeten Werkstoffe umfassen Metalle⁸, Keramiken⁹, Polymere¹⁰, Glas¹¹ und Verbundwerkstoffe¹². Dabei gewinnen Polymere zunehmend an Bedeutung als Biomaterialien, da durch gezielte Synthese, Modifizierung oder Mischung maßgeschneiderte Eigenschaften für das jeweilige Einsatzgebiet geschaffen werden können. Der klinische Einsatz von Polymeren begann in den 60er Jahren in Form von Einwegartikeln, wie z.B. Spritzen oder Kathetern. Die steigende Verbreitung von klinisch eingesetzten Polymeren ist auf die einfache und preisgünstige Verarbeitung sowie die einfache Herstellung einer Vielzahl von Formen und Geometrien und ihr breites Spektrum von chemischen und physikalischen Eigenschaften zurückzuführen. Polymere werden daher in fast allen medizinischen Bereichen eingesetzt (vgl. Tab. 1).

Tab. 1: Auswahl von medizinisch eingesetzten, synthetischen Polymeren und ihren Anwendungsgebieten^{13,14,15}

Polymer	Anwendung
Polyethylen (PE)	Sehnen- und Bänderersatz, Knieprothesen, Katheterschläuche, Spritzen
Polypropylen (PP)	Komponenten für Blutoxygenatoren und Nierendialyse, Herzklappen, Nahtmaterial, Einweg-Spritzen
Polyethylenterephthalat (PET)	Künstliche Blutgefäße, Sehnen- und Bänderersatz, Nahtmaterial
Polyvinylchlorid (PVC)	Extrakorporale Blutschläuche, Blutbeutel, Beutel für Lösungen für intravenöse Anwendungen, Einwegartikel
Polycarbonat (PC)	Komponenten für Dialysegeräte, sterile Flaschen, Spritzen, Schläuche, Verpackungsmaterial
Polyamide (PA)	Nahtmaterial, Katheterschläuche, Komponenten für Dialysegeräte, künstliche Zähne, Zahnfüllmaterial
Polytetrafluorethylen (PTFE)	Gefäßimplantate
Polymethylmethacrylat (PMMA)	Knochenzement, Intraokularlinsen und harte Kontaktlinsen, künstliche Zähne, Zahnfüllmaterial
Polyurethan (PU)	Künstliche Blutgefäße, Hautimplantate, künstliche Herzklappen, Dialysemembranen, Infusionsschläuche, Schlauchpumpen
Polyorganosiloxane (z.B. PDMS)	Brustimplantate, künstliche Sehnen, kosmetische Chirurgie, künstliche Herzen und Herzklappen, Kontaktlinsen, Blasenprothesen, Katheter und Schlauchsonden, Beatmungsbälge, Dialyseschläuche, Dichtungen in medizinischen Geräten

Die genannten Polymere erfüllen für medizinische Anwendungen eine Reihe von Anforderungen, wie Prozessierbarkeit mit konventionellen Herstellungsmethoden, genügend hohe mechanische Eigenschaften, Sterilisierbarkeit und Langzeitstabilität *in vivo*.

Zur Verbesserung der Biokompatibilität werden zahlreiche Ansätze entwickelt, die auf oberflächenspezifisch wirkenden Modifizierungsverfahren basieren. Dazu gehören unter

anderem Laser-¹⁶ oder Plasmabehandlung¹⁷, Pffropfpolymerisation¹⁸, *Vapour Deposition* Verfahren¹⁹, chemische Reaktionen mit funktionellen Gruppen auf der Oberfläche²⁰, Langmuir-Blodget Technik²¹.

1.2 Polyvinylidenfluorid als Biomaterial

Polyvinylidenfluorid (PVDF) ist ein thermoplastisches Fluorpolymer, das wegen seiner piezoelektrischen Eigenschaften, hohen Beständigkeit gegen Temperatur- und Chemikalieneinwirkung, Witterungsresistenz und seiner Biokompatibilität wachsende wissenschaftliche Aufmerksamkeit und industrielle Bedeutung erfährt²². PVDF zeichnet sich durch hohe mechanische Festigkeit, Steifigkeit und Zähigkeit aus. Es ist geruchlos, geschmacklos und nicht toxisch. Es zeigt eine Beständigkeit gegenüber vielen organischen und Mineralsäuren, gegenüber aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen, Alkoholen und halogenierten Lösungsmitteln.

PVDF ist ein polymerer Werkstoff mit guten textilen und biologischen Eigenschaften²³. Aufgrund seiner hohen Beständigkeit wird PVDF zu Implantaten mit textilen Strukturen wie künstlichen Bändern²⁴, Bauchnetzen²⁵ oder Halterungen der künstlichen Hornhaut²⁶ verarbeitet. Gegenüber Polyestern weist es eine deutlich verbesserte Hydrolysebeständigkeit auf. Das beim Polypropylen beobachtete Nachkristallisieren und die daraus resultierende mit dem Alter zunehmende Versprödung ist beim PVDF nicht festzustellen. Nach 9 Jahren verliert PVDF 7,5% seiner Festigkeit, Polypropylen dagegen 47%²⁷. Anderweitige „Alterungsprozesse“ werden beim PVDF ebenfalls nicht detektiert. Die textilen Eigenschaften vom PVDF sind über einen weiten Temperaturbereich von -40°C bis $+160^{\circ}\text{C}$ stabil²⁸. Die Reibfestigkeit liegt auf dem Niveau der Polyamide und übersteigt dasjenige der Polyester. Im Vergleich zum Polypropylen ist die entzündliche Fremdkörperreaktion deutlich reduziert²⁹.

PVDF wird als Biomaterial wegen seiner außerordentlichen chemischen Stabilität verwendet. Da PVDF nicht sehr reaktionsfähig ist, werden meistens aufwendige Methoden zur Modifizierung von PVDF benötigt, mit dem Ziel, an der PVDF-Oberfläche geeignete funktionelle Gruppen zu erzeugen. Die Generierung von funktionellen Gruppen an der

Oberfläche kann mit Hilfe verschiedener Strategien erreicht werden. Hierzu gehören das Verfahren der *Chemical Vapour Deposition* (CVD) sowie der Plasmatechnologie.

1.2.1 *Chemical Vapour Deposition* zur Funktionalisierung von Materialoberflächen

Zahlreiche Arbeiten zur Optimierung der Biokompatibilität von Materialien basieren auf dem Ansatz, durch Oberflächenbeschichtung mit einem Polymer die Bioverträglichkeit ohne Beeinträchtigung der mechanischen Eigenschaften des Bulkmaterials zu erhöhen. Als Polymere werden Polyamide³⁰, Polyurethane³¹ oder Polydimethylsiloxane³² verwendet. Die Beschichtungen mit diesen Polymeren erfolgen meist in einem Tauchprozess aus flüssiger Phase und sind hinsichtlich ihrer Homogenität sowie der Abbildungspräzision des zu beschichtenden Substrates – insbesondere bei anspruchsvollen Geometrien– begrenzt. Außerdem wird bei derartigen Tauchbeschichtungen häufig mangelnde Adhäsion zum Substrat beobachtet. Dies ist im Wesentlichen auf Inhomogenitäten der zu beschichtenden Substratoberfläche zurückzuführen mit der Folge einer nur bedingt beeinflussbaren Schichtdicke³³. Eine weitere Einschränkung bezüglich der Biokompatibilität der beschriebenen Verfahren stellt die Verwendung von Lösungsmitteln und anderen Zusätzen dar.

In jüngster Zeit hat sich die Verwendung von CVD-Verfahren etabliert. Die ultradünne Beschichtung (bis 1 μm)³⁴ von Materialien wird verwendet, wenn zufriedenstellende Bulkigenschaften und Oberflächentopographien erhalten bleiben sollen und gleichzeitig eine gezielte Verbesserung der Grenzflächeneigenschaften notwendig ist. Vor allem die Beschichtung von Metallen mit diesem Verfahren findet vielfache Verwendung³⁵.

Beim CVD-Verfahren werden geeignete Monomere in einer Verdampfungseinrichtung in den gasförmigen Zustand überführt und mit Hilfe eines inerten Trägergases (Edelgas) über eine zwischengeschaltete Pyrolysekammer in die Polymerisationszone befördert. In der Polymerisationskammer scheiden sich die in der Pyrolysekammer gebildeten reaktiven Monomerspezies auf einer gekühlten Substratoberfläche unter Polymerisation ab.

Das CVD-Verfahren weist gegenüber anderen Methoden (Tauchverfahren etc.) eine Reihe von Vorteilen auf, die für die Verwendung auf dem Biomaterialsektor bedeutend sind, wie beispielsweise:

- universelle Anwendbarkeit auf Materialien wie Metalle und Polymere,
- keine Verwendung von Lösungsmitteln während der Beschichtung,
- keine Verwendung von Additiven und Initiatoren, daher geringes Toxizitätspotential,
- gute Spaltgängigkeit, daher hohe Abbildungspräzision bei Werkstücken mit anspruchsvoller Geometrie,
- geringe Schichtdicke, daher keine Beeinflussung der mechanischen Eigenschaften des Werkstücks,
- Beschichtung des Werkstücks unter milden Bedingungen, daher geringe physikalische Beanspruchung.

Neben der Plasmapolymersation ist die CVD-Polymerisation von [2.2]-Paracyclophan (pcp) und seinen Derivaten eines der wenigen Beispiele für ein Verfahren zur Gasphasenbeschichtung von Oberflächen mit Polymeren.

Die mittels CVD gewonnenen Polymere Poly-*p*-xylylene (ppx) besitzen einige besondere Eigenschaften. Zum einen werden die guten isolatorischen Eigenschaften und zum anderen die chemische Resistenz gegen praktisch alle Lösungsmittel³⁶ für zahlreiche Anwendungen (z.B. Leiterplattentechnik und Isolierungen für Herzschrittmacher)³⁷ genutzt. Mit Poly-2-chlor-*p*-xylylen-beschichtete Artikel haben für verschiedene medizinische Applikationen eine FDA-Zulassung erhalten³⁸.

1.2.2 Plasmaaktivierung zur Modifizierung von Materialoberflächen

Plasmabehandlungen werden häufig aufgrund der Oberflächenspezifität dieser Methoden eingesetzt, um die Oberflächen von Polymeren unter Erhalt der Bulkigenschaften zu modifizieren oder spezielle funktionelle Gruppen einzuführen.

Der Begriff Plasma bezeichnet ein angeregtes Gas aus Neutralteilchen, Ionen, Radikalen und Elektronen, die miteinander in Wechselwirkung stehen³⁹. Der Plasmazustand wird oft als vierter Aggregatzustand bezeichnet. Das Zünden eines Plasmas geschieht durch Einbringung von Energie in Form elektromagnetischer Felder, wobei hohe Spannungen mit Frequenzen bis zu einigen 10 MHz (Radiofrequenz-Anregung) eingesetzt werden. Desweiteren werden Plasmen durch Mikrowellen angeregt, wobei die Frequenzen der Wechselfelder im GHz-Bereich liegen.

Zur Behandlung temperatursensibler Materialien werden Niederdruckplasmen (1 bis 100 Pa) eingesetzt⁴⁰. Die Stoßwahrscheinlichkeit ist in diesem Druckbereich stark reduziert, so dass die durch das angelegte Feld angeregten Elektronen, die Temperaturen von einigen 10000 K erreichen⁴¹, ihre Energie nicht auf schwere Teilchen übertragen können. Infolgedessen liegen die Neutralteilchen und Ionen bei RT vor.

Durch nicht polymerisierbare Gase wie Sauerstoff oder Schwefeldioxid findet ein Ätzabtrag der Oberfläche statt. Die während der Plasmaätzung ablaufenden Reaktionen sind von der Reaktivität des plasmabildenden Gases abhängig. Es sind Oxidations- und Reduktionsreaktionen, Radikalbildungen und Folgereaktionen sowie die Erzeugung neuer funktioneller Gruppen möglich.

Im Gegensatz zur Plasmaätzung werden durch Inertgase wie Stickstoff oder Argon hauptsächlich chemische Bindungen an der Oberfläche der Polymeren gespalten und radikalische Gruppen erzeugt, welche nach Belüftung der Plasmaanlage mit Luftsauerstoff zu Peroxyradikalen und schließlich zu Hydroperoxiden abreagieren⁴². Die Hydroperoxide können für eine anschließende radikalische Pfropfcopolymerisation mit geeigneten Monomeren als Initiatoren wirken, da sie durch thermische oder photochemische Spaltung Radikale bilden⁴³. Die gebildeten Radikale initiieren die Pfropfcopolymerisation an der Substratoberfläche sowie eine Homopolymerisation in Lösung.

Die Energie der Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung in Hydroperoxiden ist verhältnismäßig niedrig (150 kJ/mol), so dass eine selektive homolytische Spaltung von Hydroperoxiden durch Zufuhr entsprechender Energie möglich ist. Temperaturen von 50 bis 100°C reichen aus, um Hydroperoxide zu spalten. Auch die photolytische Spaltung der Hydroperoxide durch UV-Strahlung ($\lambda = 300\text{-}360\text{ nm}$)⁴⁴ ist zur Initiierung einer Pfropfcopolymerisation geeignet.

1.3 Der Einfluss von Proteinadsorptionsprozessen auf die Biokompatibilität

Die Biokompatibilität eines Implantats wird maßgeblich durch dessen Wechselwirkungen mit dem umgebenden Medium des Wirts bestimmt. Hierunter ist nicht nur der Kontakt zu ortständigen Bindegewebszellen und frei beweglichen Zellen des Abwehrsystems zu verstehen, sondern insbesondere die Wechselwirkungen mit den Substanzen der Extrazellulärmatrix, der interstitiellen Flüssigkeit sowie der Bestandteile des Blutes. Zu diesen Substanzen zählen vor

allem Proteine bzw. Glykoproteine. Die Kontrolle der Art, Menge und Konformation adsorbierter Proteine auf der Biomaterialoberfläche ist eine wichtige Voraussetzung für die Herstellung biokompatibler Materialien, wie sie beispielweise für Prothesen, Implantate, Katheter und Kontaktlinsen benötigt werden⁴⁵. Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang Oberflächenbeschichtungen, die unspezifische Proteinanlagerungen verringern oder vollständig unterbinden und so die Körperverträglichkeit des Materials verbessern.

Die Adsorption von Proteinen auf der Oberfläche erfolgt unmittelbar nach der Implantation eines Materials^{46,47,48}. Proteinadsorption ist ein viel schnellerer Prozess als der Zelltransport zur Materialoberfläche. Deshalb erkennen die Zellen nicht das unterliegende Material, sondern eine mit Proteinen beschichtete Oberfläche. Diese adsorbierte Proteinschicht determiniert die nachfolgenden Reaktionen des Körpers und ist für die Biokompatibilität entscheidend^{49,50,51}.

Die vielfältigen Mechanismen und Einflussfaktoren, die letztendlich zur Proteinadsorption führen, sind äußerst komplex. Vroman schrieb bereits 1971 hierzu: *“... we have calculated on the basis of our present progress that the combined studies proposed above will require 10⁷ years”*⁵². In der Tat sind diese Vorgänge bis heute noch nicht vollkommen verstanden und vollständig aufgeklärt, können jedoch in groben Zügen dargestellt werden. Die Proteinadsorption ist von zahlreichen Faktoren, die sowohl das Protein, das umgebende Medium als auch die Materialoberfläche betreffen, abhängig. Die wichtigsten Faktoren, die Einfluss auf eine Proteinadsorption haben, sind in Tab. 2 aufgezählt⁵³.

Tab. 2: Wesentliche Einflussfaktoren auf die Proteinadsorption, die von Protein, Material oder umgebendem Medium ausgeübt werden

Einflussfaktoren auf die Proteinadsorption von		
Protein	Material	Medium
<ul style="list-style-type: none"> • Proteinkonzentration • Größe des Proteins • Molekulargewicht • dreidimensionale Struktur in Lösung • Konformationsstabilität • Aminosäurezusammensetzung • Nettoladung und Ladungsverteilung • Dichte und Verteilung hydrophober bzw. hydrophiler Domänen • Isoelektrischer Punkt 	<ul style="list-style-type: none"> • chemische Oberflächenzusammensetzung • Oberflächentopographie • freie Oberflächenenergie • Stabilität im jeweiligen Medium • Oberflächeladung • Grenzflächendynamik • Quellbarkeit • Anordnung hydrophiler und hydrophober Bereiche 	<ul style="list-style-type: none"> • pH-Wert • Ionenstärke • Viskosität • Temperatur • Strömungsphänomene • Druck • niedermolekulare Bestandteile

Art und Menge der adsorbierten Proteine werden vor allem durch die chemischen, physikochemischen, morphologischen und topographischen Oberflächeneigenschaften des Biomaterials bestimmt. Phänomenologisch kann für die meisten hydrophoben Oberflächen eine hohe Proteinadsorptionsfähigkeit bei gleichzeitiger Tendenz zu konformativen Änderungen bis hin zur Denaturierung festgestellt werden. Hydrophile Oberflächen hingegen lassen weniger Proteinadsorption zu^{54,55,56}.

Die dreidimensionale Struktur eines Proteins im wässrigen Medium hat einen unmittelbaren Einfluss auf dessen Wechselwirkungen mit Oberflächen. Unpolare Gruppierungen finden sich vornehmlich in den inneren Bereichen globulär angeordneter Polypeptidketten, geladene oder hochpolare Bereiche in den nach außen, dem wässrigen Millieu zugekehrten Segmenten. Starke hydrophobe Interaktionen der unpolaren Gruppen mit Materialoberflächen müssen zwangsläufig nachhaltigen Einfluss auf die strukturelle Integrität und damit auf Struktur-Funktions-Beziehungen haben. Die Geometrie der Bindungstasche in aktiven Zentren von Biomolekülen ist in der Regel geringer als diejenige des Gesamtproteins, um die für chemische Reaktionen und molekulare Erkennungsprozesse notwendige Flexibilität zu gewährleisten. Deswegen

können hydrophobe Wechselwirkungen gegebenenfalls zum Verlust der biologischen Aktivität führen.

Zur adsorptiven Bindung von Proteinen tragen Bindungskräfte von enthalpischer und entropischer Natur bei, die nachfolgend aufgeführt sind⁵⁷:

- ionische Bindung (ΔH (wäss. Milieu) $\approx 12,5$ kJ/mol) und Umverteilung geladener Gruppen nach Überlappung der elektrochemischen Doppelschicht des Festkörpers mit der Ladungs-/Gegenionenschicht des Proteins,
- strukturelle Umwandlungen innerhalb des Proteinmoleküls,
- hydrophobe Wechselwirkungen bzw. Dehydratation unpolarer Bereiche sowohl auf Seiten des Proteins als auch der Materialoberfläche,
- Van der Waals-Wechselwirkungen (ΔH (wäss. Milieu) $\approx 0,4$ kJ/mol),
- Wasserstoffbrückenbindungen (ΔH (wäss. Milieu) ≈ 4 kJ/mol).

1.3.1 Minimierung der Biofilmbildung

In vielen Biomaterialanwendungen stellt die Biofilmbildung (*Biofouling*), d.h. die unkontrollierte, nicht spezifische Ansammlung und Adhäsion von biologischem Material (Proteinadsorption, Zell- und Bakterienadhäsion, Blutplättchendeponation) auf der Oberfläche ein großes Problem dar und bleibt eine Herausforderung für die Biomaterialentwicklung⁵⁸. Auf molekularer Ebene werden diese verschiedenen Bioadhäsionsprozesse in der Anfangsphase von einer sehr schnellen Proteinadsorption auf der „nackten“ Materialoberfläche initiiert.^{59,60,61} Deswegen wird die Proteinadsorption als wichtigster Faktor gesehen, der zur Biofilmbildung beiträgt und kontrolliert werden soll. Darausfolgende unerwünschte Reaktionen umfassen fibröse Einkapselung⁶², akute und chronische Entzündung⁶³, Verstopfung von kleinumigen Blutkapillaren⁶⁴, Aktivierung der Blutgerinnungskaskade⁶⁵, Trübung von Kontaktlinsen⁶⁶ sowie Signalbeeinflussung von Sensoren⁶⁷. Biofilmbildung betrifft auch die nicht medizinischen Gebiete: Membranen bei der Wasseraufreinigung, Transport- und Lagerungssysteme werden mit Biofilmen bedeckt, Schiffshüllen und Meereseinrichtungen werden von Meeresorganismen besiedelt⁶⁸.

Es gibt daher verschiedene einander teilweise ausschließende Anforderungen an die bioaktiven Eigenschaften der Oberfläche von Polymeren, die für eine medizinische Verwendung bestimmt

sind. Sie sollen stets bakterienabweisend und verträglich mit Körperflüssigkeiten und Gewebe sein aber wahlweise zellproliferationshemmend oder –fördernd wirken. Die optimale Biomaterialoberfläche sollte die unerwünschte Proteinadsorption unterdrücken und gleichzeitig spezifische Wechselwirkungen zwischen Zellen und der Oberfläche fördern.

Die Oberflächenmodifizierung mit hydrophilen Polymeren ist ein Weg, um die Proteinadsorption und die damit verbundene Biofilmbildung zu kontrollieren^{69,70}. Diese Modifizierung der Oberfläche kann durch Plasmaverfahren⁷¹, chemische Kopplung (*end-grafting*)⁷² oder *in situ* Polymerisation mittels photo- oder nasschemischer Methoden erfolgen⁷³.

1.4 Hydrophile Polymere zur Minimierung der Proteinadsorption an Oberflächen

Zur Reduzierung unspezifischer Proteinadsorption werden Polyethylenglykole⁷⁴, Polysaccharide^{75,76}, Phospholipide^{77,78} sowie prä-adsorbierte Proteine⁷⁹ eingesetzt. Der Einsatz von Polyethylenglykolen ist derzeit immer noch der effektivste Weg, um die unerwünschte Proteinadsorption und Zelladhäsion zu reduzieren⁸⁰.

1.4.1 Einsatz von Polyethylenglykolen zur Reduzierung von Proteinadsorption

Polyethylenglykol (PEG) ist ein linearer oder verzweigter, neutraler Polyether, der im Molmassenbereich von 200 bis zu mehreren Millionen verfügbar ist. PEG ist im Gegensatz zu Polypropylenoxid unbegrenzt wasserlöslich. Dies resultiert aus H-Brückenbindungen zwischen dem Ethersauerstoff vom PEG und Wassermolekülen⁸¹. PEGs haben aufgrund ihrer Atoxizität und Löslichkeit in wässrigen und organischen Solventien eine große Anwendungsbreite gefunden⁸². Beispiele umfassen neben der Reinigung von Proteinen und Nukleinsäuren^{83,84}, die Konjugation mit Proteinen. Letztere verhindert Immunreaktionen und führt zu einer zunehmenden Verweildauer im Körper (*serum lifetime*)^{85,86}. Außerdem finden PEG eine verbreitete Verwendung bei der Wirkstoffkonjugation und -freisetzung^{87,88,89,90}. Oberflächen werden mit PEG modifiziert, mit dem Ziel Proteinadsorption zu unterdrücken bzw. Blutplättchenadhäsion und Thrombogenität zu reduzieren^{91,92,93}. Zusätzlich wird PEG

erfolgreich zur Bindung von Enzymen und anderen Biomolekülen (Konjugate) unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität eingesetzt^{94,95}.

Es werden verschiedenen Methoden zu Oberflächenmodifizierung mit PEG eingesetzt. Beispiele umfassen Bulkmodifizierungen^{96,97}, physikalische Adsorption von Blockcopolymeren wie PEG-PPG-PEG^{98,99}, Propfcopolymerisationen^{100,101,102} und die direkte chemische Bindung^{103,104}. Blockcopolymere, die hydrophile und hydrophobe Segmente enthalten (z.B. PEG-PPG-PEG), sind dabei effektiver bezüglich der sterischen Abstoßung verglichen mit Homopolymeren^{105,106}. Über das hydrophobe Segment wird das Blockcopolymer an die hydrophobe Oberfläche adsorbiert und das wasserlösliche hydrophile Segment erstreckt sich in die Lösung. Wenn andererseits ein Homopolymer kovalent an die Oberfläche gekoppelt wird, ist der sterische Effekt auf die Proteinabstoßung größer als der von Blockcopolymeren^{107,108}.

Eine Vielzahl der Struktureigenschaften von PEG in Wasser kann in Zusammenhang mit den proteinresistenten Eigenschaften gebracht werden. Die Proteinresistenz kann teilweise mit der geringen freien Grenzflächenenergie des PEG/Wasser-Systems erklärt werden. Für solche Systeme ist die Triebkraft der Proteinadsorption gering. Dies allein reicht jedoch nicht aus, die außergewöhnliche Passivität von mit PEG beschichteten Oberflächen gegenüber Proteinen zu erklären. Vielmehr wird ein sterischer Abstoßungseffekt (*steric repulsion effect*) angenommen^{109,110}. Diese Abstoßungskraft setzt sich aus zwei Beiträgen zusammen. Der erste Repulsionsbeitrag betrifft das Ausschlussvolumen (*excluded volume*) und ist auf einen Entropieverlust zurückzuführen, der mit der Reduzierung der Zahl der möglichen Konformationen bei der Annäherung eines Proteins an PEG einhergeht. Bei der Annäherung eines Proteins an die mit PEG-beschichtete Oberfläche reduziert sich das verfügbare Volumen für jedes Polymersegment, und eine repulsive Kraft entsteht infolge des Verlusts an konformationeller Freiheit der PEG-Ketten. Der zweite Beitrag ergibt sich aus einer Mischungswechselwirkung (*mixing interaction*)¹¹¹. Diese beinhaltet eine osmotische Wechselwirkung zwischen Protein und mit PEG beschichteter Oberfläche. Die Zahl der verfügbaren Konformationen der PEG-Segmente wird reduziert aufgrund einer Kompression der PEG-Ketten sowie durch ein Hineindiffundieren von Proteinmolekülen in die PEG-Schicht. Dies wiederum verursacht eine osmotische Abstoßungskraft. Ob nun die Kompression oder das Hineindiffundieren der dominierende Faktor ist, hängt von der PEG-Kopplungsdichte ab¹¹². Für dichter gekoppelte PEG-Ketten ist die Kompression vermutlich ausschlaggebend¹¹³.

Die hydratisierten PEG-Ketten sind flexibel, gut beweglich in Wasser¹¹⁴ und verhalten sich passiv gegenüber Proteinmolekülen, da für die irreversible Adsorption an die Oberfläche ein gewisser Zeitrahmen notwendig wäre. Die hohe PEG-Kettenmobilität verhindert jedoch, dass die Proteinmoleküle lange genug in Kontakt mit der Oberfläche sind, um bindende Wechselwirkungen zu ihr auszubilden, die zur irreversiblen Adsorption führen.

Bis heute gibt es keine einheitliche Theorie, die das proteinabweisende Verhalten von PEG erklären kann. Bislang existieren zwei molekulare Modelle, die aus Arbeiten von Jeon et al.^{115,116} und Szleifer et al.^{117,118} resultieren und auf denen alle übrigen Theorien basieren^{119,120}.

Das Jeon-Modell besagt, dass die sterische Abstoßung bei der Annäherung eines Proteins an die Oberfläche Hauptursache der Proteinresistenz ist. Durch diese Annäherung der Proteine werden die PEG-Knäuel zusammengepresst und entwässert. Dieser Effekt ist von der PEG-Kettenlänge und -Pfpföichte abhängig. Die Proteinresistenz ist umso ausgeprägter, je länger die PEG-Ketten sind und je dichter sie auf der Oberfläche gepackt vorliegen.

Das Szleifer-Modell basiert auf Untersuchungen der Proteinadsorption auf Glasoberflächen, die mit prä-adsorbierten Ethylenoxid- Propylenoxid- Ethylenoxid (PEG-PPG-PEG)-Triblockcopolymeren verschiedener Blocklängen modifiziert sind. Aus dem Szleifer-Modell geht hervor, dass die Länge der in die Lösung hineinragenden PEG-Ketten nahezu keinen Einfluss auf die Proteinadsorption hat. Im Gegensatz zu Jeon et al. weisen Szleifers Untersuchungen auf die Bedeutung der PEG-Kettendichte und die daraus resultierende Kettenkonformation hin. Mit zunehmender Kopplungsdichte kommt es zu einer Änderung der all-trans Konformation in eine helikale Konformation, wobei letztere eine Verstärkung der Proteinabweisung zur Folge hat.

Dies stimmt mit Ergebnissen überein, die an selbstorganisierten Monoschichten (*Self-assembled monolayers, SAM*) gewonnen wurden. Diese Monoschichten bestehen lediglich aus drei Ethylenoxydeinheiten und weisen eine hohe Kettendichte auf^{121,122}.

Aus beiden Modellen geht hervor, dass die PEG-Schicht zur Ausbildung einer Barriere an der Grenzfläche fungieren soll, damit Proteine daran gehindert werden, mit der darunter befindlichen Oberfläche in Kontakt zu treten. Um dies zu erreichen, sollte die Kopplungsdichte der PEG-Ketten möglichst hoch sein. Die praktische Umsetzung ist allerdings außerordentlich

schwierig. Der Grund dafür sind sterische Barrieren, die nicht nur Proteine sondern ebenfalls zu koppelnde PEG-Moleküle daran hindern, mit der Oberfläche in Kontakt zu treten.

Die Kopplungsdichte kann durch Reaktionsbedingungen, insbesondere durch Variation der Löslichkeitsbedingungen für PEG, von uneingeschränkter bis geringer Löslichkeit (*marginal solvation*), gesteuert werden¹²³. Zusätzlich können Reaktionstemperatur und Salzkonzentration variiert werden.

Unter Bedingungen uneingeschränkter Löslichkeit sind die PEG-Ketten stark hydratisiert (jede Monomereinheit (-CH₂-CH₂-O-) kann mit 2-3 Wassermolekülen solvatisiert werden)¹²⁴ und stoßen sich gegenseitig ab. Die an die Oberfläche gekoppelten hydratisierten PEG-Moleküle verhindern aufgrund ihrer vollständigen Hydratisierung und des daraus resultierenden hohen Trägheitsradius (*radius of gyration*), dass andere PEG-Moleküle in Kontakt mit den reaktiven Gruppen der Oberfläche kommen können. Hieraus resultiert eine geringe Kopplungsdichte.

Für PEG werden die Bedingungen schlechterer Löslichkeit mittels Zugabe von Salzen (z.B. Kaliumsulfat, Magnesiumsulfat, Natriumthiosulfat, Trikaliumphosphat)¹²⁵ im Kopplungspuffer erreicht. Die Salzzugabe führt zur einer Erniedrigung der unteren kritischen Lösungstemperatur (*Lower Critical Solution Temperature*, LCST) für das System PEG/Wasser¹²⁶. Diese Phasenübergangstemperatur wird als Trübungspunkt (*cloud point*) bezeichnet. Unter Bedingungen verringerter Löslichkeit unterliegen die PEG-Ketten reversiblen Phasenübergängen infolge des Bruchs der Hydratationshülle. Damit benötigen die Ketten ein kleineres Volumen. Dies resultiert in einer reduzierten Kettenabstoßung¹²⁷, als Folge dessen die PEG-Ketten nicht länger als solvatisierte statistische Knäuel (*random coil*) vorliegen. Dadurch werden der effektive Trägheitsradius und das hydrodynamische Volumen der einzelnen Ketten reduziert und eine dichtere Packung von gekoppelten Ketten auf der Oberfläche wird ermöglicht.

Daraus folgt, dass beim Vorliegen von hochfunktionalisierten Oberflächen und einer PEG-Kopplung am *cloud point* eine theoretisch maximale PEG-Kettendichte resultiert.

1.4.2 Einsatz von Polysacchariden zur Reduzierung von Proteinadsorption

Polysaccharide stellen eine Alternative zu PEG dar zur Verhinderung von Proteinadsorption und der daraus resultierenden Zelladhäsion¹²⁸. Polysaccharide besitzen im allgemeinen ähnlich wie

PEG eine stark hydratisier- und quellbare Struktur mit flexiblen Ketten, die zur Proteinabstoßung beitragen¹²⁹. Sehr gute Ergebnisse werden durch Oberflächenmodifizierungen auf Heparinbasis für Biomaterialien, die im Blutkontakt stehen, erzielt^{130,131}.

Die bisherigen Arbeiten über proteinresistente Eigenschaften von Polysacchariden sind nicht so umfangreich wie diejenigen über PEG. Bis heute ist wenig bekannt über die Abstoßung von Proteinen und Zellen, die durch Polysaccharide verursacht wird. Ebenso besteht wenig Klarheit über eine Optimierung einer derartigen Abstoßung. Die Natur dieser Moleküle und ihre Interaktion mit Wasser, insbesondere dann, wenn die Moleküle auf der Oberfläche kovalent gebunden sind, ist komplex, und deshalb konnten theoretische Modelle wie für PEG bisher nicht aufgestellt werden.

Es ist nach wie vor unklar, welchen Effekt die Struktur von auf der Materialoberfläche immobilisierten Polysacchariden auf die Proteinadsorption hat. Ein Vergleich verschiedener Orientierungen (*side-on* und *end-on*) immobilisierter Dextranmoleküle zeigt nur einen geringen Unterschied bezüglich der Proteinadsorption¹³².

Polysaccharide wie Dextran und Stärke haben den Vorteil, dass sie chemisch leicht zu modifizieren sind. So besteht die Möglichkeit, funktionelle Gruppen einzuführen und bioaktive Substanzen an Zwischenschichten auf Polysaccharidbasis zu immobilisieren. Auf diese Weise gestaltete Oberflächen verfügen über eine spezifische, biologische Antwort, da die proteinabweisende Polysaccharid-Schicht eine nicht spezifische Proteinadsorption ausschließt^{133,134}.

2 Problemstellung

Die unspezifische Adsorption von Proteinen und anderen Biomolekülen auf Materialoberflächen ist ein Problem, das Medizinprodukten, biochemischen Prozessen, Biodiagnostika und der Bioanalytik gemeinsam ist. Diese Ablagerungen biologischen Materials werden vom lebenden System als Fremdkörper erkannt. Das verursacht eine Reihe von nachteiligen biologischen Reaktionen, die die Leistung eines Implantats beeinträchtigen oder sogar im Falle der Verstopfung kleinlumiger Blutkapillaren zu lebensbedrohlichen Situationen führen können.

Im Rahmen dieser Arbeit wird als Basismaterial das Polymer PVDF eingesetzt, da es ein hohes Anwendungspotential im Bereich der biomedizinischen Technik und in der Implantatentwicklung besitzt. Ein Nachteil des PVDF ist seine Hydrophobie und die damit im Zusammenhang stehende unspezifische Proteinadsorption mit nachfolgender Zell- und Bakterienadhäsion. Ziel dieser Arbeit ist es, ein Verfahren zur oberflächenspezifischen Modifizierung von PVDF unter Erhalt seiner Bulkigenschaften zu entwickeln, um eine unspezifische Proteinadsorption und Zelladhäsion zu unterdrücken. Hierzu sollen zwei unterschiedliche Strategien zur Funktionalisierung bzw. permanenten Oberflächenmodifizierung von PVDF verfolgt werden. Dabei handelt es sich zum einen um eine Modifizierung nach dem CVD-Verfahren und zum anderen um eine Acrylsäure-Pfropfcopolymerisation (vgl. Abb. 1).

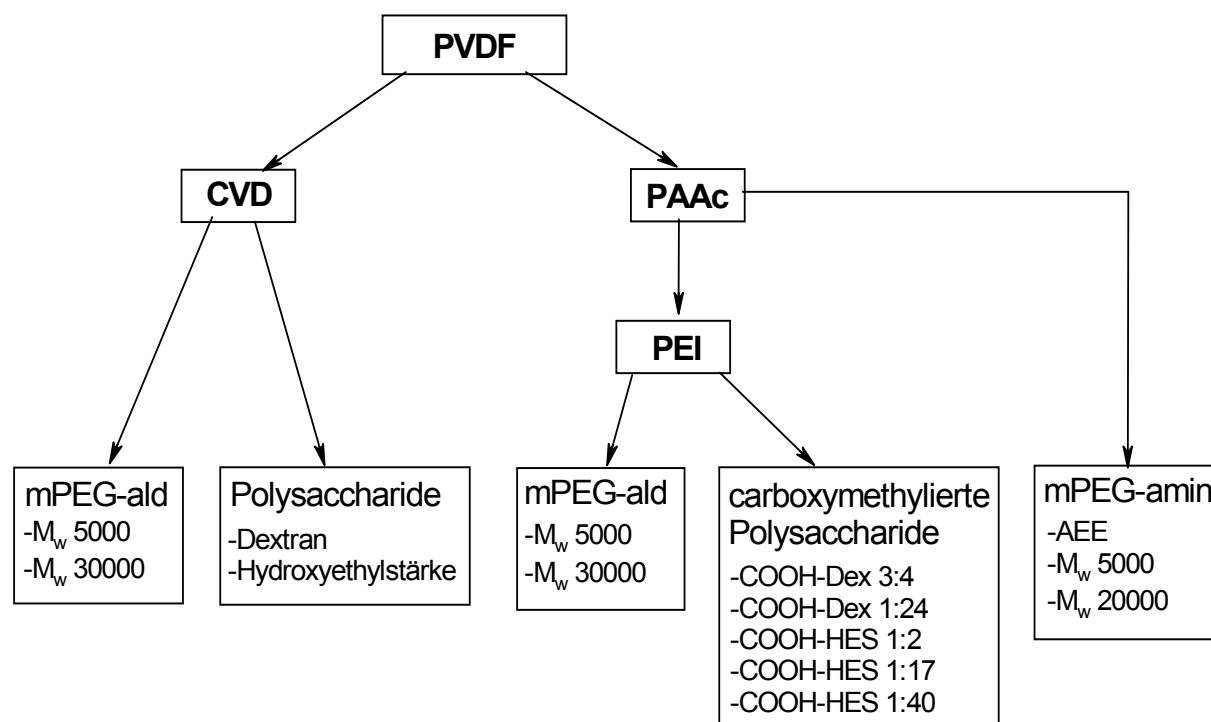


Abb. 1: Darstellung des Konzeptes zur Modifizierung und kovalenten Immobilisierung von PEG oder Polysacchariden auf modifizierten PVDF-Oberflächen

Aus Abb. 1 geht der Aufbau der verschiedenen protein- und zellabweisenden Systeme, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet werden, hervor.

Bei der Funktionalisierung der PVDF-Oberflächen nach dem CVD-Verfahren soll 4-Amino-[2.2]-paracyclophan als Monomer verwendet werden. Hieraus resultiert nach der Abscheidung auf den PVDF-Oberflächen eine dünne Schicht aus Polyamino-*p*-xylylen-*co*-poly-*p*-xylylen mit niedriger Aminogruppendichte (PVDF-Amino-ppx). Darauf sollen zunächst methoxyterminierte-PEG-aldehyde (mPEG-ald) mit unterschiedlichen Molekulargewichten (M_w 5000 und M_w 30000) durch reduktive Aminierung gekoppelt werden. Als Alternative zu den linearen, langkettigen und durch große Torsionswinkel charakterisierten PEG-Molekülen sollen Polysaccharid-Moleküle Dextran (Dex) und Hydroxyethylstärke (HES) eingesetzt werden, die weniger bewegliche Kettenmoleküle bilden und zudem sterisch wesentlich anspruchsvoller sind.

Eine höhere Aminogruppendichte soll durch ein aufwendigeres, dreistufiges Verfahren erzeugt werden. Hierbei soll zunächst mittels argonplasma-induzierter Pfropfcopolymerisation von Acrylsäure eine carboxylgruppenhaltige Oberfläche (PVDF-PAAc) hergestellt werden. Die auf der Oberfläche generierten Carboxylgruppen werden für die Immobilisierung von

Polyethylenimin (PEI) benutzt. Schließlich sollen ebenfalls mPEG-aldehyde mit Molekulargewichten M_w 5000 und M_w 30000 durch reduktive Aminierung an die modifizierten PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen kovalent gebunden werden. Auch hier werden als Alternative zu den PEGs carboxymethylierte Polysaccharide Dextran (COOH-Dex) und Hydroxyethylstärke (COOH-HES) eingesetzt werden.

Als Alternative zur Anbindung von mPEGs an die PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen soll eine direkte Kopplung von methoxyterminierten-PEG-aminen (mPEG-amin) mittels EDC/NHS-Verfahren an die PVDF-PAAc-Oberflächen erfolgen. Die verwendeten mPEG-amine haben Molekulargewichte von M_w 5000 und M_w 20000. Außerdem soll an die PVDF-PAAc-Oberflächen das kurzketttige 2-(2-Aminoethoxy)-ethanol (AEE) gebunden werden. Hierdurch soll der Einfluss von sehr kurzen Diethylenglykolen auf die Proteinadsorption untersucht werden.

Durch die Verwendung dieser beiden unterschiedlichen Verfahren zur Generierung kopplungsfähiger, funktioneller Gruppen auf der PVDF-Oberfläche, die zu einer unterschiedlichen Kopplungsdichte führen, ist eine Überprüfung der Modelle nach Jeon und Szleifer möglich.

Die Charakterisierung der einzelnen Modifizierungsschritte erfolgt durch Anwendung oberflächensensitiver, spektroskopischer Analysemethoden wie Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) und Infrarotspektroskopie in der Aufnahmetechnik der abgeschwächten Totalreflexion (ATR-IR). Unterstützt sollen diese Untersuchungen durch dynamische Kontaktwinkel- und rasterkraftmikroskopische (*atomic force microscopy*, AFM) Messungen werden.

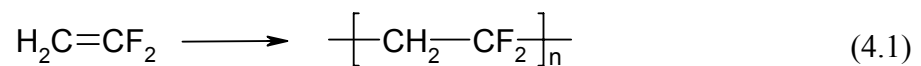
Abschließend soll die Fähigkeit der immobilisierten PEGs und Polysaccharide, die Adsorption von Lysozym und Insulin zu verhindern, durch *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* im *Surface-Modus* (*Surface-MALDI-TOF-MS*) untersucht werden. Darüber hinaus soll mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) die Adsorption von Insulin und Fibronectin auf den modifizierten PVDF-Oberflächen getestet werden. Zusätzlich sollen Insulin, Lysozym und Fibronectin radioaktiv markiert und die auf den Oberflächen adsorbierte Menge der Proteine quantifiziert werden.

Die Oberflächen mit den besten proteinabweisenden Eigenschaften sollen schließlich mit Fibroblasten L 929 auf ihre Zelladhäsionseigenschaften hin untersucht werden, um eine abschließende Beurteilung der Wirksamkeit der Modifizierung zu ermöglichen.

3 Funktionalisierung von PVDF durch Oberflächenmodifizierung

3.1 Das Grundpolymer Polyvinylidenfluorid

Polyvinylidenfluorid (PVDF) wird mittels radikalischer Polymerisation¹³⁵ in Emulsion¹³⁶ oder Suspension¹³⁷ aus dem gasförmigen Monomer 1,1-Difluorethen (Vinylidenfluorid) hergestellt (Gl. 4.1).



Die Eigenschaften des PVDF sind von dessen Struktur abhängig, die im Idealfall ohne Fehlstellen als (-CH₂-CF₂-)-Ketten dargestellt werden kann. Die radikalische Polymerisation von Vinylidenfluorid ist nicht regioselektiv. In der Regel treten etwa 5% des Monomers während des Kettenwachstums mit umgekehrter Orientierung auf und verursachen unregelmäßige Kopf-Kopf (-CF₂-CF₂-)- und Schwanz-Schwanz (-CH₂-CH₂-)-Gruppen in der Polymerkette¹³⁸. In handelsüblichem PVDF liegt der Anteil dieser anomalen Orientierung zwischen 3,5 und 6%¹³⁹.

Das Dipolmoment der PVDF-Monomereinheiten ist sehr hoch, da die Fluoratome im Vergleich zu den Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen stark elektronegativer sind. Dieses Dipolmoment entlang der PVDF-Ketten beeinflusst sowohl die Morphologie und Kristallisation als auch die piezoelektrischen und pyroelektrischen Eigenschaften des PVDF¹⁴⁰.

PVDF zeigt ein sehr komplexes Kristallisationsverhalten. Die kristalline Zusammensetzung wird durch die Parameter Temperatur, Druck, Verstreckungsgrad und elektrische Feldstärke beeinflusst und bestimmt die mechanischen und piezoelektrischen Eigenschaften des PVDF^{141,142}. In Abb. 2 sind schematisch die Bedingungen zum Erhalt und zur Umwandlung der verschiedenen Modifikationen dargestellt.

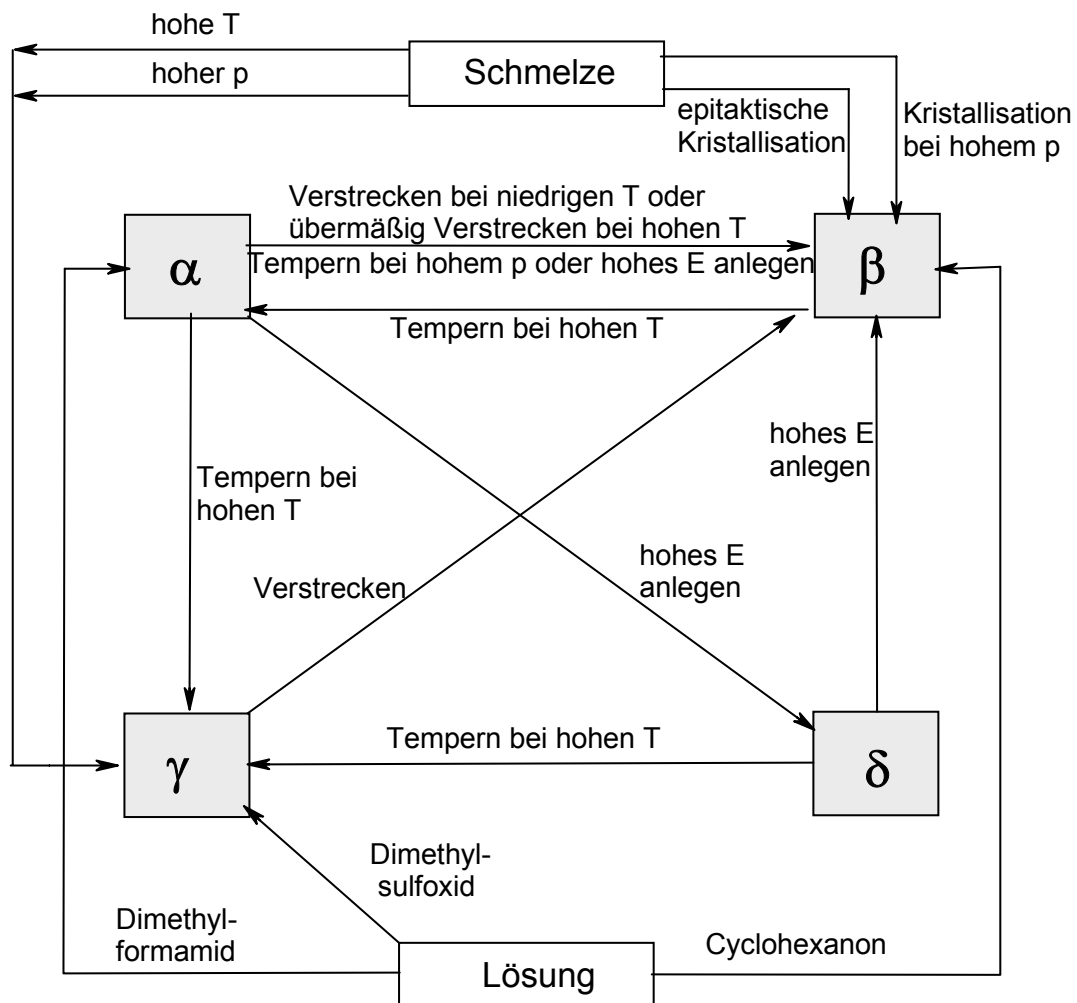


Abb. 2: Schematische Darstellung der Umwandlungsbeziehungen der verschiedenen PVDF-Kristallmodifikationen in Abhängigkeit von den Parametern Temperatur (T), Druck (p), elektrische Feldstärke (E)¹⁴³

PVDF kommt in vier unterschiedlichen kristallinen Modifikationen, α , β , γ und δ genannt, vor. Normalerweise kristallisiert PVDF aus der Schmelze heraus in der α -Modifikation^{144,145}. Die β -Modifikation, die für pyro- und piezoelektrische Anwendungen von Bedeutung ist, wird durch mechanische Deformation der α -Modifikation bei Temperaturen über 100°C erhalten¹⁴⁴. Bei Temperaturen über 160°C kristallisiert ein Teil des PVDF in der γ -Modifikation^{146,147}. Die polare Version der α -Modifikation ist die δ -Modifikation. Sie wird durch eine Polarisation der α -Modifikation in einem elektrischen Feld mit hoher elektrischer Feldstärke erhalten^{148,149}.

Die PVDF-Ketten zeigen eine hohe Flexibilität, weil das *backbone* nur aus Einfachbindungen aufgebaut ist. Die Torsionsenergie um eine C-C Bindung hat drei Minima, die den gauche-minus (g^-), trans (t) und gauche-plus (g^+) Konformationen zuzuordnen sind. Der

Energieunterschied zwischen diesen Minima beträgt nur 2,24 kJ/mol Wiederholungseinheit¹⁵⁰. Daraus resultiert eine entsprechend niedrige Glasübergangstemperatur der amorphen Bereiche ($T_g = -40^\circ\text{C}$).

Abb. 3 zeigt Kugelstab-modell Darstellungen von PVDF-Kettenkonformationen der α , β und γ Kristallmodifikationen in seitlicher Ansicht und Aufsicht sowie die Höhe der Elementarzelle (c).

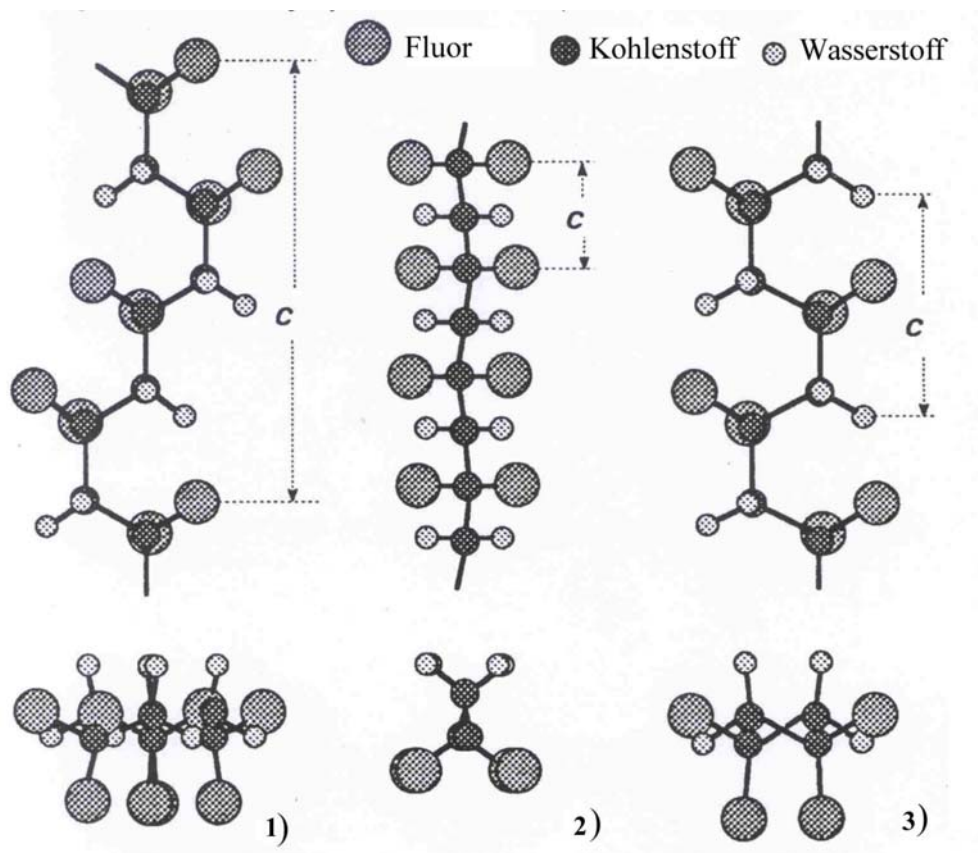


Abb. 3: Darstellung von PVDF-Kettenkonformationen der Kristallmodifikationen γ (1), β (2) und α (3) in seitlicher Ansicht (oben) und Draufsicht (unten); c ist die Höhe der Elementarzelle

In der α -Modifikation liegt eine tg^-tg^+ -Kettenkonformation vor, in der sich die trans-Konformation mit den gauche-minus- bzw. gauche-plus Konformationen abwechselt (Abb. 3-3). In der β -Modifikation hingegen setzt sich das Zellelement aus zwei Polymerketten zusammen, die jeweils in all-trans-Konformation (all- t) vorliegen und ein paralleles Dipolmoment erzeugen (Abb. 3-2). Die γ -Modifikation ist im Vergleich zur α -Modifikation durch längere trans-

Sequenzen (ttg^-ttg^+) charakterisiert und weist ebenfalls wie die β -Modifikation ein paralleles Dipolmoment auf (Abb. 3-1).

Eine Übersicht der Kristalleigenschaften aller vier PVDF-Modifikationen ist in Tab. 3 gezeigt.

Tab. 3: Überblick über die Kristalleigenschaften der Modifikationen des PVDF¹⁵¹

Phasenbezeichnung	Kettenkonformation	Richtung des Dipolmoments	Kristallographie	Zelldimension a/b/c in nm	Dichte in g/cm ³
α	tg^-tg^+	antiparallel	orthorhombisch	0,460/0,964/ 0,462	1,93
β	all- <i>t</i>	parallel	orthorhombisch	0,858/0,491/ 0,256	1,97
γ	ttg^-ttg^+	parallel	monoklin $\beta=93^\circ$	0,496/0,967/ 0,920	1,92
δ	tg^-tg^+	parallel	orthorhombisch	0,460/0,964/ 0,462	1,93

In dieser Arbeit wird ein kommerzielles PVDF-Granulat der Fa. Solvay (Frankreich) eingesetzt, das durch radikalische Polymerisation in Suspension hergestellt wird. Das mittlere Molekulargewicht beträgt $M_w = 110000$ ¹⁵². Aus dem Granulat werden sowohl PVDF-Folien als auch PVDF-Filamente hergestellt. Die PVDF-Folien werden aus der Schmelze hergestellt, indem das Granulat bei 195°C aufgeschmolzen wird. Nach dem Pressvorgang lässt man die Schmelze bei atmosphärischem Druck auf Raumtemperatur langsam abkühlen.

Die Filamente werden in einem Schmelzspinnprozess hergestellt. Durch einen nachfolgenden Verstreckungsprozess erhalten die Filamente ihre mechanischen Eigenschaften¹⁵³.

3.1.1 Thermische Eigenschaften von PVDF

Die Untersuchung des thermischen Verhaltens von PVDF erfolgt mittels Differentialkalorimetrie (DSC) und gibt Aufschluss über die vorliegende Kristallmodifikation. Die DSC erlaubt die Bestimmung charakteristischer thermischer Daten, wie der

Schmelztemperatur (T_m) und Schmelzenthalpie (ΔH_m) kristalliner Phasen oder der Glasübergangstemperatur (T_g) amorpher Bestandteile.

In Abb. 4 sind die thermischen Umwandlungscharakteristika von PVDF als Granulat, Folie und Filament dargestellt. Jeder Schritt in der PVDF-Behandlung resultiert in einer Modifizierung der kristallinen Struktur.

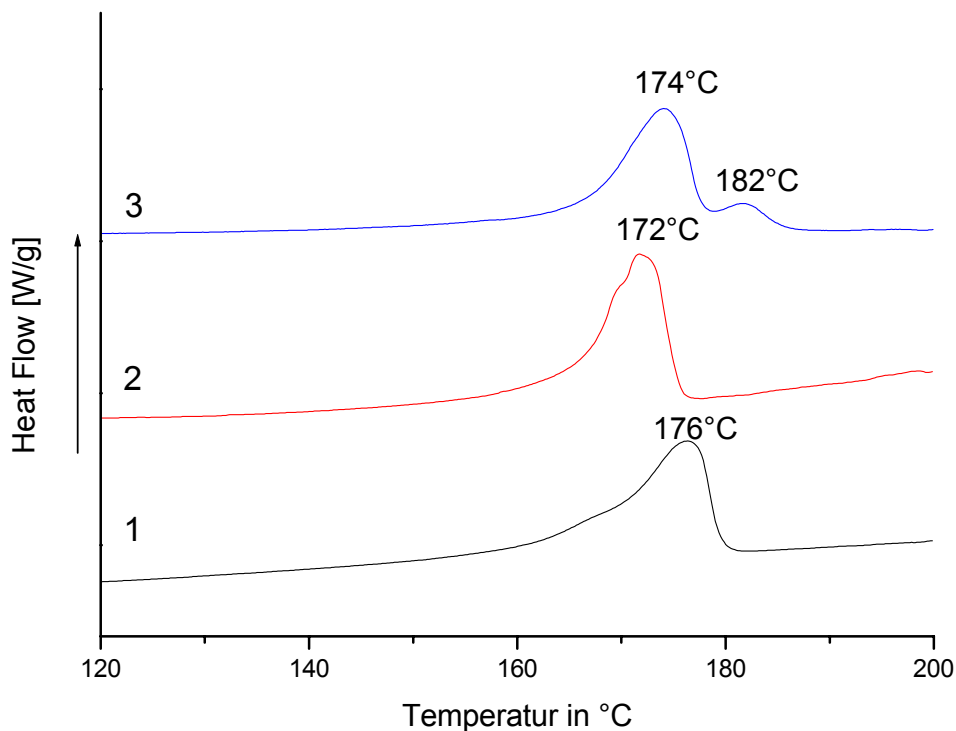


Abb. 4: DSC-Thermogramme von (1) PVDF-Granulat, (2) PVDF-Folie und (3) PVDF-Filament (Aufheizrate 20 K/min, 1. Aufheizen)

Im Thermogramm (1) des PVDF-Granulats tritt ein breiter Schmelzpeak mit einem Maximum bei 176°C auf, der auf die α -Modifikation hinweist. Weiterhin geht aus dem Kurvenverlauf hervor, dass im Bereich von 160-170°C eine Abweichung im Vergleich zum Thermogramm des Herstellers beobachtet werden kann.

Bei PVDF-Folien (Thermogramm 2) wird ein Schmelzpunkt bei 172°C gemessen, der charakteristisch ist für die α -Modifikation. Diese wird durch langsames Abkühlen der Schmelze erhalten. Außerdem wird im Thermogramm vor dem Schmelzpeak eine Schulter detektiert, die auf ein Schmelzen gestörter Kristallite zurückzuführen ist, die während der Abkühlung entstanden sind.

Bei PVDF-Filamenten werden zwei Schmelztemperaturen gemessen: Der erste Schmelzpunkt bei 174°C entspricht der α -Modifikation. Der zweite Schmelzpunkt bei 182°C wird der β -Modifikation zugeordnet, obwohl der Schmelzpeak der γ -Modifikation auch bei dieser Temperatur liegt. Matsushige et al. beobachteten den Effekt von Druck auf die PVDF-Kristallisation und legten die Schmelzpunkte für die β -Modifikation in einem Temperaturbereich von 189-300°C fest¹⁵⁴. El Mohajir et al. ordneten diesen Peak der β -Modifikation zu¹⁵⁵, da nur diese beim Verstrecken aus der α -Phase entstehen kann. Die Bedingungen für die Bildung der γ -Modifikation sind bei der Herstellung von PVDF-Filamenten nicht vorhanden¹⁵³ (vgl. Abb. 2).

In der Messung wird der Aufheizprozess wiederholt, um die thermische Vorgeschichte der Materialien zu eliminieren. Die Ergebnisse des 1. und 2. Aufheizvorganges von PVDF-Granulat, -Folie und -Filament sind in Tab. 4 gegenübergestellt.

Tab. 4: Thermische Eigenschaften von PVDF-Materialien nach DSC-Messungen

Probe	Schmelzpeak			Kristallisationspeak	
	T_m in °C	ΔH_m in J/g	Kristallinitätsgrad in %	T_c in °C	ΔH_c in J/g
Granulat , 1. Aufheizen	176	46,5	50	132	-52,9
Granulat , 2. Aufheizen	175	49,4	53		
Folie , 1. Aufheizen	172	43,9	47	133	-49,9
Folie , 2. Aufheizen	174	45,2	48		
Filament , 1. Aufheizen	174 und 182	50,0	54	141	-52,9
Filament , 2. Aufheizen	174	50,5	54		

Granulat und Folie zeigen innerhalb der Messgenauigkeit ein identisches thermisches Verhalten bei einer Wiederholung des Aufheizprozesses im Gegensatz zur 1. Aufheizkurve (vgl. Tab. 4). Bei den Filamenten tritt nach dem zweiten Aufheizen ebenfalls nur noch der Peak der α -Phase auf, da die Filamente während des 1. Aufheizens geschmolzen wurden und die Kristallisation aus der Schmelze heraus bei atmosphärischem Druck durchgeführt wurde (vgl. Abb. 2).

Zusätzlich zu den Schmelztemperaturen werden aus den ermittelten Schmelzenthalpien die Kristallinitätsgrade der unterschiedlichen PVDF-Materialien ermittelt. Diese Werte sind ebenfalls in Tab. 4 gezeigt und beziehen sich gemäß der Literatur auf ein „100 % kristallines“ PVDF (Kristallit-Schmelzwärme mit 93,2 J/g)¹⁵⁶.

Aus der ersten Aufheizphase wird für das Granulat ein Kristallinitätsgrad von 50% berechnet. Dieser Wert liegt niedriger als die vom Hersteller angegebenen 64%. Für Folien wird ein niedrigerer Kristallinitätsgrad von 47% berechnet. Da die Filamente während des Herstellungsprozesses verstreckt werden, zeigen sie von allen drei PVDF-Materialien erwartungsgemäß den höchsten Kristallinitätsgrad von 54%. Die Schmelzenthalpien und die daraus resultierenden Kristallinitätsgrade sollten nach dem 2. Aufheizvorgang für alle PVDF-Materialien gleich sein. Dies trifft für Granulat und Filament erwartungsgemäß zu. Im Gegensatz dazu ergibt sich für die Folie auch nach dem 2. Aufheizvorgang ein niedrigerer Kristallinitätsgrad.

3.1.2 Schwingungsspektroskopische Messungen an PVDF-Materialien

Schwingungsspektroskopische Verfahren wie Infrarot- (IR) und Raman-Spektroskopie sind wichtige Methoden zur Bestimmung der Kettenkonformation und der daraus abzuleitenden kristallinen Formen des PVDF. Da für die weiteren Einsatzzwecke der PVDF-Materialien insbesondere deren Oberflächeneigenschaften von Interesse sind, werden beide schwingungsspektroskopische Methoden in oberflächensensitiver Weise durchgeführt. Dies bedeutet im Falle der IR-Spektroskopie der Einsatz interner Reflexionselemente (IRE) wie beispielsweise Germanium (Ge) oder Thalliumbromid/-iodid-Mischkristall (KRS-5).

Die Region zwischen 400-800 cm^{-1} liefert charakteristische Informationen bezüglich der kristallinen Formen des PVDF. Aus diesem Grunde werden die Messungen unter Verwendung eines KRS-5 Kristalls als Reflexionselement durchgeführt. Die Informationstiefe der IR-ATR-Technik liegt bei Verwendung eines KRS-5-Kristalles bei 0,5 bis 3 μm ¹⁵⁷.

Abb. 5a zeigt die Infrarotspektren einer PVDF-Folie (1) und eines PVDF-Filamentes (2) im Bereich von 3500-450 cm^{-1} . Außerdem werden in Abb. 5b Ausschnittsvergrößerungen des Wellenzahlbereiches von 1500 bis 400 cm^{-1} gezeigt, der detaillierte Informationen über die Kristallinität der PVDF-Materialien enthält.

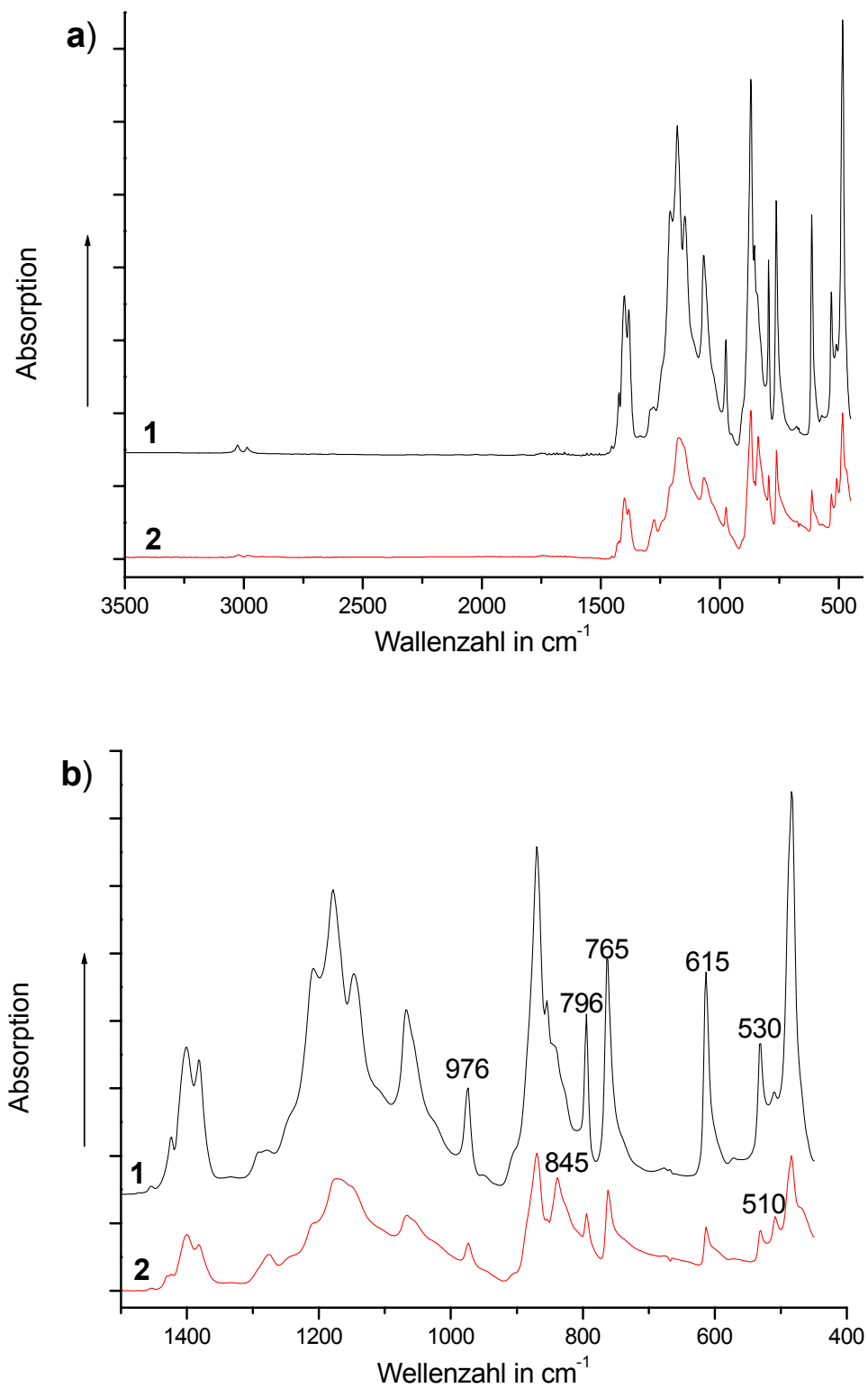


Abb. 5: a) IR-ATR-Übersichtsspektren einer PVDF-Folie (1) und eines PVDF-Filamentes (2); b) Ausschnittsvergrößerungen mit Informationen zur Kristallinität beider PVDF-Materialien (KRS-5 als Reflexionselement)

In der Ausschnittvergrößerung des Spektrum 1 der PVDF-Folie treten die für die α -Phase charakteristischen Absorptionsbanden auf¹⁵⁸. Zu diesen Banden gehören (CF_2) -Deformationsschwingungen bei 530 cm^{-1} , 615 cm^{-1} und 765 cm^{-1} . Außerdem sind hierfür (CH_2) -Deformationsschwingungen bei 796 cm^{-1} und 976 cm^{-1} charakteristisch. Die bei der β - und γ -Modifikation auftretende (CF_2) -Deformationsschwingung von trans-Segmenten bei 812 cm^{-1} wird nicht detektiert. Ebenso wenig wird die ausschließlich für die β -Phase typische (CH_2) -Deformationsschwingung bei 845 cm^{-1} gemessen.

Im Gegensatz zur PVDF-Folie sind in der Ausschnittvergrößerung des Spektrums 2 des PVDF-Filamentes die für die β -Phase charakteristischen Banden bei 510 cm^{-1} und 845 cm^{-1} erkennbar. Die gesamte Zuordnung aller Absorptionsbanden ist im Anhang aufgeführt (Tab. A1).

Die schwingungsspektroskopischen Messungen stehen im Einklang mit den DSC-Untersuchungen, bei denen ebenfalls fast ausschließlich die α -Phase detektiert wird. Im IR-Spektrum des PVDF-Filamentes wird zudem die β -Phase detektiert. Dies ist ein Beleg dafür, dass der Schmelzpeak bei 182°C im Thermogramm der β -Phase und nicht der γ -Phase zugeordnet werden muss (vgl. Abb. 4).

Weiterhin können diese Ergebnisse mit Hilfe der Raman-Mikrospektroskopie an beiden PVDF-Materialien bestätigt werden. In Abb. 6 ist eine Ausschnittsvergrößerung der Raman-Spektren der PVDF-Folie (1) und des PVDF-Filamentes (2) aus dem Wellenzahlbereich 700 bis 900 cm^{-1} gezeigt.

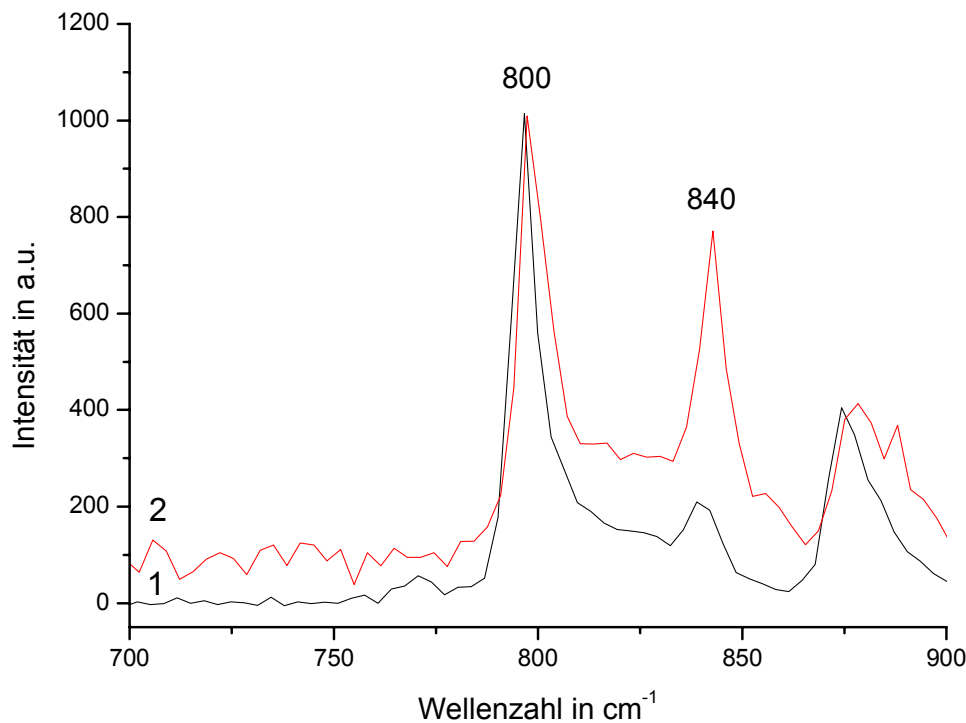


Abb. 6: Ausschnitt aus den Ramanspektren der PVDF-Folie (1) und des PVDF-Filamentes (2) im Bereich $700\text{-}900\text{ cm}^{-1}$

In Ergänzung zu den IR-Spektren weisen die Raman-Spektren bei 800 und 840 cm^{-1} zwei Banden auf, die zur Strukturcharakterisierung der PVDF-Materialien verwendet werden können. Sowohl die PVDF-Folie als auch das PVDF-Filament weisen eine starke $\nu(\text{CH}_2)$ -Bande bei 800 cm^{-1} auf. Diese Bande wird in Übereinstimmung mit der Literatur der α -Phase zugeordnet¹⁵⁹.

Außerdem weisen beide Materialien eine für die β -Phase charakteristische $\nu(\text{CF}_2)$ -Bande bei 840 cm^{-1} auf. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass sich das Bandenverhältnis $800/840$ beider Materialien deutlich unterscheidet, wobei das PVDF-Filament einen deutlich größeren Anteil an β -Modifikation enthält.

3.1.3 Röntgenphotoelektronenspektroskopische Messungen an PVDF-Folie

Die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS : *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) ist eine oberflächensensitive Messtechnik, die die quantitative Elementzusammensetzung, sowie Aussagen über die Bindungszustände der Elemente- mit Ausnahme von Wasserstoff und

Helium- an Festkörperoberflächen ermöglicht. Die Informationstiefe diese Methode beträgt in Abhängigkeit von den Messbedingungen 6-10 nm.

In Tab. 5 sind die Elementzusammensetzungen und die Bindungsenergien der PVDF-Folienoberflächen den berechneten Werten, die sich aus der Zusammensetzung der Wiederholungseinheit (-CH₂-CF₂-) ergeben, gegenübergestellt.

Tab. 5: Elementzusammensetzung und Bindungsenergien von PVDF-Folienoberfläche im Vergleich zu den berechneten Werten

Oberfläche		Kohlenstoff (C1s) in Atom-%			O1s in Atom-%	N1s in Atom-%	F1s in Atom-%
		285,0 eV	286,5 eV	290,9 eV	531,0 eV	400,0 eV	688,0 eV
		<u>C</u> -H, <u>C</u> -C	<u>C</u> -O, <u>CH</u> ₂ -CF ₂	CH ₂ - <u>C</u> F ₂	<u>C</u> -O, C- <u>O</u> -C	C- <u>N</u>	C- <u>F</u> ₂
1. PVDF-Folie	46,9	3,2	23,4	20,3	2,4	0,9	49,8
2. PVDF berechnet	50,0	-	25,0	25,0	-	-	50,0

Das theoretische Atom-Verhältnis von Kohlenstoff zu Fluor in PVDF beträgt 1:1. Im Gegensatz dazu resultiert aus den XPS-Messungen an PVDF-Folien eine Elementzusammensetzung von 46,9-Atom% Kohlenstoff zu 49,8-Atom% Fluor. Außerdem werden in den Folien als Fremdatome Sauerstoff und Stickstoff detektiert. Aus dem hochaufgelösten C1s-Spektrum sollte theoretisch für die (CH₂-CF₂)-Kohlenstoffspezies bei 286,5 eV und für die (CH₂-CF₂)-Kohlenstoffspezies bei 290,9 eV ein Verhältnis von 1:1 resultieren. Tatsächlich zeigen die XPS-Messungen ein Verhältnis von 23,4 Atom-% zu 20,3 Atom-%. Weitere 3,2 Atom-% entfallen auf detektierten aliphatischen Kohlenstoff (C-H, C-C) bei 285,0 eV.

3.2 Oberflächenmodifizierung von PVDF durch CVD-Polymerisation von 4-Amino-[2.2]-paracyclophan

Zur Funktionalisierung von PVDF-Oberflächen mit Aminogruppen wird eine Polymerisation von 4-Amino-[2.2]-paracyclophan mit Hilfe des CVD-Prozesses nach Gorham durchgeführt¹⁶⁰.

Abb. 7 zeigt den schematischen Aufbau dieser Verfahrensweise.

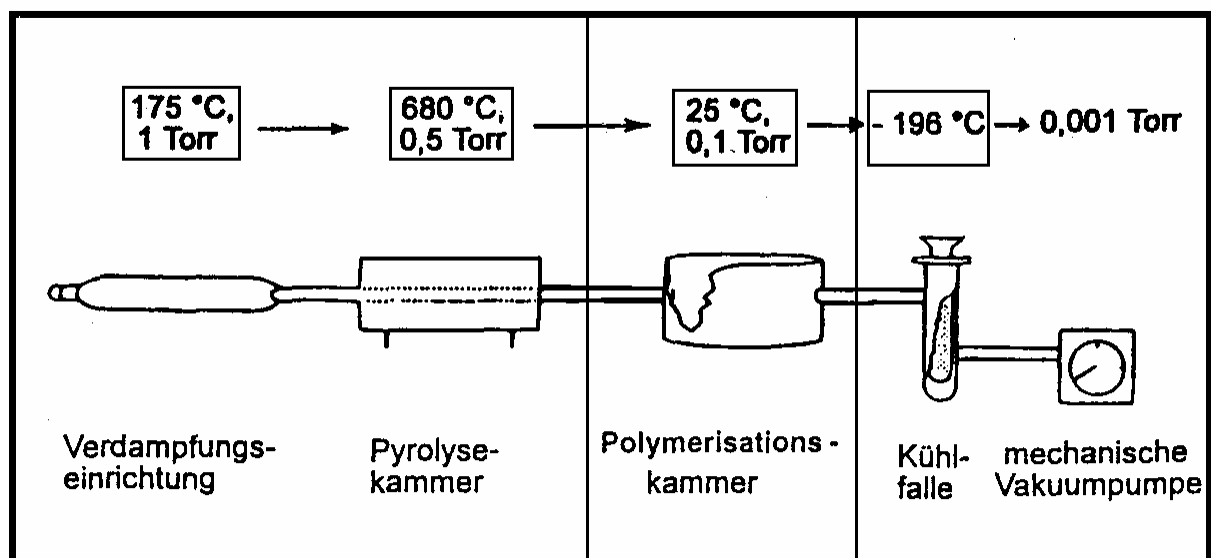
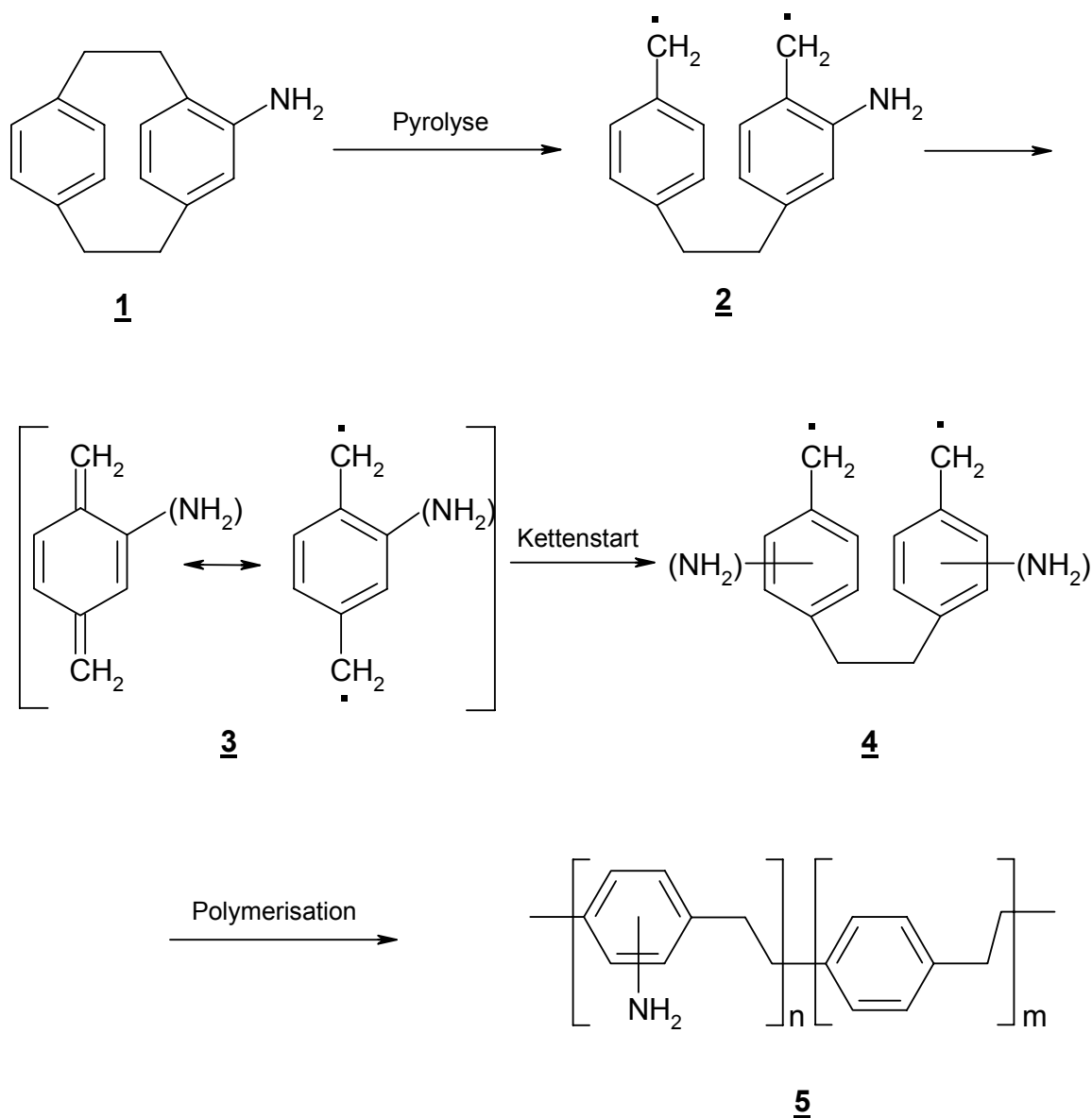


Abb. 7: Darstellung des Gorham-Prozesses zur Herstellung von Poly-*p*-xylylen (ppx)¹⁶¹

Diese Methode, die bislang nur zu Beschichtung von Metallen eingesetzt wurde^{162,163}, wird hier erstmalig zur Oberflächenmodifizierung eines Polymeren (PVDF) angewandt.

In der Verdampfungseinrichtung wird das Monomer 4-Amino-[2.2]-paracyclophan sublimiert und mit Hilfe eines Argon-Stromes in eine nachgeschaltete Pyrolysezone überführt. Die in dieser Zone herrschenden Bedingungen (680 °C, 0,5 Torr) führen aufgrund der Ringspannung im Paracyclophan zu einer Spaltung der beiden Ethylenbrücken. Dabei kommt es zur Ausbildung reaktiver Spezies. Diese reaktiven Spezies gelangen in eine Kammer (Polymerisationskammer), in der auf der gekühlten Probenoberfläche bei 25°C und 0,1 Torr die Polymerisation unter praktisch quantitativer Bildung von Poly-*p*-xylylen (ppx) stattfindet. Schema 1 verdeutlicht die einzelnen Reaktionsschritte, die zu mit Amino-poly-*p*-xylylen beschichteten PVDF-Oberflächen (PVDF-Amino-ppx) führen.



Schema 1: Darstellung der Reaktionen, die zur Bildung von Amino-ppx durch CVD-Polymerisation führen^{164,165,166}

Während der Pyrolyse bei $>600^{\circ}\text{C}$ kommt es zur homolytischen Spaltung einer der beiden pcp-Brücken des Amino-ppc **1** unter Ausbildung eines Biradikals **2**. Die Ringöffnung der Paracyclophane über einen radikalischen Übergangszustand konnte anhand von Isomerisierungsreaktionen bei der Pyrolyse pseudo-geminal substituierter Dibrom-[2.2]-paracyclophane nachgewiesen werden¹⁶⁷. Diese Biradikale werden in hochreaktive Monomere **3** gespalten. Man unterscheidet zwei energetisch unterschiedliche Strukturen. Die Struktur in **3**, die ein chinoides System wiedergibt, ist um 12 kJ/mol energieärmer als der biradikalische

Aromat¹⁶⁸. Auf der gekühlten Probenoberfläche kommt es unter Rekombination der reaktiven Spezies **3** zum Kettenstart der Polymerisation, die im weiteren Verlauf schließlich zu Bildung des Amino-ppx **5** führt.

3.2.1 Schwingungsspektroskopische Messungen an PVDF-Amino-ppx-Oberflächen

Die Dicke von Amino-ppx-Schichten auf Metalloberflächen beträgt 300 bis 500 nm³⁵. Unter Einhaltung gleicher Reaktionsbedingungen wird angenommen, dass die Ausbildung etwa gleich starker Schichtdicken von Amino-ppx auf PVDF-Oberflächen erfolgt. Die PVDF-Folien werden mit und ohne Amino-ppx-Beschichtung mit Hilfe der IR-ATR-Spektroskopie untersucht. Dabei wird Germanium als IRE mit einer Informationstiefe von 0,2-1,0 µm¹⁵⁷ eingesetzt.

Abb. 8 zeigt die Übersichtspektren der unmodifizierten (1) und mit Amino-ppx modifizierten (2) PVDF-Oberflächen.

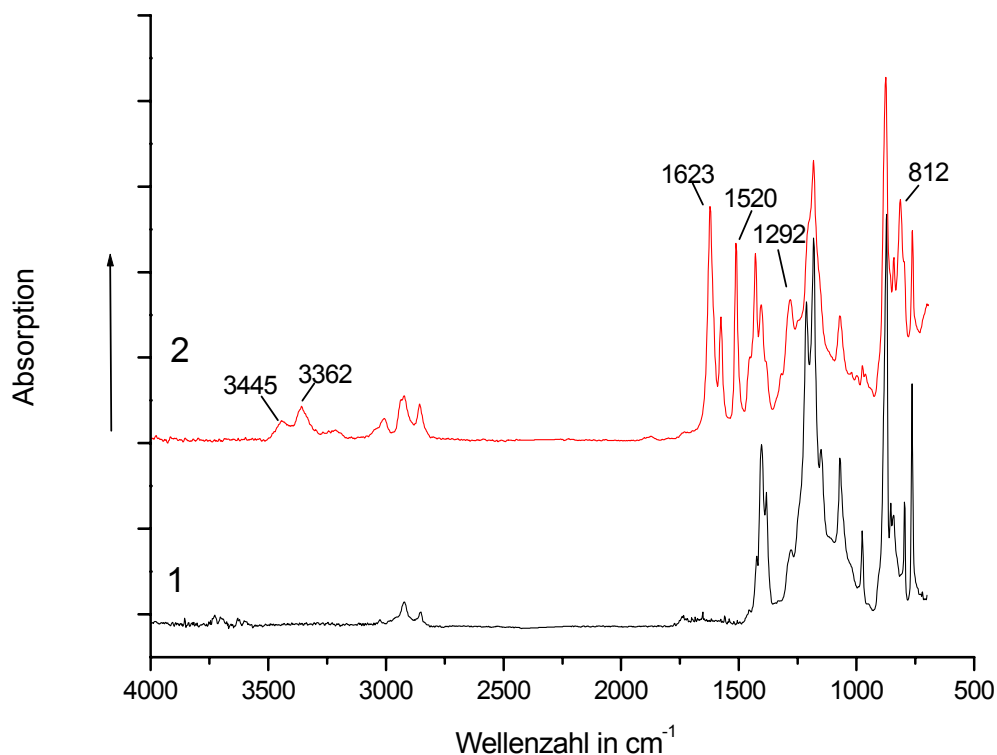


Abb. 8: IR-ATR-Spektren von PVDF-Folien vor (1) und nach (2) Beschichtung mit Amino-ppx (Germanium als IRE)

Im Spektrum der PVDF-Amino-ppx-Oberfläche sind neben den ppx-Gerüstschwingungen, deren stärkste Bande eine (C=C)-Streckschwingung bei 1520 cm^{-1} ist, charakteristische Banden der primären Aminogruppe zu erkennen. Hierbei handelt es sich um die symmetrische und asymmetrische (NH)-Valenzschwingung bei 3445 und 3362 cm^{-1} . Außerdem werden die (NH)-Deformationsschwingung bei 1623 cm^{-1} und die (CN)-Valenzschwingung bei 1292 cm^{-1} detektiert. Die Banden der aromatischen (CH)-Deformationsschwingungen, die Auskunft über das Substitutionsmuster des Aromaten geben, befinden sich zwischen 810 und 870 cm^{-1} . Für 1,4-disubstituierte Aromaten ist eine charakteristische Einzelbande bei 810 cm^{-1} zu erkennen, während für 1,2,4-trisubstituierte Ringe eine Doppelbande bei ca. 810 cm^{-1} und bei 850 bis 870 cm^{-1} typisch ist¹⁶⁹. Da sich in diesem Bereich auch die Schwingungsbanden des Grundmaterials PVDF befinden, ist eine eindeutige Zuordnung schwierig. Nur die ausgeprägte Bande bei 812 cm^{-1} , die sich aus einer Überlagerung der Einzelbande des 1,4-disubstituierten Ringes und einer der beiden Banden des 1,2,4-trisubstituierten Ringes ergibt, kann dem Amino-ppx eindeutig zugeordnet werden.

3.2.2 XPS-Messungen an PVDF-Amino-ppx-Oberflächen

Die Elementzusammensetzung der erzeugten PVDF-Amino-ppx-Oberflächen wird außerdem mittels XPS untersucht. In Tab. 6 sind die ermittelten Werte der unmodifizierten und modifizierten PVDF-Oberflächen und die berechneten Werte der Amino-ppx-Schicht gegenübergestellt.

Tab. 6: Elementzusammensetzungen und die Bindungsenergie von PVDF-Oberflächen vor und nach der CVD-Beschichtung im Vergleich zu den berechneten Werten für Amino-ppx

Oberfläche	Kohlenstoff (C1s)			O1s	N1s	F1s	
	in Atom-%			in Atom-%	in Atom-%	in Atom-%	
		285,0eV	286,5eV	290,9eV	532,5eV	399,7eV	688,0eV
		<u>C</u> -H, <u>C</u> -C	<u>CH</u> ₂ - <u>CF</u> ₂	<u>CF</u> ₂ - <u>CH</u> ₂	<u>C</u> - <u>O</u>	<u>C</u> - <u>N</u>	<u>C</u> - <u>F</u> ₂
			<u>C</u> - <u>O</u> , <u>C</u> - <u>N</u>				
1. PVDF	46,9	3,2	23,4	20,3	2,4	0,9	49,8
2. PVDF-Amino-ppx	89,5	83,7	5,8	-	5,2	5,3	-
3. Amino-ppx berechnet	94,1	88,2	5,9	-	-	5,9	-

Alle Werte sind für Si aus [-Si(Me)₂-O-] korrigiert, wobei der maximale Si-Gehalt 2,0 Atom-% betrug

Nach der Modifizierung der PVDF-Oberflächen mit Amino-ppx wird eine deutliche Zunahme an Kohlenstoff in dem von der XPS erfassten Informationsvolumen detektiert. Im Vergleich zu unbehandelten PVDF-Oberflächen wird der Stickstoffanteil infolge der Amino-ppx-Beschichtung von 0,9 auf 5,3 Atom-% erhöht. Gleichzeitig wird eine Erhöhung des Sauerstoffgehaltes detektiert, ein Ergebnis, das durch eine Reaktion mit Luftsauerstoff nach der Beschichtung zustande kommt. Ein weiterer Hinweis für die erfolgreiche Abscheidung des Amino-ppx auf der PVDF-Oberfläche ergibt sich aus der Tatsache, dass an PVDF-Amino-ppx mittels XPS kein Fluor detektiert werden kann.

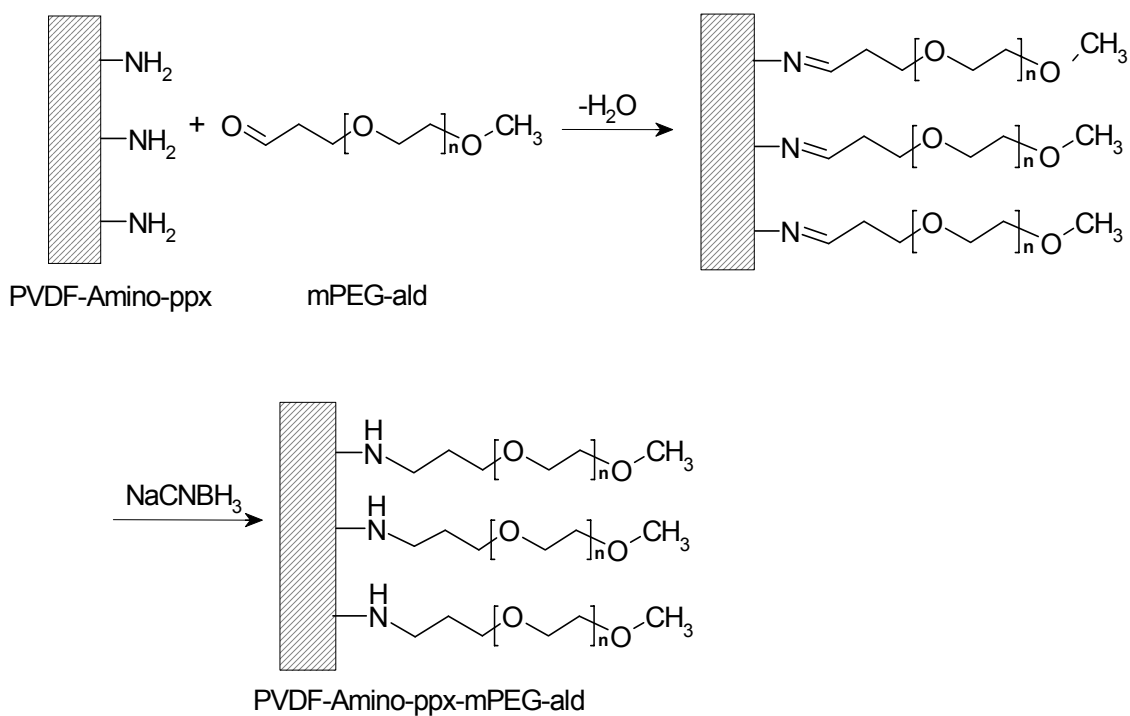
Die hochaufgelösten C1s-Spektren des PVDF-Amino-ppx liefern in Folge der sehr deutlichen Zunahme an Kohlenstoff-Kohlenstoff Signal, das gemäß Strukturformel **5**, Schema 1, vom ppx-Gerüst herrührt, einen weiteren Beleg für die erfolgreiche Beschichtung.

3.3 Immobilisierung von Polyethylenglykolen und Polysacchariden an PVDF-Amino-ppx-Oberflächen

Die mittels CVD-Beschichtung auf die PVDF-Oberflächen aufgebraachte Amino-ppx-Schicht wird anschließend als polymere Zwischenschicht für die Immobilisierung proteinabweisender Schichten verwendet. Diese Schichten bestehen in Rahmen dieser Arbeit aus Polyethylenglykolen oder Polysacchariden (Dextran und Hydroxyethylstärke).

3.3.1 Immobilisierung von mPEG-ald an PVDF-Amino-ppx-Oberflächen

Methoxyterminierte-PEG-aldehyde (IUPAC: O-(3-Oxopropyl)-O'-methylpolyethylenglykol) mit einem mittleren Molekulargewicht von 5000 (m-PEG-ald 5000) oder 30000 (mPEG-ald 30000) werden mit Hilfe einer reduktiver Aminierung auf der PVDF-Amino-ppx Oberfläche immobilisiert.



Schema 2: Kovalente Immobilisierung von mPEG-ald auf einer PVDF-Amino-ppx-Oberfläche und anschließende Reduktion der Schiffschen Basen mit Natriumcyanborhydrid zu sekundären Aminogruppen

Hierbei handelt es sich um eine zweistufige Reaktion (Schema 2). In der ersten Reaktion setzen sich die endständigen Carbonylgruppen der mPEG-ald-Moleküle mit den Aminogruppen des PVDF-Amino-ppx unter Bildung von Schiffsbasen um. Im zweiten Schritt werden diese mittels Natriumcyanborhydrid (NaCNBH_3) zu den entsprechenden sekundären Aminogruppen reduziert.

Die kovalente Immobilisierung von m-PEG-ald an Amino-ppx-Oberflächen wird zur Einstellung der PEG-Kopplungsdichte unter Variation der Löslichkeitsbedingungen für PEGs bzw. PEG-Derivate von uneingeschränkter bis geringer Löslichkeit durchgeführt. Dabei wird die Reaktionstemperatur (37°C bzw. 60°C) sowie die Salzkonzentration (0,2 M bzw. 0,6 M Kaliumsulfat) variiert.

Die Länge einer Ethylenoxideinheit wurde aus kristallographischen Daten mit 0,278 nm bestimmt¹⁷⁰. mPEG-ald 5000 mit 114 und mPEG-ald 30000 mit 682 Ethylenoxideinheiten haben im vollausgestreckten Zustand eine Kettenlänge von 32 bzw. 190 nm. Im Gegensatz dazu resultieren aus Messungen in trockenem Zustand mittels Ellipsometrie an auf Silika immobilisierten mPEG-Derivaten wesentlich geringere Schichtdicken. Dabei wurde für mPEG-epoxid 5000 eine Schichtdicke von 2 bis 7 nm¹⁷¹ und für mPEG-ald 2000 von 1,5 nm⁷² gemessen. Demzufolge kann mittels IR-ATR-Spektroskopie eine erfolgreiche Immobilisierung von mPEG-aldehyden an PVDF-Amino-ppx nicht nachgewiesen werden, da die Schichtdicke wesentlich kleiner ist als die Informationstiefe der IR-ATR-Spektroskopie.

3.3.1.1 Nachweis von mPEG-ald auf PVDF-Amino-ppx mittels XPS

Die im Gegensatz zur IR-ATR-Spektroskopie wesentlich oberflächensensitivere XPS wird zum Nachweis von mPEG-ald 5000 bzw. 30000 auf PVDF-Amino-ppx-Oberflächen eingesetzt. In Tab. 7 sind die gemessenen Elementzusammensetzungen sowie Bindungsenergien der PVDF-Amino-ppx-Oberflächen nach Immobilisierung der m-PEG-aldehyde unter verschiedenen Reaktionsbedingungen dargestellt.

Tab. 7: Mittels XPS ermittelte Elementzusammensetzungen und die Bindungsenergien von PVDF-Amino-ppx-Oberflächen vor und nach Immobilisierung von m-PEG-aldehyden unter verschiedenen Reaktionsbedingungen

Oberfläche	Kohlenstoff (C1s) in Atom-%	in Atom-%			O1s in Atom-%	N1s in Atom-%	Andere in Atom-%	O/C
		285,0eV C-H,C-C	286,5eV C-O,C-N	288,5eV N-C=O	532,1eV C-O	399,7eV C-N		
1. PVDF-Amino-ppx	89,5	83,7	5,8	-	5,2	5,3	-	0,06
2. +mPEG-ald 5000 37°C-0,6M K ₂ SO ₄	81,2	62,2	18,0	0,9	14,4	3,2	1,2	0,18
3. +mPEG-ald 5000 60°C-0,2M K ₂ SO ₄	78,8	60,6	14,5	3,7	13,3	6,1	1,9	0,17
4. +mPEG-ald 5000 60°C-0,6M K ₂ SO	71,8	18,6	53,2	-	27,1	1,2	-	0,38
5. +mPEG-ald 30000 37°C-0,6M K ₂ SO ₄	85,2	64,5	20,7	-	10,2	4,1	0,4	0,12
6. +mPEG-ald 30000 60°C-0,2M K ₂ SO ₄	80,7	59,5	17,6	3,6	13,7	5,1	0,4	0,17
7. +mPEG-ald 30000 60°C-0,6M K ₂ SO ₄	75,8	32,3	43,5	-	22,2	2,0	-	0,29

Alle Werte sind für Si aus [-Si(Me)₂-O-] korrigiert, wobei der maximale Si-Gehalt 2,5 Atom-% betrug

Im Vergleich zur PVDF-Amino-ppx-Oberfläche zeigen alle Oberflächen mit immobilisierten mPEG-aldehyden eine Verringerung des Kohlenstoffanteils. Demgegenüber weisen alle Oberflächen eine deutliche Zunahme an Sauerstoff auf. Eine derartig deutliche Tendenz ist bezüglich des Stickstoffanteils nicht bei allen Oberflächen zu erkennen. Wie aus Tab. 7 hervorgeht, werden im Vergleich zur PVDF-Amino-ppx-Oberfläche bei den unter *cloud point* Kopplungsbedingungen modifizierten Oberflächen 4 und 7 die niedrigsten Kohlenstoff- und Stickstoffanteile sowie die höchsten Sauerstoffanteile detektiert.

In Ergänzung zu den bisherigen Informationen zeigen die hochaufgelösten C1s-Spektren eine Intensitätszunahme der Photolinie bei 286,5 eV für alle mit mPEG-aldehyden modifizierten

Oberflächen. Da durch die Kopplung der mPEG-aldehyde kein Stickstoff in die Oberfläche des PVDF-Amino-ppx eingeführt wird, kann davon ausgegangen werden, dass diese Intensitätszunahme ausschließlich durch die Etherkohlenstoffe der mPEG-aldehyde hervorgerufen wird. Auch hier tritt die deutlichste Zunahme bei den Oberflächen auf, die unter *cloud point* Kopplungsbedingungen modifiziert werden. Gleichsam zeigen die hochaufgelösten C1s-Spektren dort die stärkste Abnahme an aliphatischem Kohlenstoff.

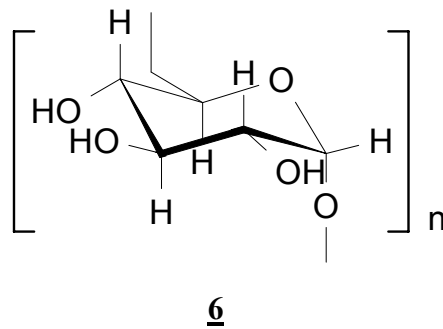
Zur Beurteilung der Güte der Kopplungsbedingungen für PEGs bzw. PEG-Derivate wird in Übereinstimmung mit der Literatur zusätzlich das O/C-Verhältnis angegeben^{172,173}. Gemäß der theoretischen XPS-Zusammensetzung für PEG sollte ein O/C-Verhältnis von 0,5 resultieren. Außerdem sollte der Stickstoffanteil Null werden. Im Gegensatz dazu zeigen die Messergebnisse selbst unter *cloud point* Kopplungsbedingungen weder ein Absinken des Stickstoffanteils auf Null noch einen Anstieg des O/C-Verhältnisses auf 0,5. Dies ist nur zu erklären mit einer Dicke der immobilisierten PEG-Derivate, die kleiner ist als die maximale Informationstiefe der XPS.

Ebenso wird aus dem O/C-Verhältnis deutlich, dass die Temperatur bei konstanter Salzkonzentration einen großen Einfluss auf die Immobilisierung der mPEG-aldehyde unabhängig von deren Molekulargewicht hat. Dies verdeutlicht der Anstieg des O/C-Verhältnisses bei mPEG-ald 5000 von 0,18 auf 0,38 und bei mPEG-ald 30000 von 0,12 auf 0,29, wenn die Temperatur von 37°C auf 60°C erhöht wird. Für den Anstieg der Salzkonzentration bei konstanter Temperatur resultiert eine völlig analoge Tendenz. Die ermittelten Ergebnisse stehen in sehr guter Übereinstimmung mit der Löslichkeitsreduktion und der gegenseitigen Kettenabstoßung von PEG-Molekülen bei steigender Temperatur bzw. steigender Ionenstärke¹⁷⁴.

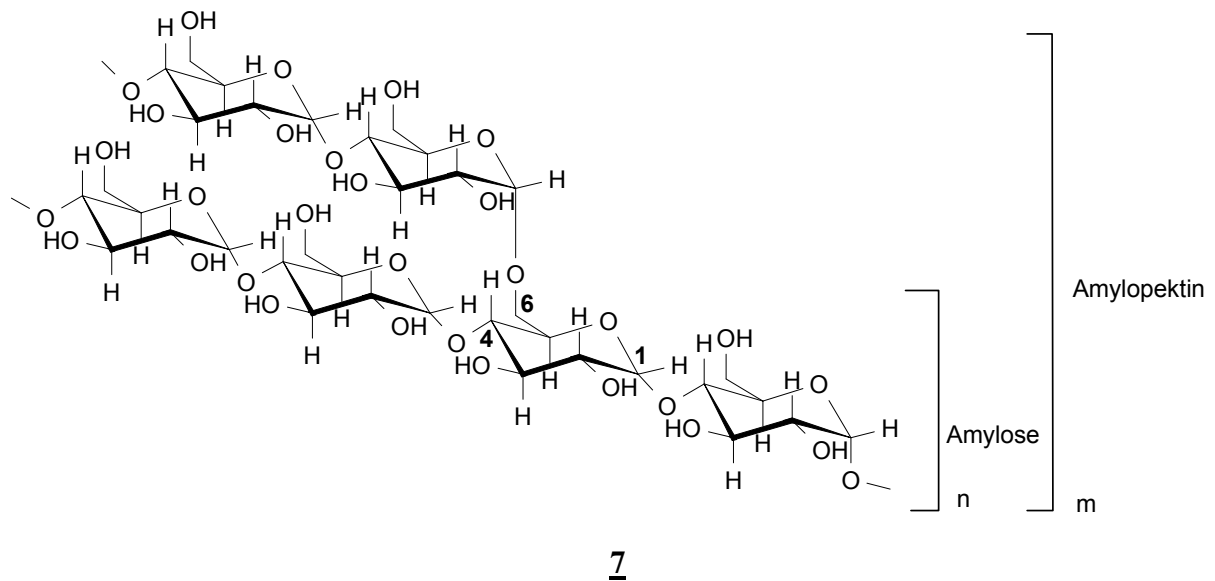
3.3.2 Immobilisierung von Polysacchariden an PVDF-Amino-ppx-Oberflächen

Eine Alternative zur Reduzierung unerwünschter Proteinadsorption und Zelladhäsion auf Biomaterialoberflächen stellt die Immobilisierung von Polysacchariden dar. Daher wird im Rahmen dieser Arbeit die Kopplung von Dextran und Hydroxyethylstärke an modifizierte PVDF-Oberflächen vorgenommen.

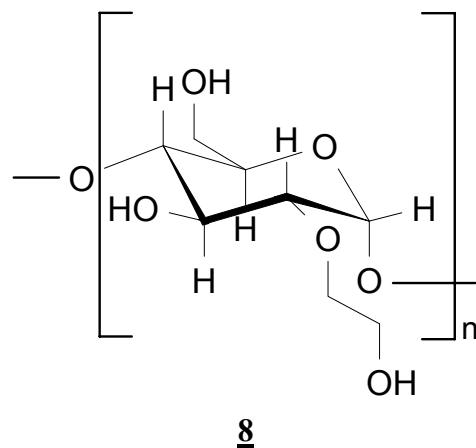
Dextran ist ein hochmolekulares, lineares und neutrales Polysaccharid $(C_6H_{10}O_5)_n$, das aus n Monomereinheiten der Struktur **6** zusammengesetzt ist. Es setzt sich aus D-Glucose-Wiederholungseinheiten, die α -1,6-verknüpft sind, zusammen. Hierdurch erhält das Dextran eine hohe Kettenflexibilität¹⁷⁵.



Stärke setzt sich ebenfalls aus D-Glucose-Einheiten zusammen, weist allerdings im Gegensatz zum Dextran eine stark verzweigte Struktur auf. Die Glucosemoleküle bilden innerhalb der Stärke zwei Komponenten, die als Amylose und Amylopektin bezeichnet werden. Dabei trägt die geradkettige Amylose 20-30% zur Stärke-Struktur bei und das verzweigte Amylopektin 70-80%. Die Amylose besteht aus α -1,4-verknüpften linearen, schraubenförmigen Ketten, die aus etwa 300-1200 Glucosemolekülen aufgebaut sind. Das Amylopektin ist ebenfalls aus linearen Glukoseketten aufgebaut, wobei innerhalb jeder Kette nach durchschnittlich 25 Glucosebausteinen eine α -1,6-Verknüpfung auftritt. Dadurch entstehen astähnlichen Gebilde mit etwa 1500-12000 Glucoseeinheiten (vgl. **7**).

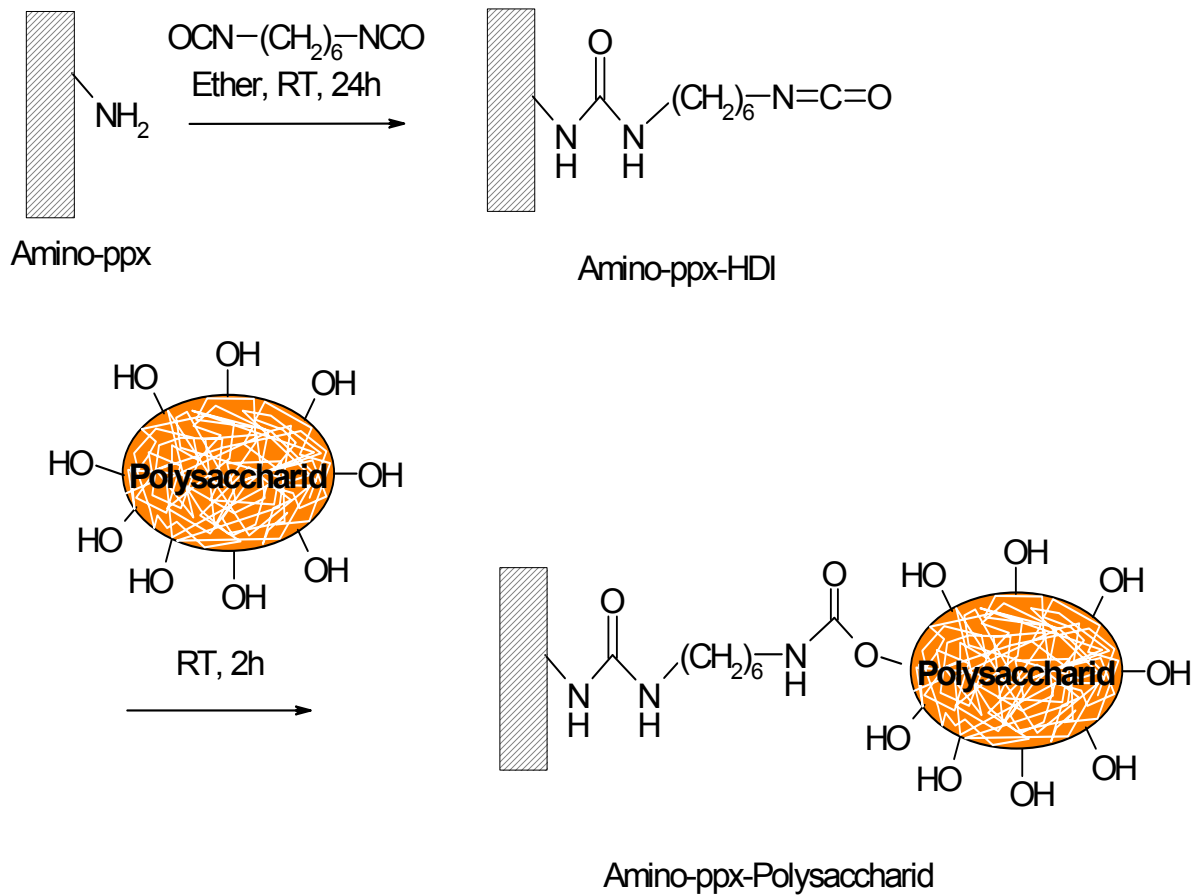


In dieser Arbeit wird als Stärkederivat Hydroxyethylstärke (HES) eingesetzt (vgl. **8**), da sich diese im Vergleich zu unmodifizierter Stärke durch eine erhöhte Stabilität gegenüber Säuren, Alkalien, Oxidationsmitteln und Enzymen auszeichnet¹⁷⁶.



Einen weiteren Vorteil bietet HES hinsichtlich ihrer Einsatzfähigkeit als Blutersatzflüssigkeit und der damit einhergehenden Hämokompatibilität.

Zur Immobilisierung von Dextran und HES wird die PVDF-Amino-ppx-Oberfläche zunächst mit dem bifunktionellen Kopplungsreagenz Hexamethylendiisocyanat (HDI) aktiviert (Schema 3). Dabei zeichnen sich die Isocyanatgruppen durch eine hohe Reaktivität gegenüber Amino- und Hydroxylgruppen aus.



Schema 3: Umsetzung der Amino-ppx-Oberflächen mit HDI und anschließende Immobilisierung von Polysacchariden

Aus den Aminogruppen der Amino-ppx-Schicht entstehen durch die Reaktion mit HDI Harnstoffbindungen. Die zweite Isocyanatgruppe wird in einer nachfolgenden Reaktion in wässrigem Medium bei alkalischem pH 9,4 mit den Hydroxylgruppen der Polysaccharidmoleküle zur Urethangruppe umgesetzt.

Die IR-ATR-Spektroskopie ist hier ebenfalls nicht geeignet die gekoppelten Polysaccharidmoleküle zu detektieren.

3.3.2.1 Nachweis von Dextran und Hydroxyethylstärke auf PVDF-Amino-ppx mittels XPS

Im Falle der Polysaccharide bewegt sich die Schichtdicke der auf PVDF-Amino-ppx gekoppelten Moleküle ebenfalls in der Größenordnung der von der XPS erfassten Informationstiefe. In Tab. 8 sind die mittels XPS ermittelten Elementzusammensetzungen sowie die Ergebnisse der hochaufgelösten C1s-Spektren der Oberflächen vor und nach der Polysaccharid-Immobilisierung auf den mit HDI aktivierten Amino-ppx-Oberflächen aufgeführt.

Tab. 8: Elementzusammensetzungen und Ergebnisse der hochaufgelösten C1s-Spektren der mit HDI aktivierten PVDF-Amino-ppx-Oberflächen vor und nach der Immobilisierung von Dextran (Dex) und HES

Oberfläche	Kohlenstoff (C1s)			O1s in Atom-%	N1s in Atom-%	Andere in Atom-%	O/C	
	in Atom-%							
		285,0eV	286,5eV	288,5eV	532,1eV	399,7eV		
		<u>C</u> -H, <u>C</u> -C	<u>C</u> -O, <u>C</u> -N	O- <u>C</u> -O N- <u>C</u> =O	<u>C</u> -O, C- <u>O</u> -C	<u>C</u> - <u>N</u>		
1. PVDF-Amino-ppx	89,5	83,7	5,8	-	5,2	5,3	-	0,06
2. +HDI	83,5	72,5	9,8	1,2	7,5	8,5	0,6	0,09
3. +HES/pH 9,4	69,4	45,2	17,0	7,2	21,4	3,8	4,3	0,31
4. +Dex/pH 9,4	77,4	62,6	10,3	4,6	14,7	4,0	3,6	0,19

Alle Werte sind für Si aus $[-Si(Me)_2-O-]$ korrigiert, wobei der maximale Si-Gehalt 2,3 Atom-% betrug

Im Vergleich zu den PVDF-Amino-ppx-Oberflächen zeigen die Elementzusammensetzungen der HDI-aktivierten PVDF-Amino-ppx-Oberflächen eine Zunahme an Sauerstoff- und

Stickstoffgehalt. Ein weiteres Indiz für eine erfolgreiche Reaktion zwischen Isocyanatgruppen des HDI und Aminogruppen des Amino-ppx unter Ausbildung von Harnstoffbindungen resultiert aus dem hochaufgelösten C1s-Spektrum durch Auftreten der für Carbonamid-Kohlenstoff charakteristischen Photolinie bei 288,5 eV.

Die erfolgreiche Immobilisierung der Polysaccharide Dextran und HES können ebenfalls mittels XPS nachgewiesen werden. Dabei wird im Falle der HES eine Kohlenstoffabnahme von 14,1 Atom-% und eine Stickstoffabnahme von 4,7 Atom-% detektiert. Gemäß der Elementzusammensetzung von HES (vgl. **8**) steigt der Sauerstoffgehalt um 13,9 Atom-%. Ein weiterer Hinweis für die Kopplung des HES ergibt sich aus dem O/C-Verhältnis, das im Vergleich zur HDI-aktivierten Oberfläche von 0,09 auf 0,31 steigt. Die hochaufgelösten C1s-Spektren der Oberflächen mit gekoppeltem HES zeigen, dass der Anteil des aliphatisch gebundenen Kohlenstoffs um 27,3 Atom-% abnimmt. Der sauerstoffgebundene Kohlenstoff nimmt hingegen um 7,2 Atom-% zu. Außerdem liefert die Intensitätszunahme der Photolinie bei 288,5 eV, die für die Acetalbindungen der Kohlenhydratketten einerseits und die durch die Kopplung an HDI entstehenden Urethanbindungen andererseits charakteristisch ist, einen Nachweis für die erfolgte Immobilisierung von HES.

Sowohl aus den Übersichtspektren als auch aus den hochaufgelösten C1s-Spektren der mit Dextran modifizierten PVDF-Amino-ppx-Oberflächen resultieren tendenziell gleiche Ergebnisse wie für die entsprechenden mit HES modifizierten Oberflächen.

Gemäß der theoretischen XPS-Zusammensetzung für HES sollte ein O/C-Verhältnis von 0,87 resultieren und für Dextran von 0,83. Tatsächlich wird für HES mittels XPS ein O/C-Verhältnis von 0,31 ermittelt. Für Dextran beträgt das Verhältnis lediglich 0,19. Vergleicht man die O/C-Verhältnisse der beiden immobilisierten Polysaccharide mit den O/C-Verhältnissen der mPEG-aldehyde, so wird deutlich, dass die Immobilisierung der letzteren unter *cloud point* Bedingungen an PVDF-Amino-ppx-Oberflächen wesentlich effektiver verläuft.

3.4 Oberflächenmodifizierung von PVDF durch Plasmabehandlung

Die bisherigen Ergebnisse zur Modifizierung von PVDF-Amino-ppx-Oberflächen mit stark hydrophilen Molekülen wie PEG oder Polysacchariden zur Reduzierung von Proteinadsorption und der daraus resultierenden Zelladhäsion sind zwar erfolgversprechend, aber bezüglich der Menge an immobilisierten PEG- oder Polysaccharidmolekülen (Kopplungsdichte) limitiert.

Zur Erzielung einer deutlich höheren Kopplungsdichte für die angesprochenen Verbindungen wird eine weitere Oberflächenmodifizierungsstrategie untersucht. Hierzu soll Polyacrylsäure (PAAc) auf PVDF gepfropft werden. Dazu muss im ersten Schritt die PVDF-Oberfläche aktiviert werden. Diese Aktivierung wird mit Hilfe eines gepulsten mikrowelleninduzierten Niederdruckplasmas realisiert. Bei einer Leistung von 1600 W wird die PVDF-Oberfläche einem Argon-Plasma ausgesetzt. Es ist zu berücksichtigen, dass die effektiv eingestrahlte Leistung dabei stets unter dem theoretischen Wert liegt, da ein Anteil von 10 bis 20% der eingestrahlten Energie reflektiert wird. Die Aktivierungsversuche werden unter Variation der Behandlungszeit durchgeführt

3.4.1 XPS-Messungen an mit Argonplasma aktivierten PVDF-Oberflächen

Zur oberflächensensitiven Charakterisierung der Elementzusammensetzung der mittels Argonplasma aktivierten PVDF-Oberflächen wird die XPS eingesetzt. Hierzu werden die Ergebnisse der Übersichtspektren sowie der hochaufgelösten C1s-Spektren von PVDF vor und nach der Plasmaaktivierung in Abhängigkeit von der Behandlungszeit in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9: Elementzusammensetzungen und Ergebnisse der hochaufgelösten C1s-Spektren von PVDF-Oberflächen vor und nach Plasmaaktivierung in Abhängigkeit der Behandlungszeit (30s bzw. 120s)

Oberfläche	Kohlenstoff (C1s)				O1s	N1s	F1s	Andere	
	in Atom-%				in Atom-%	in Atom-%	in Atom-%	in Atom-%	
		285,0eV	286,5eV	287,8eV	290,9eV	532,2eV	399,9eV	688,0eV	
		<u>C</u> -H, <u>C</u> -C	<u>C</u> -O, <u>CH</u> ₂ - <u>CF</u> ₂	<u>C</u> =O,	<u>CH</u> ₂ - <u>CF</u> ₂	<u>C</u> - <u>O</u> <u>C</u> - <u>O</u> - <u>C</u>	<u>C</u> - <u>N</u>	<u>C</u> - <u>F</u> ₂	
1. PVDF-unmod.	46,6	3,2	23,4	-	20,2	2,5	0,9	49,8	-
2. PVDF-30s Ar-Plasmabeh.	53,2	10,9	17,6	5,8	19,0	7,9	1,0	37,9	-
3. PVDF-120s Ar-Plasmabeh.	63,4	33,2	13,6	7,5	9,1	12,3	1,4	22,1	0,7

Alle Werte sind für Si aus [-Si(Me)₂O-] korrigiert, wobei der maximale Si-Gehalt 0,5 Atom-% betrug

Wie aus Tab. 9 hervorgeht, nimmt der Sauerstoffanteil in Abhängigkeit von der Dauer der Argonplasmabehandlung erwartungsgemäß zu. Dabei steigt dieser von 2,5 Atom-% bei unmodifiziertem PVDF über 7,9 Atom-% nach 30s auf 12,3 Atom-% nach 120s Argonplasmabehandlung. Die Sauerstoffzunahme der PVDF-Oberflächen resultiert aus einer Absättigung der Oberflächenradikale, die während der Plasmabehandlung generiert werden, durch Reaktion mit Luftsauerstoff während der Belüftung und anschließender Lagerung unter Atmosphärenbedingungen. Dies führt zur Bildung von Peroxiden und Hydroperoxiden. Aus dem Übersichtsspektrum geht außerdem hervor, dass der Kohlenstoffanteil mit zunehmender Behandlungszeit deutlich steigt, während der Fluoranteil entsprechend stark abnimmt. In den hochaufgelösten C1s-Spektren zeigt sich, dass es sich bei der Kohlenstoffzunahme um aliphatisch gebundenen Kohlenstoff handelt. Ebenso resultiert aus den hochaufgelösten C1s-Spektren eine Abnahme der aus PVDF stammenden Kohlenstoffspezies. Hierbei handelt es sich um Kohlenstoff aus der (CH₂-CF₂)-Gruppe bei 286,5 eV und aus der (CH₂-CF₂)-Gruppe bei 290,9 eV. Die Abnahme an detektierbarem PVDF im Informationsvolumen, das von der XPS erfasst wird, geht einher mit der Zunahme an erzeugten Sauerstoffspezies auf den PVDF-

Oberflächen. Dies wird ebenfalls deutlich durch den Nachweis von Carbonylkohlenstoff bei 287,8 eV. Obwohl bei dieser Photolinie ebenfalls monofluorgebundener Kohlenstoff (C-F) erscheint, kann diese Spezies hier ausgeschlossen werden. Dies resultiert auch aus den hochaufgelösten F1s-Spektren, in denen nur die C-F₂-Spezies nachgewiesen wird. Ein weiterer Grund für die Abnahme an detektierbaren PVDF steht im Zusammenhang mit der Zunahme an aliphatischem Kohlenstoff auf den PVDF-Oberflächen. Dies ist eine Folge der Adsorption von aliphatischen Kohlenwasserstoffen aus der Umgebung während der Lagerung. Dabei resultiert eine umso stärkere Adsorption, je länger die Oberflächen einer Plasmabehandlung ausgesetzt waren.

In Ergänzung zu den XPS-Ergebnissen werden Restgasanalysen mittels Quadrupolmassenspektrometrie während der Plasmabehandlung durchgeführt. Dabei werden die Spezies, die aus der Oberfläche heraustreten, detektiert. In Abb. 9 werden die Massenspektren der Restgasanalyse ohne und mit PVDF in der Plasmakammer aufgeführt.

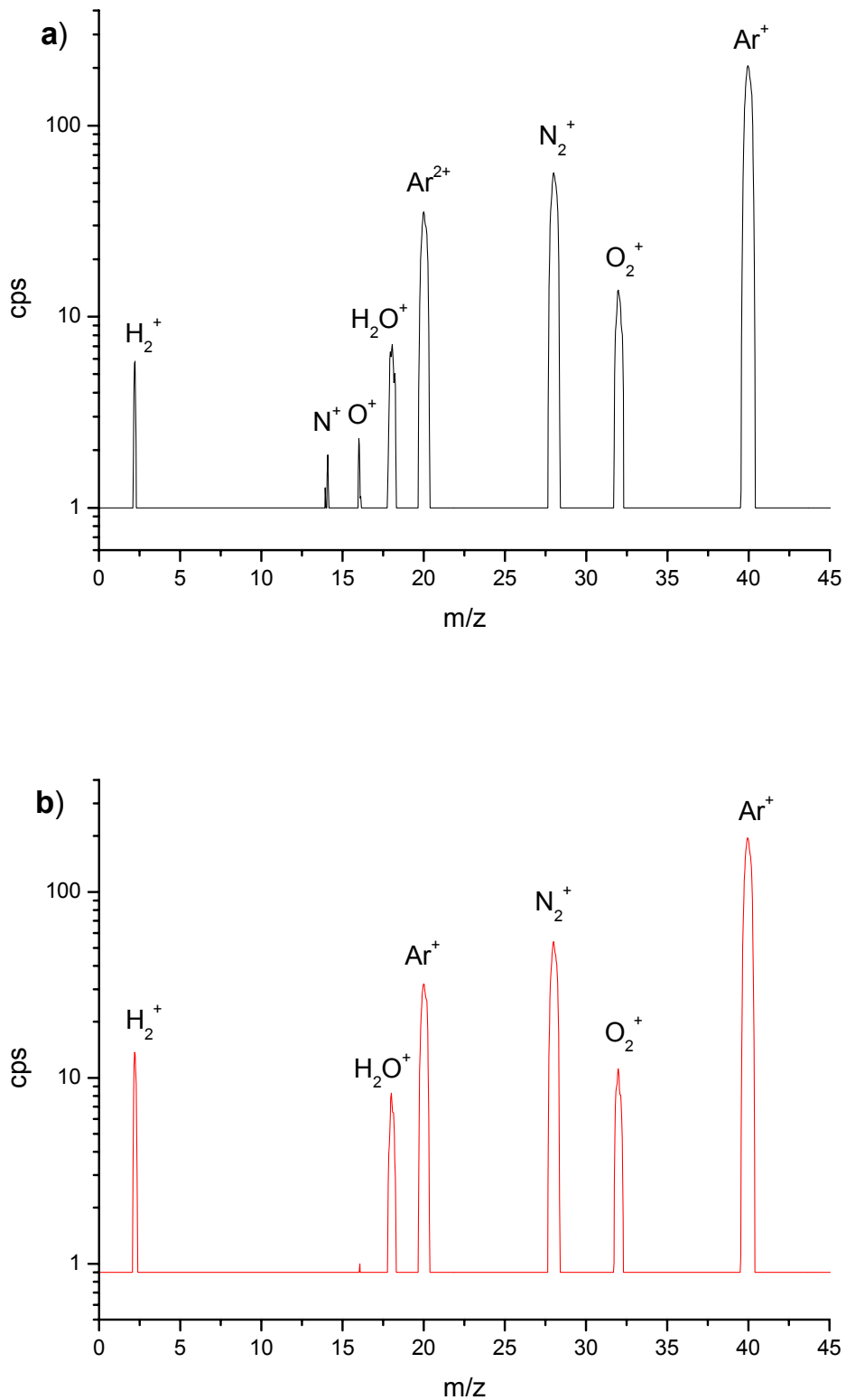
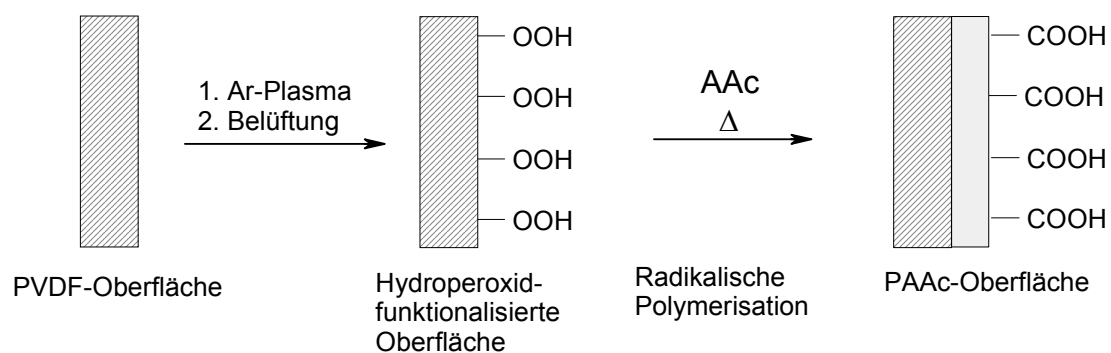


Abb. 9: Massenspektren der Restgasanalyse ohne(a) und mit (b) PVDF in der Plasmakammer

Im Plasmagas werden außer Argon- zusätzlich Stickstoff-, Sauerstoff-, Wasser- und Wasserstoffionen detektiert. Während der Plasmabehandlung von PVDF-Oberflächen werden keine weiteren Ionen nachgewiesen (vgl. Abb. 9-b). Aus der Differenz den Massenspektren geht hervor, dass aus der PVDF-Oberfläche während der Argonplasmabehandlung nur Wasserstoff und kein Fluor austritt. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der XPS.

3.4.2 Thermisch-induzierte Pfropfcopolymerisation von Acrylsäure auf plasma-aktivierten PVDF-Oberflächen

Zur thermisch-induzierten Pfropfcopolymerisation von Acrylsäure (AAc) auf PVDF muss dessen Oberfläche aktiviert werden. In Folge der beschriebenen Argonplasmaaktivierung werden die gebildeten Oberflächenradikale durch Belüftung zu Hydroperoxidgruppen umgewandelt. Im zweiten Reaktionsschritt wird das aktivierte Substrat in eine auf 90°C erwärmte Acrylsäurelösung getaucht. Die thermische Energie führt zur Spaltung der Peroxid-Bindungen. Die dabei gebildeten Radikale initiieren eine Pfropfcopolymerisation an der Substratoberfläche sowie eine Homopolymerisation in Lösung (vgl. Schema 4).



Schema 4: Schematische Darstellung der Erzeugung von Hydroperoxiden an PVDF-Oberflächen mit anschließender thermisch-induzierter Pfropfcopolymerisation von Acrylsäure zu carboxylfunktionalisierten PVDF-Oberflächen (PVDF-PAAc)

3.4.2.1 Schwingungsspektroskopische Messungen an PVDF-PAAc-Oberflächen

Gemäß theoretischer Berechnungen nach Steffens et al. zur Dicke von PAAc-Schichten, die auf Poly (D,L)-lactid gepfropft wurden, werden Schichtdicken von 0,6 bis 1 μm erhalten¹⁷⁷. Zum Nachweis der PAAc-Schicht auf PVDF-Oberflächen wird die IR-ATR- Spektroskopie mit einem Germanium-Kristall als IRE eingesetzt. In Abb. 10 sind die Übersichtspektren von unmodifiziertem PVDF (1) und von mit Polyacrylsäure gepfropftem PVDF (2) (PVDF-PAAc) aufgeführt.

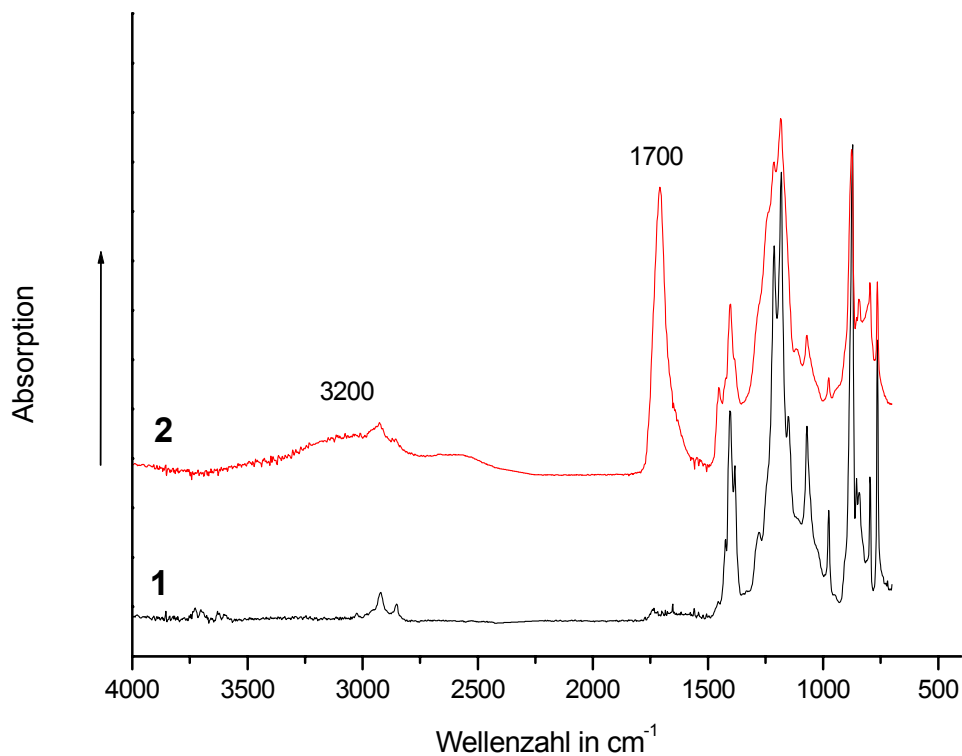


Abb. 10: IR-ATR-Spektren von PVDF (1) und PVDF-PAAc (2) (Ge als Reflexionselement)

Die erfolgreiche Modifizierung der PVDF-Oberflächen mit PAAc wird durch die detektierte intensitätsstarke Carbonyl-Valenzschwingung $\nu(\text{C}=\text{O})$ der Carboxylgruppen des PAAc bei 1700 cm^{-1} nachgewiesen. Außerdem belegt die verbreiterte Valenzschwingungsbande im Wellenzahlbereich um 3200 cm^{-1} das Vorhandensein von assoziierten OH-Gruppen auf den Oberflächen. Dies ist ebenfalls ein Indiz für die mit PAAc modifizierten Oberfläche.

3.4.2.2 XPS-Messungen an PVDF-PAAc-Oberflächen

In Ergänzung zu den schwingungsspektroskopischen Messungen an PVDF-PAAc-Oberflächen wird deren Elementzusammensetzung mit Hilfe der XPS untersucht. In Tab. 10 sind die Elementzusammensetzungen sowie die Ergebnisse der hochaufgelösten C1s-Spektren von unbehandeltem PVDF sowie von PVDF-PAAc aufgeführt.

Tab. 10: Elementzusammensetzungen und Ergebnisse der hochaufgelösten C1s-Spektren von unbehandeltem PVDF sowie von PVDF-PAAc

Oberfläche	Kohlenstoff (C1s)	O1s	N1s	F1s	Andere				
						in Atom-%			
	in Atom-%	in Atom-%	in Atom-%	in Atom-%	in Atom-%				
	285,0eV	286,5eV	289,1eV	290,9eV	532,5eV	399,7eV	688,0eV		
	<u>C</u> -H, <u>C</u> -C	<u>CH</u> ₂ - <u>CF</u> ₂ <u>C</u> -O	O- <u>C</u> =O	<u>CF</u> ₂ - <u>CH</u> ₂	<u>C</u> - <u>O</u> , <u>C</u> - <u>O</u> - <u>C</u>	<u>C</u> - <u>N</u>	<u>C</u> - <u>F</u> ₂		
1. PVDF	46,9	3,2	23,4	-	20,2	2,5	0,9	49,8	-
2. PVDF-PAAc	79,3	68,8	-	10,5	-	20,0	0,5	-	0,2

Alle Werte sind für Si aus [-Si(Me)₂O-] korrigiert, wobei der maximale Si-Gehalt 2,7 Atom-% betrug

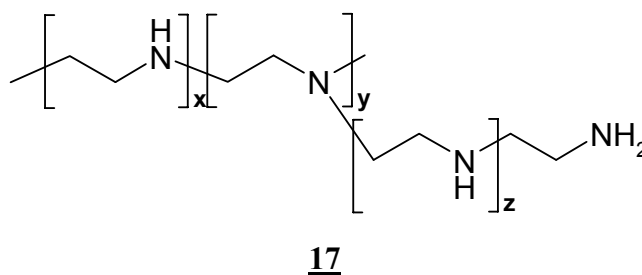
Aus Tab. 10 geht hervor, dass nach der Acrylsäurepfropfung auf den PVDF-Oberflächen der Gehalt an Kohlenstoff um 32,4 Atom-% zunimmt. Ebenso nimmt der Sauerstoffgehalt um 17,5 Atom-% zu. Berücksichtigt man außerdem die hochaufgelösten C1s-Spektren, so wird deutlich, dass sich die von der XPS erfasste Oberflächenschicht sowohl aus aliphatischem Kohlenstoff als auch aus Carboxylkohlenstoff zusammensetzt. Im Vergleich zum unmodifizierten PVDF führt die Acrylsäurepfropfung zu einer Erzeugung von Carboxylgruppen auf den PVDF-Oberflächen. Da die beiden Photolinien bei 286,5 eV (CH₂-CF₂) und 290,9 eV (CF₂-CH₂) in den Spektren der PVDF-PAAc-Oberflächen nicht mehr nachgewiesen werden können, kann davon ausgegangen werden, dass die Dicke der PAAc-Schicht größer ist als das von der XPS erfasste Informationsvolumen.

In Ergänzung zu den schwingungs- und röntgenphotoelektronenspektroskopischen Messungen an PVDF-PAAc-Oberflächen wird mit Hilfe eines spektrophotometrischen Verfahrens der Säuregruppengehalt dieser Oberflächen quantifiziert. Hierzu werden die Säuregruppen der PAAc auf den PVDF-Oberflächen mit Toluidinblau, einem kationischen Farbstoff, in wässriger Lösung derivatisiert¹⁷⁸. Setzt man eine 1:1-Reaktion zwischen den Acrylsäuregruppen und den Toluidinblaumolekülen voraus, so ergibt sich eine Pflöpfungsdichte von $1,4 \times 10^{-8} \pm 0,13 \times 10^{-8} \text{ mol/cm}^2$.

Wie in Schema 5 gezeigt, reagieren die Carboxylgruppen (**9**) im ersten Reaktionsschritt mit *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid (EDC) (**10**) zu ihren *O*-Acylisoharnstoffderivaten (**11**). Die *O*-Acylisoharnstoffgruppen sind hochreaktiv und leicht hydrolysierbar. Da die Kopplungsreaktionen in wässrigen Medien durchgeführt werden, besteht die Gefahr, dass die *O*-Acylisoharnstoffgruppen bereits vor der Kopplung proteinabweisender Moleküle abreagieren. Zu diesen unerwünschten Nebenreaktionen gehören die Umlagerung zum nichtreaktiven *N*-Acylharnstoffderivat (**13**) sowie die Hydrolyse unter Rückbildung der freien Säuregruppen des PAAc und der Freisetzung der entsprechenden Harnstoffderivaten (**15**). Zur Vermeidung dieser Nebenreaktionen setzt man die *O*-Acylisoharnstoffgruppen mit *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) (**12**) zu den Aktivestern um. Der letzte Reaktionsschritt zur Kopplung proteinabweisender Moleküle erfolgt in basischem Medium, da hierdurch eine Deprotonierung der Aminogruppen der zu koppelnden Moleküle gewährleistet ist und so der nukleophile Angriff der Aminogruppen ermöglicht wird.

3.5.1 Immobilisierung von Polyethylenimin an aktivierten PVDF-PAAc-Oberflächen

Zur Erzielung einer möglichst hohen Kopplungsdichte an proteinabweisenden Molekülen werden die Aktivester der PVDF-PAAc-Oberflächen mit Polyethylenimin (PEI) umgesetzt.



Bei PEI (**17**) handelt es sich um ein verzweigtes Polyamin, in dem primäre, sekundäre und tertiäre Aminogruppen im Verhältnis von näherungsweise 1:2:1 vorliegen und dessen primäre Aminogruppenkonzentration auf der Oberfläche zu $1,32 \times 10^{-9} \text{ mol/cm}^2$ bestimmt wurde¹⁸¹. Im Vergleich dazu besitzt die Amino-ppx-Schicht etwa drei mal weniger Aminogruppen (Aminogruppenkonzentration ca. $4,15 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$)¹⁸².

Die PEI-Immobilisierung auf PVDF-PAAc-Oberflächen erfolgt nach der Carbodiimidmethode (vgl. Schema 5).

3.5.1.1 Nachweis der PEI-Immobilisierung an PVDF-PAAc-Oberflächen mittels XPS

Malmsten et al. bestimmten aus Ellipsometriemessungen für PEI-Schichten, die adsorptiv auf Siliziumscheiben aufgebracht wurden, eine Dicke von etwa 3 nm¹⁷¹. Da derartig dünne Schichten mittels IR-ATR-Spektroskopie nicht erfasst werden können, wird die Immobilisierung mittels XPS nachgewiesen. In Tab. 11 sind die Elementzusammensetzungen und hochaufgelösten C1s-Spektren von PVDF-PAAc vor und nach Immobilisierung von PEI dargestellt.

Tab. 11: Elementzusammensetzungen und Ergebnisse der hochaufgelösten C1s-Spektren von PVDF-PAAc- und PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen

Oberfläche		Kohlenstoff (C1s)			O1s	N1s	Andere
		in Atom-%			in Atom-%	in Atom-%	in Atom-%
		285,0eV	286,5eV	288,8eV	532,2eV	399,5eV	
		<u>C</u> -H, <u>C</u> -C	<u>C</u> -O, <u>C</u> -N	O- <u>C</u> =O N- <u>C</u> =O	<u>C</u> -O, C- <u>O</u> -C	C- <u>N</u>	
1. PVDF-PAAc	79,3	68,8	-	10,5	20,0	0,5	0,2
2. PVDF-PAAc+PEI	76,5	41,6	26,6	8,2	10,9	12,6	0,1

Nach der PEI-Kopplung auf die PVDF-PAAc-Oberflächen steigt der Stickstoffanteil von 0,5 auf 12,6 Atom-%, während der Sauerstoffanteil von 20 auf 10,9 Atom-% abnimmt. In den hochaufgelösten C1s-Spektren nimmt der Anteil aliphatischen Kohlenstoffs ab und gleichzeitig nehmen die Kohlenstoffspezies der Photolinie bei 286,5 eV von 0 auf 26,6 Atom-% zu. Hierbei kann dieser Anteil ausschließlich dem an Stickstoff gebundenen Kohlenstoff zugeordnet werden. Dies ist ein deutliches Indiz für die erfolgreiche Kopplung von PEI.

3.5.2 Immobilisierung von mPEG-ald an PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen

Der nachfolgende Modifizierungsschritt besteht in der Anbindung von mPEGs, die über eine Aldehyd-Endgruppe verfügen und ein mittleres Molekulargewicht von 5000 (mPEG-ald 5000) bzw. 30000 (mPEG-ald 30000) aufweisen, an PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen. Die mPEG-aldehyde werden wiederum wie in Schema 2 (Kap. 3.3.1) bereits gezeigt über eine reduktive Aminierung kovalent an die primäre Aminogruppen dieser Oberflächen gekoppelt.

Hierbei wird unter Variation von Reaktionstemperatur und Salzkonzentration deren Einfluss auf die Kopplungsdichte untersucht.

3.5.2.1 Nachweis der mPEG-ald-Immobilisierung an PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen mittels XPS

Zur Überprüfung der Kopplung von mPEG-aldehyden an PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen unter Berücksichtigung verschiedener Kopplungsbedingungen und der Bestimmung der Kopplungsdichte wird die XPS eingesetzt (vgl. Tab. 11).

Tab. 12: Durch XPS ermittelte Elementzusammensetzungen und hochaufgelöste C1s-Spektren von PVDF-PAAc-PEI vor und nach Immobilisierung von m-PEG-aldehyden unter Variation der Kopplungsbedingungen

Oberfläche	Kohlenstoff (C1s) in Atom-%	Kohlenstoff (C1s) in Atom-%			O1s in Atom-%	N1s in Atom-%	Andere in Atom-%	O/C
		285,0eV C-H C-C	286,5eV C-O C-N	288,7eV O-C=O N-C=O	532,2eV C-O C-O-C	399,5eV C-N		
1. PVDF-PAAc-PEI	76,5	41,6	26,6	8,2	10,9	12,6	0,1	0,14
2. +mPEG-ald 5000 37°C-0,6M K ₂ SO ₄	69,3	28,8	41,1	-	26,5	3,1	0,8	0,38
3. +mPEG-ald 5000 60°C-0,2M K ₂ SO ₄	70,6	32,9	34,4	3,3	22,4	5,9	1,0	0,32
4. +mPEG-ald 5000 60°C-0,6M K ₂ SO ₄	69,0	7,9	61,1	-	29,4	1,6	-	0,43
5. +mPEG-ald 30000 37°C-0,6M K ₂ SO ₄	65,5	34,0	23,8	7,8	22,9	9,3	1,3	0,35
6. +mPEG-ald 30000 60°-0,2M K ₂ SO ₄	64,7	38,4	18,4	7,5	24,5	9,4	1,1	0,38
7. +mPEG-ald 30000 60°C-0,6M K ₂ SO ₄	67,1	25,5	37,0	5,1	25,1	6,8	1,0	0,37

Alle Werte sind für Si aus [-Si(Me)₂-O-] korrigiert, wobei der maximale Si-Gehalt 2,1 Atom-% betrug

Bei einem Vergleich der Elementzusammensetzungen von PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen vor und nach Immobilisierung von mPEG-ald 5000 fällt auf, dass es bei nahezu konstant bleibendem Kohlenstoffgehalt zu einer deutlichen Zunahme an Sauerstoff und einer ebenso deutlichen Abnahme von Stickstoff kommt. Betrachtet man weiterhin das hochaufgelöste C1s-Spektrum, so wird deutlich, dass die Kopplung von mPEG-ald 5000 zur erwarteten Abnahme an aliphatischem Kohlenstoff und zur Zunahme an Etherkohlenstoff führt. In Ergänzung dazu liefert die Intensitätsabnahme der Photolinie bei 288,5 eV (O-C=O, N-C=O) ein weiteres Indiz für die stattgefundenene Kopplung von mPEG-ald 5000.

Beim Vergleich des XPS-Ergebnisse der Probe 2, bei der die Kopplung von mPEG-ald 5000 bei 37°C und 0,6 M Kaliumsulfatlösung erfolgt, mit Probe 4, bei der die Kopplung bei 60°C und gleicher Salzkonzentration durchgeführt wird, wird deutlich, dass die Immobilisierung unter *cloud point* Bedingungen (Probe 4) erfolgreicher verläuft. Dabei nimmt der Anteil an aliphatischem Kohlenstoff von 28,8 auf 7,9-Atom-% ab, gleichzeitig erfolgt eine Zunahme der Intensität der Photolinie bei 286,5 eV (C-O). Vergleicht man den Gehalt an Sauerstoff und Stickstoff beider Proben, kann davon ausgegangen werden, dass der von der XPS erfasste Oberflächenbereich eine Zunahme an Ethergruppen und damit an mPEG-Einheiten aufweist. Außerdem wird der Einfluss der Salzkonzentration bei konstanter Temperatur untersucht (vgl. Probe 3 und 4 in Tab. 12). Dabei zeigt sich eine analoge Tendenz bezüglich der Menge an gekoppeltem mPEG-ald 5000. Dabei ist der Einfluss der Salzkonzentration weniger stark ausgeprägt als ein Temperatureinfluss.

Ebenso zeigt sich bei der Kopplung von mPEG-ald 30000 an PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, dass eine Temperaturerhöhung von 37°C auf 60°C bei konstanter Salzkonzentration von 0,6 M zu einer besseren Kopplung führt als eine Erhöhung der Salzkonzentration von 0,2 M auf 0,6 M bei einer konstanten Temperatur von 60°C. Vergleicht man die XPS-Ergebnisse mit denen der Kopplungen von mPEG-ald 5000 so wird deutlich, dass die Abnahme an aliphatischem Kohlenstoff und an Stickstoff sowie die Zunahme an Sauerstoff bei mPEG-ald 30000 weniger deutlich ausgeprägt ist.

Bei Betrachtung der Intensitäten der Photolinie bei 288,5 eV (N-C=O) in den hochaufgelösten C1s-Spektren aller in Tab. 12 aufgeführten Proben wird deutlich, dass die Kopplung von mPEG-ald 5000 sowohl unter Bedingungen uneingeschränkter Löslichkeit als auch unter Bedingungen geringerer Löslichkeit (*cloud point*) erfolgreicher verläuft als die Kopplung von mPEG-ald 30000. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass eine Immobilisierung von mPEG-aldehyden mit zunehmender Kettenlänge und einem daraus resultierenden größeren Trägheitsradius erschwert wird¹⁸³. Dieser Umstand gilt nicht nur für Bedingungen uneingeschränkter Löslichkeit und damit maximaler Beweglichkeit der mPEG-Ketten sondern ebenfalls für *cloud point* Bedingungen, bei denen dieser Effekt allerdings weniger stark ausgeprägt ist (vgl. Probe 4 und 7 in Tab. 12).

Ebenso wie bei den Untersuchungen zur Kopplung von mPEG-aldehyden an PVDF-Amino-ppx-Oberflächen, wird auch hier das O/C-Verhältnis zur Abschätzung der Kopplungsdichte

herangezogen. Für die Kopplung von mPEG-ald 5000 an PVDF-PAAc-PEI unter *cloud point* Bedingungen wird ein O/C-Verhältnis von 0,43 und für mPEG-ald 30000 von 0,37 bestimmt. Somit wird das theoretische O/C-Verhältnis von 0,5 selbst unter günstigen Kopplungsbedingungen (*cloud point*) nicht erreicht.

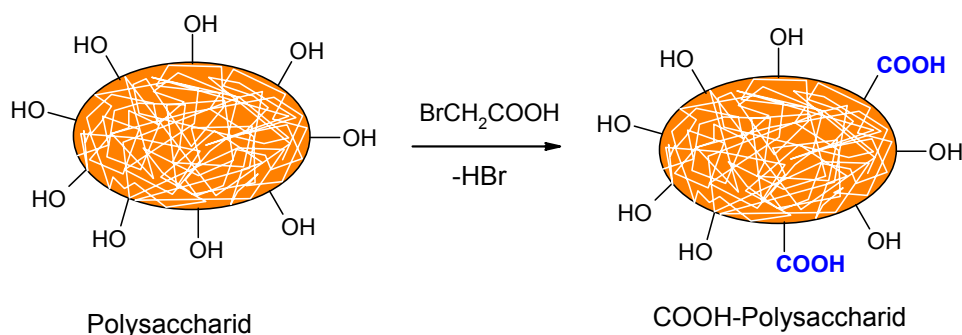
Im Vergleich zu den O/C-Verhältnissen von mPEG-ald 5000 (0,43) und mPEG-ald 30000 (0,37) an PVDF-PAAc-PEI zeigen die O/C-Verhältnisse der an PVDF-Amino-ppx gekoppelten entsprechenden mPEG-aldehyde geringere Werte. Dabei ergibt sich für mPEG-ald 5000 ein O/C-Verhältnis von 0,38 und für mPEG-ald 30000 von 0,29 (vgl. Tab. 7). Die geringeren O/C-Verhältnisse im Falle der PVDF-Amino-ppx-Oberflächen resultieren aus einer geringeren Kopplungsdichte. Dieses Ergebnis ist aufgrund der geringeren Aminogruppendichte auf Amino-ppx-Oberflächen zu erwarten. Außerdem bestätigen die Ergebnisse, dass eine höhere PEG-Kettendichte durch Erhöhung der Aminogruppendichte erzielt werden kann.

3.5.3 Immobilisierung von carboxymethylierten Polysacchariden an mit PAAc-PEI modifizierten PVDF-Oberflächen

Bislang existiert keine Oberfläche auf Basis von immobilisiertem PEG, die eine vollständige Vermeidung von Proteinadsorption und Zelladhäsion gewährleisten kann⁷⁰. Dies lässt sich auf geringe Kopplungsdichten und die daraus resultierenden eingeschränkten Oberflächenabschirmung zurückführen. Zur Verhinderung einer Proteinadsorption an diesen Stellen müssen hydrophile und sperrige Moleküle, die die abzuschirmenden Oberflächen vollständig bedecken, immobilisiert werden.

Moleküle, die diesem Eigenschaftsprofil gerecht werden, sind unter anderem die Polysaccharide Dextran und Hydroxyethylstärke. Die genannten Kohlenhydrate müssen zur Kopplung an PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen carboxymethyliert und mit Hilfe der Carbodiimid-Methode (vgl. Schema 5) umgesetzt werden.

Zur Herstellung der kommerziell nicht erhältlichen carboxymethylierten Polysaccharide werden die entsprechenden Polysaccharide mit Bromessigsäure umgesetzt (vgl. Schema 6)¹⁸⁴.



Schema 6: Synthese von carboxymethylierten Polysacchariden durch Umsetzung mit Bromessigsäure

Der Carboxymethylierungsgrad der Hydroxyethylstärke (COOH-HES) wird durch Säure-Base Titration bestimmt und auf die Hydroxyethylglykoseeinheit (HEG) bezogen (Tab. 13).

Tab. 13: Carboxylierungsgrad von Hydroxyethylstärke bestimmt durch Säure-Base-Titration

Konzentration BrAc in mol/l	COOH/HEG
0,5	1:2
0,125	1:17
0,03	1:40

Die modifizierten Dextrane (COOH-Dex) werden mit einem Carboxymethylierungsgrad von 3:4 und 1:24 synthetisiert und ebenfalls über Säure-Base-Titration quantifiziert¹⁸².

3.5.3.1 Nachweis der carboxymethylierten Polysaccharide nach Immobilisierung auf PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen mittels XPS

In Tab. 14 sind die mittels XPS ermittelten Elementzusammensetzungen und die Ergebnisse aus den hochaufgelösten C1s-Spektren von PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen vor und nach der Immobilisierung von carboxymethylierten Dextranen und Hydroxyethylstärken, die durch unterschiedliche Carboxylierungsgrade charakterisiert sind, dargestellt.

Tab. 14: Elementzusammensetzungen und Ergebnisse der hochaufgelösten C1s-Spektren von PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen vor und nach Immobilisierung von carboxymethylierten Polysacchariden mit variierenden Carboxylierungsgraden, in Klammern theoretische O/C-Verhältnisse

Oberfläche	Kohlenstoff (C1s) in Atom-%			O1s in Atom-%	N1s in Atom-%	Andere in Atom-%	O/C	
	285,0eV C-H,C-C	286,5eV C-O,C-N	288,5eV N-C=O O-C=O O-C-O	532,2eV C-O C-O-C	399,7eV C-N			
1. PVDF-PAAc-PEI	76,5	41,6	26,6	8,2	10,9	12,5	0,1	0,14
2. +COOH-HES 1:2	70,1	37,3	24,3	8,5	21,8	7,5	2,2	0,31 (0,78)
3. +COOH-HES 1:17	71,2	36,0	25,2	10,0	22,2	6,2	1,1	0,31 (0,75)
4. +COOH-HES 1:40	71,3	40,6	22,9	7,7	21,1	6,8	2,1	0,30 (0,75)
5. +COOH-Dex 3:4	69,4	35,3	25,5	8,0	22,4	7,6	1,6	0,32 (0,79)
6. +COOH-Dex 1:24	69,7	38,2	24,8	6,8	24,8	4,9	1,7	0,36 (0,75)

Alle Werte sind für Si aus [-Si(Me)₂-O-] korrigiert, wobei der maximale Si-Gehalt 1,9 Atom-% betrug

Ein Vergleich von Probe 1 (PVDF-PAAc-PEI) mit allen übrigen Proben (immobilisierte carboxymethylierte Polysaccharide) verdeutlicht, dass es infolge der Polysaccharid-Immobilisierung zu einem deutlichen Anstieg an Sauerstoff und zu einer entsprechend deutlichen Abnahme an Stickstoff in deren Elementzusammensetzung kommt. Die erfolgreiche Kopplung ist ebenfalls anhand des angestiegenen O/C-Verhältnisses in alle Fällen zu erkennen. Ein Vergleich der berechneten O/C-Verhältnisse mit den spektroskopisch ermittelten zeigt, dass erstere für jede Probe um einen Faktor von etwa 2,5 größer sind als letztere. Da außerdem die Aminogruppen des Polyethylenimins detektiert werden, handelt es sich vermutlich um relativ dünne bzw. um relativ inhomogene Polysaccharidschichten.

In den Übersichtspektren zeigt sich keine wesentliche Veränderung des Kohlenstoffgehaltes der aufgeführten Proben. Ebenso gehen keine signifikanten Veränderungen aus den C1s-Spektren hervor.

Zur Beurteilung des Kopplungserfolges bei der Immobilisierung der aufgeführten Polysaccharide an PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen im Vergleich zu PVDF-Amino-ppx-Oberflächen werden ebenfalls die O/C-Verhältnisse herangezogen. Dabei kann im Falle der Hydroxyethylstärke zwischen beiden Oberflächen kein Unterschied festgestellt werden. Demgegenüber findet im Falle der Dextrane an PEI-Oberflächen eine deutlich höhere Immobilisierung statt. Das O/C-Verhältnis ist von 0,19 bei PVDF-Amino-ppx auf 0,36 bei PVDF-PAAc-PEI angestiegen.

3.6 Immobilisierung von mPEG-aminen an Polyacrylsäure-modifizierten PVDF-Oberflächen

Eine direkte Anbindung von PEGs auf PVDF-PAAc-Oberflächen ohne PEI-Zwischenschicht ist durch eine Immobilisierung von aminofunktionalisierten mPEGs (mPEG-amin) durchführbar. Hierbei wird wiederum die in Schema 5 dargestellte EDC/NHS-Methode eingesetzt. Außer der direkten Kopplung bietet diese Verfahrensweise einen wesentlichen Vorteil bezüglich der kürzeren Reaktionszeiten im Vergleich zu mPEG-aldehyden. Zur Untersuchung des Einflusses der Kettenlänge auf die Qualität der Proteinabweisung werden mPEG-amine mit mittleren Molekulargewichten von 5000 (mPEG-amin 5000) bzw. 20000 (mPEG-amin 20000) immobilisiert. Als Ergänzung zu den aufgeführten mPEG-aminen werden zusätzlich Oberflächen mit gekoppeltem 2-(2-Aminoethoxy)-ethanol (AEE), das über zwei Ethylenglykol-Einheiten verfügt, untersucht. Entsprechend der Literatur ist bekannt, dass ebenfalls selbstorganisierende Monolagen (SAMs, *self-assembling monolayers*) von Oligo(ethylenglycol)-terminierten (OEG) Alkanthiolaten mit 2 bis 7 Ethylenglykol-Einheiten eine gewisse Proteinresistenz aufweisen^{121,185}.

3.6.1 Nachweis der immobilisierten mPEG-amine an PVDF-PAAc-Oberflächen

In Tab. 15 sind die mittels XPS ermittelten Elementzusammensetzungen sowie hochaufgelösten C1s-Spektren von PVDF-PAAc-Oberflächen vor und nach Immobilisierung der m-PEG-amine sowie des AEE dargestellt.

Tab. 15: Mittels XPS ermittelte Elementzusammensetzungen von PVDF-PAAc vor und nach Immobilisierung von m-PEG-aminen unter verschiedenen Kopplungsbedingungen sowie von AEE

Oberfläche		Kohlenstoff (C1s) in Atom-%			O1s in Atom-%	N1s in Atom-%	Andere in Atom-%	O/C
		285,0eV	286,5eV	288,5eV	532,3eV	399,9eV		
		$\frac{\text{C-H}}{\text{C-C}}$	$\frac{\text{C-O}}{\text{C-N}}$	$\frac{\text{O-C=O}}{\text{N-C=O}}$	$\frac{\text{C-O}}{\text{C-O-C}}$	$\frac{\text{C-N}}{\text{C-N}}$		
1. PVDF-PAAc	79,3	68,8		10,5	20,0	0,5	0,2	0,25
2. +AEE/RT	73,0	48,3	17,2	7,1	20,3	6,3	0,3	0,28
3. +mPEG-amin5 000 37°C-0,6M K ₂ SO ₄	71,8	33,1	36,8	1,9	26,8	0,7	0,5	0,37
4. +mPEG-amin 5000 60°C-0,2M K ₂ SO ₄	71,6	40,9	25,2	5,8	25,3	1,7	1,1	0,35
5. +mPEG-amin 5000 60°C-0,6M K ₂ SO ₄	73,2	39,2	31,0	2,9	25,3	1,3	0,2	0,34
6. +mPEG-amin 20000 37°C-0,6MK ₂ SO ₄	73,8	33,4	38,2	2,3	25,3	0,6	0,4	0,34
7. +mPEG-amin 20000 60°-0,2M K ₂ SO ₄	69,9	28,3	38,4	3,3	27,9	1,6	0,6	0,40
8. +mPEG-amin 20000 60°C-0,6M K ₂ SO ₄	70,5	21,4	45,5	3,6	28,4	0,8	0,3	0,40

Alle Werte sind für Si aus [-Si(Me)₂-O-] korrigiert, wobei der maximale Si-Gehalt 2,2 Atom-% betrug

Zur Erzielung einer hohen Kopplungsdichte an mPEGs und einer damit verbundenen möglichst umfassenden Proteinresistenz, wird die kovalente Immobilisierung der m-PEG-amine auf PVDF-PAAc-Oberflächen unter Variation von Reaktionstemperatur und Salzkonzentration durchgeführt. Im Gegensatz dazu wird AEE lediglich bei Raumtemperatur immobilisiert.

Ein Vergleich zwischen PVDF-PAAc und den übrigen Proben 2-8 in Tab. 15 zeigt nur eine geringe Abnahme des Kohlenstoffgehaltes. Bezüglich des Sauerstoffgehalts zeigt die Probe 2 (AEE gekoppelt bei Raumtemperatur) keine Veränderung, die übrigen Proben weisen jedoch eine mittlere Zunahme an Sauerstoff von etwa 6 Atom-% auf. Ein weiterer Unterschied zwischen Probe 2 und den übrigen Proben im Vergleich zu PVDF-PAAc ist beim Stickstoffgehalt zu beobachten. Hier zeigt die mit AEE modifizierte Oberfläche eine Stickstoffzunahme von 5,8 Atom-%. Bei den übrigen Proben liegt diese Zunahme zwischen 0,2 und 1,2 Atom-%.

In den hochaufgelösten C1s-Spektren ist für alle Proben eine deutliche Abnahme an aliphatischem Kohlenstoff im Vergleich zu PVDF-PAAc zu beobachten. In diesem Zusammenhang zeigt sich weiter das Auftreten der Etherkohlenstoff-Photolinie bei 286,5 eV, deren Intensität bei den Proben 3 bis 8 aufgrund der längeren PEG-Ketten wesentlich größer ausfällt als bei der Probe 2 mit gekoppelten AEE. Die für Carboxyl- und Carbonamidkohlenstoffe charakteristische Photolinie bei 288,5 eV verliert nach Immobilisierung von AEE bzw. mPEG-aminen an Intensität. Dabei ist der Intensitätsverlust bei einer Modifizierung mit AEE weniger stark ausgeprägt im Vergleich zu den übrigen Modifizierungen.

Ein Vergleich der Proben 3 und 5, bei denen mPEG-amin 5000 bei gleicher Salzkonzentration (0,6 M Kaliumsulfat) aber bei verschiedenen Temperaturen (37°C bzw. 60°C) gekoppelt wird, ergibt nur einen geringen Unterschied in der Elementzusammensetzung. Im Gegensatz dazu zeigt die Kopplung dieses mPEG-amins bei 60°C und einer geringeren Salzkonzentration (0,2 M) eine geringere Intensitätsabnahme der Kohlenstoff-Photolinien bei 285,0 und 288,5 eV sowie eine schwächere Zunahme der Kohlenstoff-Photolinie bei 286,5 eV im Vergleich zu PVDF-PAAc-Oberflächen.

Ein entsprechender Vergleich der Daten aus den hochaufgelösten Kohlenstoffspektren der mPEG-amine 20000 zeigt wiederum das beste Kopplungsergebnis unter *cloud point* Bedingungen.

Abschließend wird zur Beurteilung der Kopplungsgüte das O/C-Verhältnis der einzelnen Proben betrachtet. Infolge der kurzen Kettenlänge zeigt PVDF-PAAc-AEE ein zu PVDF-PAAc etwa gleich großes O/C-Verhältnis. Ein deutlich größeres O/C-Verhältnis wird für Probe 3 erhalten. Da die O/C-Verhältnisse der beiden Proben 3 und 5 nahezu gleich groß sind, kann daraus geschlossen werden, dass *cloud point* Bedingungen nicht unbedingt zu einem besseren Kopplungsergebnis führen müssen. Auch für die Kopplung von mPEG-amin 20000 wird ein O/C-Verhältnis von 0,4 ermittelt, wobei *cloud point* Bedingungen hierzu nicht unbedingt erforderlich sind (vgl. Probe 7 und 8). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, die bei der Kopplung von mPEG-aldehyden erhalten werden. Eine mögliche Ursache hierfür ergibt sich aus der hohen Reaktivität der Aktivester.

3.7 Untersuchungen zum Benetzungsverhalten der modifizierten PVDF-Oberflächen

Eine nichtspektroskopische Methode zur Charakterisierung der physikochemischen Eigenschaften von Polymeroberflächen ist die Bestimmung des Benetzungsverhaltens über die Messung des Kontaktwinkels θ an der Phasengrenze fest/flüssig/gasförmig. Dabei ist die Benetzbarkeit der Polymeroberfläche abhängig von Parametern wie chemische Zusammensetzung der obersten Schicht, Kristallinität, Geometrie (Krümmung) und Rauigkeit¹⁸⁶. Nach Feijen et al. besteht ein Zusammenhang zwischen der Benetzbarkeit einer Oberfläche und der Zelladhäsion und dem daraus resultierenden Zellwachstum¹⁸⁷.

Im Rahmen dieser Arbeit werden dynamische Kontaktwinkelmessungen nach der *Wilhelmy-Platten*-Methode an PVDF-Oberflächen vor und nach den Modifizierungen durchgeführt. Hierzu wird die jeweilige Polymerprobe, die an einer Mikrowaage befestigt ist, in eine Messflüssigkeit (Wasser) eingetaucht und anschließend wieder herausgezogen. Die dabei auftretende Kraft wird als Funktion der Eintauchtiefe gemessen. Für den Eintauchvorgang der Probe wird dabei der Vorrückwinkel θ_a (engl. *advancing*) und für den Vorgang des Hochziehens der Rückzugwinkel θ_r (engl. *receding*) erhalten. Dabei beschreibt der Vorrückwinkel die niederenergetischen, hydrophoben Anteile der Oberfläche. Der Rückzugwinkel lässt dagegen Rückschlüsse auf die hochenergetischen, hydrophilen Anteile zu. Die aus diesen Messungen resultierende Winkeldifferenz wird als Kontaktwinkelhysterese bezeichnet. Diese resultiert aus einer Reihe von kinetischen und thermodynamischen Effekten. Während die zeitabhängige kinetische Hysterese von Quellungseffekten, der Oberflächendynamik und der Reorientierung funktioneller Gruppen abhängig ist, ist die zeitunabhängige thermodynamische Hysterese auf Rauigkeit, chemische Oberflächenheterogenität, Oberflächenentropie und Deformationserscheinungen zurückzuführen. Eine ideale Oberfläche weist keine Hysterese auf.

3.7.1 Dynamische Kontaktwinkelmessungen an PVDF-Amino-ppx vor und nach Immobilisierung proteinabweisender Schichten

Abb. 11 zeigt die dynamischen Kontaktwinkel, die an PVDF und PVDF-Amino-ppx vor und nach Kopplung der proteinabweisenden Molekülen erhaltenen werden. Dabei ist für jede

Oberfläche sowohl der Vorrück- als auch der Rückzugwinkel dargestellt. Bei den proteinabweisenden Beschichtungen handelt es sich um PVDF-Amino-ppx mit unter *cloud point* Bedingungen immobilisierten mPEG-aldehyden (mPEG-ald 5000 und 30000) sowie den immobilisierten Polysacchariden Dextran und Hydroxyethylstärke.

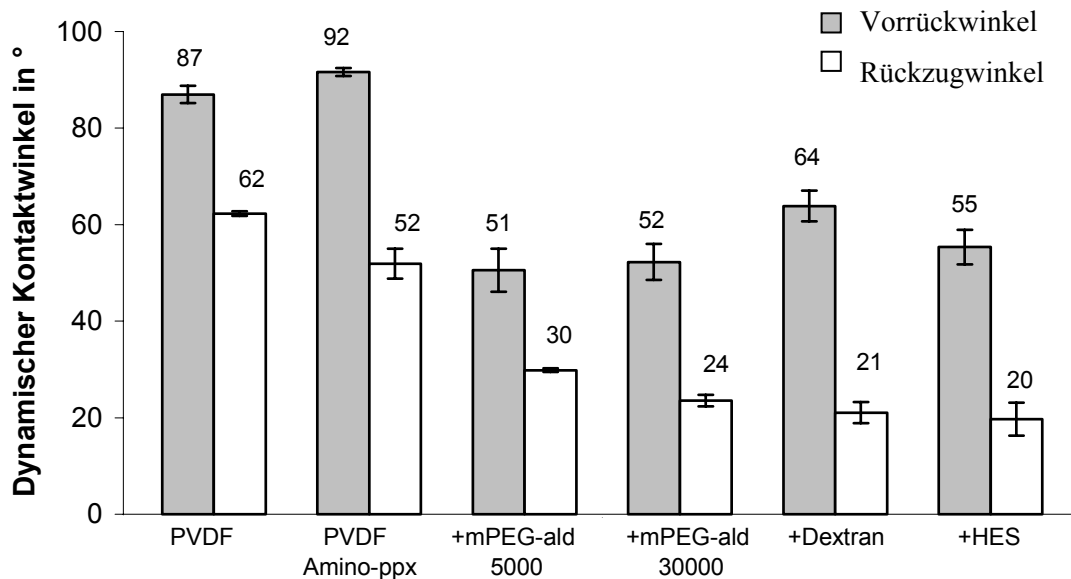


Abb. 11: Dynamische Kontaktwinkel (Vorrück-, Rückzugwinkel) für PVDF und PVDF-Amino-ppx vor und nach Modifizierung mit proteinabweisenden Molekülen

Beim Eintauchen von unmodifiziertem PVDF in Wasser wird ein Vorrückwinkel von 87° gemessen. Der beim Herausziehen der Probe ermittelte Rückzugwinkel beträgt 62° . Die gemessenen Winkel belegen die hydrophobe Natur des PVDF. Wären die Oberflächen der PVDF-Folien ideal glatt, müssten Vorrück- und Rückzugwinkel gleich sein. Die resultierende Hysterese liefert daher einen Hinweis für die Oberflächerrauigkeit der PVDF-Folien.

Bei der Untersuchung der PVDF-Amino-ppx-Oberflächen resultiert ein mittlerer Vorrückwinkel von 92° , der eine geringe Zunahme der Hydrophobie durch die aufgebraute Amino-ppx-Schicht andeutet. Verglichen mit PVDF zeigen die Amino-ppx-Oberflächen einen deutlich geringeren mittleren Rückzugwinkel von 52° . Amino-ppx verfügt über aromatische Aminogruppen, die trotz des stark hydrophoben Charakters der aromatischen Polymerketten eine gewisse Wechselwirkung mit Wassermolekülen (Wasserstoffbrückenbindungen) eingehen. Die Folge ist die resultierende starke Hysterese.

Unabhängig von ihrem mittleren Molekulargewicht und den daraus resultierenden deutlich verschiedenen Kettenlängen weisen die Vorrückwinkel beider mPEG-ald-Oberflächen identische Werte auf. Betrachtet man hingegen die Rückzugwinkel, so zeigt sich ein signifikanter Unterschied von 6° bezogen auf die mittleren Rückzugwinkel. Die stärkere Hydrophilie der Oberflächen mit immobilisiertem mPEG-ald 30000 geht einher mit deren längeren Ketten. Die resultierenden Hysteresen ergeben sich aus der Quellung der mPEG-Schichten in Wasser.

Die Oberflächen mit gekoppeltem Dextran weisen von den aufgeführten proteinabweisenden Schichten den höchsten mittleren Vorrückwinkel auf. Nach der Quellung in Wasser wird ein mittlerer Rückzugwinkel von 21° gemessen, der damit in der Größenordnung des mittleren Rückzugwinkels der Oberflächen mit immobilisiertem mPEG-ald 30000 liegt.

Die Kontaktwinkel-Ergebnisse der HES-Oberflächen sind mit denen der mPEG-ald 30000-Oberflächen vergleichbar.

3.7.2 Dynamische Kontaktwinkelmessungen an PVDF-PAAc vor und nach Immobilisierung von AEE und mPEG-aminen

Analog zu Abb. 11 sind in Abb. 12 die Vorrück- und Rückzugwinkel der PVDF-PAAc-Oberflächen vor und nach Modifizierung mit AEE und mPEG-aminen aufgeführt.

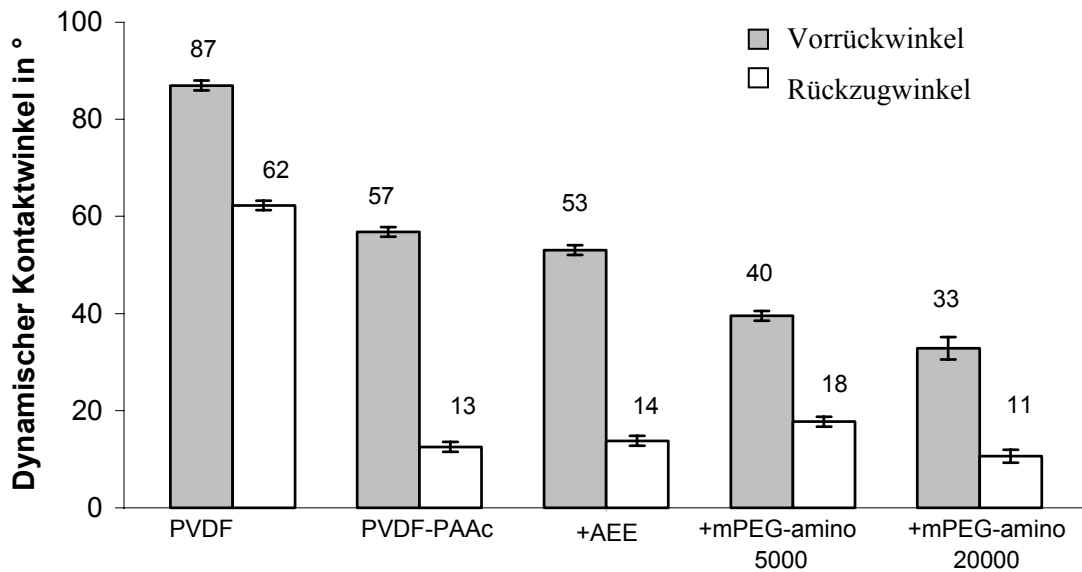


Abb. 12: Dynamische Kontaktwinkel (Vorrück-, Rückzugwinkel) der mit AEE und mPEG-aminen modifizierten PVDF-PAAc-Oberflächen

Wie zu erwarten zeigen die PVDF-PAAc-Oberflächen einen wesentlich geringeren mittleren Vorrückwinkel als die hydrophoben PVDF-Oberflächen. Dabei liegt der mittlere Vorrückwinkel in der Größenordnung desjenigen der PVDF-Amino-ppx-Oberflächen mit gekoppeltem mPEG-ald 5000, mPEG-ald 30000 und HES (vgl. Abb. 11). Nach dem Eintauchen der Proben in Wasser wird ein mittlerer Rückzugwinkel von 13° gemessen, der im Gegensatz zu den vorgenannten Proben aus Abb. 11 deutlich geringer ist und PAAc-Oberflächen als wesentlich hydrophiler charakterisiert.

Die mittleren Vorrück- und Rückzugwinkel von PVDF-PAAc- und von PVDF-PAAc-AEE-Oberflächen weisen ähnliche Werte auf. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine Kettenlänge, bestehend aus zwei Ethylenglykoleinheiten, keinen Einfluss auf das Benetzungsverhalten an Oberflächen, die mit Acrylsäure gefropft sind, ausüben.

Bei Betrachtung der mittleren Vorrückwinkel führt die Kopplung von mPEG-amin 5000 und 20000 unter *cloud point* Bedingungen zu einer weiteren Hydrophilierung der PVDF-PAAc-Oberflächen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die mPEGs auf den PVDF-PAAc-Oberflächen die Wechselwirkung mit Wasser noch verstärken. Betrachtet man das Ergebnis der Rückzugwinkelmessungen an PVDF-PAAc-mPEG-amin 5000, so zeigt sich im Vergleich mit dem mittleren Rückzugwinkel der PVDF-PAAc-Oberflächen, dass kurze mPEG-Ketten die

starke Hydrophilie der PAAc nicht verstärken. Auch bei einer Verlängerung der mPEG-Ketten (mPEG-amin 20000) ist eine signifikante Erhöhung der Hydrophilie nicht beobachtbar.

3.7.3 Dynamische Kontaktwinkelmessungen an PVDF-PAAc-PEI vor und nach Immobilisierung proteinabweisender Schichten

Abb. 13 zeigt Vorrück- und Rückzugwinkel von PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen vor und nach Kopplung von mPEGs-ald 5000, mPEG-ald 30000 unter *cloud point* Bedingungen und von carboxymethylierten Polysacchariden mit einem Carboxylierungsgrad von 1:17 im Falle von Hydroxyethylstärke und von 3:4 im Falle von Dextran.

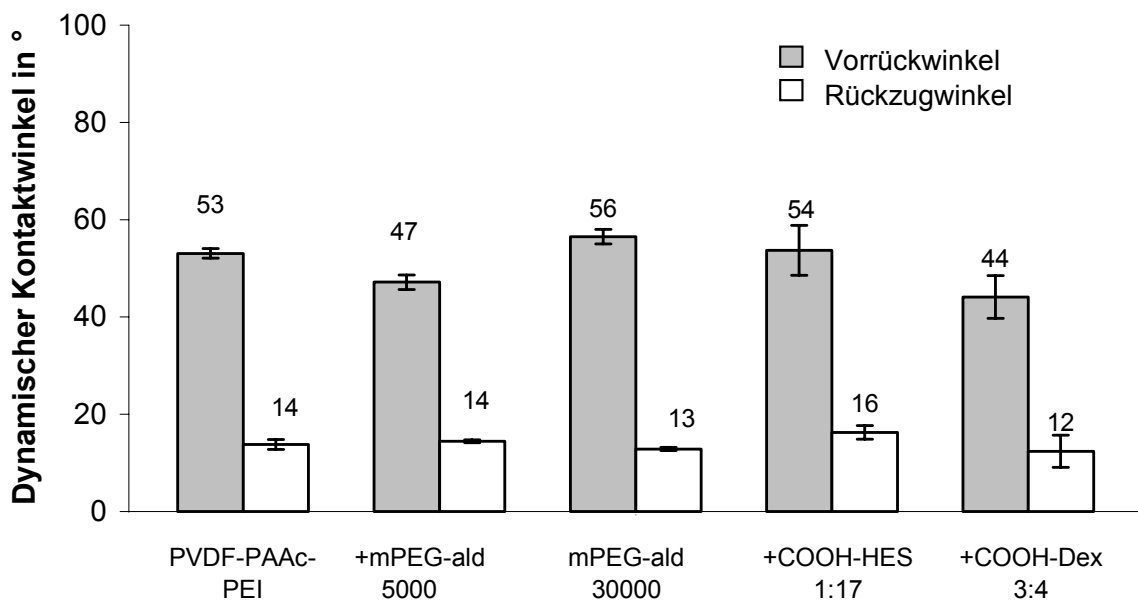


Abb. 13: Dynamische Kontaktwinkel (Vorrück-, Rückzugwinkel) für mit PEI modifizierten PVDF-PAAc-Oberflächen vor und nach der Kopplung von mPEG-aldehyden und carboxymethylierten Polysacchariden

Sowohl der mittlere Vorrückwinkel als auch der mittlere Rückzugwinkel von PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen ist nahezu identisch mit den entsprechenden Winkeln der PVDF-PAAc-Oberflächen (vgl. Abb. 12). Demnach wird die Hydrophilie einer PVDF-PAAc-Oberfläche durch die Kopplung von PEI nicht beeinflusst. Die Kopplung von mPEG-ald 5000 an die PEI-Zwischenschicht führt zu einer geringen aber signifikanten Abnahme des mittleren Vorrückwinkels. Der Wert des mittleren Rückzugwinkels wird im Gegensatz dazu nicht

beeinflusst. Die Immobilisierung von mPEG-ald 30000 führt zu einem mittleren Vorrückwinkel von 56° , der somit größer ist als derjenige der PEI-Schichten, jedoch bleibt auch hier der mittlere Rückzugwinkel unverändert. Die Verringerung des mittleren Vorrückwinkels bei mPEG-ald 5000 impliziert eine Verbesserung der Benetzbarkeit und steht im Einklang mit der höheren Kopplungsdichte, die mittels XPS gemessen wird (vgl. Tab. 12). Infolge der geringeren Kopplungsdichte bei mPEG-ald 30000 (vgl. Tab. 12) ist ein mittlerer Vorrückwinkel in der Größenordnung der PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen zu erwarten. Vergleicht man die Werte der mittleren Rückzugwinkel dieser drei Proben, so wird der dominierende Einfluss der PAAc-Schichten auf die Benetzbarkeit deutlich.

Die Oberflächen mit immobilisiertem COOH-HES 1:17 zeigen einen mittleren Vorrückwinkel, der vergleichbar ist mit dem der PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen. Im Unterschied zu diesem zeigt er eine wesentlich größere Standardabweichung. Diese Standardabweichung liefert einen Hinweis auf eine inhomogenere Verteilung des COOH-HES 1:17 auf den Oberflächen. Ebenso wie bei den vorherigen Schichten resultiert auch hier keine Änderung bezüglich der Rückzugwinkelwerte. Eine deutliche Verringerung des mittleren Vorrückwinkels ergibt sich bei der Kopplung der COOH-Dex 3:4. Die Standardabweichung ist ebenfalls relativ groß, so dass auch hier von einer inhomogeneren Oberflächenschicht ausgegangen werden kann. Da sich der mittlere Rückzugwinkel nicht wesentlich von denen der anderen unterscheidet, tritt auch hier die Dominanz der PAAc-Schicht hinsichtlich der Benetzbarkeit deutlich hervor.

3.8 Oberflächentopographie der modifizierten Oberflächen

Zur Charakterisierung der Oberflächentopographie wird die Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*, AFM) verwendet. Die AFM ermöglicht die Untersuchung der Oberflächentopographie bis in den molekularen Maßstab. Das Prinzip der AFM beruht auf der Annäherung einer Abtastspitze mit atomarer Dimension an eine Probenoberfläche und die Messung der auf die Spitze wirkenden Kräfte. Dabei wird die Auslenkung des Hebelarms, an dem sich die Spitze befindet, detektiert. Zur Untersuchung des Grundmaterials PVDF und der nachfolgenden Modifizierungsschritte wurden AFM-Untersuchungen im *Tapping Mode* durchgeführt. Bei dieser Verfahrensvariante oszilliert der Hebelarm über der Probe mit mehreren hundert Kilohertz. Als Messgröße dient die Dämpfung der vorgegebenen Schwingung durch die wirksamen interatomaren Wechselwirkungskräfte. Die Spitze tritt nur kurzzeitig mit der Probe in Wechselwirkung, und folglich wird das Risiko einer Beschädigung der Probe durch auftretende laterale Kräfte eliminiert.

Zur Untersuchung der Oberflächen bzw. der Oberflächentopographie vor und nach Kopplung mit proteinabweisenden Schichten unter physiologisch relevanten Bedingungen werden die AFM-Messungen im *tapping in fluid mode* in Wasser vorgenommen.

In Abb. 14 sind AFM-Aufnahmen von PVDF und PVDF-Amino-ppx-Oberflächenausschnitten, die für die ausgewählten Proben repräsentativ sind, gegenübergestellt.

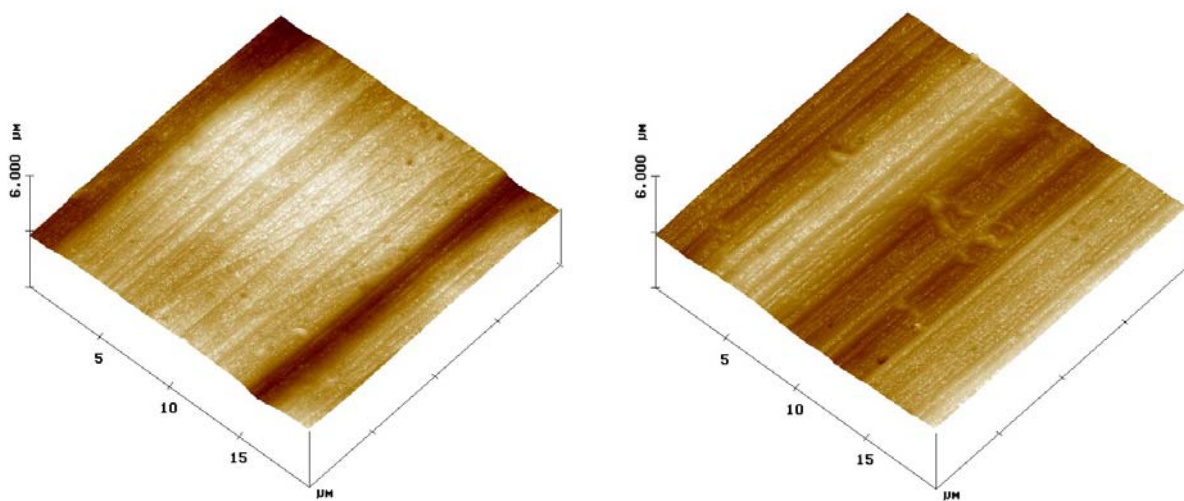


Abb. 14: AFM-Aufnahmen einer PVDF- (links) und PVDF-Amino-ppx-Oberfläche (rechts)

Die AFM-Aufnahme der unbehandelten PVDF-Folie (vgl. Abb. 14, links) weist in Richtung der y-Achse parallel verlaufende Rillen auf. Die daneben aufgeführte Abbildung gehört zu einer PVDF-Amino-ppx-Oberfläche. Es ist deutlich zu erkennen, dass die CVD-Beschichtung mit Amino-ppx keinen mittels AFM nachweisbaren Einfluss auf die Oberflächentopographie der verwendeten Folien hat.

In Abb. 15 sind zwei AFM-Aufnahmen von PVDF-Amino-ppx-Oberflächen nach Kopplung von mPEG-ald 5000 (links) und mPEG-ald 30000 (rechts) unter *cloud point* Bedingungen dargestellt.

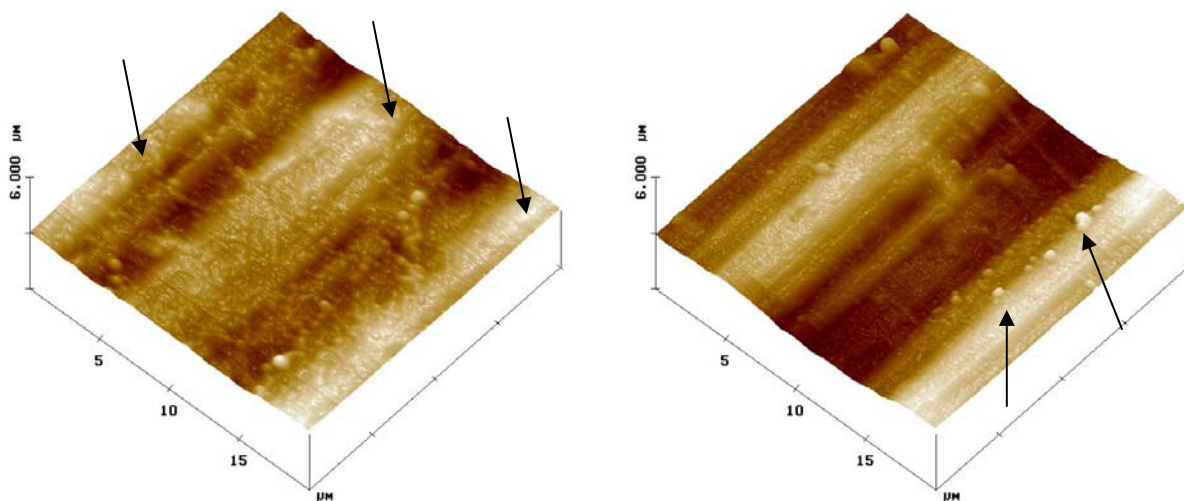


Abb. 15: AFM-Aufnahmen von PVDF-Amino-ppx-Oberflächen nach Kopplung von mPEG-ald 5000 (links) und mPEG-ald 30000 (rechts) unter *cloud point* Bedingungen

In der linken Abbildung sind drei Erhebungen mit dazwischenliegenden Vertiefungen zu erkennen. Außerdem weist die Oberfläche des PVDF-Amino-ppx-mPEG-ald 5000 eine deutlich erkennbare und relativ gleichmäßige Verteilung von punktuellen Erhebungen auf. Es ist zu vermuten, dass es sich hierbei um Bereiche mit immobilisiertem mPEG-ald 5000 handelt. Bei Vergleich mit der rechten AFM-Abbildung ist zu erkennen, dass die Ausbildung derartiger Erhebungen bei der Immobilisierung von mPEG-ald 30000 wesentlich geringer und inhomogener ausfällt. Diese mittels AFM erzeugten optischen Eindrücke stehen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die mittels XPS gewonnen werden (vgl. Tab. 7). Dort zeigt sich anhand der O/C-Verhältnisse eine höhere Kopplungsdichte für mPEG-ald 5000.

In Abb. 16 werden AFM-Aufnahmen einer PVDF-Folie vor und nach Argonplasma-Behandlung gegenübergestellt.

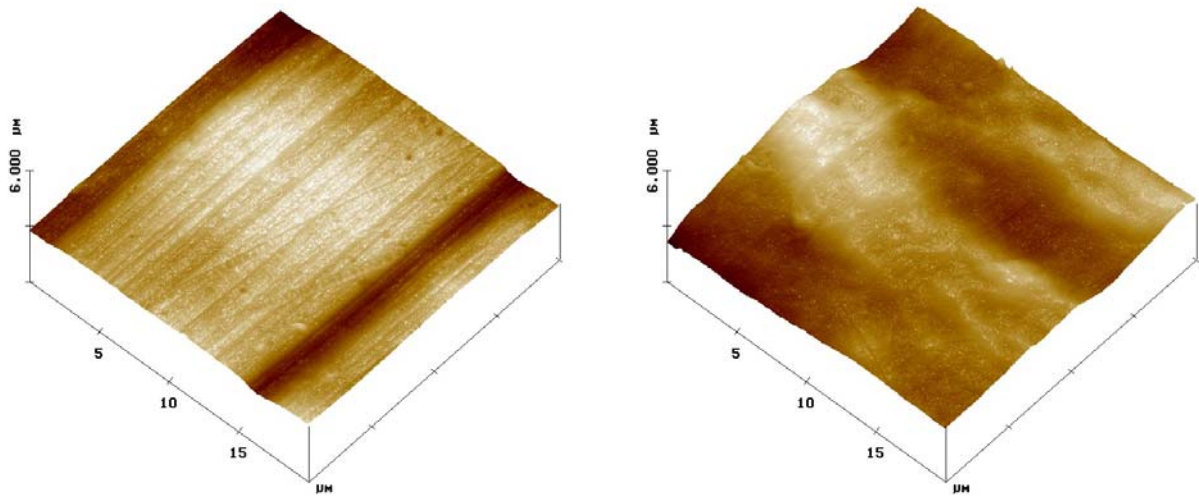


Abb. 16: Gegenüberstellung von AFM-Aufnahmen einer unbehandelten und einer mit Argonplasma behandelten PVDF-Oberfläche

Nach der Argonplasma-Behandlung weist die PVDF-Folienoberfläche eine deutlich veränderte Oberflächentopographie auf. Die auf der unbehandelten Oberfläche zu erkennenden parallel angeordneten Rillen in y-Richtung sind nach der Argonplasma-Behandlung nicht mehr zu sehen.

Die im Anschluss an die Oberflächenaktivierung mittels Argonplasma durchgeführte Pfropfcopolymerisation von Acrylsäure sowie die anschließend an PVDF-PAAc gekoppelte PEI-Schicht werden ebenfalls mittels AFM untersucht und verglichen (vgl. Abb. 17).

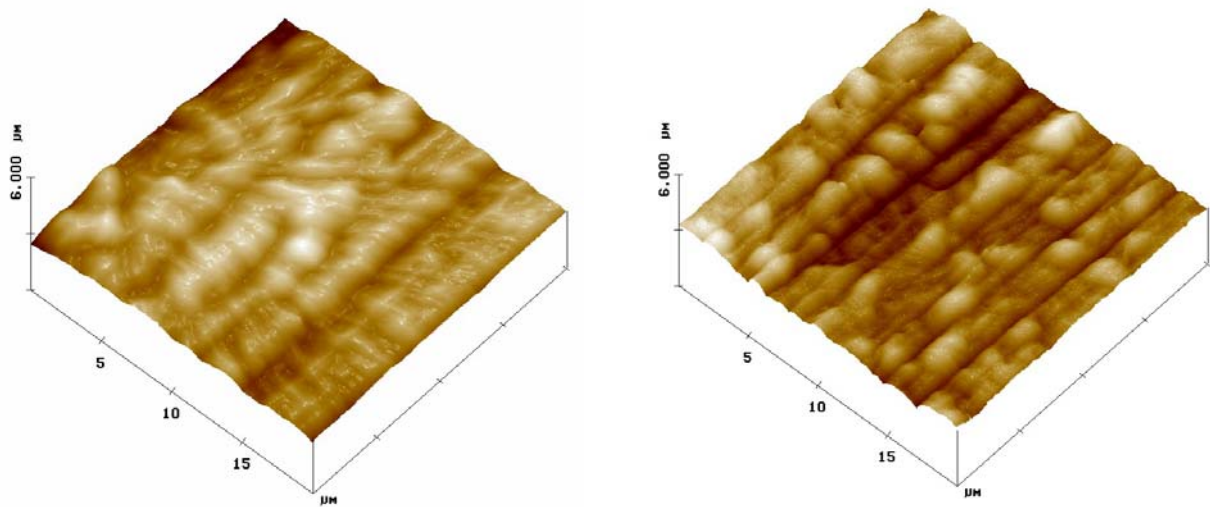


Abb. 17: AFM-Aufnahmen von PVDF-PAAc vor (links) und nach Kopplung von PEI (rechts)

Beide Oberflächen zeigen unterschiedliche Oberflächentopographien. Dabei sind im Falle der PVDF-PAAc-Oberfläche die in y-Richtung parallel verlaufenden Rillen weniger deutlich zu erkennen als im Falle der PVDF-PAAc-PEI-Oberfläche. Außerdem sind auf der letztgenannten Oberfläche auf den Kämmen zwischen den Rillen nur vereinzelte Erhebungen zu erkennen. Demgegenüber erscheint die PVDF-PAAc-Oberfläche gleichmäßiger beschichtet.

In Abb. 18 sind AFM-Aufnahmen von PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen nach Immobilisierung von mPEG-ald 5000, mPEG-ald 30000, COOH-Dex und COOH-HES dargestellt.

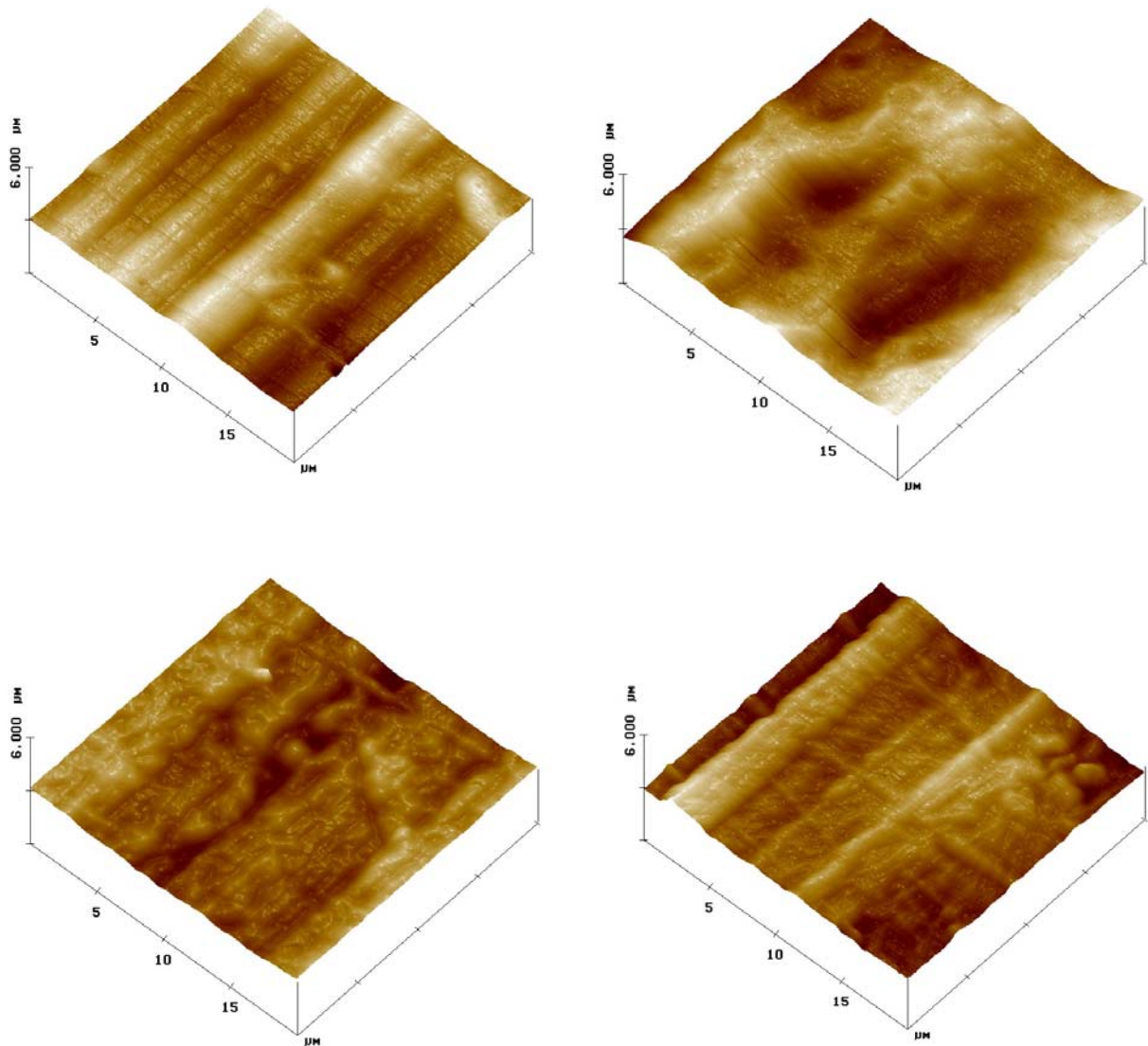


Abb. 18: AFM-Aufnahmen von PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen nach Kopplung von mPEG-ald 5000 (oben links), mPEG-ald 30000 (oben rechts), COOH-Dex (unten links) und COOH-HES (unten rechts)

Ein Vergleich der aufgeführten AFM-Aufnahmen zeigt deutliche Unterschiede hinsichtlich der Oberflächentopographie aller vier Oberflächenmodifikationen.

In Abb. 19 sind PVDF-PAAc-Oberflächen nach Modifizierung mit mPEG-amin 5000 und mPEG-amin 20000 dargestellt.

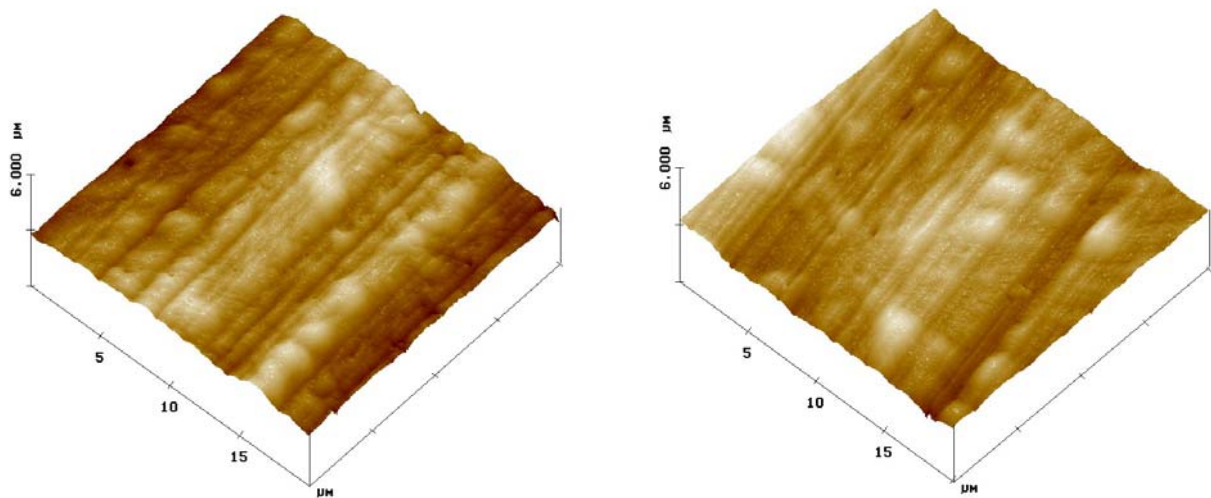


Abb. 19: AFM-Aufnahmen von PVDF-PAAc-Oberflächen nach Kopplung von mPEG-amin 5000 (links) und mPEG-amin 20000 (rechts)

Beide Oberflächen weisen bezüglich ihrer Oberflächentopographie nur sehr geringe Unterschiede auf. Ein Vergleich mit der AFM-Aufnahme der PVDF-PAAc-Oberfläche (vgl. Abb. 17-links) lässt keine Veränderungen infolge der Kopplung mit den mPEG-aminen erkennen.

3.9 Proteinadsorptionsprozesse als Schlüssel zur Biokompatibilität

Beim Kontakt einer Materialoberfläche mit einer biologischen Flüssigkeit (z.B. Blutplasma, Extrazellulärflüssigkeit) setzt augenblicklich ein dynamischer Prozess der Adsorption und Desorption einer Vielzahl von Proteinen des Biosystems ein. Dieser Prozess verläuft wesentlich schneller als die Adhäsion von Zellen, so dass die Biomaterialeigenschaften durch die maskierende Proteinschicht determiniert werden. Art und Menge der adsorbierten Proteine werden durch die chemischen, physikochemischen, morphologischen und topographischen Oberflächeneigenschaften des Biomaterials bestimmt. Phänomenologisch kann für die meisten hydrophoben Oberflächen eine hohe Proteinadsorptionfähigkeit bei gleichzeitiger Tendenz zu konformativen Veränderungen bis hin zur Denaturierung der adsorbierten Proteine festgestellt werden. Hydrophile Oberflächen dagegen weisen eine verminderte Proteinadsorption auf¹⁸⁸.

Proteine setzen sich aus bis zu 20 proteinogenen Aminosäuren zusammen. Diese Aminosäuren unterscheiden sich hinsichtlich des hydrophilen bzw. hydrophoben Charakters, der Ladung und der Neigung zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen ihrer Seitenketten. Hieraus resultieren vielfältige Möglichkeiten zur Ausbildung von Primär-, Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteinmonomere. Insbesondere die Flexibilität ihrer dreidimensionalen Konformationen in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen und die daraus resultierende Ausrichtung ihrer hydrophoben Domänen spielen eine entscheidende Rolle bei der Wechselwirkung der Proteine mit Biomaterialoberflächen¹⁸⁹. Die Existenz eines hochgeordneten, gefalteten Proteins in wässriger Umgebung verlangt, dass der Verlust an Konformationsentropie durch die entropischen und enthalpischen Beiträge aus intra- und intermolekularen Wechselwirkungen kompensiert wird. Diese sind elektrostatischer, hydrophober bzw. disperser Natur und beinhalten ebenfalls Wasserstoffbrückenbindungen. Die verschiedenen abstoßenden und anziehenden Wechselwirkungen stehen unter bestimmten Bedingungen in einem Gleichgewicht zueinander, das die native Tertiärstruktur des Proteins determiniert. Dies bedeutet aber auch, dass sich bei einer Änderung der Umgebungsbedingungen bzw. dem Auftreten eines neuen Wechselwirkungspartners (Biomaterial) die verschiedenen Wechselwirkungsanteile neu zusammensetzen und damit zu einer Umstrukturierung des Proteins führen.

Die Grundvoraussetzung für den spontanen Ablauf der Proteinadsorption bei konstanter Temperatur und Druck ist eine negative Änderung der freien Gibbschen Energie ΔG_{ads} (vgl. Gl. 3.9.1).

$$\Delta G_{\text{ads}} = \Delta H_{\text{ads}} - T\Delta S_{\text{ads}} \quad (3.9.1.)$$

Wie anhand der Gibbs-Helmholtz-Gleichung zu sehen ist, kann diese negative Änderung durch eine Enthalpieabnahme ($\Delta H_{\text{ads}} < 0$) oder eine Entropiezunahme ($\Delta S_{\text{ads}} > 0$) realisiert werden. Die enthalpischen und entropischen Beiträge, die eine Proteinadsorption auf einer Oberfläche begünstigen oder hemmen, sind in Tab. 16 zusammengefasst.

Tab. 16: Enthalpische und entropische Beiträge, die bei der Proteinadsorption auf Oberflächen begünstigend oder hemmend wirken¹⁹⁰

adsorptionsfördernd	$\Delta H_{\text{ads}} < 0$ Van der Waals-Wechselwirkungen (kurze Reichweite) Ion-Ion Wechselwirkungen (lange Reichweite)
	$\Delta S_{\text{ads}} > 0$ Desorption von Wassermolekülen Entfaltung von Proteinen Freisetzung von Gegenionen
adsorptionshemmend	$\Delta H_{\text{ads}} > 0$ Dehydratation (Oberfläche + Protein) Entfaltung von Proteinen Kompression von Hydrogelketten (z.B. PEG)
	$\Delta S_{\text{ads}} < 0$ Proteinadsorption Ausrichtung hydrophober Domänen nach außen Kompression von Hydrogelketten (z.B. PEG) osmotische Repulsion

Wie aus Tab. 16 hervorgeht, führen van der Waals- und elektrostatische Wechselwirkungen zur Ausbildung negativer Adsorptionsenthalpien und damit zu einer Begünstigung der Proteinadsorption. Die Desorption von Wassermolekülen, die Denaturierung von Proteinen sowie die Aufhebung von Salzbrücken innerhalb des Proteins resultieren in einer Entropiezunahme, die ebenfalls zur Begünstigung der Proteinadsorption führt. Von den aufgeführten enthalpischen und entropischen Einflussfaktoren, die die Adsorption fördern, liefert die Desorption von Wassermolekülen den größten Beitrag. Wassermoleküle, die an hydrophoben Gruppen eines Proteins bzw. an einer hydrophoben Biomaterialoberfläche haften, nehmen eine höhere Ordnung als in der flüssigen Phase ein. Wenn sich apolare Gruppen jedoch

vereinen, so resultiert dabei eine Freisetzung von ursprünglich geordneten Wassermolekülen unter Zunahme der Entropie. Dies wird als „hydrophober Effekt“ bezeichnet.

Positive Werte für die Adsorptionenthalpie werden verursacht durch eine Dehydratation der Biomaterialoberfläche sowie des Proteins. Außerdem führen sowohl die Proteindenaturierung als auch die Kompression von Hydrogelketten, die auf Biomaterialien immobilisiert sind, zur Vergrößerung der Enthalpie und damit zu einer Vermeidung der Proteinadsorption.

Faktoren, die zu einer Entropieabnahme führen, sind die Proteinadsorption an sich, die Ausrichtung hydrophober Proteindomänen aus dem Proteincore nach außen, die Kompression von Hydrogelketten sowie die osmotische Repulsion. Von den genannten Faktoren hat die Kompression von hydratisierten und zufällig orientierten Polymerketten (PEG), die auf einer Materialoberfläche immobilisiert sind, und die osmotische Repulsion dieser Ketten auf die Verhinderung der Proteinadsorption den größten Einfluss.

3.9.1 Die Auswahl von Modelproteinen zur Untersuchung ihres Adsorptionsverhaltens auf PVDF-Oberflächen vor und nach Modifizierung

Zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von Proteinen auf unbehandelten und modifizierten PVDF-Oberflächen werden verschiedene Proteine, die sich bezüglich ihres strukturellen Aufbaus und der daraus resultierenden Eigenschaften unterscheiden, ausgewählt. Diese Proteine sind Insulin, Lysozym und Fibronectin. Einige Proteineigenschaften, die für Adsorptionsprozesse auf Materialoberflächen von Bedeutung sind, werden in Tab. 17 aufgeführt.

Tab. 17: Ausgewählte Eigenschaften der verwendeten Proteine Insulin¹⁹¹, Lysozym¹⁹² und Fibronectin¹⁹³

Parameter	Insulin	Lysozym	Fibronectin
Molekulargewicht	5778	14600	ca. 500000
Abmessungen	Hexamer: Sphäroid 5 nm x 3,5 nm	Elipsoid 4,5 nm x 3,0 nm x 3,0 nm	Länge 140 nm
Isolelektrischer Punkt (pI)	5,3	11,1	5,5-6,0

Die Proteingröße spielt bei Adsorptionsprozessen eine bedeutende Rolle. Da die Kopplung flexibler Polymerketten auf Materialoberflächen in Abhängigkeit von der Kopplungsdichte zu offenen (porösen) Schichten führt, ist eine Diffusion von Proteinen in Abhängigkeit von ihrer Größe in die Ketten-Zwischenräume möglich. Außerdem ist neben der Diffusion eine Stauchung der Polymerketten bei der Wechselwirkung mit Proteinen, die ein hohes Molekulargewicht aufweisen, gegeben. Insulin und Lysozym werden als Vertreter der kleineren und leichteren Proteine und Fibronectin als Vertreter für die größeren und schwereren Proteine bezüglich ihres Adsorptionsverhaltens an PVDF-Oberflächen untersucht. Da diesbezüglich nicht nur Größe und Molekulargewicht von Bedeutung sind, sondern ebenso deren Nettoladung bei physiologischem pH-Wert (pH 7,4), werden Insulin und Fibronectin als Vertreter mit negativer Nettoladung und Lysozym mit positiver Nettoladung eingesetzt.

Ein weiteres Kriterium zur Einordnung von Proteinen bei der Beurteilung ihres Adsorptionsverhaltens ist ihre Widerstandsfähigkeit gegen strukturelle Änderungen während der Adsorption („weiche“ und „harte“ Proteine). Hiernach wird ein Protein als „hart“ betrachtet, wenn seine tertiäre Struktur während der Adsorption nicht wesentlich verändert wird. Solche Proteine mit hoher innerer Stabilität adsorbieren nicht an hydrophile neutrale Oberflächen¹⁹⁴. Lysozym ist ein Protein mit hoher konformativer Stabilität und wird daher als „hart“ bezeichnet¹⁹⁵. Insulinmonomere können aufgrund zweier interchenarer sowie einer intrachenaren Disulfidbrücke und der daraus resultierenden strukturellen Stabilität ebenfalls den „harten“ Proteinen zugeordnet werden.

Im Gegensatz dazu weisen „weiche“ Proteine eine niedrige innere Stabilität auf und adsorbieren aufgrund der konformationsbedingten Entropiezunahme auf allen Oberflächen. Das bekannteste „weiche“ Protein ist Albumin. Albumin adsorbiert infolge seiner strukturellen Eigenschaften sowohl an hydrophilen als auch an elektrostatisch repulsiven Oberflächen¹⁹⁶. Fibronectin kann ebenfalls zu den „weichen“ Proteinen gezählt werden, da es aufgrund seines komplexen Aufbaus eine starke Tendenz zum partiellen Verlust seiner biologischen Aktivität nach der Adsorption zeigt.

3.9.2 Untersuchung der Proteinadsorption auf Biomaterialoberflächen mittels *Surface-MALDI-TOF-MS*

Die Matrix-unterstützte-Laser-Desorption/Ionisation-Flugzeit-Massenspektrometrie (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*, MALDI-TOF-MS) hat in den letzten Jahren als Methode zur Molekulargewichtsbestimmung und Strukturaufklärung von Peptiden, Proteinen, Nucleinsäuren, Oligosacchariden sowie synthetischen Makromolekülen zunehmend an Bedeutung gewonnen^{197,198,199}. Eine weitere Stärke dieser Methode ist der Nachweis geringer Probenmengen (Femtomolbereich)²⁰⁰.

In der jüngsten Vergangenheit wird MALDI-TOF-MS außerdem zur Analyse der Zusammensetzung von Körperflüssigkeiten²⁰¹, zur Analyse von Proteinmodifikationen²⁰² und sogar zu Differenzierung der Unterschiede zwischen normalem Hämoglobin und Sichelzellenhämoglobin eingesetzt^{203,204}. Weitere Arbeiten beschäftigen sich mit der Wechselwirkung von Zellen bzw. Proteinen und der Biomaterialoberfläche²⁰⁵. Hierzu zählen nicht nur Adsorptionsphänomene sondern auch Untersuchungen zur Genexpression (Proteomics)^{206,207}.

Bei der konventionellen MALDI-TOF-MS werden Analyt- und Matrixmoleküle in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und auf einen Probenträger aufgebracht²⁰⁸. Dort verdampft das Lösungsmittel, und die Analytmoleküle werden in Matrixkristalle eingekapselt. Dabei hat die Matrix mehrere Funktionen. Über ihre hohe Absorption bei der eingestrahlten Wellenlänge, die von einem gepulsten N₂-Laser emittiert wird, absorbiert die Matrix Energie aus den Laserpuls. Außerdem schützt sie durch ihre Absorptionscharakteristik und ihre Präsenz in hohem Überschuss gegenüber der Probe diese vor photolytischer Zersetzung. Sie überträgt dabei nicht

nur die zur Desorption notwendige Energie auf die Probe (Analytmoleküle), sondern stellt auch die für die Ionisierung notwendigen Protonen zur Verfügung bzw. nimmt Protonen auf. Sie reduziert die Wechselwirkung der Probenmoleküle untereinander sowie mit der Metalloberfläche des Targets. Die von der Targetoberfläche desorbierten und ionisierten Probenmoleküle werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und in einem Flugzeitmassenspektrometer analysiert.

Zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von Proteinen, die auf Biomaterialoberflächen adsorptiv gebunden sind, wird die sogenannte *Surface*-MALDI-TOF-MS-Methode eingesetzt²⁰⁹. Abb. 20 zeigt den schematischen Aufbau einer MALDI-TOF-MS zur Analyse von Proteinen, die auf Biomaterialoberflächen adsorbiert sind.

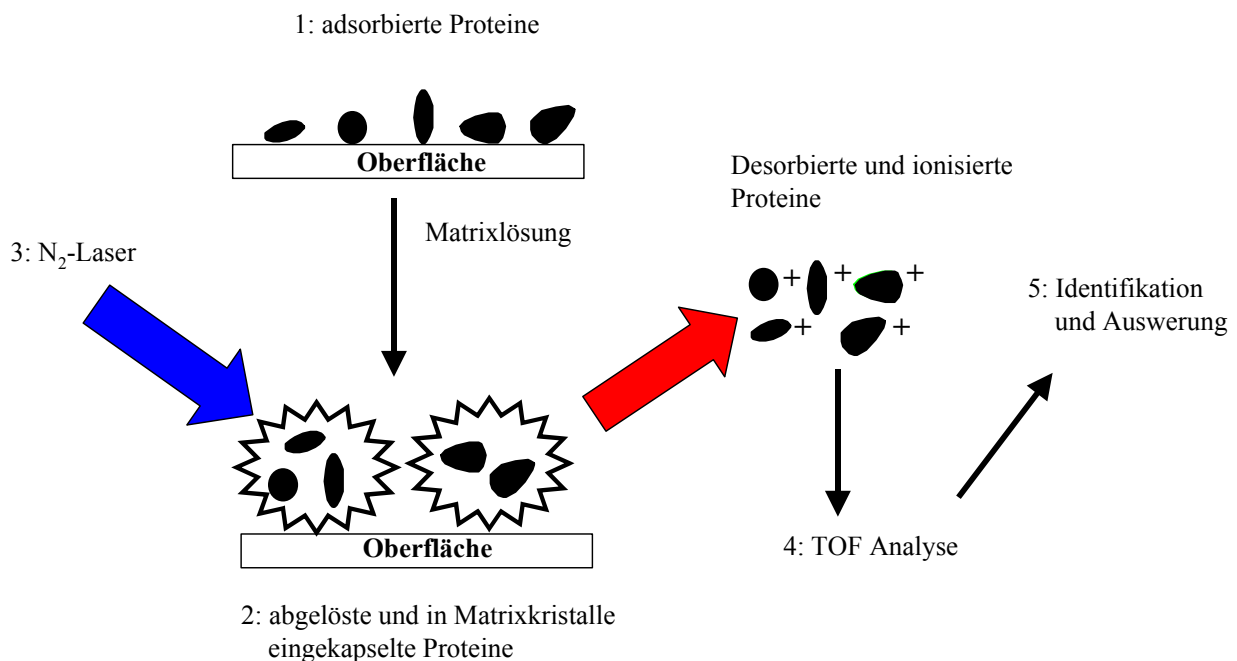


Abb. 20: Schematische Darstellung der *Surface*-MALDI-TOF-MS-Methode

Im Gegensatz zur klassischen MALDI-Präparation, bei der die Analytmoleküle vollständig von Matrixmolekülen umgeben sind und deren Desorptionsverhalten ausschließlich durch ihre Wechselwirkung mit der Matrix determiniert ist, tritt bei der *Surface*-MALDI-Methode die Wechselwirkung der Analytmoleküle mit der Biomaterialoberfläche hinzu. Hierdurch entsteht eine Wechselwirkungskonkurrenz des Analyten zur Biomaterialoberfläche einerseits und zur Matrix andererseits. Dadurch wird sein Desorptionsverhalten abhängig von der Stärke der

adsorptiven Wechselwirkung zur Biomaterialoberfläche. Realisiert wird diese bivalente Wechselwirkung durch vorherige Präparation des Analyten (Protein) und eine anschließende Coverpräparation der Matrix¹⁸⁶.

Mit Hilfe der *Surface*-MALDI-TOF-MS-Methode wird das Adsorptionsverhalten von Lysozym und Insulin auf PVDF- und modifizierten PVDF-Oberflächen untersucht. Fibronectin kann aufgrund seines hohen Molekulargewichts von ca. 500000 mittels MALDI-TOF-MS nicht analysiert werden.

3.9.2.1 Untersuchung der Adsorption von Lysozym auf PVDF- und modifizierten PVDF-Oberflächen mittels *Surface*-MALDI-TOF-MS

Abb. 21 zeigt die *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Lysozym nach der Adsorption auf PVDF- und PVDF-Amino-ppx-Oberflächen.

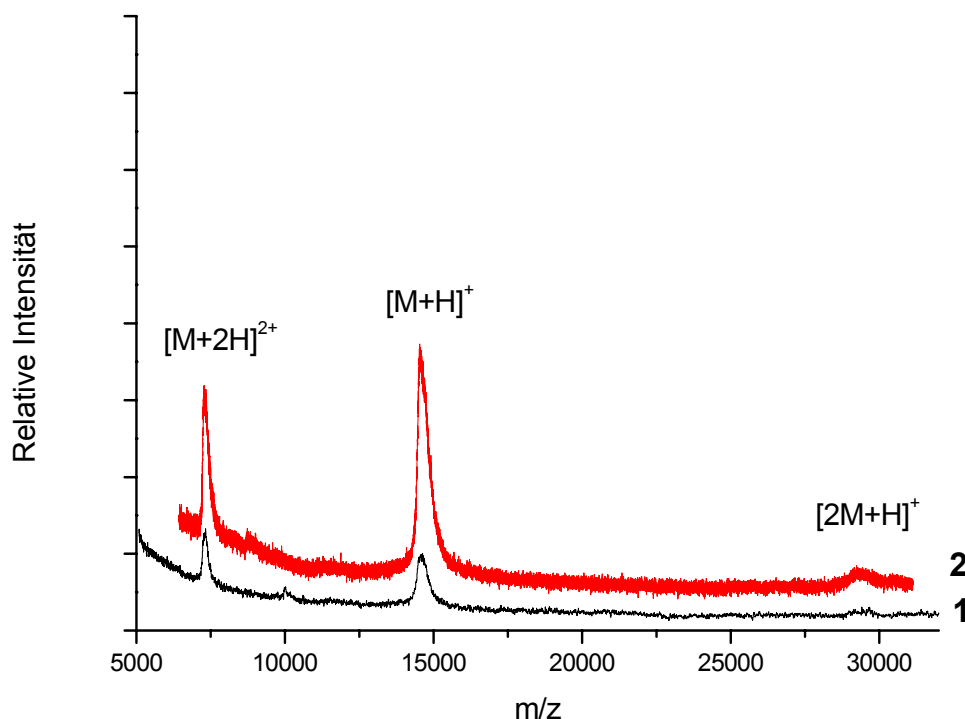


Abb. 21: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektrum von adsorbiertem Lysozym auf PVDF- (1) und PVDF-Amino-ppx- (2) Oberflächen

In beiden Spektren sind drei Peaks zu erkennen, die für Lysozym charakteristisch sind. Das Signal bei m/z 7491 entspricht dem zweifach geladenen monomeren Lysozym $[M+2H]^{2+}$, das Signal bei m/z 14990 entspricht dem einfach geladenen monomeren Lysozym $[M+H]^+$ und das Signal bei m/z 29800 entspricht dem einfach geladenen dimeren Lysozym $[2M+H]^+$. Die Abweichungen der gemessenen m/z -Werte gegenüber den berechneten m/z -Werten resultiert aus den nicht durchgeführten Kalibrierungen. Die exakten Massen sind bei der Untersuchung des Adsorptionsverhaltens eines definierten Proteins an Oberflächen nicht von Relevanz, und daher werden aus praktischen Erwägungen hier keine Kalibrierungen vorgenommen.

Beide Spektren belegen eindeutig eine Adsorption des Lysozym sowohl auf PVDF- als auch auf PVDF-Amino-ppx-Oberflächen. Nach Lahann sind die Aminogruppen der Amino-ppx-Schicht bei pH 7,4 (Inkubationsbedingungen) protoniert¹⁶². Da Lysozym bei diesem pH-Wert ebenfalls über eine positive Nettoladung verfügt, sollte eine Adsorption erschwert sein. Die *Surface*-MALDI-Ergebnisse zeigen hingegen, dass dies nicht der Fall ist. Ganz im Gegenteil zeigt Lysozym gerade gegenüber den Amino-ppx-Schichten eine sehr starke Adsorption. Dies wird deutlich bei der Betrachtung von Spektrum 2 in Abb. 21. Da die Desorption im MALDI-TOF-MS ebenfalls unter trockenen Bedingungen abläuft, steht dieses Ergebnis in sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der dynamischen Kontaktwinkelmessungen an beiden Oberflächen (vgl. Abb. 11).

Abb. 22 zeigt die *Surface*-MALDI-Spektren von adsorbiertem Lysozym auf Amino-ppx-Oberflächen, die mit mPEG-ald 5000 unter verschiedenen Reaktionsbedingungen modifiziert sind.

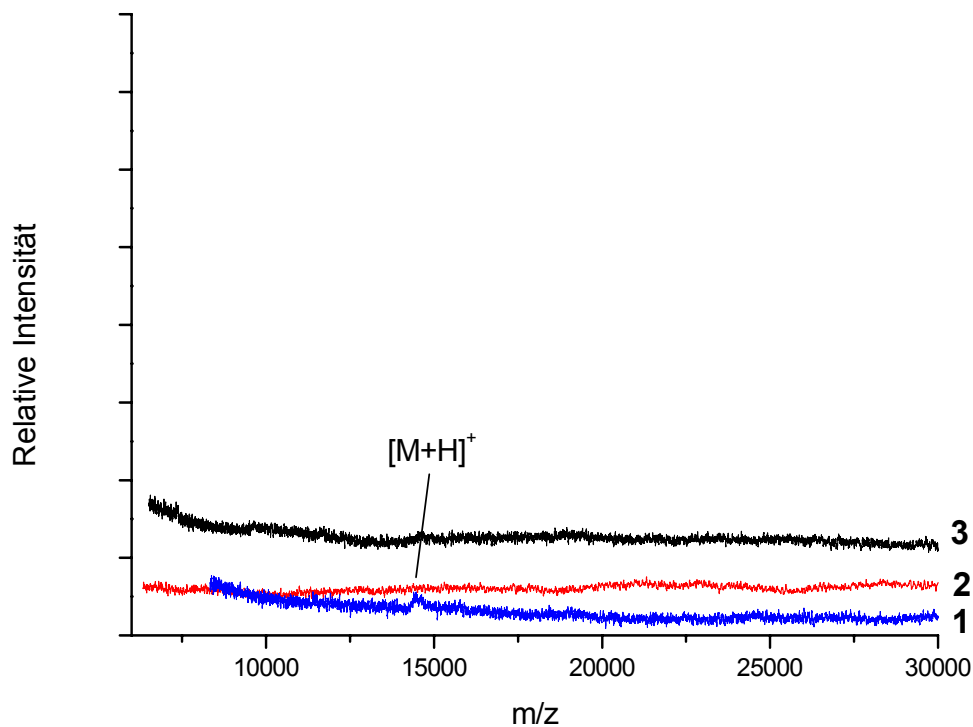


Abb. 22: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Lysozym auf PVDF-Amino-ppx-Oberflächen, die mit mPEG-ald 5000 bei 60°C-0,2M K₂SO₄ (1), 37°C-0,6M K₂SO₄ (2) und 60°C-0,6M K₂SO₄ (3) modifiziert sind

Die *Surface*-MALDI-Spektren aus Abb. 22 zeigen im Vergleich zu den Spektren aus Abb. 21 ein völlig differenziertes Verhalten von Lysozym gegenüber den wesentlich hydrophileren Oberflächen auf Basis von Amino-ppx-mPEG-ald 5000. In Spektrum 1 (Abb. 22) tritt bei m/z 14990 ein schwaches Signal auf, das auf eine Lysozymadsorption hinweist. Da aus den XPS-Untersuchungen (vgl. Tab. 7) jedoch hervorgeht, dass diese Kopplungsbedingungen (60°C und 0,2 M K₂SO₄) zu den geringsten Kopplungsdichten von mPEG-ald 5000 auf Amino-ppx führen, stellt dieses *Surface*-MALDI-Spektrum ein zu erwartendes Ergebnis dar. Bei den beiden anderen Kopplungsbedingungen ist eine Lysozymadsorption innerhalb der Nachweisgrenze des MALDI-TOF-MS nicht zu detektieren. Dies bestätigt sowohl die XPS-Ergebnisse, die für diese Bedingungen eine höhere Kopplungsdichte an proteinabweisenden Molekülen ergeben, als auch die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (vgl. Abb. 11).

In Abb. 23 sind die *Surface*-MALDI-Spektren von adsorbiertem Lysozym auf Amino-ppx-Oberflächen, die mit mPEG-ald 30000 unter verschiedenen Reaktionsbedingungen modifiziert sind, gegenübergestellt.

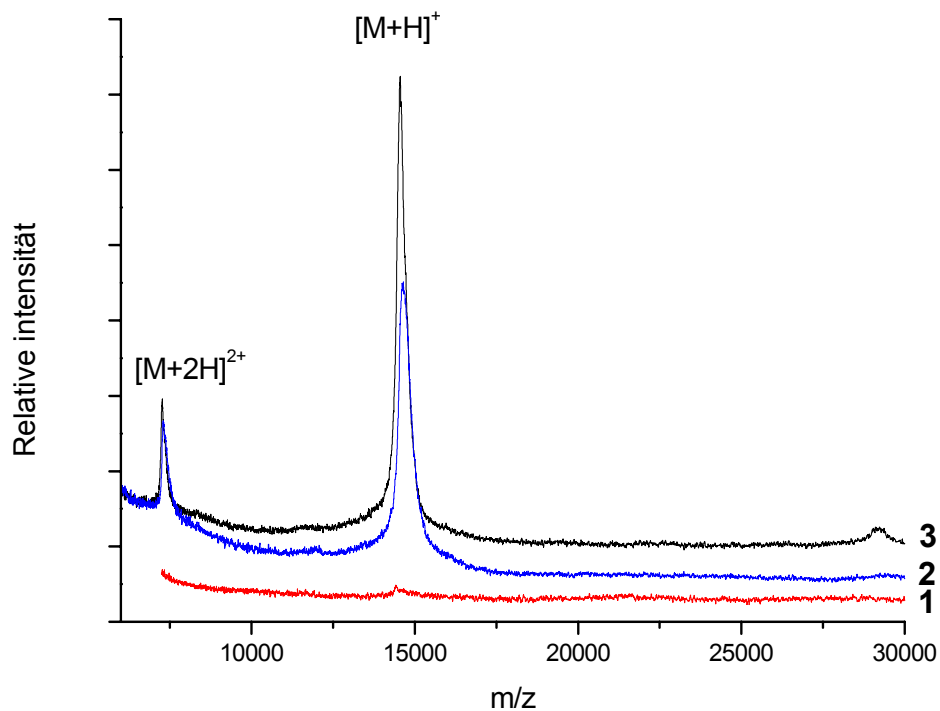


Abb. 23: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Lysozym auf PVDF-Amino-ppx-Oberflächen, die mit mPEG-ald 30000 bei 60°C-0,6M K₂SO₄ (1), 37°C-0,6M K₂SO₄ (2) und 60°C-0,2M K₂SO₄ (3) modifiziert sind

Wie aus Spektrum 2 und 3 hervorgeht, adsorbiert Lysozym auf PVDF-Amino-ppx-Oberflächen, die mit mPEG-ald 30000 bei 37°C-0,6M K₂SO₄ und 60°C-0,2M K₂SO₄ modifiziert werden. Im Gegensatz zu diesen Bedingungen wird auch hier das beste Ergebnis bezüglich einer Verhinderung der Proteinadsorption durch Kopplung von mPEG-ald 30000 unter *cloud point* Bedingungen erreicht (Spektrum 1). Dieses Verhalten bestätigt die XPS-Ergebnisse, aus denen hervorgeht, dass das größte O/C-Verhältnis und damit die höchste Kopplungsdichte für mPEG-ald 30000 unter *cloud point* Bedingungen erreicht wird (vgl. Tab. 7) Dennoch kann wie aus Spektrum 1 bei m/z 14990 hervorgeht, eine vollständige Lysozymadsorption nicht vermieden werden. Durch einen Vergleich der Spektren in Abb. 22 und Abb. 23 wird deutlich, dass mit mPEG-ald 5000 eine effektivere proteinabweisende Ausrüstung erzielt wird als mit mPEG-ald 30000. Ein Ergebnis, das die XPS-Daten bestätigt (vgl. Tab. 7).

In Abb. 24 sind die *Surface*-MALDI-Spektren von adsorbiertem Lysozym auf Amino-ppx-Oberflächen, die mit Dextran und Hydroxyethylstärke modifiziert sind, dargestellt.

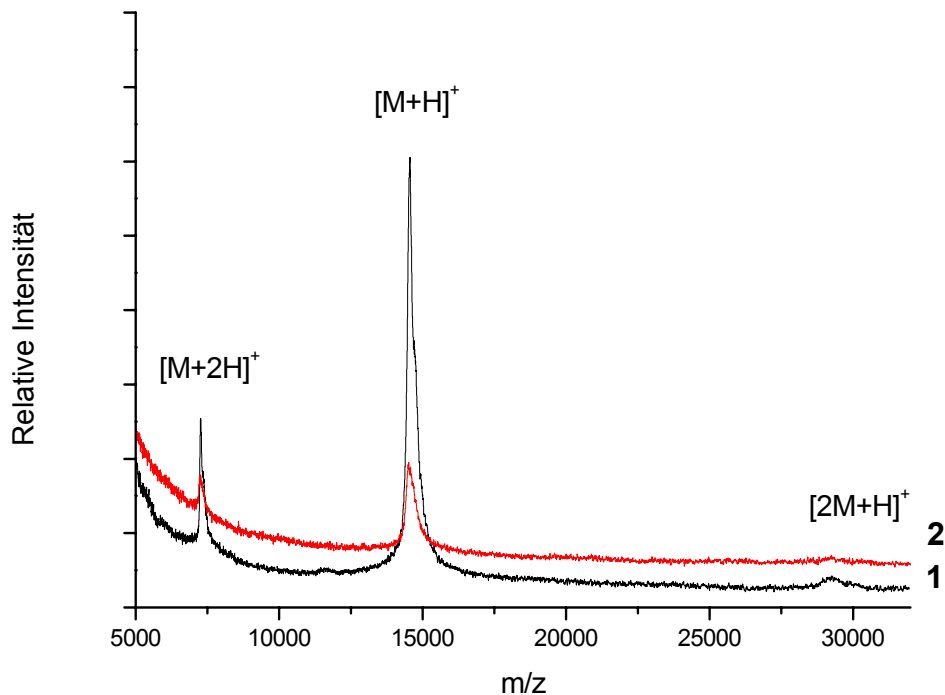


Abb. 24: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Lysozym auf PVDF-Amino-ppx-Oberflächen, die mit Dextran (1) und Hydroxyethylstärke (2) modifiziert sind

Beide Oberflächenmodifikationen können eine Adsorption von Lysozym nicht hindern. Auch hier liefern die *Surface*-MALDI-Untersuchungen Ergebnisse, die mit den zugehörigen XPS-Daten (vgl. Tab. 8) korrelieren. Bei Immobilisierung von Polysacchariden an PVDF-Amino-ppx-Oberflächen werden wesentlich geringere Kopplungsdichten erreicht als bei Umsetzung mit den mPEG-aldehyden. Die Rückzugwinkel für an PVDF-Amino-ppx-Oberflächen gekoppeltes mPEG-ald 30000, Dextran und HES liegen in gleichen Größenordnung und deuten auf eine vergleichbare Hydrophilie hin (vgl. Abb. 11). Die Hydrophilie dieser drei Oberflächen ist sogar größer als die der Amino-ppx-mPEG-ald 5000-Oberflächen. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Hydrophilie einer Oberfläche nicht unbedingt mit ihren proteinabweisenden Eigenschaften korreliert.

Das Adsorptionsverhalten von Lysozym auf PVDF-PAAc-Oberflächen vor und nach Modifizierung mit AEE sowie mit mPEG-aminen 5000 bzw. 20000 wird ebenfalls mittels *Surface*-MALDI-TOF-MS untersucht. Abb. 25 zeigt zunächst einen Vergleich des Adsorptionsverhaltens von Lysozym an PVDF-PAAc und an PVDF-PAAc, das mit AEE modifiziert ist.

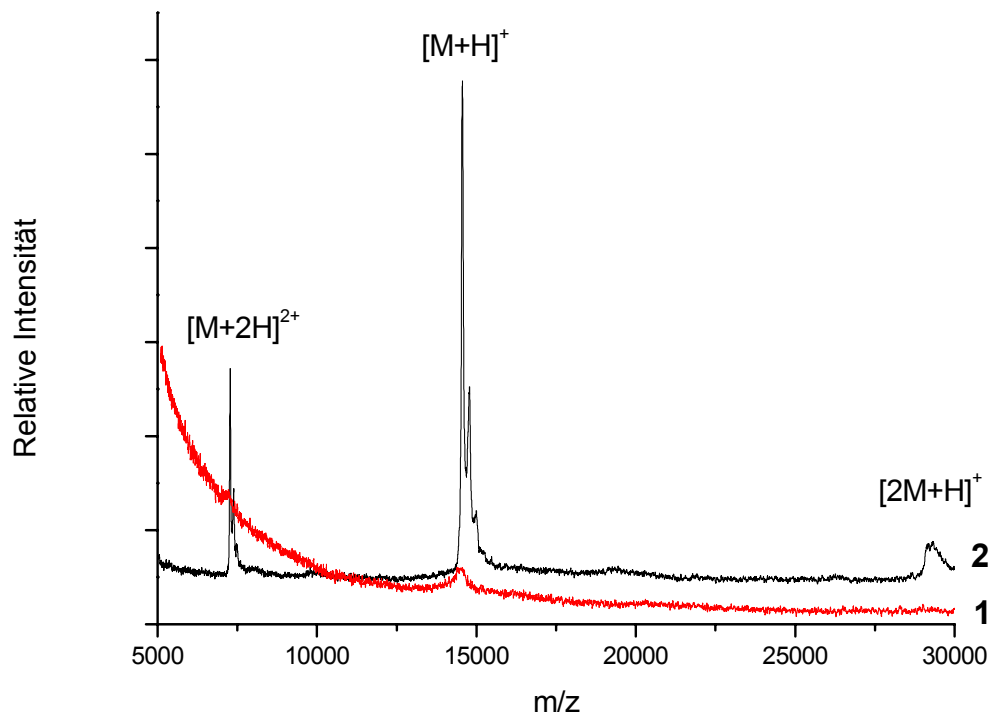


Abb. 25: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Lysozym auf PVDF-PAAc- (2) und PVDF-PAAc-AEE- (1) Oberflächen

In Spektrum 2 sind die für Lysozym charakteristischen Signale zu erkennen. Dies weist daraufhin, dass Lysozym auf den stark hydrophilen PVDF-PAAc-Oberflächen adsorbiert. Auch hier zeigt sich, dass der Parameter Hydrophilie alleine als Kriterium zur Beurteilung der Güte einer proteinabweisenden Schicht nicht ausreicht. Da die Adsorption bei physiologischem pH-Wert (7,4) durchgeführt wird, treten positiv geladene Lysozymmoleküle mit negativ geladenen Carboxylatgruppen der weitestgehend dissoziierten Polyacrylsäure (pK_a -Wert von ca. 4,0)²¹⁰ in Wechselwirkung. Diese elektrostatische Wechselwirkung führt zu einer verstärkten Adsorption von Lysozym an PVDF-PAAc-Oberflächen. Durch eine Kopplung von AEE auf PVDF-PAAc-Oberflächen kann eine Lysozymadsorption zurückgedrängt werden. Dies geht eindeutig aus dem Spektrum 1 (Abb. 25), in dem bei m/z 14545 nur noch ein sehr intensitätsschwaches Signal zu erkennen ist, hervor. Hierdurch wird gezeigt, dass eine Aufhebung der anziehenden elektrostatischen Wechselwirkung zwischen der Biomaterialoberfläche und den entgegengesetzt geladenen Proteinmolekülen zu einer deutlichen Verminderung der Adsorption führt. Eine stärkere Zurückdrängung der Lysozymadsorption unter die Nachweisgrenze der *Surface*-

MALDI-Methode ist aufgrund der sehr kurzen Kettenlänge der AEE-Moleküle nicht zu realisieren.

Abb. 26 zeigt die *Surface*-MALDI-Spektren von adsorbiertem Lysozym auf PVDF-PAAc-Oberflächen, die mit mPEG-amin unter verschiedenen Reaktionsbedingungen modifiziert sind.

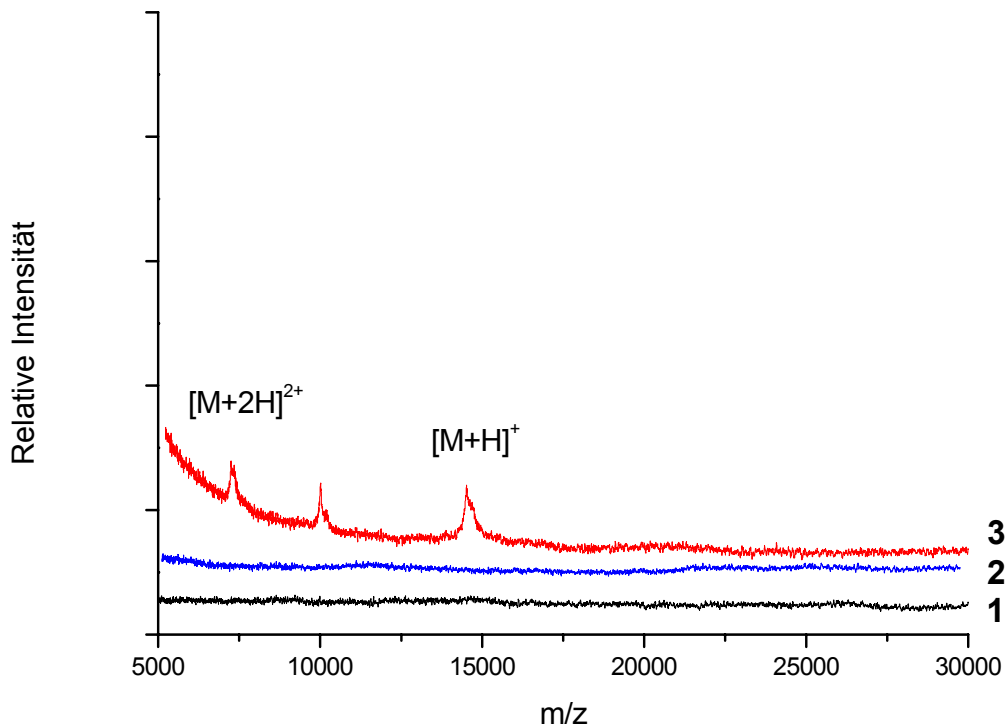


Abb. 26: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Lysozym auf PVDF-PAAc-Oberflächen, die mit mPEG-amin 5000 bei 60°C-0,2M K₂SO₄ (1), 60°C-0,6M K₂SO₄ (2) und 37°C-0,6M K₂SO₄ (3) modifiziert sind

Durch eine Kopplung von mPEG-amin 5000 bei 60°C kann unabhängig von der Salzkonzentration bezüglich der Proteinabweisung ein besseres Ergebnis erzielt werden als mit einer AEE-Modifizierung (Abb. 25). Außerdem wird festgestellt, dass eine Immobilisierung bei niedrigerer Temperatur von mPEG-amin 5000 zu einer Verstärkung der Proteinadsorption führt. In einer weiteren Versuchreihe wird der Einfluss von mPEG-amin 20000, immobilisiert unter verschiedenen Reaktionsbedingungen, untersucht (Abb. 27).

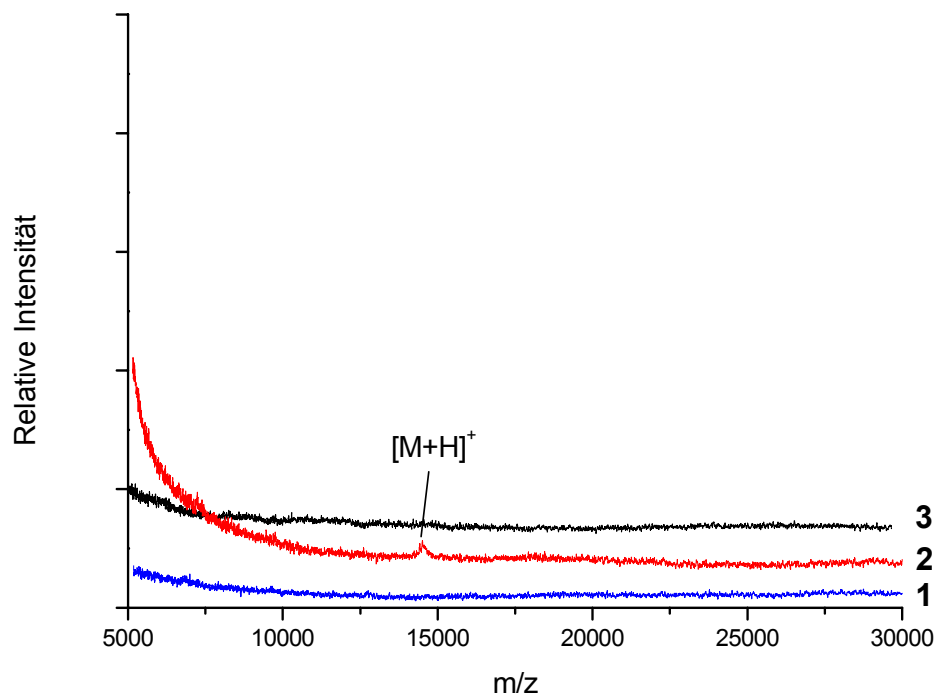


Abb. 27: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Lysozym auf PVDF-PAAc-Oberflächen, die mit mPEG-amin 20000 bei 60°C-0,6M K₂SO₄ (1), 37°C-0,6 M K₂SO₄ (2) und 60°C-0,2M K₂SO₄ (3) modifiziert sind

Das Spektrum 1 für das Produkt einer Kopplung von mPEG-amin 20000 unter *cloud point* Bedingungen zeigt ein zu erwartendes Ergebnis. Aus Spektrum 3 geht hervor, dass eine Verminderung der Salzkonzentration auf 1/3 der *cloud point* Salzkonzentration im Falle des mPEG-amin 20000 ebenfalls zu einem gleich gutem Ergebnis führt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den O/C-Verhältnissen, die mittels XPS ermittelt werden (vgl. Tab. 15). Verringert man die Kopplungstemperatur, so verschlechtern sich die proteinabweisenden Eigenschaften der betrachteten Oberflächen (vgl. Spektrum 2).

In Ergänzung zu den *Surface*-MALDI-Spektren zur Lysozymadsorption auf PVDF-PAAc- und PVDF-PAAc-AEE-Oberflächen werden außerdem PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen untersucht (vgl. Abb. 28).

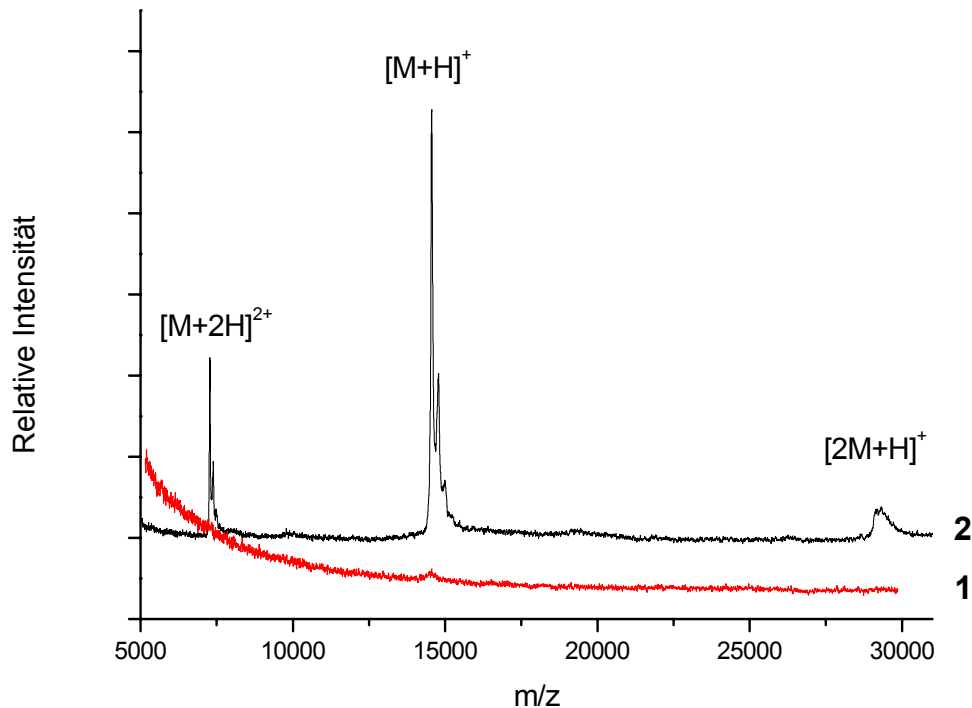


Abb. 28: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektrum von adsorbiertem Lysozym auf PVDF-PAAc- (2) und PVDF-PAAc-PEI- (1) Oberflächen

Im Gegensatz zu PVDF-PAAc kann durch die Immobilisierung von PEI eine Lysozymadsorption stark zurückgedrängt werden. Dies ist ein Resultat der starken elektrostatischen Abstoßung zwischen den positiv geladenen Aminogruppen der PEI-Schicht (pK_a -Wert von 8-10)²¹¹ und positiv geladenen Aminosäureseitenketten der Lysozymmoleküle bei pH 7,4. Dabei wird festgestellt, dass eine Immobilisierung von PEI alleine zu keiner effektiveren Proteinabweisung führt als eine Immobilisierung von AEE an PAAc-Schicht. Daher wird in einem nächsten Modifizierungsschritt an die freien Aminogruppen des PEI mPEG-ald 5000 bzw. 30000 immobilisiert. Die zugehörigen *Surface*-MALDI-Spektren zur Lysozymadsorption auf diesen Oberflächen werden in Abb. 29 und Abb. 30 gezeigt. Dabei werden auch hier wieder die Immobilisierungen bei verschiedenen Kopplungsbedingungen durchgeführt.

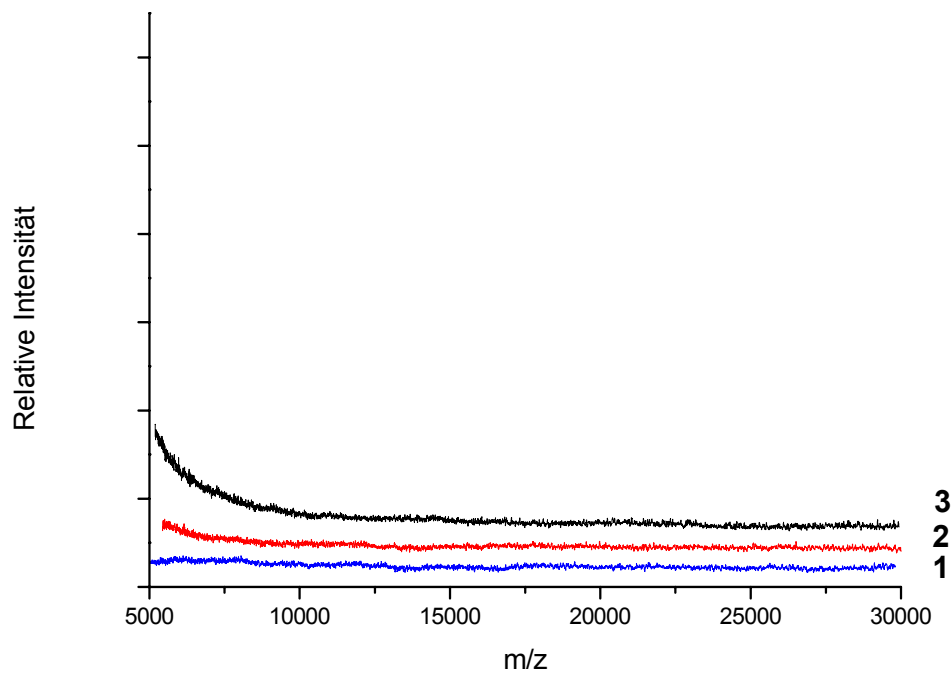


Abb. 29: *Surface-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Lysozym auf PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, die mit mPEG-ald 5000 bei 60°C-0,6M K₂SO₄ (1), 37°C-0,6M K₂SO₄ (2) und 60°C-0,2M K₂SO₄ (3) modifiziert sind*

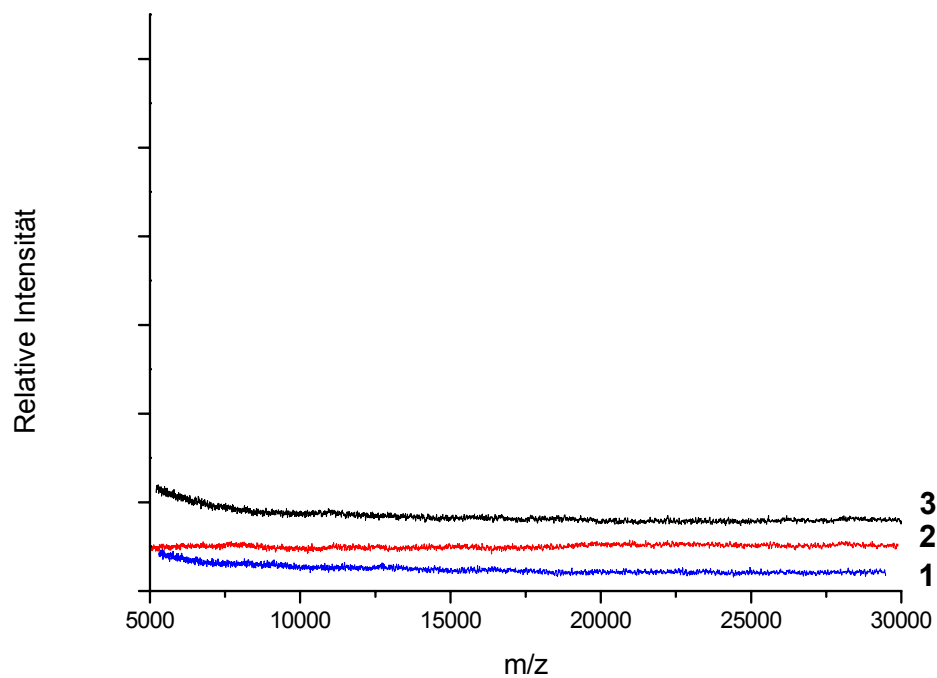


Abb. 30: *Surface-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Lysozym auf PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, die mit mPEG-ald 30000 bei 60°C-0,6M K₂SO₄ (1), 37°C-0,6M K₂SO₄ (2) und 60°C-0,2M K₂SO₄ (3) modifiziert sind*

Wie aus den Spektren 1 bis 3 (Abb. 29 und Abb. 30) hervorgeht, wird unabhängig vom mittleren Molekulargewicht der mPEG-Ketten innerhalb der Nachweisgrenze der *Surface*-MALDI-Methode für alle Kopplungsbedingungen ein gleich gutes Ergebnis bezüglich der Verringerung der Proteinadsorption erhalten.

Als Alternative zu den hochflexiblen mPEG-aldehyden wird ebenfalls der Einfluss wenig flexibler carboxymethylierter Polysaccharide auf die Lysozymadsorption untersucht. Hierzu wird carboxymethyliertes Dextran mit unterschiedlichen Carboxylierungsgraden auf PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen immobilisiert. In Abb. 31 sind die zugehörigen *Surface*-MALDI-Spektren aufgeführt.

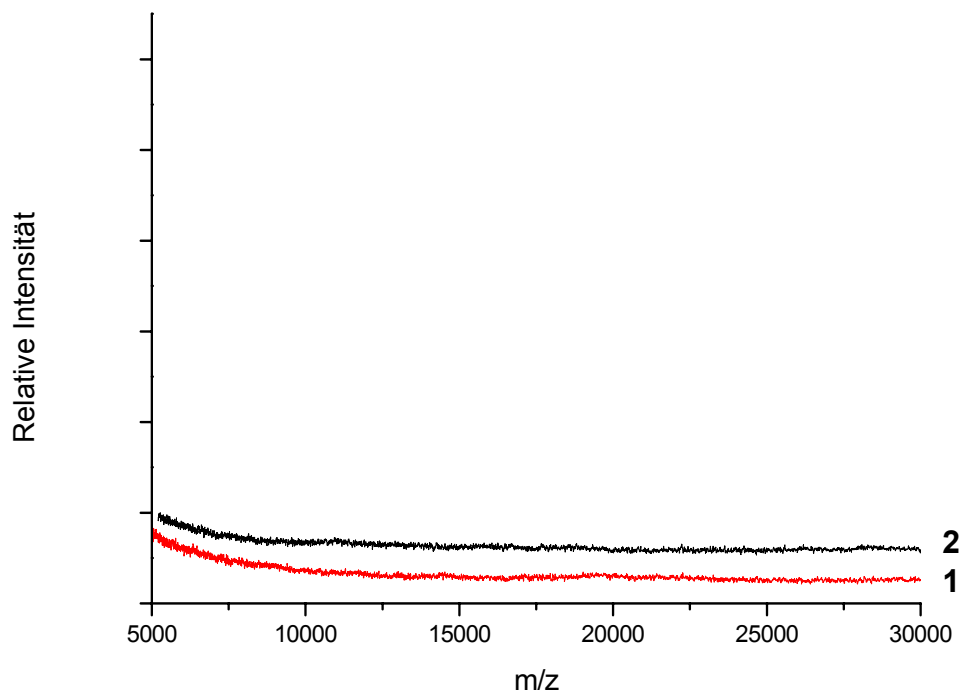


Abb. 31: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Lysozym auf PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, die mit carboxymethyliertem Dextran: COOH-Dex 1:24 (1) und COOH-Dex 3:4 (2) modifiziert sind

Für beide carboxymethylierten Dextrane wird unabhängig vom Carboxylierungsgrad die Verhinderung der Lysozymadsorption nachgewiesen. Im Vergleich zu den Ergebnissen, die für PVDF-PAAc-Oberflächen erhalten werden (vgl. Abb. 25), ist dieses Ergebnis insbesondere für das COOH-Dex 3:4, das über eine große Anzahl freier Carboxylgruppen verfügt, nicht zu

erwarten. Da im Gegensatz zu den PVDF-PAAc-Oberflächen hier keine Adsorption von positiv geladenem Lysozym detektiert werden kann, resultiert die Schlussfolgerung, dass die dissoziierten Carboxylgruppen für die Lysozymmoleküle nicht zugänglich sind. Dies kann aus zweierlei Gründen der Fall sein. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass die Carboxylgruppen der carboxymethylierten Dextrane, die nach erfolgter Kopplung über die Aktivester-Methode (vgl. Schema 5) noch frei sind, mit den positiv geladenen Aminogruppen der PEI-Zwischenschicht Salzbrücken ausbilden. Zum anderen ist es denkbar, dass trotz des hohen Carboxylierungsgrades ein Großteil der Carboxylgruppen durch die Immobilisierung an PEI verbraucht sind und folglich für eine elektrostatische Wechselwirkung mit Lysozymmolekülen nicht zur Verfügung steht.

Die nachfolgenden *Surface*-MALDI-Spektren der Abb. 32 dokumentieren die Untersuchung der Lysozymadsorption auf PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, die mit Hydroxyethylstärken mit unterschiedlichen Carboxylierungsgrad modifiziert sind.

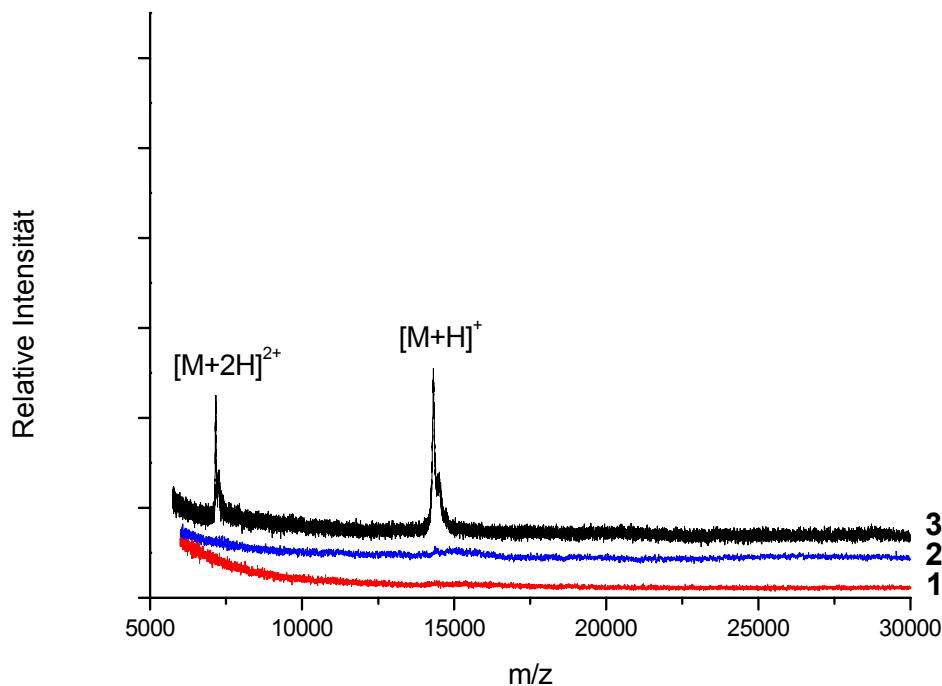


Abb. 32: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Lysozym auf PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, die mit carboxymethylierter Hydroxyethylstärke: COOH-HES 1:40 (1), COOH-HES 1:17 (2) und COOH-HES 1:2 (3) modifiziert sind

Anhand der Spektren 1 und 2 in Abb. 32 ist zu erkennen, dass eine Lysozymadsorption durch Kopplung von carboxymethylierter Hydroxyethylstärke mit niedrigem (1:40) bis mittlerem (1:17) Carboxylierungsgrad vermieden wird. Bei Verwendung von Hydroxyethylstärke mit einem sehr hohen Carboxylierungsgrad (1:2) resultiert nach erfolgter Kopplung an der PEI-Zwischenschicht eine große Anzahl freier Carboxylgruppen. Im Gegensatz zu den freien Carboxylgruppen der carboxymethylierten Dextrane haben diese durch die Hydroxyethylgruppen einen größeren Abstand zum Zuckergrundgerüst und verfügen somit über eine höhere Flexibilität und bessere Erreichbarkeit für die Lysozymmoleküle zur Ausbildung einer anziehenden elektrostatischen Wechselwirkung unter physiologischen Bedingungen. Die hieraus resultierende Lysozymadsorption ist in Spektrum 3 dargestellt (vgl. Abb. 32).

3.9.2.2 Untersuchung der Adsorption von Schweineinsulin auf PVDF- und modifizierten PVDF-Oberflächen mittels *Surface*-MALDI-TOF-MS

Zur Untersuchung des Einflusses der Proteingröße und zur Überprüfung der Bedeutung elektrostatischer Wechselwirkungen auf die Proteinadsorption an PVDF- und modifizierten PVDF-Oberflächen werden die Adsorptionsversuche, die im vorangegangenen Kapitel für Lysozym beschrieben sind, nun für Schweineinsulin dargestellt.

In Abb. 33 sind die *Surface*-MALDI-Spektren der Insulinadsorption an unbehandelten PVDF- und PVDF-Amino-ppx-Oberflächen dargestellt.

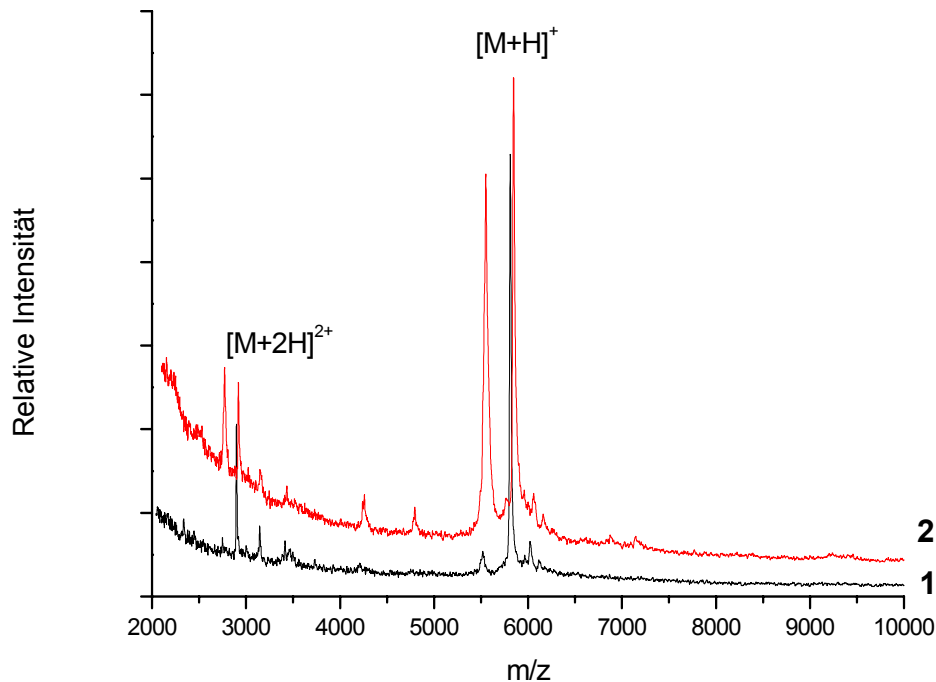


Abb. 33: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Insulin auf PVDF- (1) und PVDF-Amino-ppx- (2) Oberflächen

In den Spektren 1 und 2 der Abb. 33 sind die für Insulin charakteristischen m/z -Signale bei 5845 für einfach geladenes, monomeres Insulin $[M+H]^+$ und bei 2918 für zweifach geladenes, monomeres Insulin $[M+2H]^{2+}$ dargestellt. Die gemessenen m/z -Werte stimmen auch hier nicht mit den berechneten Werten überein, da auch hier keine Kalibrierung durchgeführt wird. Außer den zu erwartenden Signalen treten sowohl in Spektrum 1 als auch in Spektrum 2 weitere m/z -Signale auf. Bei diesen Signalen handelt es sich um Degradationsprodukte des Insulins, die während der Desorption gebildet werden. Es fällt auf, dass die Signale der Fragmentierungsprodukte in Spektrum 2 intensitätstärker sind, obwohl die verwendete Desorptionsenergie bei beiden Untersuchungen gleich groß ist. Dieses Ergebnis lässt sich nur dann plausibel erklären, wenn für die Adsorption von Insulin auf PVDF-Amino-ppx eine stärkere hydrophobe Wechselwirkung angenommen wird als auf PVDF. Diese verstärkte Bindung zum PVDF-Amino-ppx führt zu einer verminderten bzw. verhinderten Resolubilisierung der Insulinmoleküle während der Coverpräparation der Matrix. Dadurch ist eine ideale Matrix-Analyt-Kristallitbildung nicht gewährleistet, so dass eine Fragmentierung der Analytmoleküle während der Desorption nicht zu vermeiden ist. Im Gegensatz dazu können die Analytmoleküle bei einer weniger starken Bindung an PVDF während der Matrixpräparation

kurzzeitig in Lösung gehen und somit von Matrixmolekülen aggregiert werden. Hieraus resultiert wiederum eine verbesserte Kokristallisation. Dadurch ist gewährleistet, dass die Matrix durch ihre Adsorptionscharakteristik für die eingestrahlte Laserwellenlänge und durch ihre Präsenz in hohem Überschuss gegenüber dem Analyten, dessen photolytische Zersetzung weiterstehend verhindert.

In Abb. 34 und Abb. 35 sind die *Surface*-MALDI-Spektren der Insulinadsorption an PVDF-Amino-ppx-Oberflächen, die mit mPEG-ald 5000 bzw. mPEG-ald 30000 unter verschiedenen Reaktionsbedingungen modifiziert sind, dargestellt.

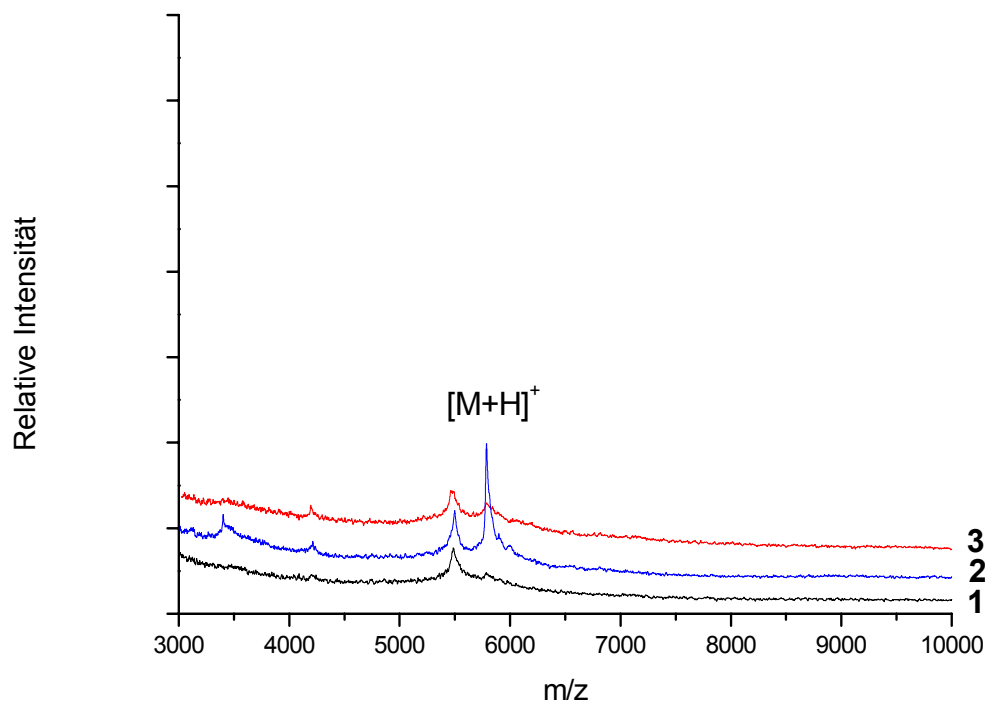


Abb. 34: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Insulin auf PVDF-Amino-ppx-Oberflächen, die mit mPEG-ald 5000 bei 60°C-0,2M K₂SO₄ (1), 60°C-0,6M K₂SO₄ (2) und 37°C-0,6M K₂SO₄ (3) modifiziert sind

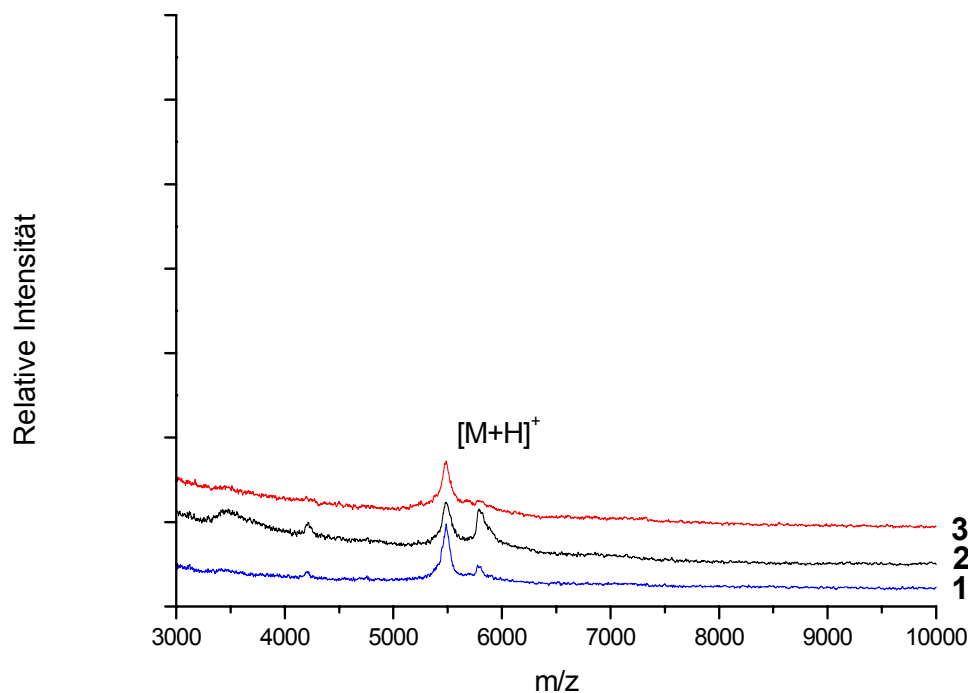


Abb. 35: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Insulin auf PVDF-Amino-ppx-Oberflächen, die mit mPEG-ald 30000 bei 60°C-0,6M K₂SO₄ (1), 60°C-0,2M K₂SO₄ (2), und 37°C-0,6M K₂SO₄ (3) modifiziert sind

Anhand aller Spektren der Abb. 34 und Abb. 35 ist deutlich zu erkennen, dass eine Adsorption von Insulin an PVDF-Amino-ppx durch die Kopplung von mPEG-Ketten unabhängig von deren Kettenlänge und den verwendeten Kopplungsbedingungen nicht verhindert werden kann. Dies wird nicht nur sichtbar durch das Auftreten der charakteristischen Insulinsignale, sondern vor allem durch die detektierten Signale von Insulinfragmenten. Durch dieses Ergebnis wird deutlich, dass die mPEG-Ketten nicht dicht gekoppelt sind und damit den relativ kleinen Insulinmolekülen einen Zugang zur Amino-ppx-Oberfläche ermöglichen. Außerdem tritt bei der Kopplung von mPEG-Ketten an Amino-ppx die geringe Kopplungsdichte als weiteres Problem hinzu (vgl. XPS-Daten in Tab. 7).

In Abb. 36 werden die *Surface*-MALDI-Spektren der Insulinadsorption an PVDF-Amino-ppx-Oberflächen, die mit den Polysacchariden Dextran und Hydroxyethylstärke modifiziert sind, miteinander verglichen.

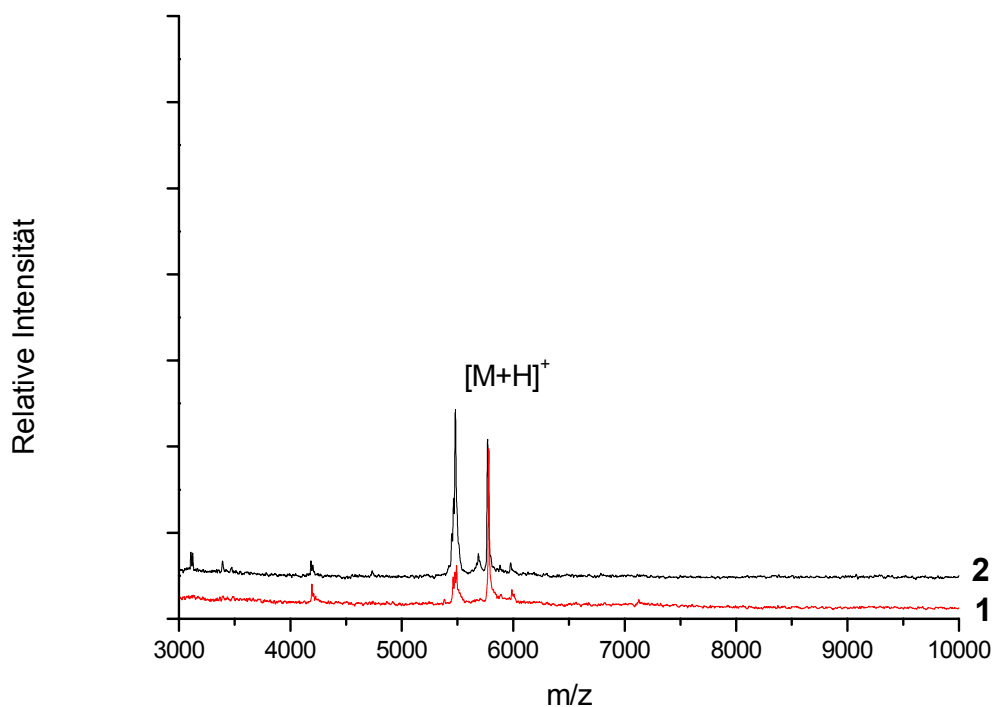


Abb. 36: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Insulin auf PVDF-Amino-ppx-Oberflächen modifiziert mit Dextran (1) und HES (2)

Die *Surface*-MALDI-Spektren in Abb. 36 sind nahezu identisch. Dieses Ergebnis impliziert ein identisches Verhalten der Insulinmoleküle mit den hier betrachteten modifizierten PVDF-Amino-ppx-Oberflächen unabhängig von der unterschiedlichen Struktur der eingesetzten Polysaccharide Dextran bzw. HES.

In Abb. 37 sind die *Surface*-MALDI-Spektren der Insulinadsorption an PVDF-PAAc- und PVDF-PAAc-AEE- Oberflächen dargestellt.

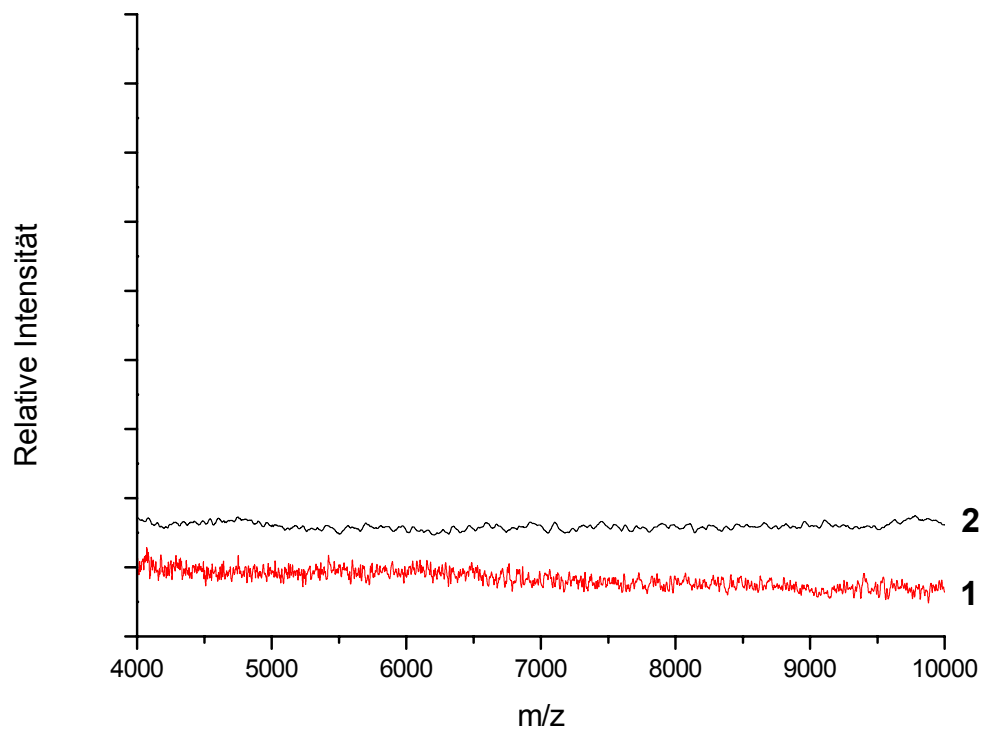


Abb. 37: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Insulin auf PVDF-PAAc- (1) und PVDF-PAAc-AEE- (2) Oberflächen

Die PVDF-PAAc- und PVDF-PAAc-AEE-Oberflächen zeigen hinsichtlich der Insulinadsorption völlig identisches Verhalten. Im Gegensatz zum Lysozym, das unter physiologischen Bedingungen positiv geladen ist, weist Insulin eine negative Nettoladung auf. Hierdurch findet zwischen der ebenfalls negativ geladenen PAAc-Schicht und den Insulinmolekülen eine starke elektrostatische Abstoßung statt. Folglich wird eine Insulinadsorption vollständig vermieden. Aufgrund dieser starken elektrostatischen Abstoßung ist eine zusätzliche Immobilisierung der kurzen AEE-Ketten überflüssig.

Im Falle von Proteinen, die wie Insulin unter physiologischen Bedingungen eine negative Nettoladung aufweisen, macht somit eine weitere Modifizierung mit längeren mPEGs keinen Sinn. Da physiologische Medien generell aus einer Vielzahl von Proteinen mit unterschiedlichsten Eigenschaften (z.B. Nettoladung) bestehen, ist eine derartige Modifizierung mit PEGs jedoch erforderlich (vgl. Lysozymadsorption).

In Abb. 38 und Abb. 39 sind die *Surface*-MALDI-Ergebnisse der Insulinadsorption auf PVDF-PAAc-Oberflächen, die mit mPEG-amin 5000 bzw. 20000 unter verschiedenen Reaktionsbedingungen modifiziert sind, aufgeführt.

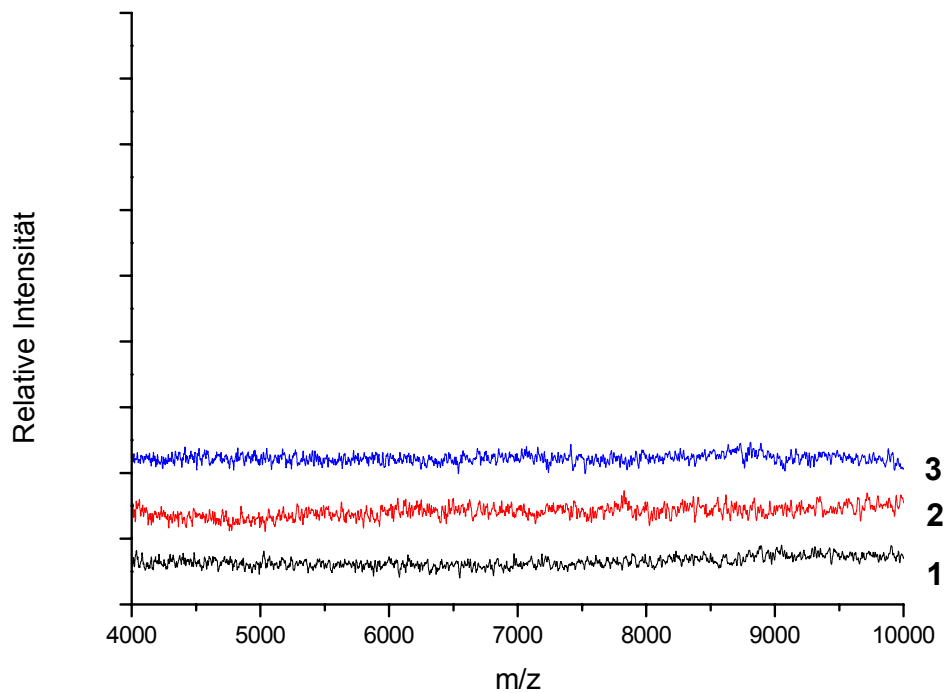


Abb. 38: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Insulin auf PVDF-PAAc-Oberflächen, die mit mPEG-amin 5000 bei 60°C-0,2M K₂SO₄ (1), 37°C-0,6M K₂SO₄ (2) und 60°C-0,6M K₂SO₄ (3) modifiziert sind

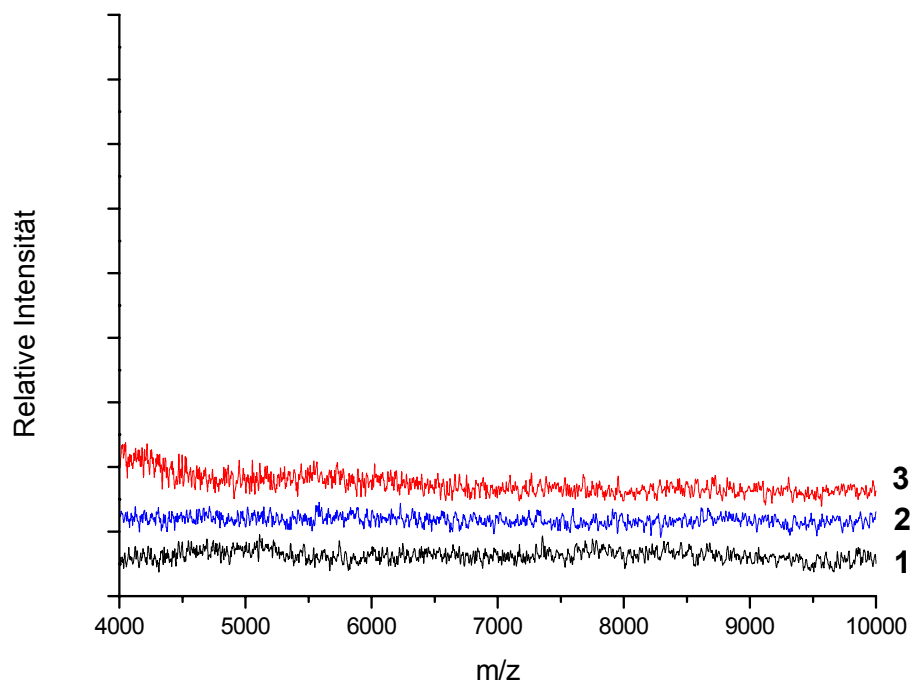


Abb. 39: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Insulin auf PVDF-PAAc-Oberflächen, die mit mPEG-amin 20000 bei 60°C-0,2M K₂SO₄ (1), 60°C-0,6M K₂SO₄ (2) und 37°C-0,6M K₂SO₄ (3) modifiziert sind

In Abb. 40 ist der Vergleich der *Surface*-MALDI-Spektren der Insulinadsorption an PVDF-PAAc- und PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen dargestellt. Dieser Vergleich bestätigt die Hypothese der elektrostatischen Wechselwirkungen.

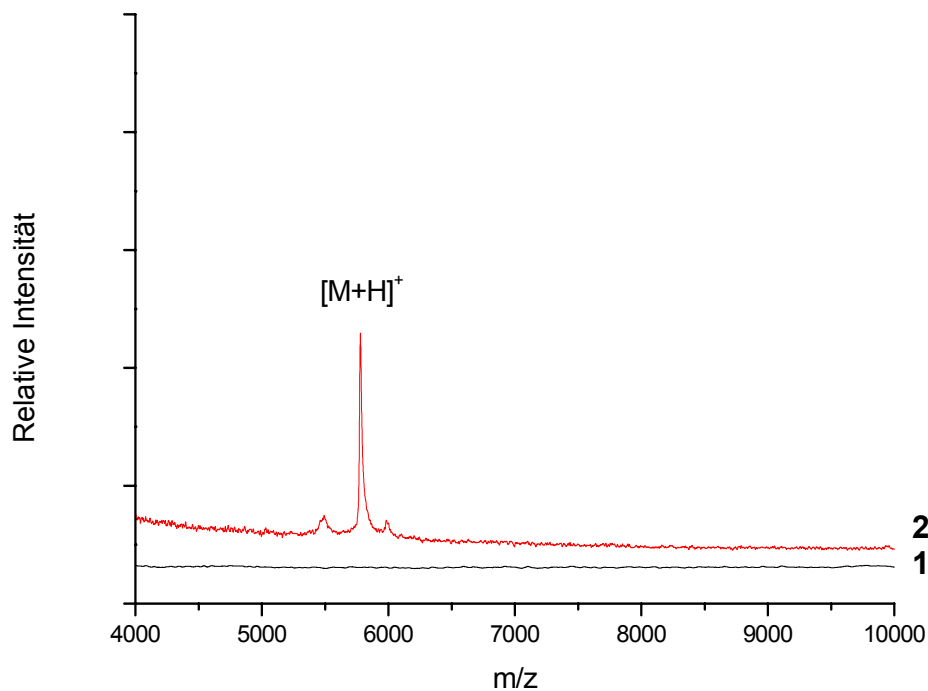


Abb. 40: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Insulin auf PVDF-PAAc- (1) und PVDF-PAAc-PEI- (2) Oberflächen

Die Kopplung von PEI an PAAc führt zu Oberflächenschichten mit freien Aminogruppen, die unter physiologischen Bedingungen zu einer positiven Nettoladung führen. Das Auftreten eines Insulin-Fragmentationensignals bei m/z 5788 verdeutlicht eine sehr starke anziehende elektrostatische Wechselwirkung zwischen der Oberfläche und den Insulinmolekülen, die ebenfalls zu einer verminderten Resolubilisierung (*Redissolution*-Probenpräparation) während der Coverpräparation führt¹⁸⁶.

In der nächsten Versuchsserie werden mPEG-aldehyde unter verschiedenen Kopplungsbedingungen an PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen immobilisiert. Infolge einer höheren Aminogruppendichte (vgl. XPS-Daten in Tab. 12) bei PEI als bei Amino-ppx wird eine höhere Belegung der Oberflächen mit mPEGs erreicht. Inwieweit durch diesen höheren mPEG-Gehalt

der Oberflächen eine Adsorption von kleineren Proteinmolekülen wie Insulin vermieden werden kann, zeigen die *Surface*-MALDI-Spektren, die in Abb. 41 und Abb. 42 dargestellt sind.

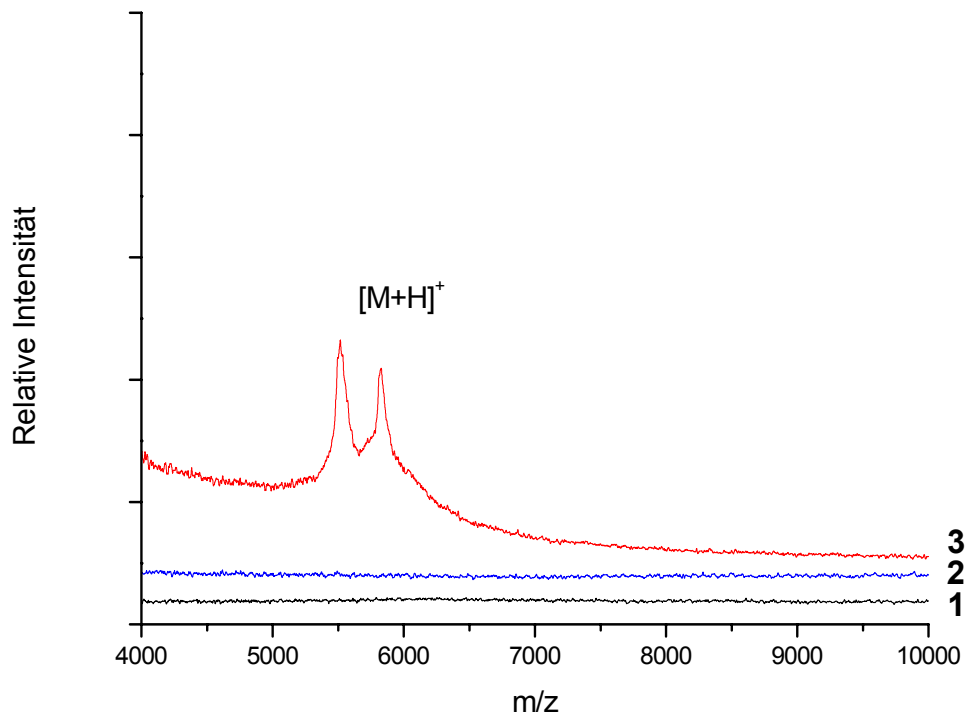


Abb. 41: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Insulin auf PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, die mit mPEG-ald 5000 bei 60°C-0,2M K₂SO₄ (1), 60°C-0,6M K₂SO₄ (2) und 37°C-0,6M K₂SO₄ (3) modifiziert sind

Spektrum 2 (Abb. 41) belegt, dass eine Insulinadsorption innerhalb der Nachweisgrenze der *Surface*-MALDI-Methode an PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, die mit mPEG-ald 5000 unter *cloud point*-Bedingungen modifiziert werden, unterbunden wird. Gemäß Spektrum 1 wird ein gleich gutes Ergebnis für PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, die mit mPEG-ald 5000 bei 60°C und einer Salzkonzentration von 0,2 M modifiziert werden, erreicht. Durch eine Kopplung von mPEG-ald 5000 bei 37°C und einer Salzkonzentration von 0,6 M kann eine Insulinadsorption nicht vermieden werden, wie aus Spektrum 3 hervorgeht. Beim Vergleich der Ergebnisse aus den Spektren 1 bis 3 (Abb. 41) mit den entsprechenden XPS-Ergebnissen (Tab. 12.) wird deutlich, dass eine Insulinadsorption an den Oberflächen mit geringstem mPEG-Gehalt (Spektrum 1) und mit höchstem mPEG-Gehalt (Spektrum 2) vermieden wird.

Im Vergleich dazu geht aus den Spektren 1 bis 3 (Abb. 42) hervor, dass im Falle einer Immobilisierung der längerkettigen mPEG-aldehyde 30000 eine Vermeidung der Insulinadsorption nur für die Kopplung unter *cloud point*-Bedingungen erreicht werden kann.

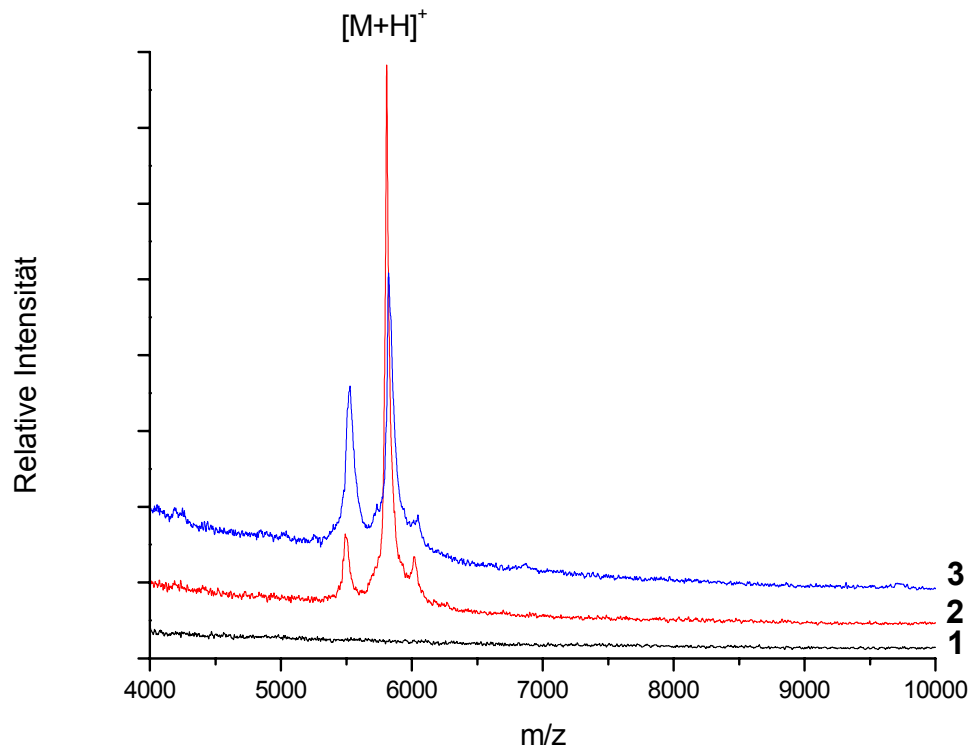


Abb. 42: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Insulin auf PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, die mit mPEG-ald 30000 bei 60°C-0,6M K₂SO₄ (1), 37°C-0,6M K₂SO₄ (2) und 60°C-0,2M K₂SO₄ (3) modifiziert sind

Weitere Untersuchungen bezüglich einer Insulinadsorption werden mit PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, die mit carboxymethylierten Dextranen und Hydroxyethylstärken mit unterschiedlichen Carboxylierungsgraden modifiziert sind, vorgenommen. Die zugehörigen *Surface*-MALDI-Spektren sind den Abb. 43 und Abb. 44 zu entnehmen.

In Abb. 43 sind die Spektren zur Insulinadsorption an PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, die mit COOH-Dex 3:4 (Spektrum 1) und COOH-Dex 1:24 (Spektrum 2) modifiziert sind, aufgeführt.

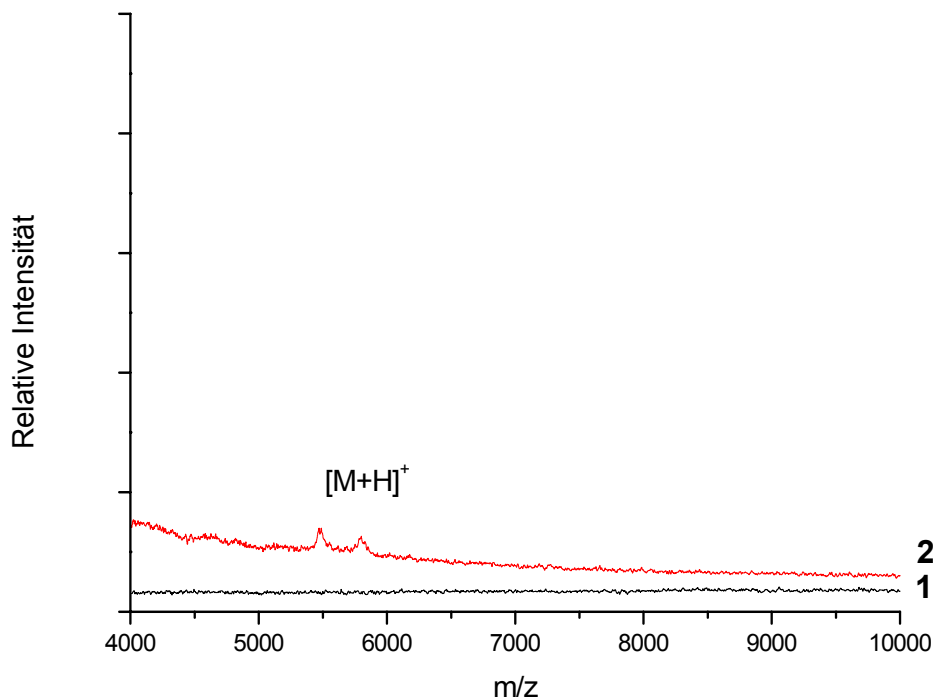


Abb. 43: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Insulin auf PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, die mit carboxyliertem Dextran: COOH-Dex 3:4 (1) und COOH-Dex 1:24 (2) modifiziert sind

Nur bei einem ausreichenden Carboxylierungsgrad ist eine Insulinadsorption vollständig zu verhindern. Der hohe Carboxylierungsgrad führt zu einer entsprechend hohen Konzentration an dissoziierten, negativ geladenen Carboxylgruppen, die unter physiologischen Bedingungen eine hohe elektrostatische Abstoßung gegenüber den ebenfalls negativ geladenen Insulinmolekülen gewährleisten. Bei einer vergleichbaren Oberflächenbelegung mit COOH-Dex 1:24 (vgl. XPS-Daten in Tab. 14) kann eine Insulinadsorption nicht ganz vermieden werden (Spektrum 2). Dies belegt die Bedeutung des Carboxylierungsgrades für die Insulinadsorption.

In Abb. 44 sind die Spektren zur Insulinadsorption an PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, die mit COOH-HES 1:2 (Spektrum 1), COOH-HES 1:17 (Spektrum 2) und COOH-HES 1:40 (Spektrum 3) modifiziert sind, aufgeführt.

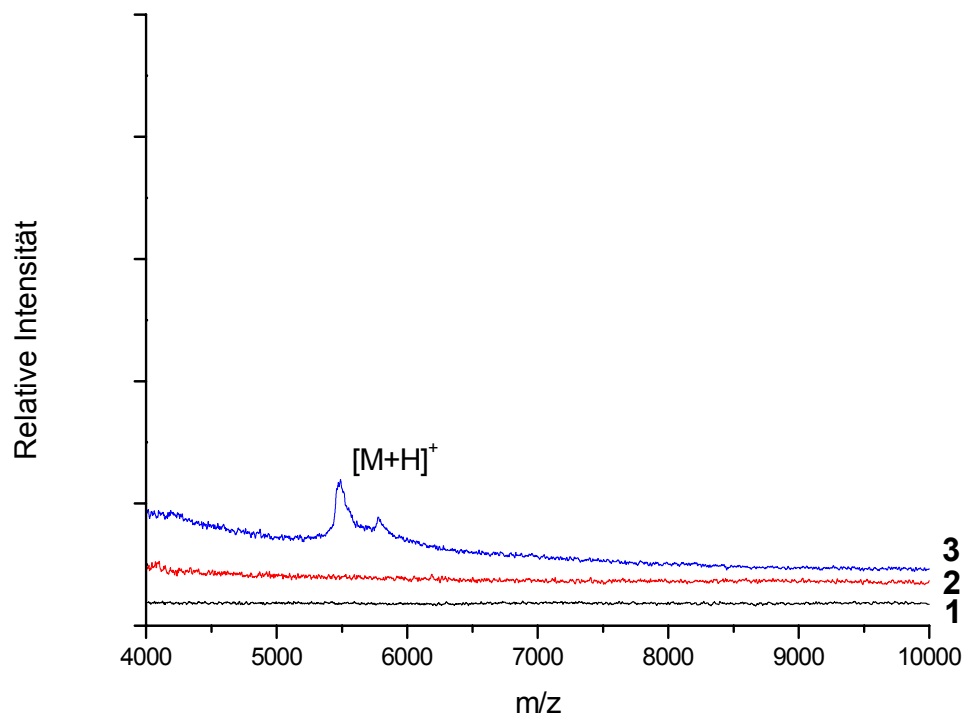


Abb. 44: *Surface*-MALDI-TOF-MS-Spektren von adsorbiertem Insulin auf PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, die mit carboxylierter Hydroxyethylstärke: COOH-HES 1:2 (1), COOH-HES 1:17 (2) und COOH-HES 1:40 (3) modifiziert sind

In Analogie zu den Ergebnissen aus Abb. 43 zeigt sich auch hier eine vollständige Verhinderung der Insulinadsorption bei denjenigen Oberflächen, die über eine hohe Konzentration an Carboxylgruppen verfügen (Spektrum 1 und 2 in Abb. 44). Im Falle von COOH-HES 1:40 (Spektrum 3) ist der Carboxylierungsgrad zu gering, so dass eine geringe Insulinadsorption detektiert werden kann.

Aus den *Surface*-MALDI-TOF-MS-Untersuchungen zur Proteinadsorption auf PVDF-Oberflächen vor und nach Modifizierung mit PEGs bzw. Polysacchariden (vgl. Abb. 1) geht hervor, dass eine weitgehende Verhinderung der Adsorption von Proteinen (innerhalb der Nachweisgrenze der Methode) und damit der Adhäsion der Zellen nur dann erreicht wird, wenn die entsprechenden Oberflächen stark hydrophiliert und anziehende elektrostatische Wechselwirkungen vermieden werden. Dies kann durch eine Immobilisierung von mPEG-amin (5000 bzw. 20000) an PVDF-PAAc oder von mPEG-ald (5000 bzw. 30000) an PVDF-PAAc-PEI unter *cloud point* Bedingungen realisiert werden.

3.9.3 Untersuchung der Adsorption von Insulin und Fibronectin auf Biomaterialoberflächen mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

In Ergänzung zu den Proteinadsorptionsexperimenten mittels *Surface*-MALDI-TOF-MS werden weitere Untersuchungen zur Wechselwirkung von Proteinen mit Biomaterialoberflächen auf Basis von PVDF vor und nach Modifizierung (vgl. Konzept) mittels *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) durchgeführt. ELISA als Festphasentechnik ist eine spezielle Form des Immunoassays, bei der zunächst das Antigen an die Festphase gebunden und dann mit einem primären Antikörper umgesetzt wird. Die gebundene primäre Antikörper wird durch einen sekundären mit Meerrettichperoxidase konjugierten Antikörper nachgewiesen. Der gebildete Enzym-Antikörperkonjugat wird einer Enzym-Substrat-Reaktion unterworfen. Dabei bildet sich ein Zwischenprodukt, das photometrisch bestimmt wird²¹². Bei den hier eingesetzten Antigenen handelt es sich um Insulin und Fibronectin. Die Festphase wird durch Gewebekulturpolystyrol (*tissue culture polystyrene*, TCPS), PVDF bzw. modifiziertes PVDF gebildet. Insulin dient auch hier als Modell für Proteine kleiner Größe und wird ebenfalls zur qualitativen Überprüfung der *Surface*-MALDI-Ergebnisse eingesetzt. Da das Molekulargewicht des Glycoproteins Fibronectin für die MALDI-TOF-MS zu groß ist, wird dessen Adsorptionsverhalten ebenfalls mittels ELISA untersucht.

Die photometrisch ermittelten optischen Dichten (O.D.), die für die PVDF-Oberflächen vor und nach Modifizierung erhalten werden, werden mit denen von TCPS verglichen. TCPS wird wegen seiner hohen Proteinbindungskapazität als Referenz eingesetzt. Als Negativ-Referenz dienen TCPS-Oberflächen, die mit hochadhäsivem Rinderserumalbumin (BSA) vollständig bedeckt sind. Die Materialoberflächenbeschichtung mit Albumin ist eine Methode, um weitere Proteinadsorption auf Oberflächen zu reduzieren^{213,214}. Obwohl bei dieser Methode die Gefahr der Verdrängung der BSA-Moleküle durch andere Proteine besteht, wird TCPS, das mit BSA geblockt ist, als Vergleichswert einbezogen. In allen nachfolgenden ELISA-Abbildungen werden die relativ zum TCPS ermittelten optischen Dichten gezeigt (relative O.D.).

Abb. 45 zeigt die relativen O.D.-Werte für Fibronectin und Insulin auf PVDF und PVDF-Amino-ppx vor und nach Modifizierung mit den Polysacchariden Dextran bzw. Hydroxyethylstärke.

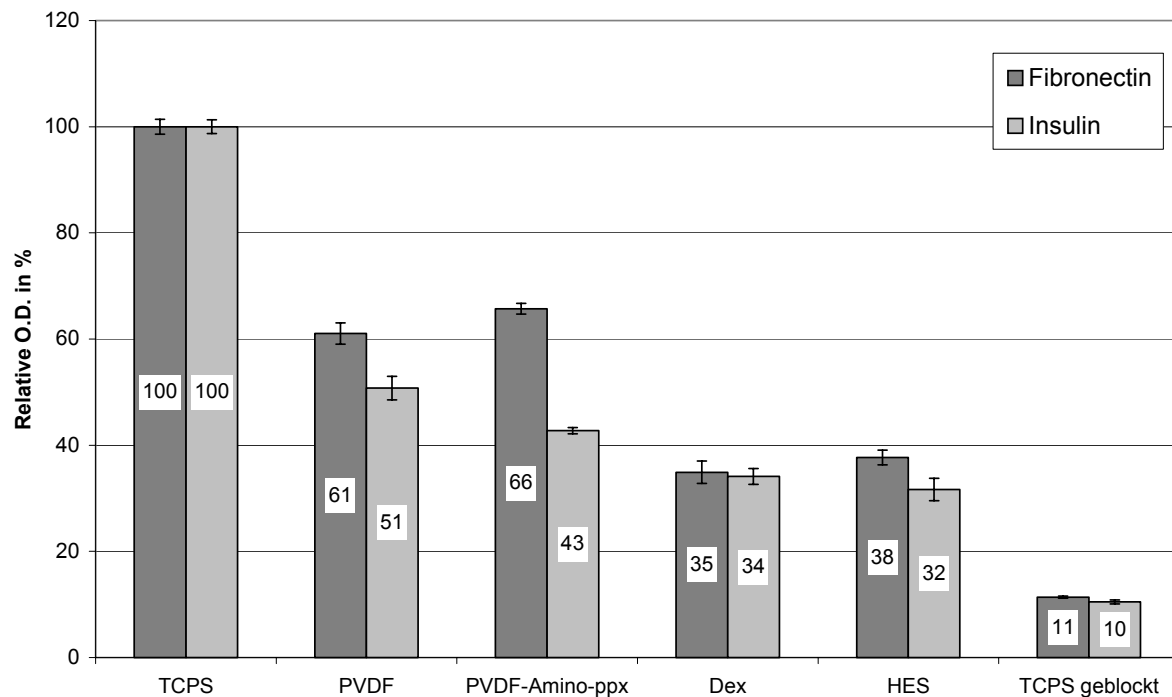


Abb. 45: Mittels ELISA ermitteltes relatives Adsorptionsverhalten von Fibronectin und Insulin an PVDF und PVDF-Amino-ppx vor und nach Modifizierung mit Polysacchariden

Die Werte der O.D., die für Fibronectin bzw. Insulin an TCPS gemessen werden, sind willkürlich auf 100% gesetzt. Die Fibronectin- und Insulinadsorption an geblocktem TCPS führt zu gleich großen relativen O.D.-Werten. Innerhalb dieser beiden Grenzwerte für Proteinadsorption sollten sich die O.D.-Werte der zu untersuchenden Oberflächen bewegen. Im Idealfall wird ein proteinabweisendes Verhalten der Testoberflächen erwartet, das mit dem des geblockten TCPS vergleichbar ist.

Erwartungsgemäß werden relativ hohe Proteinadsorptionswerte für hydrophobe Oberflächen PVDF und PVDF-Amino-ppx erhalten (vgl. Abb. 45). Im Gegensatz dazu, kann durch die Immobilisierung hydrophiler Polysaccharide (Dex bzw. HES) die Proteinadsorption sowohl für Fibronectin als auch für Insulin reduziert werden. Trotz einer Reduktion der Adsorption beträgt sie für die betrachteten Oberflächen relativ zu TCPS etwa 30-40%.

In Abb. 46 sind die Ergebnisse der Fibronectin- und Insulinadsorption an PVDF-Amino-ppx-Oberflächen, die mit mPEG-ald 5000 bzw. 30000 unter verschiedenen Reaktionsbedingungen modifiziert sind, dargestellt.

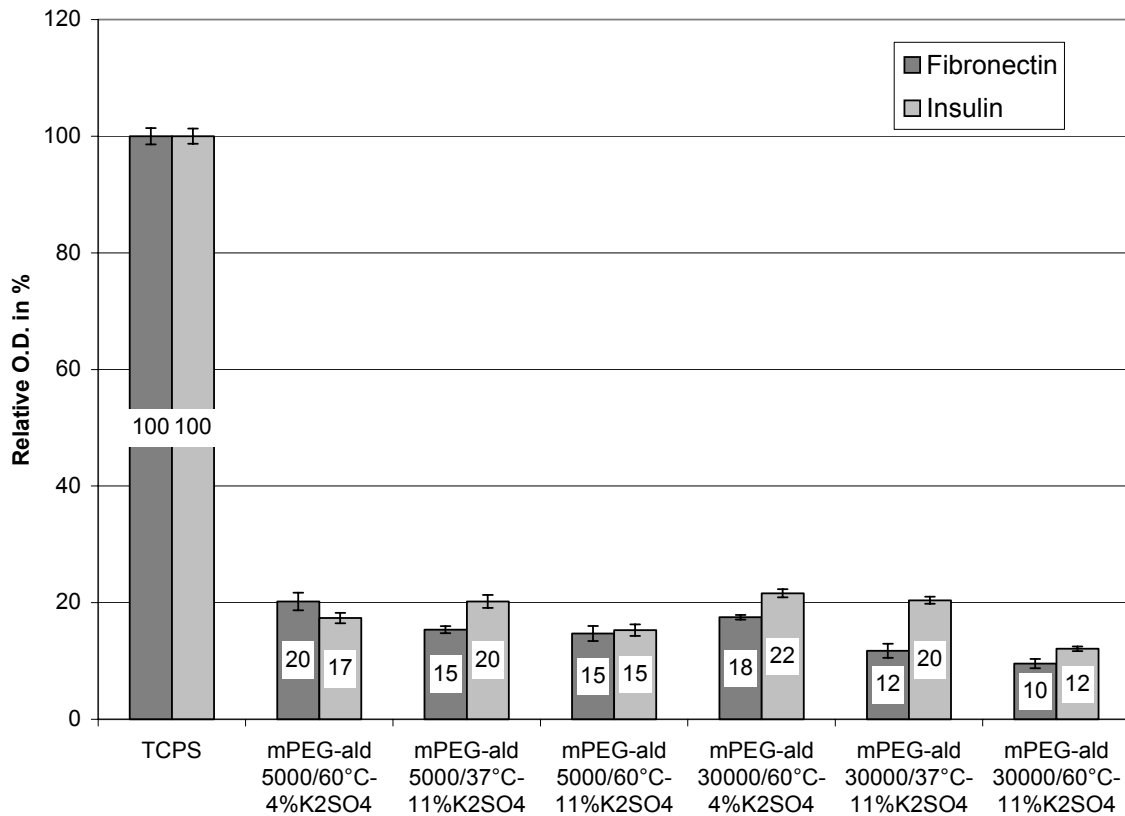


Abb. 46: Mittels ELISA ermitteltes relatives Adsorptionsverhalten von Fibronectin und Insulin an PVDF-Amino-ppx nach Modifizierung mit mPEG-ald 5000 bzw. 30000 unter Variation der Kopplungsbedingungen

Im Gegensatz zu den Polysacchariden wird im Falle immobilisierter mPEGs eine deutlich stärkere Zurückdrängung der Proteinadsorption erreicht. Dabei werden die besten Ergebnisse durch eine Kopplung der mPEG-aldehyde unter *cloud point* Bedingungen erzielt.

In Abb. 47 sind die ELISA-Ergebnisse der Fibronectin- und Insulinadsorption auf PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen vor und nach Modifizierung mit mPEG-ald 5000 bzw. 30000 aufgeführt.

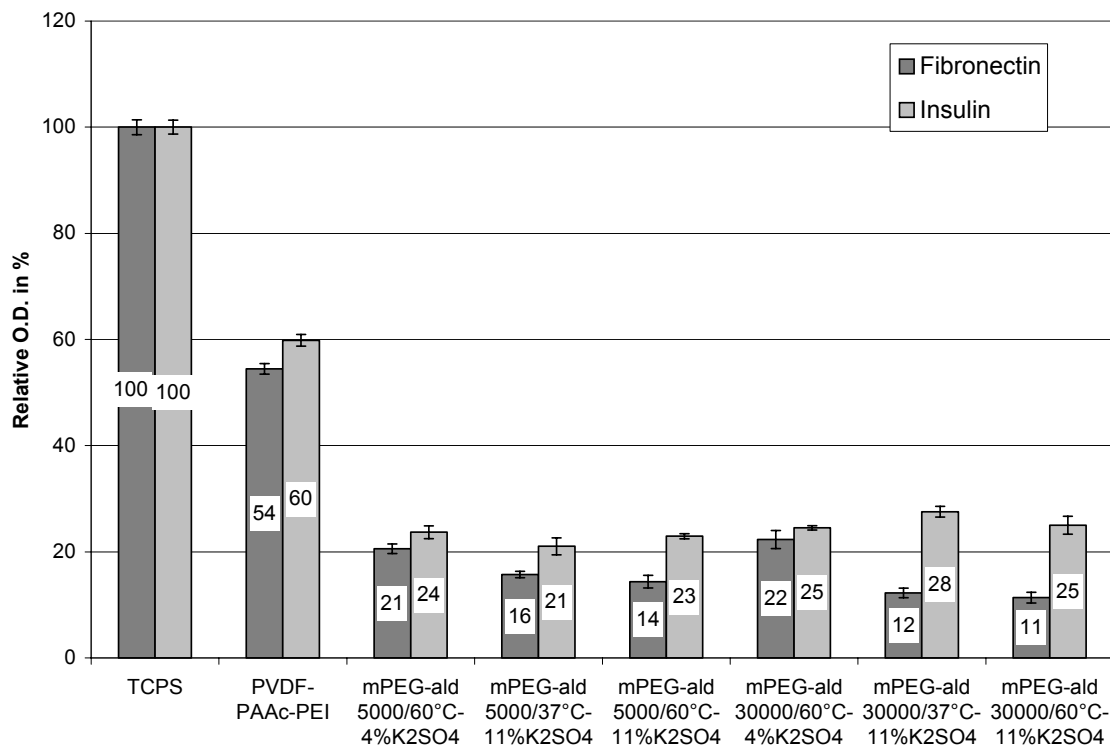


Abb. 47: Mit Hilfe des ELISA ermittelte relative Fibronectin- und Insulinadsorption auf PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen nach Modifizierung mit mPEG-ald 5000 und 30000

Im Vergleich zu PVDF-Amino-ppx-Oberflächen (Abb. 45) zeigt die PVDF-PAAc-PEI-Oberfläche (Abb. 47) ein nahezu identisches Verhalten bezüglich der Proteinadsorption von Fibronectin bzw. Insulin. Infolge der hohen positiven Ladungsdichte der PEI-Schicht bei physiologischem pH Wert resultiert eine starke anziehende elektrostatische Wechselwirkung zwischen dieser und den Proteinen. Durch die Kopplung von mPEG-ald 5000 bzw. 30000 kann die Anziehung der negativ geladenen Proteine reduziert und die Proteinadsorption stark zurückgedrängt werden.

Abb. 48 zeigt die ELISA-Ergebnisse der PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen nach Modifizierung mit carboxymethylierten Dextranen bzw. Hydroxyethylstärken.

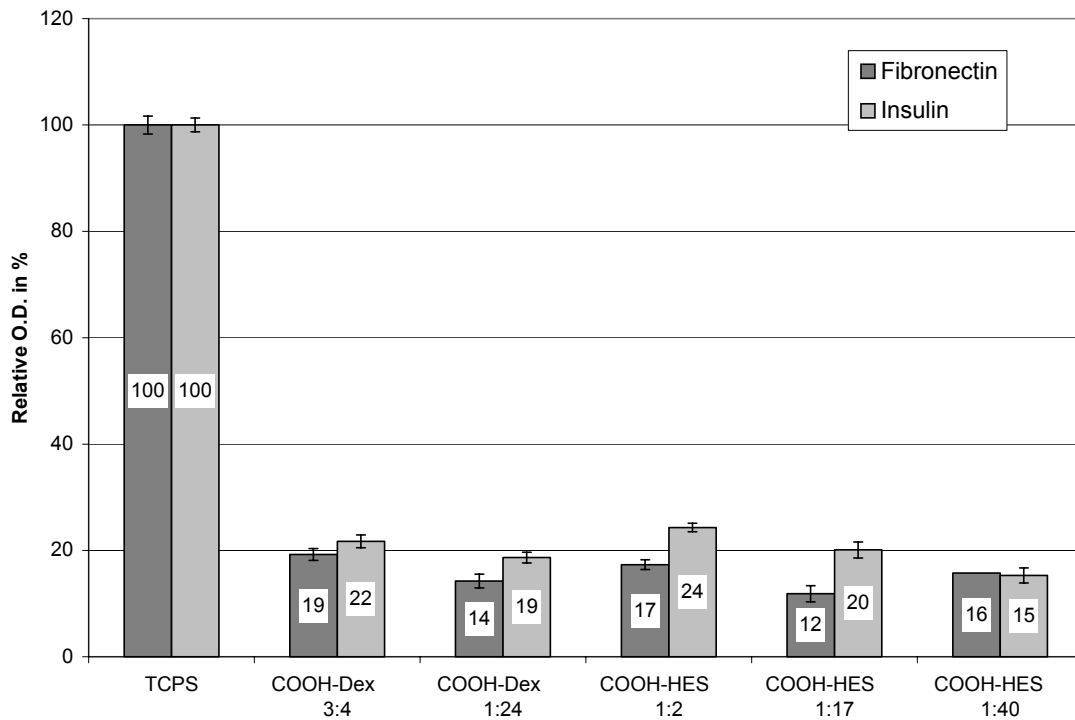


Abb. 48: Mit Hilfe des ELISA ermittelte relative Fibronectin- und Insulinadsorption auf PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen nach Modifizierung mit carboxymethylierten Dextranen bzw. Hydroxyethylstärken

Die Ergebnisse in Abb. 48 zeigen eine starke Reduzierung der Proteinadsorption relativ zu TCPS. Unabhängig vom Carboxylierungsgrad zeigen alle aufgeführten Oberflächenmodifikationen eine Proteinabweisung in vergleichbarer Größenordnung. Für die Modifikationen mit den höchsten Carboxylierungsgraden, die unter physiologischen Bedingungen eine hohe negative Oberflächenladung tragen und dementsprechend zu einer starken Abstoßung der negativ geladenen Proteine führen, steht dieses Ergebnis in sehr guter Übereinstimmung zu den *Surface*-MALDI-Ergebnissen. Diese Übereinstimmung gilt nicht für die Modifikationen mit niedrigem Carboxylierungsgrad. Dennoch können diese Ergebnisse nicht als widersprüchlich bezeichnet werden, da die ELISA-Versuche im Gegensatz zu den *Surface*-MALDI-Experimenten in Lösung durchgeführt werden und folglich bei ersteren eine starke Quellung der Polysaccharidschichten zum Tragen kommt.

Abb. 49 vergleicht die ELISA-Ergebnisse der Untersuchungen zur Fibronectin- und Insulinadsorption an PVDF-PAAc-Oberflächen vor und nach Modifizierung mit mPEG-aminen unterschiedlicher Kettenlänge und unter Variation der Kopplungsbedingungen.

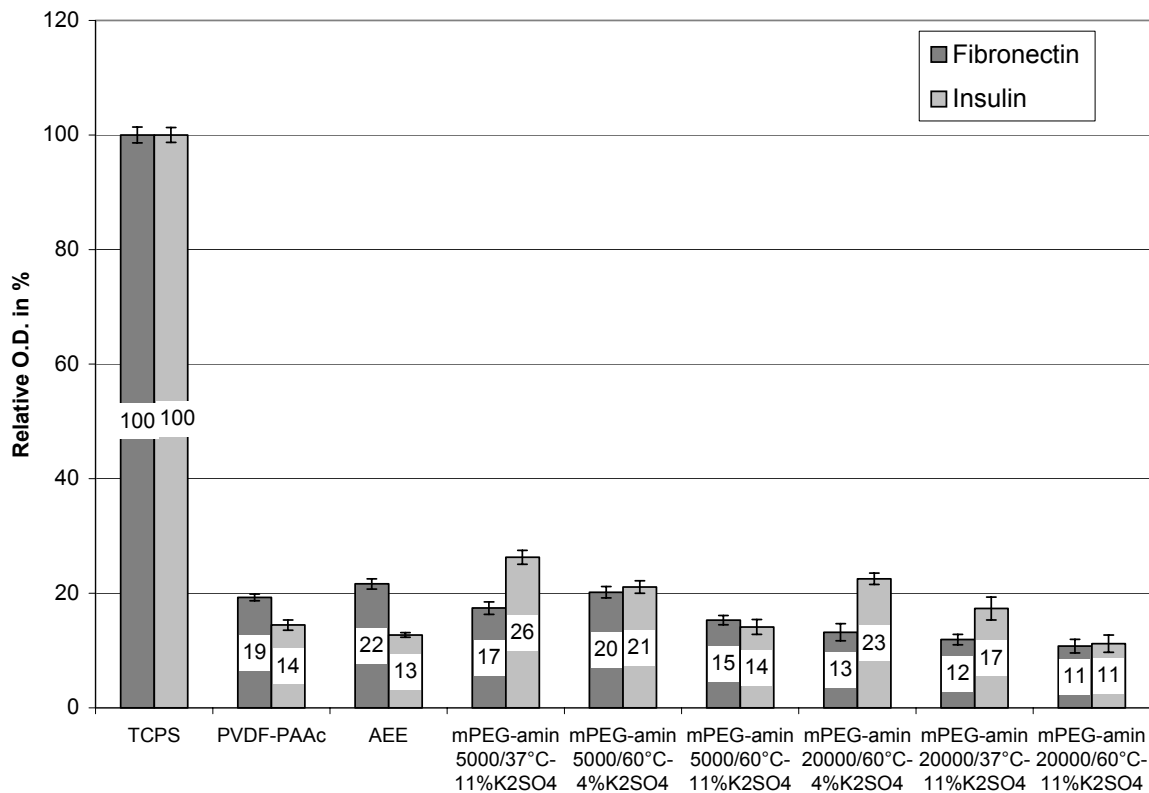


Abb. 49: Mit Hilfe des ELISA ermittelte relative Fibronectin- und Insulinadsorption auf PVDF-PAAc-Oberflächen vor und nach Modifizierung mit mPEG-aminen

Bereits die Acrylsäurepfropfung an PVDF führt zu einer Zurückdrängung der Proteinadsorption, die derjenigen des geblockten TCPS (vgl. Abb. 45) sehr nahe kommt. Dies ist eine Folge der großen negativen Oberflächenladung und starken Quellung der PAAc-Schicht. Eine signifikante Steigerung der Proteinabweisung kann nur noch durch eine Immobilisierung von mPEG-amin 20000 unter *cloud point* Bedingungen erreicht werden.

3.9.4 Untersuchung der Adsorption von Lysozym, Insulin und Fibronectin mittels radioaktiver Markierung

Die Quantifizierung der Menge an adsorbiertem Protein wird mittels radioaktiver Markierung der Proteinmoleküle mit dem Isotop ^{125}I durchgeführt. Die Iodierung der Proteine erfolgt mit Hilfe der *Chloramin T*-Methode^{215,216}. Unter der Annahme, dass die native Struktur der Proteine

durch die Iodierung von Tyrosinresten unverändert bleibt, kann man von vergleichbarem Adsorptionsverhalten von iodiertem und nativem Protein ausgehen²¹⁷.

In Analogie zu den bisherigen Untersuchungen werden auch die Quantifizierungsexperimente zum Adsorptionsverhalten von Proteinen an PVDF- und modifizierten PVDF-Oberflächen mit Fibronectin, Lysozym und Insulin durchgeführt.

Die Messungen der Proteinkonzentrationen an adsorbiertem Fibronectin, Lysozym und Insulin auf den Oberflächen wird mit einer TCPS-Oberfläche als Referenz verglichen. Außerdem wird eine mit BSA geblockte TCPS-Oberfläche als negative Referenz eingesetzt.

In Abb. 50 sind die absoluten Mengen an Proteinen, die auf PVDF und PVDF-Amino-ppx vor und nach Modifizierung mit Polysacchariden adsorbieren, gegenübergestellt.

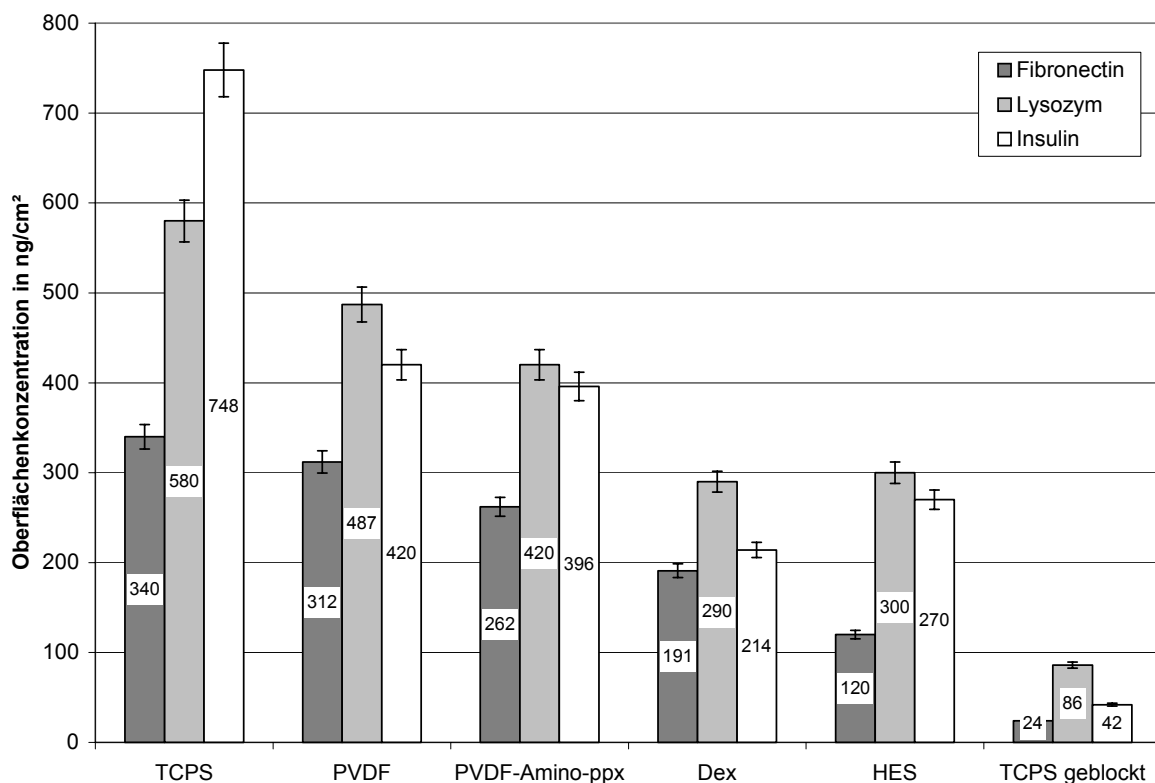


Abb. 50: Mittels ¹²⁵I-Markierung ermittelte Oberflächenkonzentration adsorbierter Proteine auf PVDF und PVDF-Amino-ppx vor und nach Modifizierung mit Dextran und Hydroxyethylstärke

Gemäß der Literatur beträgt eine Oberflächenbelegung mit einer Fibronectin-*monolayer* unter der Annahme, dass die Fibronectinmoleküle seitlich aufliegen (*multipoint attachment*),

240 ng/cm²²¹⁸. Für eine Lysozym-*monolayer* beträgt die theoretische Belegung zwischen 200-300 ng/cm²²¹⁹. Diejenige für eine Insulin-*monolayer* berechnet sich zu etwa 270 ng/cm²²²⁰.

Aus Abb. 50 geht hervor, dass die Mengen an adsorbiertem Protein auf TCPS-, PVDF- und PVDF-Amino-ppx-Oberflächen deutlich höher liegen als die Werte für eine *monolayer*-Belegung. Durch eine Kopplung von Dextran bzw. Hydroxyethylstärke auf Amino-ppx-Oberflächen können die Mengen an adsorbierten Protein zurückgedrängt werden.

In einer weiteren Versuchreihe wird der Einfluss einer Immobilisierung von mPEG-ald 5000 bzw. 30000 an Amino-ppx-Oberflächen unter Berücksichtigung verschiedener Kopplungsbedingungen mittels ¹²⁵I-Markierung untersucht. Die nachfolgende Abb. 51 gibt die ermittelten Flächenbelegungen wieder.

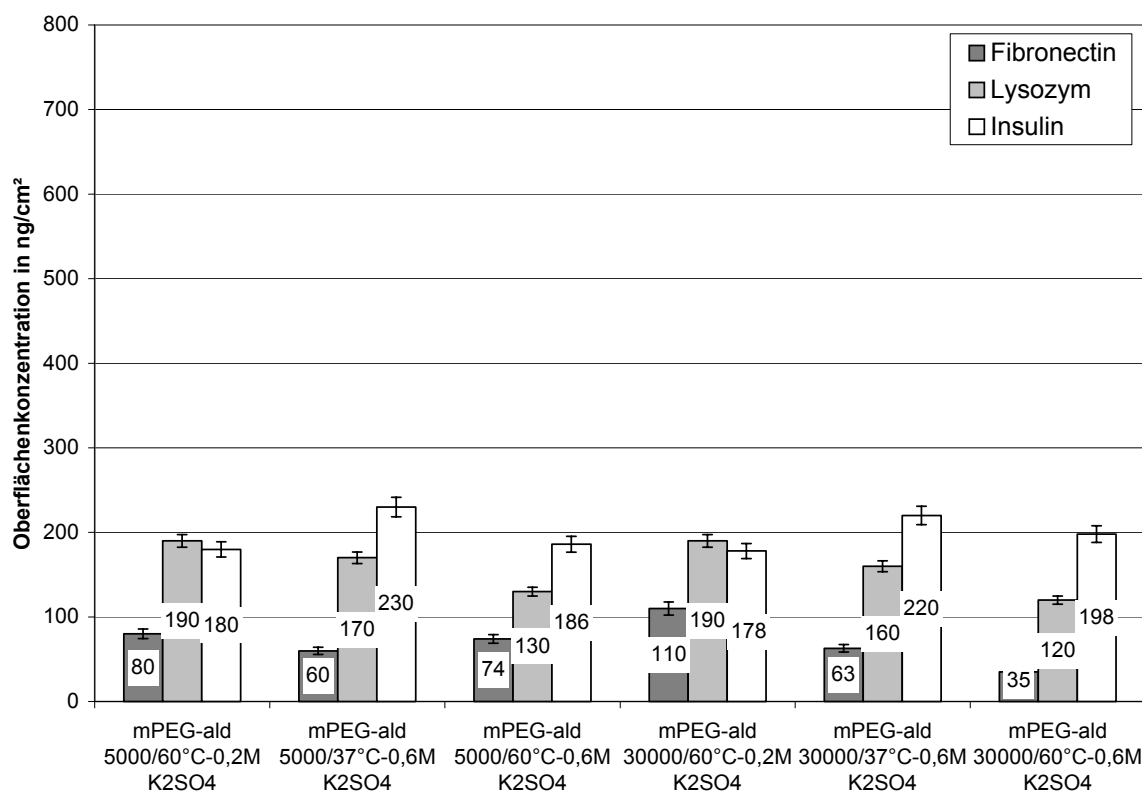


Abb. 51: Mittels ¹²⁵I-Markierung ermittelte Oberflächenkonzentration adsorbierter Proteine auf PVDF-Amino-ppx nach Modifizierung mit mPEG-ald 5000 und 30000 unter verschiedenen Reaktionsbedingungen

Im Vergleich zur Adsorption der aufgeführten Proteine an Amino-ppx kann durch die Immobilisierung von mPEG-ald 5000 bzw. 30000 insbesondere unter *cloud point* Bedingungen eine weitere Reduzierung der Proteinadsorption erzielt werden. Für die Oberflächen, die unter

cloud point Bedingungen modifiziert werden, resultiert die größte Kopplungsdichte an mPEGs. Daraus ergibt sich die abgestufte Adsorptionsmenge der eingesetzten Proteine in Abhängigkeit vom Molekulargewicht. Im Vergleich zu Fibronectin und Lysozym werden für Insulin die höchsten Adsorptionswerte gemessen. Für Proteine mit einer Größe, die der des Fibronectins entspricht, sind selbst bei den geringen Kopplungsdichten die adsorbierten Mengen relativ gering verglichen mit TCPS, PVDF und PVDF-Amino-ppx.

Abb. 52 liefert die quantitativen Ergebnisse zur Proteinadsorption an mit PEI modifizierten PVDF-PAAc-Oberflächen und den daran gekoppelten mPEG-ald 5000 bzw. 30000.

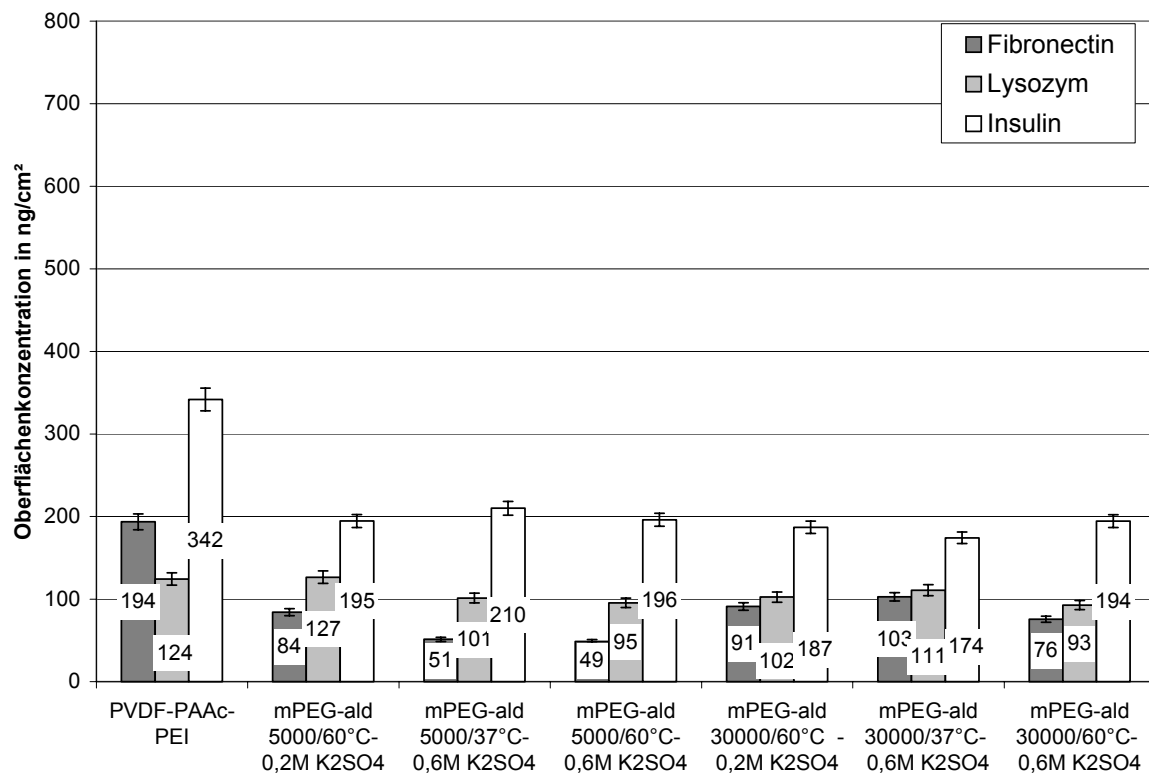


Abb. 52: Mittels ^{125}I -Markierung ermittelte Oberflächenkonzentration adsorbierter Proteine auf PVDF-PAAc-PEI vor und nach Modifizierung mit mPEG-ald 5000 und 30000

Infolge der geringen Größe des Insulins führt eine weitere Erhöhung der Kopplungsdichte durch die Verwendung einer PEI-Zwischenschicht zu keiner verbesserten Insulinabweisung. Demgegenüber führt die höhere Kopplungsdichte zu einer verstärkten Proteinabweisung bei größeren Proteinen wie Lysozym und Fibronectin.

Im Falle der PEI-Schicht, die unter physiologischen Bedingungen positiv geladen ist, wird die Adsorption des relativ kleinen und vor allem negativ geladenen Insulins infolge der elektrostatischer Anziehung verstärkt.

Im Vergleich zu den Daten aus Abb. 52 führt die Immobilisierung von carboxymethylierten Polysacchariden an PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen zu keiner verbesserten Proteinabweisung (vgl. Abb. 53).

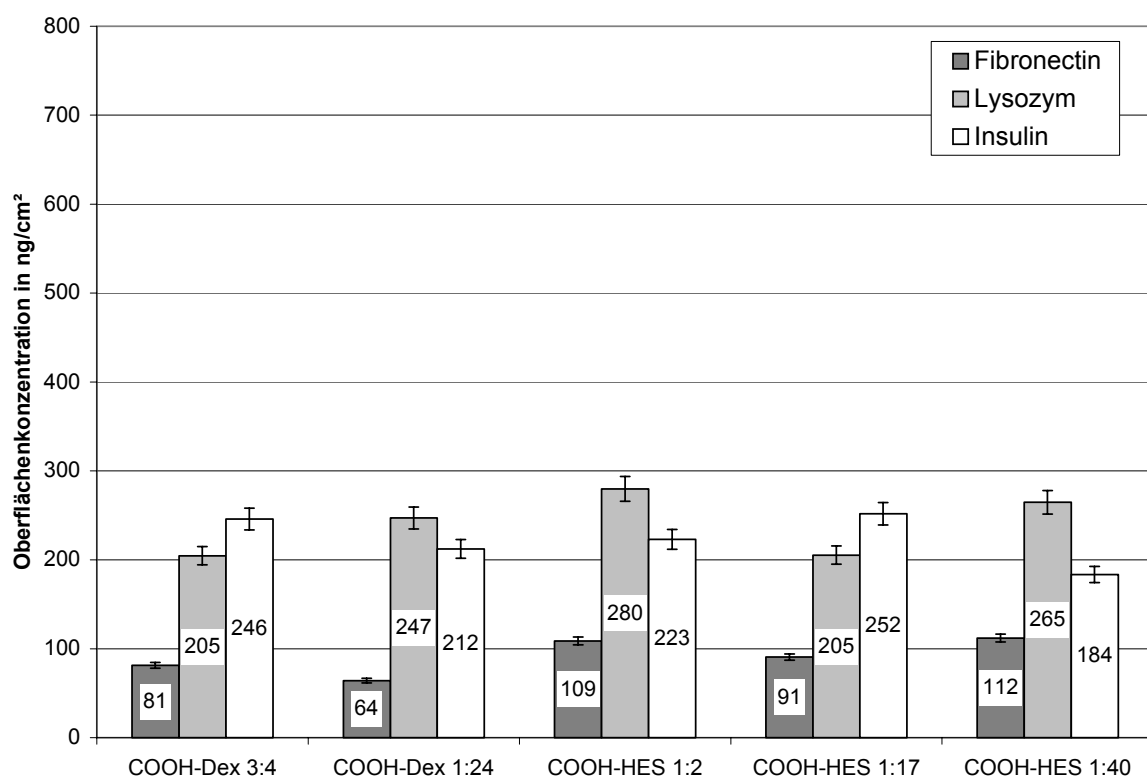


Abb. 53: Mittels ^{125}I -Markierung ermittelte Oberflächenkonzentration adsorbierter Proteine auf PVDF-PAAc-PEI nach Modifizierung mit carboxymethylierten Dextran und carboxymethylierter Hydroxyethylstärke

Im Falle sehr großer Proteine wie Fibronectin führt diese Oberflächenmodifizierung jedoch zu einer gewissen Verminderung der Adsorption. Dabei kann allerdings nicht die Effektivität der PVDF-PAAc-PEI-mPEG-ald-Oberflächen erreicht werden, bei denen die Immobilisierung von mPEG-ald unter *cloud point* Bedingungen durchgeführt wird. Bei wesentlich kleineren Proteinen wie Lysozym und Insulin wird die Uneffektivität der Schichten aus carboxymethylierten Polysacchariden besonders deutlich. Die Mengen an adsorbiertem

Lysozym und Insulin sind trotz des Größenunterschieds vergleichbar. Die erhöhte Adsorption im Falle des Lysozym ist auf eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen Lysozymmolekülen und den negativ geladenen Carboxylatgruppen der Polysaccharidmoleküle zurückzuführen. Nach Garrett et al. wird weniger eine Bildung von Multischichten als vielmehr eine Diffusion von Lysozymmolekülen in die gequollene Polysacchariden-Matrix beobachtet²¹⁹. Eine Beobachtung, die die Ergebnisse für Lysozym aus Abb. 53 bestätigt.

In Abb. 54 werden die Absolutmengen an adsorbierten Proteinen auf PVDF-PAAc vor und nach Modifizierung mit AEE und mPEG-amin 5000 bzw. 20000 aufgeführt.

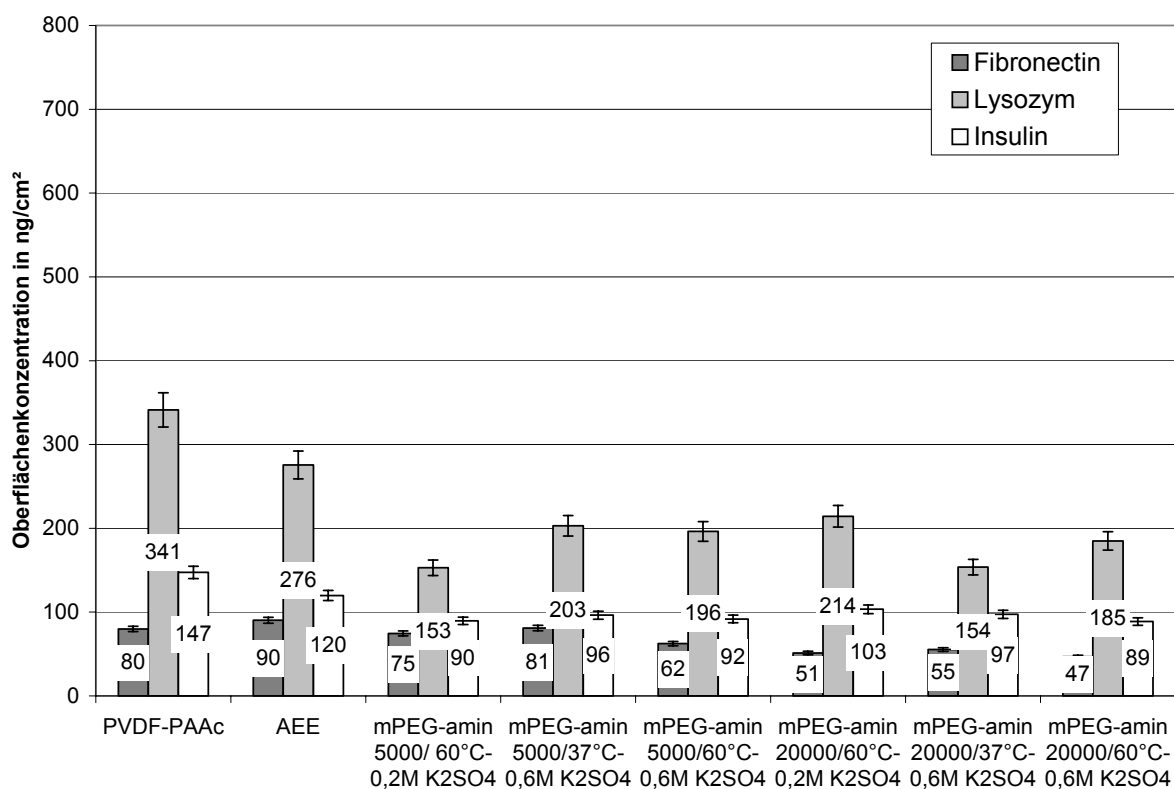


Abb. 54: Mittels ¹²⁵I-Markierung ermittelte Oberflächenkonzentration adsorbierter Proteine auf PVDF-PAAc vor und nach der Modifizierung mit AEE und mPEG-amin 5000 bzw. 20000

Vergleicht man die Ergebnisse der Abb. 54 mit denen der Abb. 52, so zeigt sich vor allem hinsichtlich der Adsorption von Lysozym und Insulin ein entgegengesetztes Adsorptionsverhalten. Dies ist eine Folge der ebenso komplementären Ladungsverhältnisse.

Dabei scheinen auch die gekoppelten längerkettigen mPEG-amine unabhängig von den Kopplungsbedingungen nicht in der Lage zu sein, die negative Ladung der darunter liegenden PAAc-Schicht abzuschirmen.

Die quantitativen Untersuchungen zur Proteinadsorption charakterisieren keine Oberfläche, die für alle Proteine unabhängig von ihrer Größe und Ladung eine vollständige Proteinabweisung zeigt. Wären die in den Abbildungen angegebenen Mengen an adsorbiertem Protein in ng/cm^2 diejenigen Mengen, die sich auf die tatsächlich vorliegende effektive Oberfläche beziehen, dann wäre keine der vorgestellten Oberflächen für eine Applikation als protein- und zellabweisendes Biomaterial geeignet.

Aus AFM-Untersuchungen geht hervor, dass die tatsächliche effektive Oberfläche, auf der die Proteinadsorption stattfindet, um etwa 10% größer ist als die berechnete PVDF-Oberfläche. Demzufolge sind alle angegebenen Mengen an adsorbiertem Protein pro Flächeneinheit entsprechend geringer.

In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, dass bereits bei den *Surface*-MALDI-Messungen auf einigen Oberflächen keine adsorbierten Proteine detektiert werden. Die mittels radioaktiver Markierung auf den entsprechenden Oberflächen ermittelten Insulin- bzw. Lysozym-Mengen bewegen sich in einer Größenordnung von pmol bis fmol. Da die Auflösung der MALDI-TOF-MS bis in den Bereich einiger Femtomol hineinreicht, führt dies zu einer weiteren Bestätigung der oben formulierten Aussage.

4 In-vitro Biokompatibilitätsuntersuchungen

Zur Überprüfung, inwieweit die hier vorgestellten Oberflächenmodifizierungen eine Zelladhäsion verringern bzw. sogar vermeiden können, werden die untersuchten Oberflächen Zelltests unterzogen. Die Zellkultur kann als initiale Prüfmethode betrachtet werden, die einen Hinweis auf die kurzfristige Reaktion der Zellen nach Materialkontakt gibt. Um eine Bewertung der Zellverträglichkeit zu erhalten, werden die durch die einzelnen Modifizierungsschritte generierten Oberflächen 24h im direkten Kontakt mit murinen Fibroblasten der kontinuierlichen Zellreihe L-929 untersucht.

Die Bewertung der Zellmorphologie erfolgt nach Fixierung der adhärenen Zellen und anschließender Anfärbung mit Hämalaun. Das äußere Erscheinungsbild der Zellen wird lichtmikroskopisch begutachtet. Ziel der Bewertung ist die Untersuchung des Einflusses der Probenoberfläche auf die Zelldichte und die Gestalt der adhärenen Zellen. Vitale murine Fibroblasten, die auf einer zellverträglichen Oberfläche siedeln, besitzen ein deutlich ausgebreitetes Zytoplasma und eine scharf begrenzte Zellmembran.

Die nachfolgenden Bilder zeigen einen repräsentativen Ausschnitt der Proben. In Abb. 55 ist die Morphologie von Fibroblasten auf Biofolie und PVC-Folie gegenübergestellt.

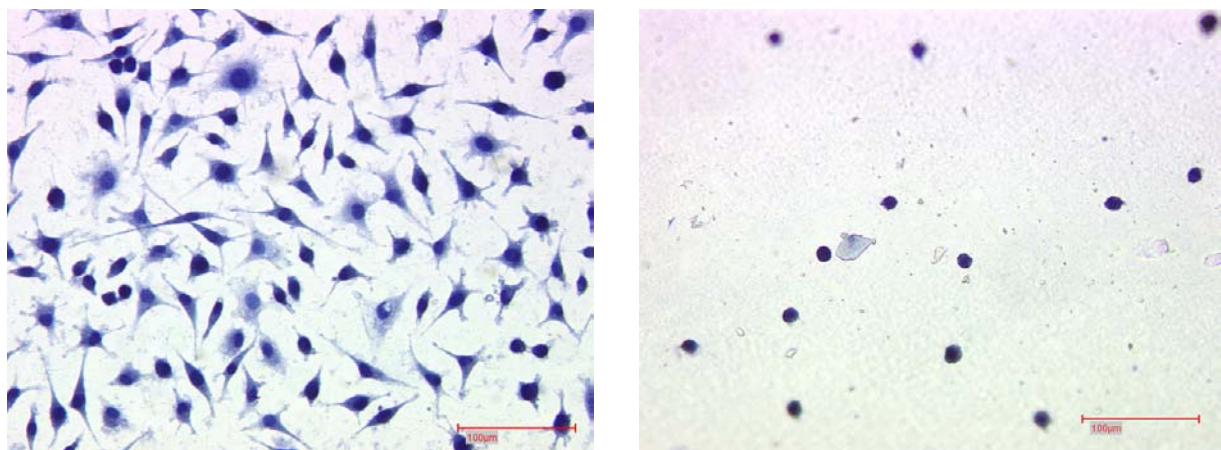


Abb. 55: Morphologie von Mausfibroblasten (L 929) auf Biofolie™ als Negativkontrolle (links) und PVC-Folie als Positivkontrolle (rechts) in 100-facher Vergrößerung

Biofolie gilt als besonders zellverträglich und wird als Negativkontrolle eingesetzt. Auf dieser Folie wachsen die Zellen bis zur Konfluenz, und nur wenige Zellen kugeln sich bis zu diesem

Zeitpunkt ab. Auf der toxischen PVC-Folie, die als Positivkontrolle eingesetzt wird, sind die wenigen Zellen, die einen Kontakt zur Oberfläche haben, abgekugelt.

Abb. 56 zeigt die Morphologie von Fibroblasten auf einer unbehandelten PVDF-Oberfläche und PVDF-Oberflächen, die mit Amino-ppx, PAAc bzw. PAAc-PEI modifizierten sind.

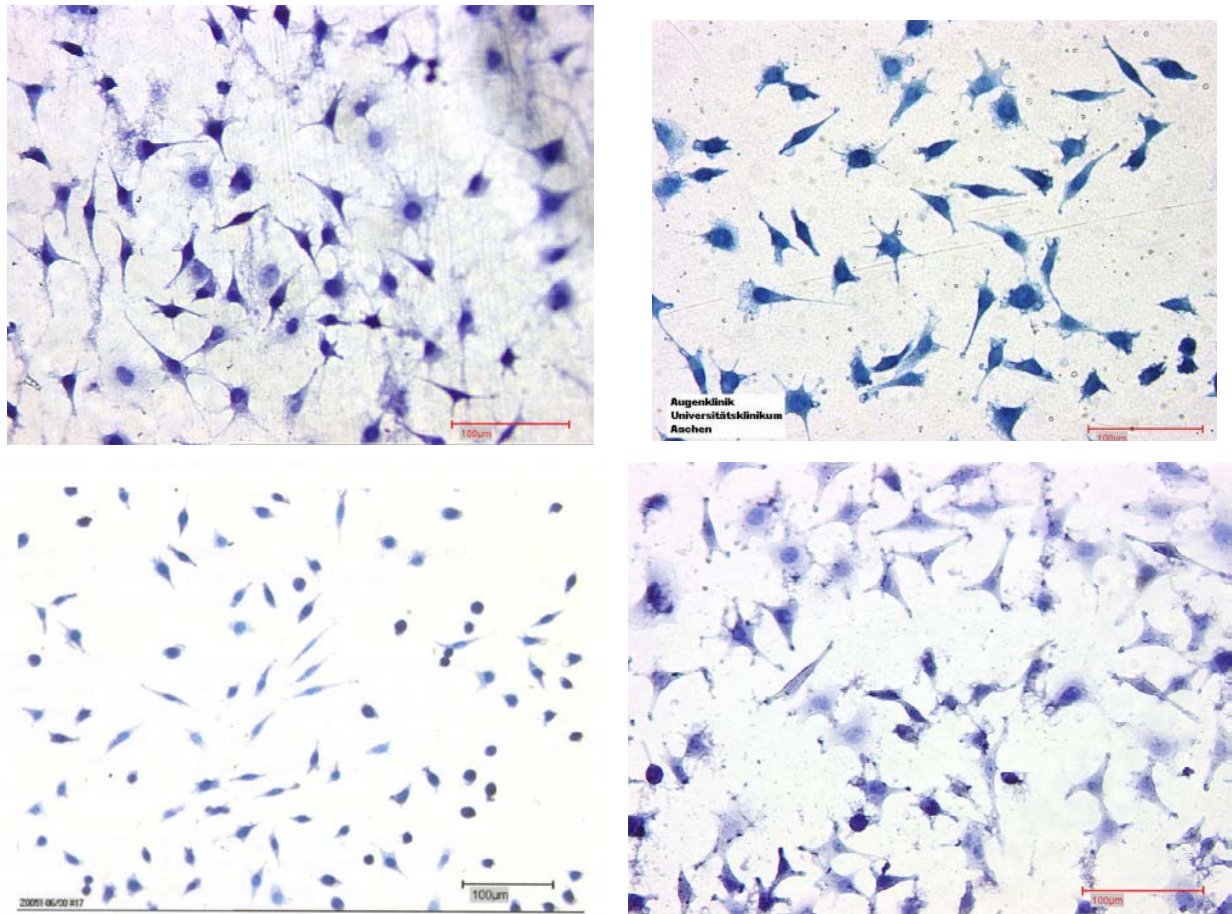


Abb. 56: Morphologie von Mausfibroblasten (L 929) auf PVDF (links oben), PVDF-Amino-ppx (rechts oben), PVDF-PAAc (links unten) und PVDF-PAAc-PEI (rechts unten) in 100-facher Vergrößerung

Auf den relativ hydrophoben Oberflächen von PVDF und PVDF-Amino-ppx zeigen die L 929-Mausfibroblasten eine für sie typische Morphologie (vgl. Biofolie in Abb. 55). Im Unterschied zur Negativkontrolle ist die Besiedelungsdichte nach 24h jedoch kleiner. Vergleicht man hierzu die entsprechenden auf PVDF-PAAc ausgesäten Zellen, so erkennt man deren deutlich veränderte Morphologie. Alle gespreiteten Zellen weisen wesentlich weniger Zellfortsätze und eine geringere Größe auf. Außerdem ist eine Vielzahl abgekugelter Zellen zu erkennen. Aus

diesen Hinweisen wird deutlich, dass bereits durch die Pfropfung von Polyacrylsäure, deren Ketten hydrophil sind und unter Zellkulturbedingungen über negativ geladene Carboxylatgruppen verfügen, die Zellabweisung gefördert wird. Im Gegensatz dazu zeigen die Zellen, die auf PVDF-PAAc-PEI ausgesät werden, eine für sie typische Morphologie. Dabei scheint die zellabweisende Eigenschaft der PAAc-Schicht durch die Kopplung von PEI kompensiert zu werden. Im Gegensatz zur PAAc-Schicht weist die PEI-Schicht eine geringere Hydrophilie und eine positive Oberflächenladung auf.

Abb. 57 zeigt die Morphologie von L 929-Mausfibroblasten nach Wechselwirkung mit PVDF-Oberflächen, die mit unterschiedlichen proteinabweisenden Schichten ausgerüstet sind.

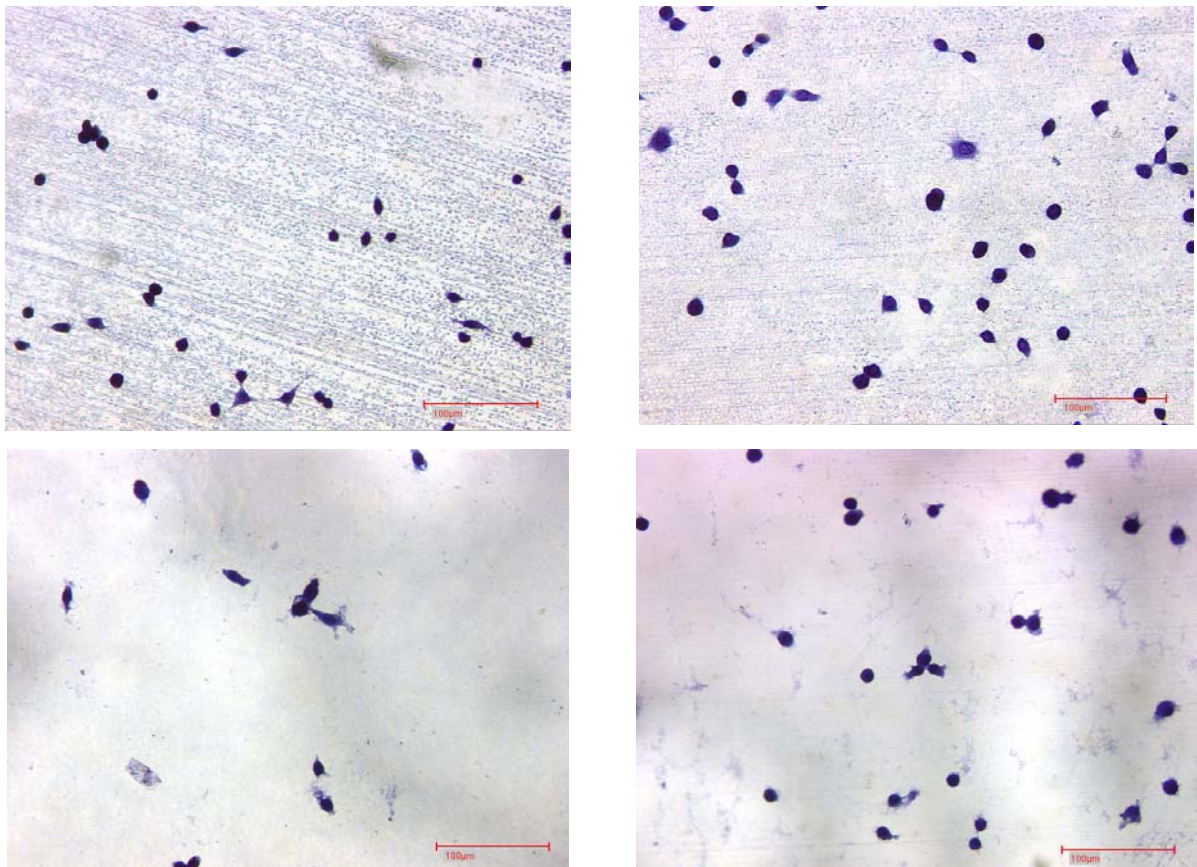


Abb. 57: Morphologie von Mausfibroblasten (L 929) auf PVDF-Amino-ppx-mPEG-ald 5000 (links oben), PVDF-PAAc-PEI-mPEG-ald 5000 (rechts oben), PVDF-PAAc-mPEG-amin (links unten) und PVDF-PAAc-PEI-COOH-Dex 3:4 (rechts unten) in 100-facher Vergrößerung

Die mit mPEG 5000 modifizierten Oberflächen (*cloud point* Bedingungen) zeigen ein für PEG-Ketten typisches, zellabweisendes Verhalten. Die Abbildungen demonstrieren, dass sich auf diesen Oberflächen nur wenige adhärenente Zellen mit weitestgehend abgekugelter Gestalt befinden. Ein völlig analoges Verhalten zeigen die Zellen auf PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, die mit carboxymethyliertem Dextran modifiziert sind.

Abb. 58 zeigt das Verhalten der Mausfibroblasten nach Aussäung auf PVDF-PAAc-PEI-Oberflächen, die mit carboxymethylierten Hydroxyethylstärken unterschiedlichen Carboxylierungsgrades modifiziert sind.

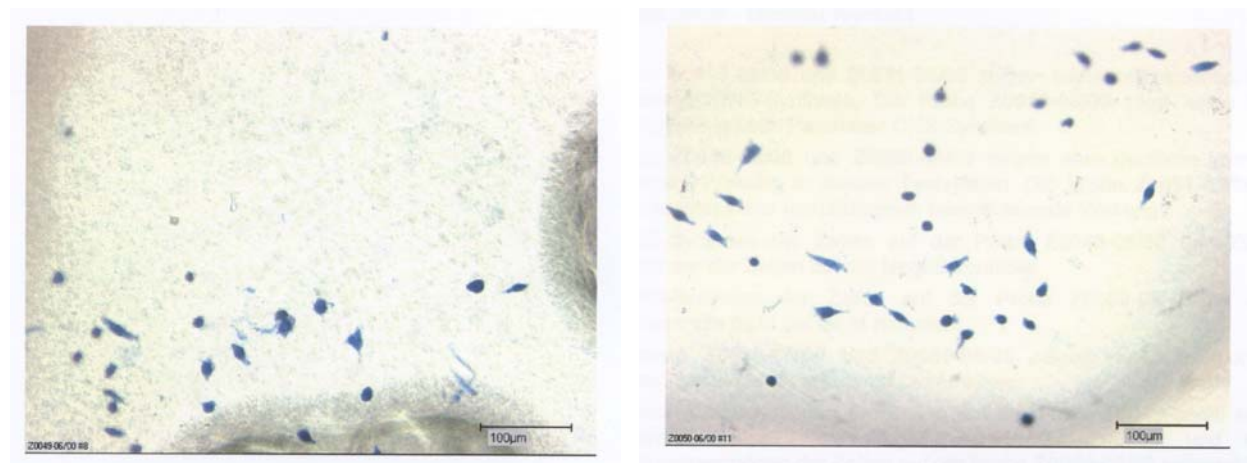


Abb. 58: Morphologie von Mausfibroblasten (L 929) auf PVDF-PAAc-PEI-COOH-HES 1:2 (links) und PVDF-PAAc-PEI-COOH-HES 1:17 (rechts) in 100-facher Vergrößerung

Auch diese Schichten zeigen eine deutliche Verringerung der Zelladhäsion. Hieraus kann geschlossen werden, dass der Carboxylierungsgrad keinen Einfluss auf die zellabweisenden Eigenschaften der modifizierten Oberflächen zu haben scheint.

5 Experimenteller Teil

5.1 Instrumentelle Analytik

5.1.1 Differentialkalorimetrie (DSC)

Die DSC-Messungen wurden mit einem Mettler TA 4000 der Fa. Mettler Instrumente GmbH (Gießen) durchgeführt. Die Temperaturkalibrierung erfolgte mit Indium, Blei und Zink.

In einem Standard-Aluminiumtiegel (40 μ l) wurden 5 bis 8 mg Substanz eingewogen und unter N_2 -Atmosphäre vermessen. Als Referenz wurde ein Standardtiegel aus 8,60 mg Aluminium verwendet. Die Aufheiz- und Abkühlraten betragen 20 $^{\circ}C/min$. Die Messungen erfolgten in einem Temperaturbereich von -20 $^{\circ}C$ bis 200 $^{\circ}C$. Zur Aufnahme und Auswertung der Messungen wurde die Software Mettler Graph Ware TA 72.2/5 verwendet.

5.1.2 Infrarotspektroskopie in abgeschwächter Totalreflexion (IR-ATR)

Die IR-spektroskopischen Messungen in der oberflächensensitiven ATR-Technik unter Verwendung eines Ge-Kristalles bzw. eines KRS-5-Kristalles (42% Thalliumbromid, 58% Thalliumiodid) als Reflexionseinheit wurden an einem FTIR-Spektrometer 60 SXR bzw. 710 der Fa. Nicolet (Offenbach) durchgeführt. Die Einstrahlwinkel betrug 45° , die Spiegelgeschwindigkeit 3,2 mm/s.

5.1.3 Raman-Spektroskopie

Die Raman-Spektren wurden mit einem konfokalen Laser Raman Mikrospektrometer Modell Labram der Fa. Jobin Yvon/Horiba GmbH (Bensheim) angefertigt. Das Spektrometer verfügt über einen integrierten HeNe-Laser mit der Anregungswellenlänge 633 nm bei einer Leistung

von 20 mW (18 mW auf der Probe). Die Laserstrahlung wird mit Hilfe eines Notch-Filters vollständig gegen die Probenoberfläche reflektiert. Die Raman-Streuung wird ihrerseits vollständig durch den Notch-Filter hindurchgelassen und fällt auf die konfokale Lochblende (pinhole) sowie auf den Eingangsspalt des Spektrometers.

Der Spektrograph ist mit einem CCD-Chip, der als Detektor dient, verknüpft. Der CCD-Chip wird elektrisch mit Hilfe eines Peltier-Elements auf -70°C gekühlt. Seine Auflösung beträgt 1024×256 Bildpunkte. Der Spektrograph verfügt über zwei Gitter (600 g/mm und 1800 g/mm), die wahlweise in den Strahlengang gebracht werden können. Die maximal mögliche spektrale Auflösung des Spektrographen beträgt 2 cm^{-1} .

5.1.4 Kontaktwinkelmessung nach der *Wilhelmy-Platte-Methode*

Die Kontaktwinkelmessungen wurden an einem rechnergesteuerten Kontaktwinkelmessgerät der Fa. Lemke & Partner (Kaarst) durchgeführt. Zur Bestimmung des dynamischen Kontaktwinkels nach der *Wilhelmy-Platte-Methode* wurde eine Probe in entionisiertes Wasser eingetaucht und danach wieder entnommen. Die auf die Probe wirkende Kraft wurde in Abhängigkeit von der Eintauchtiefe gemessen. Die Messungenauigkeit der Waage betrug 0,1 mg. Zur Vermessung der Proben wurden jeweils drei Zyklen durchlaufen. Bei einer Eintauchgeschwindigkeit von 0,15 mm/min und einer Eintauchtiefe von 6 mm betrug die Messfrequenz $0,125 \text{ s}^{-1}$, d.h. zwischen zwei Messpunkten wurde die Probe um 0,0003 mm bewegt.

5.1.5 Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)

Die Standard-XPS-Messungen wurden mit einem X-ProbeTM-Spektrometer, Modell 206 der Fa. Surface Science Instruments (Mountain View, USA) durchgeführt. Zur Aufnahme der Spektren wurden die Proben mit monochromatischer Al-K _{α} ,1,2-Strahlung (1486,6 eV; Halbwertsbreite (HBW) = 0,85 eV) mit einer Gesamtleistung von 175 W angeregt. Vor der XPS-Messung wurden die Proben mindestens 48 h im Hochvakuum gelagert, um flüchtige Substanzen an der Probenoberfläche zu entfernen. Die spektrale Auflösung, d.h. die an einer

Goldprobe bestimmte HBW der $Au_{4f7/2}$ -Photolinie, betrug bei der Aufnahme von Übersichtsspektren 1,55 eV, bei den Elementspektren hingegen 0,90 eV.

Polymere erfahren als Isolatoren bei der Emittierung von Photoelektronen eine positive elektrische Aufladung, die eine zunehmende Verschiebung der ermittelten Bindungsenergien zu höheren Werten zur Folge hat. Aus diesem Grund wurden der Probe niedrigerenergetische Elektronen ($E(e^-) = 4$ bis 24 eV) über ein Nickelnetz (Probenabstand ca. 2 mm) extern zugeführt, die eine Kompensierung der Aufladungsverschiebung bewirkte. Die Aufladungskorrektur erfolgte über die C1s-Photolinie des aliphatischen Kohlenstoffes, dessen Bindungsenergielage auf 285,0 eV festgelegt wurde. Elementkonzentrationen für Elemente mit $Z > 2$ werden in Atom-% angegeben und aus den Peakflächen der Übersichtsspektren berechnet (*pass energy*: 150 eV). Aus der Einstellung des Beobachtungswinkels auf 55° in Bezug auf die Probennormale ergibt sich eine XPS-Informationstiefe von ca. 6 nm.

Alle zur Auswertung herangezogenen XPS-Ergebnisse beziehen sich auf silicium-korrigierte Messungen. Si-Bindungsenergien von 102,3 eV ($\pm 0,2$ eV) weisen auf Polyorganosiloxane (Silicone) als Quelle der Siliciumkontamination hin.

5.1.6 Restgasmassenspektroskopie

Restgasmassenspektren wurden in einem Analysator QMG 422 der Fa. Balzers (Liechtenstein) aufgenommen. Die gasförmige Reaktionsprodukte und Plasmagasteilchen wurden von der Reaktionskammer in das Massenspektrometer überführt und durch Elektronenbeschuss mit etwa 100 eV positiv ionisiert. Anschließend werden die Reaktionsprodukte und Plasmateilchen als Ionen in einem Quadrupolmassenspektrometer analysiert.

5.1.7 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die AFM-Untersuchungen wurden mit einem Rasterkraftmikroskop Nanoscope III der Fa. Digital Instruments, Inc. (Santa Barbara, USA) durchgeführt. Es wurde in der *Tapping-In-Fluid*-Technik (Schwingfrequenz $\nu = 20$ kHz mit 100 μm Hebelarm) gearbeitet.

In Tab. 18 ist die verwendete Gerätekonfiguration aufgelistet.

Tab. 18: Gerätekonfiguration des NanoScope III-Rasterkraftmikroskops

Abtastmodus	Cantilever und Spitze	Kraftkonstante	Radius der Spitze	Höhe der Spitze	Länge des Hebelarms
<i>Contact</i>	Silicium	0,01 bis 0,6 N/m	20 bis 40 nm	3 μm	125 μm
<i>Tapping-In-Fluid</i>	Siliciumnitrid	0,01 bis 0,06 N/m	40 bis 80 nm	3 μm	100 μm

Die erhaltenen Daten wurden mit der Software NanoScope III 3.20 der Fa. Digital Instruments, Inc. erfasst und in ein dreidimensionales Bild umgewandelt (Auflösung: 256x256 Bildpunkte). Die Messung der Oberflächenrauigkeit erfolgte mit Hilfe der Software NanoScope III an $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ -Scans.

5.1.8 *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF-MS)

Alle MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem BRUKER BIFLEXTM III MALDI-Flugzeit-Massenspektrometer (Bruker-Frenzen Analytik GmbH, Bremen) aufgenommen, das mit einer SCOUT-Ionenquelle, einem Ionenspiegel (Reflektron) und Standard-*microchannel-plate*-Detektoren ausgerüstet ist. Die Matrixanregung erfolgte über einen Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm und einer Pulsdauer von 3 ns. Die Beschleunigungsspannung lag bei 20 kV. Zur verzögerten Ionenextraktion wurde ein Potentialunterschied von 6 kV mit einem Zeitverzug von 150 bis 200 ns nach jedem Laserimpuls zwischen der Ionenquelle und der Extraktionslinse erzeugt. Ionen kleinerer Masse wurden durch ein gepulstes Feld ausgeblendet. Der Druck im Massenanalysator betrug ca. 2×10^{-7} mbar. Die Beschleunigungsspannung lag bei 20 kV. Zur gitterlos verzögerten Ionenextraktion (*gridless delayed extraction*, GDE) wurde ein Potentialunterschied von 6 kV mit einem Zeitverzug von 150-200 ns nach jedem Laserimpuls zwischen die Ionenquelle und die Extraktionslinse gelegt.

Die dargestellten Massenspektren zeigen die Summe der von 100-250 Laserimpulsen erzeugten Ionensignale. Zur externen Kalibrierung der Massen wurden Proteinstandards (Sigma-Aldrich,

Deisenhofen) unter gleichen Desorptions- und Ionisierungsbedingungen, d.h. bei gleichen Geräteparametern vermessen.

Um an die Oberflächen adsorbierte Proteine zu detektieren, wird die *Surface*-MALDI-TOF-MS Methode verwendet. Die Matrixlösung bestand aus Sinapinsäure in einer 0,1 %-igen Lösung von Trifluoressigsäure in Acetonitril/Wasser. Durch Bestrahlung mit dem gepulsten UV-Laser werden die adsorbierten Biomoleküle und die Matrixmoleküle verdampft und ionisiert. Anschließend werden die Ionen mit der Standard-MALDI-MS-Methode detektiert.

Die Bearbeitung der Spektren erfolgte mit der Software Bruker Xtof 3.1.0 der Fa. Bruker-Franzen Analytik GmbH.

5.1.9 *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Verwendete Materialien

A. PBS

0,01 M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 0,14 M Natriumchlorid und 0,01 M Kaliumchlorid wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und mit Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat auf pH 7,4 eingestellt (Dulbecco's PBS), oder ein Päckchen PBS der Fa. Fluka (Schweiz) wurde in 1 l bidestilliertem Wasser gelöst.

B. Blockpuffer-Konzentrat:

In 90 ml PBS wurden 10 g BSA Fraktion V der Fa. Serva (Heidelberg) gelöst.

C. Blockpuffer:

Es wurde eine Mischung aus 50 ml Blockpuffer-Konzentrat und 450 ml PBS hergestellt.

D. Waschpuffer:

Eine Mischung aus 5 ml Tween 20[®] (0,05 %) der Fa. Pierce Europe und 10 ml Blockpuffer-Konzentrat wurden mit PBS auf ein Volumen von einem Liter aufgefüllt.

E. Antigenlösung:

Als Antigene wurden Fibronectin und Insulin eingesetzt. Fibronectin wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml in PBS eingesetzt. Insulin wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in Carbonatpuffer bei pH 8.4 eingesetzt.

F. Primäre Antikörperlösung:

Maus-*anti*-Humanfibronectin und Human-*anti*-Insulin wurden mit Blockpuffer im Verhältnis 1:5000 verdünnt.

G. Sekundäre Antikörperlösung:

Die Lösung des an Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierten Antikörper Kaninchen-*anti*-Maus IgG wurde mit Blockpuffer im Verhältnis 1:2500 verdünnt.

H. ABTS-Lösung:

Als Peroxidase-Substrat werden 10 mg ABTS-Farbsubstrat (Diammonium-2,2-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazolin-6-sulfonat) der Fa. Sigma in 40 ml ABTS-Puffer (40 mM Citronensäure-Monohydrat, 3,25 mM Natriumperborat-Tetrahydrat und 60 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat) gelöst.

Probenvorbereitung

Als Probengefäße wurden 24-Well-TCPS-Gewebekulturplatten Falcon 3046 der Fa. Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA) verwendet. Zur Absättigung der Kavitäten mit BSA wurden diese mit je 1 ml Blockpuffer 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung des Blockpuffers wurde dreimal mit jeweils 1 ml Waschpuffer gewaschen. Die Probefolien wurden mit einem Locheisen von 1.5 cm Durchmesser ausgestanzt und mittels doppelseitigem Klebeband TESA der Fa. Beiersdorf (Hamburg) in die Kavitäten eingeklebt.

Durchführung

Die folgenden Schritte wurden bei 37°C im Schüttel-Inkubator durchgeführt.

Die Proben wurden mit je 0,5 ml der Antigenlösung 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung entfernt, und die Kavitäten wurden dreimal mit jeweils 1 ml Waschpuffer gewaschen.

Nach dem Waschvorgang wurden die Kavitäten mit jeweils 0,5 ml der primären Antikörperlösung gefüllt. Nach 1 h wurde die Lösung entfernt, und die Gefäße wurden erneut, wie oben beschrieben, gewaschen.

Zur Inkubation des sekundären Antikörpers wurde in jedes Probengefäß 0,5 ml der entsprechenden Lösung gegeben. Nach 2 h erfolgte die Entfernung der Inkubationslösung und der Waschvorgang.

Für die Enzym-Substrat-Reaktion wurden die Kavitäten mit jeweils 0,5 ml ABTS-Lösung gefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurden aus jedem Probengefäß viermal 100 µl Lösung entnommen und in die Kavitäten einer 96-Well-Mikrotiterplatte Falcon 3072 der Fa. Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA) überführt.

Die Absorptionsmessungen wurden an einem Mikrotiterplattenreader Spectra 2000 der Fa. SLT Labinstruments (Crailsheim) durchgeführt. Zur Auswertung wurde die Software Easy-Fit, Version 7.17 der Fa. SLT verwendet. Bei Messungen wurde ein optisches Filter mit einem Absorptionsmaximum von 405 nm und ein Referenzfilter mit einem Absorptionsmaximum von 620 nm eingesetzt.

5.1.10 Radioaktive Proteinmarkierung

In einem silanisierten 3,5 ml Counterröhrchen wurde 1 µl Na¹²⁵I-Lösung (0,1 mCi, 3,7 MBq; 45 pmol in 1 µl 0,1 M NaOH vorgelegt und mit 2 ml Iodierungspuffer (0,3 M PBS-Puffer pH 7.6 / 6 M Harnstoff) versetzt. Nach Zugabe von 100 µl Proteinlösung (100 µg in 100 µl PBS-Puffer) wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Chloramin-T-Lösung (10 µg Chloramin T Trihydrat in 100 µl PBS) unter Rühren gestartet. Nach 5 min wurde die Fällbarkeit in Trichloressigsäure (TCA) überprüft. Dazu wurde eine abgeschmolzene Glaskapillare zuerst in die Iodierungsmischung und dann in 200 µl BSA-Lösung (eisgekühlte Lösung von 10% (w/w) BSA, 1% (w/w) NaI und 0,01% (w/w) NaN₃ in Wasser) getaucht. Nach gründlichem Durchmischen wurden 10 µl entnommen und mit weiteren 200 µl BSA-Lösung vermengt. Durch Zugabe von 2 ml eiskalter 10% TCA-Lösung wurden Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 5000 gefällt. Das präzipitierte Material aus BSA und Protein wurde durch Zentrifugation sedimentiert und vom Überstand getrennt im Gammacounter COBRA II Auto-Gamma der Fa. Packard (Dreieich) vermessen.

Zur Trennung zwischen Protein und nicht eingebautem Iod wurde das Reaktionsgemisch durch Gelfiltration an einer Sephadex[®] G-25-Säule NAP[™]5 Column der Fa. Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Schweden) aufgereinigt. Die Säule wurde zuvor mit dem Elutionsmittel PBS äquilibriert. Die durch TCA-Fällung identifizierte Proteinfraction wurde aliquotiert, bei -20°C gelagert und innerhalb einer Woche verwendet.

Fibronectin wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml in PBS, Lysozym 1 mg/ml in PBS und Insulin 1 mg/ml in Carbonatpuffer pH 8,4 gelöst. Die Lösung wurde anschließend durch Zugabe von radioaktiv markiertem Protein auf eine Aktivität von etwa 100000 cpm/500 µl (1,67 kBq/500 µl; 45,0 pCi/500 µl) eingestellt. Zur Aktivitätskontrolle wurden 500 µl-Proben am Gammacounter COBRA II Auto-Gamma der Fa. Packard (Dreieich) über einen Zeitraum von 3 min vermessen.

Die Proben wurden mit radioaktiven Proteinlösungen 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Kavitäten dreimal mit Wasser gewaschen und trocken gesaugt. Die Proben wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Radioaktivität der Proben wurde im Gammacounter über einen Zeitraum von 3 min gemessen.

5.1.11 Bestimmung von Carboxylgruppen mittels Toluidinblau

Die zu untersuchenden Polymerfolien (PVDF-PAAc) wurden mit einer Rundstanze ausgestanzt ($\varnothing = 1,5$ cm). Je 2 Folienscheibchen wurden in 5 ml Toluidinblau-Lösung gegeben (2×10^{-4} mol/l in 0,0001 M wässriger NaOH) und 6 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Folien dreimal mit 10 ml 0,0001 M wässriger NaOH gewaschen. Der gebundene Farbstoff wurde daraufhin abgelöst, indem die Folienscheiben mit 5 ml 50%-iger Essigsäure versetzt wurden. Nach 30 min wurden 8×100 µl der blau gefärbten Lösung in 96-Well-Mikrotiterplatten Falcon 3072 der Fa. Becton Dickinson einpipettiert und die Extinktion bei 620 nm gemessen. Zur Ermittlung der Farbstoffkonzentration wurde eine Kalibrierung vorgenommen. Es wurden Standardkonzentrationen von 2,0 bis 25 µg Toluidinblau in 5 ml 50%-iger Essigsäure angesetzt und deren Extinktionen vermessen.

5.2 Chemikalien und Probenpräparation

5.2.1 Chemikalien

Polyvinylidenfluorid wurde von der Fa. Solvay Adv. Polym. (Frankreich) als Granulat verwendet.

Folgende Lösungsmittel wurden jeweils in p.a.-Qualität oder in absolutierter Form eingesetzt: Aceton, Diethylether, Ethanol, Hexan, Isopropanol.

Reinstwasser (bidestilliertes Wasser) wurde durch Filtration von entmineralisiertem Wasser mit einer Anlage der Fa. Millipore (Eschborn) erhalten.

Folgende Reagenzien wurden in p.a.-Qualität von der Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs, CH), Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen: 1,6-Hexamethylendiisocyanat (>98%), Trifluoressigsäure, Polyethylenimin (M_w 100000), Eisessig, *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimid (95%-ig), Natriumcyanoborhydrid (95%-ig), Natriumiodid (99%-ig), *N*-Hydroxysuccinimid, Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, Kaliumhydroxid, Kaliumchlorid, Natriumchlorid, Natriumhydroxid.

Acrylsäure der Fa. Fluka (Buchs, CH) wurde durch Destillation unter Stickstoff im Vakuum vom Stabilisator getrennt.

Modifizierte Polyethylenglykole, mPEG-aldehyde und mPEG-amine, wurden von der Fa. Shearwater (Huntsville, USA) bezogen.

Na^{125}I wurde von der Fa. Amersham-Buchler (Braunschweig) bezogen.

Dextran mit durchschnittlichem Molekulargewicht 67300 wurde von der Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

Das carboxymethylierte Dextran wurde von Herrn Dipl. Chem. N. Weiß zur Verfügung gestellt.

Die Hydroxyethylstärke wurde von Herrn PD Dr. med. Norbert zur Verfügung gestellt.

5.2.2 Proteine und Antikörper

Zur Herstellung des Blockpuffers wurde Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA) der Fa. Serva (Heidelberg) eingesetzt. Fibronectin aus Humanplasma (Fn) wurde von der Fa. Boehringer

(Mannheim), Lysozym aus Huhnereiweiß von der Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim) und Schweineinsulin von der Fa. Aventis (USA) bezogen. Das eingesetzte Schweineinsulin wurde vor Gebrauch mittels Gelchromatographie entzinkt.

Maus-*anti*-Humanfibronectin wurde von der Fa. Sigma und Maus-*anti*-Humaninsulin und ein Meerretichperoxidase-konjugierter sekundärer monoklonaler Antikörper (Kaninchen-*anti*-Maus-IgG) wurden von der Fa. Pierce (USA) bezogen.

5.2.3 Herstellung der PVDF-Folien

Die Herstellung der PVDF-Folien erfolgte aus dem PVDF-Granulat in einer Presse der Fa. SPECAC (England). Es wurden 2 g PVDF-Granulat zwischen zwei, mit Aluminiumfolie bespannten Edelstahlplatten platziert. Die Edelstahlplatten wurden in die Presse gelegt und 20 min auf 190°C erhitzt. Anschließend wurden die Folien mit einem Druck von ca. 1000 t gepresst. Nach dem Abkühlen wurden die Folien mit einem Hexan/Ethanol-Gemisch (79:21 w/w) extrahiert. Die Folien hatten einen Durchmesser von ca. 10 cm und eine Dicke von ca. 0,3 mm.

5.2.4 Herstellung von carboxymethylierter Hydroxyethylstärke (CM-HES)

Zur Herstellung der carboxymethylierten Hydroxyethylstärke mit verschiedenen Carboxylierungsgraden wurden jeweils 1 g Hydroxyethylstärke in 10 ml 2 M Natriumhydroxid mit verschiedenen Konzentrationen Bromessigsäure über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurden die verschiedenen carboxymethylierte HES-Lösungen in einem Dialyseschlauch (D-9527 (>12000 D) der Fa. Sigma-Aldrich (USA)) 6 h gegen bidestilliertes Wasser, danach über Nacht mit 0,1 M Salzsäure, weitere 6 h mit 0,1 M Salzsäure und schließlich über Nacht mit bidestilliertem Wasser dialysiert. Danach wurden die Lösungen lyophilisiert und die Lyophilisate bei 4°C aufbewahrt. Der Carboxylierungsgrad wurde durch Titration gegen 0,1 M Natriumhydroxid mit Phenolphthalein als Indikator bestimmt.

5.3 Oberflächenmodifizierungen

5.3.1 CVD-Polymerisation zur Funktionalisierung von PVDF-Oberflächen

Die CVD-Polymerisation der 4-Amino-[2.2]-paracyclophane erfolgte in einer am Lehrstuhl für Textilchemie und Makromolekulare Chemie der RWTH Aachen entwickelten Anlage.

Das jeweilige zu beschichtende Substrat wurde auf dem Probenhalter mittels doppelseitigen Klebeband fixiert. Anschließend wurden die beiden Kühlkreisläufe aktiviert und die Rezipientwand durch Einschalten der beiden Heizbänder auf 100°C geheizt. Die Temperatur des Probenhalters betrug zwischen 10 und 15°C. Ein Porzellanschiffchen mit 30 mg Monomer wurde in die Sublimationszone gebracht. Der Reaktor wurde auf einen Basisdruck von 0,04 mbar evakuiert. Der Argongasstrom wurde auf 15 sccm eingestellt und Arbeitsdruck von 0,2 mbar vorgegeben. Sobald der Trägergasfluss und der Arbeitsdruck konstant waren, wurde die gewünschte Pyrolysetemperatur von 790°C vorgegeben. Die linke Pyrolysezone lag bei 750°C. Dann wurde die Drehbewegung des Probenhalters mit einer Drehgeschwindigkeit von 9 U/min gestartet und die Sublimationszone auf den vorgegebenen Wert erhitzt. Der Beschichtungsprozess wurde mit Hilfe des Schichtdickemonitors überwacht. Sobald sich die Abscheidungsrate dem Nullwert annähert, wurde der Beschichtungsprozess beendet. Dazu wurden Ofenregler, Drehmotor des Probenhalters und Trägergasstrom ausgeschaltet, das Drosselventil geöffnet und noch einmal auf Basisdruck abgepumpt.

5.3.1.1 Reaktion der Amino-ppx-funktionalisierten Oberflächen mit mPEG-ald

Eine Phosphatpufferlösung wurde mit Natriumhydroxid auf pH 6,2 eingestellt. Dann wurden die vorgegebene Menge von Kaliumsulfat, 3 mg/ml Natriumcyanoborhydrid und 1 mg/ml mPEG-ald 5000 oder mPEG-ald 30000 zugegeben. Anschließend wurden die Amino-ppx beschichtete PVDF-Folien eingetaucht und 6 h bei der gewünschten Temperatur gerührt. Danach wurden die Folien mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

5.3.1.2 Reaktion der Amino-ppx-funktionalisierten Oberflächen mit Polysacchariden

Die mit Amino-ppx beschichteten Proben wurden 24 h in einer 10 %-igen (v/v) Lösung von Hexamethyldiisocyanat in Ether umgesetzt und anschließend 4 h mit abs. Ether extrahiert. Danach wurden die Proben 12 h bei RT in einer 20 mg/ml Lösung des Dextrans oder der Hydroxyethylstärke in Carbonatpuffer pH 8,4 gelagert. Anschließend wurden die Proben mit bidestilliertem Wasser abgespült und anschließend getrocknet.

5.3.2 Plasmabehandlung

Die Plasmabehandlungen der PVDF-Folien wurden in einer Mikrowellenplasma-Versuchsanlage der Fa. ELTRO (Baesweiler) durchgeführt. Die Anlage verfügt über einen regulierbaren Gasfluss sowie eine regulierbare Leistung. Die max. Leistung beträgt 2 kW. Die Einstrahlung der Mikrowelle erfolgt über 7 Quarzfenster verteilt. Nach Korrektur der reflektierten Leistung und des Verhältnisses von Puls-/Periodendauer ergeben sich ca. 45 W/Quarzfenster. Die Anregungsfrequenz zum Zünden des Plasmas beträgt 2,45 GHz. Die Vakuumpumpen verfügen über eine Leistung von 250 m³/h.

Vor der eigentlichen Plasmabehandlung wurde die Reaktionskammer konditioniert, indem nach 10 min Evakuieren und einer 5 minütigen Ar-Begasung das Plasma 1,5 min ohne Probe brannte. Für die Plasmabehandlungen wurden 8 Probenstücke der Größe 5cm x 8cm auf einem Glasgestell in der Mitte der Reaktionskammer direkt unter einem Quarzfenster (Abstand zum Quarzfenster: 5 cm) plaziert. Nach erneuter Evakuierung der Kammer für 5 min wurde 2 min lang ein konstanter Gasfluss von 5 l/h eingestellt. Der Druck wurde auf 15 Pa eingestellt. Die PVDF-Folien wurden einem gepulsten Mikrowellenplasma (Plusdauer 1600 µs und Periodendauer 2000 µs) von 800 W Leistung ausgesetzt. Die Behandlungszeit betrug 30 s. Im Anschluss an die Plasmabehandlungen wurde zur Entfernung der reaktiven Gasteilchen die Reaktionskammer nochmals 2 min evakuiert.

5.3.3 Thermisch initiierte Pfropfcopolymerisation von Acrylsäure

Unter Stickstoff-Atmosphäre wurde eine 20%-ige Acrylsäurelösung (v/v) in bidestilliertem Wasser in einem Schlenkrohr angesetzt. Eine Argonplasmabehandelte Folie wurde nach 30 min Belüftung in die Lösung eingebracht und 10 min Stickstoff durch die Lösung geleitet. Das Schlenkrohr wurde verschlossen und in einem Wasserbad bei 90°C wurde die Lösung gerührt. Bei einsetzender Erhöhung der Viskosität der Lösung wurde die Pfropfcopolymerisation gestoppt. Die Folien wurden mehrmals mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

5.3.4 Reaktion der PAAc-funktionalisierten Oberflächen mit PEI

Die Folien wurden 20 min bei Raumtemperatur mit einem Gemisch aus 0,1 M *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimid (EDC) und 0,1 M *N*-Hydroxy-succinimid (NHS) in destilliertem Wasser aktiviert. Anschließend wurden die Folien kurz mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Folien wurden 2 h mit einer 3 mg/ml Polyethyleniminlösung in Carbonatpuffer (pH 8,4) bei RT umgesetzt. Danach wurden die Folien mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

5.3.4.1 Reaktion der PEI-funktionalisierten Oberflächen mit mPEG-ald

In eine Phosphatpufferlösung, die mit Natriumhydroxid auf pH 6,2 eingestellt wurde, wurden vorgegebene Konzentration von Kaliumsulfat, 3 mg/ml Natriumcyanoborhydrid und 1 mg/ml mPEG-ald 5000 oder mPEG-ald 30000 zugegeben. Anschließend wurden die PVDF-PAAc-PEI-Folien eingetaucht und 6 h bei der gewünschten Temperatur gerührt. Dann wurden die Folien mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

5.3.4.2 Reaktion der PEI-funktionalisierten Oberflächen mit carboxymethylierten Polysacchariden

Es wurden 40 mg carboxymethylierter Hydroxyethylstärke oder carboxymethylierten Dextrans 15 min in 10 ml einer Lösung aus 0,1 M EDC und 0,1 M NHS in bidestilliertem Wasser bei RT aktiviert. Anschließend wurden 30 ml Carbonatpuffer pH 8,3 zugegeben und die PVDF-PAAc-PEI-Folien wurden in die Lösung eingetaucht. Es wurde 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurden die Folien mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

5.3.5 Reaktion der PAAc-funktionalisierten Oberflächen mit mPEG-amin

Die PVDF-PAAc-Folien wurden in einer Lösung aus 0,1 M EDC und 0,1 M NHS in bidestilliertem Wasser bei RT aktiviert. Nach 20 min wurden die Folien herausgenommen, kurz mit bidestilliertem Wasser gespült und in Carbonatpuffer (pH 8,4) mit vorgegebener Konzentration von Kaliumsulfat und 1 mg/ml mPEG-amin 5000 oder mPEG-amin 20000 eingelegt und 2 h bei gewünschter Temperatur gerührt. Dann wurden die Folien mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

5.4 Untersuchung der Zelladhäsion

Für die Zellkulturuntersuchungen wurde die Zelllinie L 929 (Mausfibroblasten) verwendet. Als Kulturbedingungen wurde eine Temperatur von 37°C, ein CO₂-Gehalt von 7,5 % und ein Medium bestehend aus 90% RPMI 1640 Universalmedium der Fa. Biowhittaker (Belgien) und 10 % fetalem Kälberserum verwendet.

Zur Beurteilung der Zellmorphologie im direkten Kontakt zu den Oberflächen wurden die Zellen mit Hämalanlösung angefärbt. Die Proben wurden zunächst auf einem Glasobjektträger mit Hilfe von doppelseitigem Klebeband fixiert. Die Oberflächen wurden mit 70 %-iger Ethanol-Lösung eingesprüht und 30 min unter Laminarflow abgedampft. Anschließend wurde mit einer Zellsuspension von ca. 50000 L 929-Mausfibroblasten pro ml Nährmedium unter den beschriebenen Kulturbedingungen 24 h inkubiert. Die besiedelten Proben wurden zur Fixierung

20 min mit einer Formaldehydlösung (3,7 %, w/v) inkubiert. Nach dem Spülen der Oberflächen mit entionisiertem Wasser wurde 10 min mit der Hämalaunlösung gefärbt. Nach einem weiteren Spülvorgang und dem Trocknen der Proben an der Luft erfolgte die morphologische Beurteilung und photographische Dokumentation in 100-facher Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop.

6 Anhang

Tab. A-1: Wellenzahl, Intensität und Schwingungsart der IR und Raman Absorptionsbanden der α -kristallinen Form des PVDF

IR	Raman	Schwingungsart
Wellenzahl in cm^{-1}		
1386, m	1384, vw	δ (CH ₂)
1182, s	1190, sh	ν_s (CH ₂)
1149, m	1150, w	ν_a (CF ₂)
1067, m	1064, sh	ν_s (CC)
976, w	976, w	t (CH ₂)
878, s	885, sh	ν_s (CF ₂)
796, w	800, vs	r (CH ₂)
765, m	766, w	δ (CF ₂)
615, s	612, s	δ (CF ₂)
530, w	536, m	δ (CF ₂)
489, s	488, m	δ (CH ₂)

Tab. A-2: Wellenzahl, Intensität und Schwingungsart der IR und Raman Absorptionsbanden der β -kristallinen Form des PVDF

IR	Raman	Schwingungsart
Wellenzahl in cm^{-1}		
2980, vw	2984, s	ν_s (CH_2)
1428, w	1423, s	δ (CH_2)
1273, s	1283, m	ν_s (CF_2)
884, s	886, s	ν_s (CF_2)
842, s	840, vs	ν_s (CF_2)
508, s	514, m	δ (CF_2)
468, s	470, w	w (CF_2)
442, w	443, w	r (CF_2)

Tab. A-3: Gemessene cpm-Werte und die daraus berechneten Massenwerte an radioaktiv markiertem Fibronectin und die zugehörigen Oberflächenkonzentrationen

Oberfläche	cpm			ng	ng/cm ²
TCPS	7742	7654	7491	534	340
TCPS-geblockt	581	622	426	38	24
PVDF	6891	7015	7094	490	312
PVDF-PAAc	1789	1920	1691	126	80
PVDF-PAAc-PEI	4460	4264	4347	305	194
+mPEG-ald 5000/60°C- 0,2 M K ₂ SO ₄	1841	1931	2458	132	84
+mPEG-ald 5000/37°C- 0,6 M K ₂ SO ₄	1112	1154	1163	80	51
+mPEG-ald 5000/60°C- 0,6 M K ₂ SO ₄	985	1197	1118	77	49
+mPEG-ald 30000/60°C- 0,2 M K ₂ SO ₄	2102	2123	1904	143	91
+mPEG-ald 30000/37°C- 0,6 M K ₂ SO ₄	2356	2289	2297	162	103
+mPEG-ald 30000/60°C- 0,6 M K ₂ SO ₄	1694	1688	1718	119	76
+COOH-Dex 3:4	1797	1847	1798	127	81
+COOH-Dex1:24	1476	1387	1424	100	64
+COOH-HES 1:2	2490	2519	2320	171	109
+COOH-HES 1:17	2087	1994	2048	143	91
+COOH-HES 1:40	2389	2612	2541	176	112

71429 cpm = 5 µg Fibronectin

Oberfläche A = 1,57 cm²

Tab. A-4: Gemessene cpm-Werte und die daraus berechneten Massenwerte an radioaktiv markiertem Lysozym und die zugehörigen Oberflächenkonzentrationen

Oberfläche	cpm			ng	ng/cm²
TCPS	203	183	190	911	580
TCPS-geblockt	24	33	27	135	86
PVDF	150	164	169	765	487
PVDF-PAAc	95	119	125	535	341
PVDF-PAAc-PEI	44	38	41	196	124
+mPEG-ald 5000/60°C- 0,2 M K ₂ SO ₄	37	45	44	199	127
+mPEG-ald 5000/37°C- 0,6 M K ₂ SO ₄	49	28	22	159	101
+mPEG-ald 5000/60°C- 0,6 M K ₂ SO ₄	27	30	36	149	95
+mPEG-ald 30000/60°C- 0,2 M K ₂ SO ₄	30	95	38	160	102
+mPEG-ald 30000/37°C- 0,6 M K ₂ SO ₄	40	39	32	174	111
+mPEG-ald 30000/60°C- 0,6 M K ₂ SO ₄	34	21	38	146	93
+COOH-Dex 3:4	61	74	69	322	205
+COOH-Dex1:24	80	77	89	388	247
+COOH-HES 1:2	141	98	88	440	280
+COOH-HES 1:17	71	59	74	322	205
+COOH-HES 1:40	94	78	89	416	265

105145 cpm = 0,5 mg

Oberfläche A=1,57 cm²

Tab. A-5: Gemessene cpm-Werte und die daraus berechneten Massenwerte an radioaktiv markiertem Insulin und die zugehörigen Oberflächenkonzentrationen

Oberfläche	cpm			ng	ng/cm²
TCPS	410	483	580	1174	748
TCPS-geblockt	35	22	27	66	42
PVDF	289	263	276	659	420
PVDF-PAAc	91	89	111	231	147
PVDF-PAAc-PEI	219	230	226	537	342
+mPEG-ald 5000/60°C- 0,2 M K ₂ SO ₄	124	132	128	306	195
+mPEG-ald 5000/37°C- 0,6 M K ₂ SO ₄	151	135	128	330	210
+mPEG-ald 5000/60°C- 0,6 M K ₂ SO ₄	274	132	126	308	196
+mPEG-ald 30000/60°C- 0,2 M K ₂ SO ₄	119	129	121	294	187
+mPEG-ald 30000/37°C- 0,6 M K ₂ SO ₄	104	101	127	273	174
+mPEG-ald 30000/60°C- 0,6 M K ₂ SO ₄	137	128	119	305	194
+COOH-Dex 3:4	178	149	156	386	246
+COOH-Dex1:24	128	135	154	333	212
+COOH-HES 1:2	150	131	157	350	223
+COOH-HES 1:17	171	158	169	396	252
+COOH-HES 1:40	128	114	121	289	184

209112 cpm = 0,5 mg

Oberfläche A= 1,57 cm²

7 Literaturverzeichnis

- ¹ D.F. Williams (ed.), „Definitions in Biomaterials, Progress in Biomedical Engineering“, 4. Auflage, Elsevier, Amsterdam (1987)
- ² H.P. Jennissen, T. Zumbriak, M. Chatzinikolaïdou, J. Steppuhn, *Materialwiss. Werkstoff.* **30** (1999), 838
- ³ Y. Ikada, *Biomaterials* **15**, (1994), 725
- ⁴ G.H. Engbers, J. Feijen, *Int. J. Artif. Org.* **14** (1991), 199
- ⁵ N. Völcker, D. Klee, H. Höcker, S. Langefeld, *J. Mat. Sci.: Mat. In Medicine* **12** (2001), 111
- ⁶ J.A. Hubbell, *Bio/Technology* **13(6)** (1995), 565
- ⁷ J. A. Hubbell, *Current Opinion in Biotechn.* **10** (1999), 123
- ⁸ J.-B. Park, „Biomaterials Science and Engineering“, Plenum Press, New York, 1984
- ⁹ L.L. Hench, J. Wilson, „An Introduction to Bioceramics“, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore (1993), 1
- ¹⁰ D.V. Rosato, Biocompatible Polymers, Metals and Composites, M. Szycher (ed), Technomic Publ., Lancaster (1983)
- ¹¹ L.L. Hench, D.E. Clark, *J. Non-Cryst. Solids* **28** (1978), 83
- ¹² B.D. Agarwal, L.J. Broutman, „Analysis and Performance of Fiber Composites“, Wiley-Intersci., New York (1980)
- ¹³ H. Tanazawa, „Biomedical Applications of Polymeric Materials“, T. Tsuruta, T. Hayashi, K. Kataoka, K. Ishihara, Y. Kimura (eds.), CRC Press, Boca Raton (1993)
- ¹⁴ L.L. Hench, E.C. Ethridge, „Biomaterials- An Interfacial Approach“, Academic Press, New York (1982)
- ¹⁵ B.D. Halpern, Y.-C. Tong, In: „Polymers: Biomaterials and Medical Applications“, J.I. Kroschwitz (ed), J. Willey & Sons, New York (1989), 253
- ¹⁶ R. Dekumbis, *Chem. Eng. Prog.* **83** (1987), 23
- ¹⁷ H.J. Griesser, R.C. Chatelier, T.R. Gengebach, G. Johnson, J.G. Steele, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **5** (1994), 531
- ¹⁸ Y.X. Qui, D. Klee, W. Plüster, B. Severich, H. Höcker, *J. Appl. Polym. Sci.* **61** (1996), 2373
- ¹⁹ M.J. Hampden-Smith, T.T. Kodas, *Chem. Vap. Deposition* **1** (1995), 3
- ²⁰ A. Chilkoti, B.D. Ratner, D. Briggs, *Chem. Mater.* **3** (1991), 51
- ²¹ C.S. Cho, T. Takayama, M. Kunou, T. Alaike, *J. Biomed. Mat. Res.* **24** (1990), 1369
- ²² A.C. Sperati, „Fluoropolymers, Poly(vinylidene Fluoride) (PVDF)“ in: Handbook of plastic materials and technology, I.R. Irvin (ed.), New York: Wiley/Interscience (1990), 131

-
- ²³ E. Urban, M.W. King, R. Guidoin, G. Laroche, Y. Marois, L. Martin, A. Cardou, Y. Douville, *Asaio J.* **40(2)** (1994), 145
- ²⁴ A. Wada, H. Kubota, H. Hatanaka, H. Miura, Y. Iwamoto, *J. Hand Surgery* **26B** (2001), 212
- ²⁵ K. Junge, U. Klinge, H. Peltroche, B. Klosterhalfen, V. Shumpelick, *CAB 2002*, Arbeitstagung Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, Berlin (2002)
- ²⁶ ACTO, DE Patent 100 59 852.8-35 (2001)
- ²⁷ G. Laroche, Y. Marois, M. Therrien, L. Martin, E. Urban, G. Paré, M. King, R. Guidoin, *Artif. Org.* **19** (1995), 1190
- ²⁸ G.J. Ross, J.F. Watts, M.P. Hill, P. Morrissey, *Polymer* **41** (2000), 1685
- ²⁹ G. Laroche, Y. Marrois, R. Guidoin, M.W. King, L. Martin, T. How, Y. Douville, *J Biomed. Mat. Res.* **29** (1995), 1525
- ³⁰ T. Yoshika, D. Mirch, K.C. Wright, S. Wallace, *American Journal of Radiology* **15** (1988), 673-8.
- ³¹ I.K. de Scheerder, K.L. Wilzek, E.V. Verbeken, J. Vandorpe, P.N. Lan, E. Schacht, H. de Gesst, J. Piessens, *Atherosclerosis* **114** (1995), 105.
- ³² T. Roeren, O.J. Garcia, J.C. Palmaz, C.R. Rees, F.O. Tio, *Radiology* **174** (1990), 1069
- ³³ R.S. Gammon, "Bioabsorbable Endovascular Stent Protheses" in *Coronary Stents*, U. Siegwart and G.I. Frank, Springer Verlag, Berlin (1992)
- ³⁴ D. Klee, J. Lahann, W. Plüster, „Dünne Beschichtungen auf Biomaterialien“ in: *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*, E. Winntermantel, S.-W-Ha, Springer Verlag, Berlin (2002)
- ³⁵ J. Lahann, D. Klee, H. Thelen, H. Bienert, D. Vorwerk, H. Höcker; *J. Materials Science: Materials in Medicine* **10** (1999), 443
- ³⁶ H. Mark, N. Bikales, C. Overberger, G. Menges, *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, J. Wiley & Sons, New York, (1985), Vol. 17, S. 1015.
- ³⁷ G. Surendran, M. Gazicki, H. Yasuda, *J. Polymer Sci. Part A* **24**, (1986), S. 2089.
- ³⁸ J.Lahan, persönliche Mitteilung.
- ³⁹ M. Meichsner, R. Nischke, R. Rochotzky, M. Zeuner, *Surface und Coatings Technology* **74-75** (1995), 227
- ⁴⁰ M.R. Wertheimer, M. Moisan, *J. Vac. Sci. Technol.* **3** (1985), 2634
- ⁴¹ P.W. Rose, E.M. Liston, *Plastic Engineering* **10** (1985), 42
- ⁴² N. Inagaki, S. Tasaka, M. Masamoto, *J. Appl. Polym. Sci.* **46** (1995), 135
- ⁴³ M. Suzuki, A. Kishida, H. Iwata, Y. Ikada, *Macromolekules* **19** (1986), 1804
- ⁴⁴ J.R. Mac Calum, „Comprehensive Polymer Science“, G. Allen (ed), Pergamon Press, Oxford (1989)
- ⁴⁵ A.S. Hoffman, *Artif. Organs* **16** (1992), 43

-
- ⁴⁶ S.M. Slack, T.A. Horbert, *J. Colloid Interface Sci.* **124** (1998) Nr. 2, 535
- ⁴⁷ H. Elwing, P. Tengwall, A. Askendal, I. Lundstrom, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **3** (1991) Nr. 1, 7
- ⁴⁸ M. Houska, E. Brynda, *J. Colloid Interface Sci.* **188** (1997), 243
- ⁴⁹ A.L. Bailly, A. Laurent, H. Lu, I. Elalami, P. Jacob, O. Mundler, J.J. Merland, A. Lautier, J. Soria, C. Soria, *J. Biomed. Mat. Res.* **30** (1996), 101
- ⁵⁰ K. Park, D.F. Mosher, S.L. Cooper, *J. Biomed. Mat. Res.* **20** (1986), 589
- ⁵¹ W.G. Pitt, K. Park, S.L. Cooper, *J. Colloid Interface Sci.* **111** (1986), 343
- ⁵² L. Vroman, *Federation Proceedings* **30** (1971), 1494
- ⁵³ J.D. Andrade: „Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers“, Vol. 2: Protein Adsorption, Plenum Press, New York (1985)
- ⁵⁴ D.L. Coleman, D.E. Gregonis, J.D. Andrade, *J. Biomed. Mat. Res.* **16** (1982), 381
- ⁵⁵ F. Grinnell, M.K. Feld, *J. Biol. Chem.* **257** (1982), 4888
- ⁵⁶ T. Okama, S. Nishiyama, L. Shinohara, T. Akaike, Y. Sakuria, K. Kataoka, T. Tsuruta, *J. Biomed. Mat. Res.* **15** (1981), 383
- ⁵⁷ W. Norde, J. Lyklema, *J. Biomat. Sci. Pol. Ed.* **2(3)** (1991), 183
- ⁵⁸ B.D. Ratner, *J. Biomed. Mater. Res.* **27** (1993), 837
- ⁵⁹ J. Andrade, V. Hlady, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **516** (1987), 172
- ⁶⁰ T.A. Horbert, J.L. Brash (eds.), „Proteins at Interfaces II“, ACS Symp. Ser. Vol. **602** ACS, Washington DC (1995)
- ⁶¹ T.A. Horbert, „Proteinadsorption on Biomaterials“ in Biomaterials: Interfacial Phenomena and Applications, S.L. Cooper and N.L. Peppas (eds.), Am. Chem. Soc., Washington, DC (1982)
- ⁶² R. Johnson, D. Harrison, M. Tucci, A. Tsao, M. Lemos, A. Puckett, J.L. Hughes, H. Benghuzzi, *Biomed. Sci. Instrum.* **34** (1997), 47
- ⁶³ L. Tang, T.A. Jennings, J.W. Eaton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (1998), 8841
- ⁶⁴ G.W. Bos, N.M. Scharenborg, A.A. Poot, G.H. Engbers, T. Beugeling, W.G. van Aken, J. Feijen, *J. Biomed. Mat. Res.* **44(3)** (1999), 330
- ⁶⁵ A. Kidane, K. Park, *J. Biomed. Mat. Res.* **48** (1999), 640
- ⁶⁶ P. Kingshott, H.A. St John, H.J. Griesser, *Anal. Biochem.* **273(2)** (1999), 156
- ⁶⁷ S. Zhang, G. Wright, Y. Yang, *Biosens. Bioelectron.* **15**, (2000), 273
- ⁶⁸ H.-D. Knauth, F. Schroeder, Berichte aus dem Zentrum f. Meeres- und Klimaforschung d. Univ. Hamburg **19** (1992), 74
- ⁶⁹ B.D. Ratner, „An Introduction to Materials in Medicine“, in Biomaterials Science, B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Shoen, J.E. Lemons (eds.), Academic Press, San Diego (1996)

-
- ⁷⁰ P. Kingshott, H.J. Griesser, „Surfaces that Resist Bioadhesion“ in *Curent Oppinion in Solid State & Material Science*, B.D. Ratner, L. Hench (eds.), Vol. 4(3) (1999)
- ⁷¹ D. Beyer, W. Knoll, H. Ringsdorf, J.-H. Wang, R.T. Timmons, P. Sluka, *J. Biomed. Mater. Res.* **36** (1997), 181
- ⁷² Y.S. Lin, V. Hlady, C.-G. Gölander, *Colloids and Surf. B: Biointerfaces* **3** (1994), 49
- ⁷³ E. Uchida, Y. Ujama, Y. Ikada, *Langmuir* **10** (1994), 481
- ⁷⁴ K. Emoto, J.M. Harris, J.M. van Alstine, *Anal. Chem.* **68** (1996), 3751
- ⁷⁵ C. Brink, E. Osterberg, K. Holmberg, F. Tiberg, *Colloid Surf.* **66** (1992), 149
- ⁷⁶ S.L. Mc Arthur, K.M. Mc Lean, P. Kingshott, H.A.W. St John, R.C. Chatelier, H.J. Griesser, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **17** (2000), 37
- ⁷⁷ K. Ishihara, H. Miyazaki, T. Kurosaki, N. Nakabayashi, *J. Biomed. Mat. Res.* **29** (1995), 181
- ⁷⁸ L. Ruiz, J.G. Hilborn, D. Leonard, H.J. Mathieu, *Biomaterials* **19** (1998), 987
- ⁷⁹ J.R. Koegh, F.F. Valender, J.W. Eaton, *J. Biomed. Mat. Res.* **26(4)** (1992), 441
- ⁸⁰ P. Kingshott, H.J. Griesser, *Curr. Opinion in Solid State Mat. Sci.*, in press
- ⁸¹ R. Kjellander, E. Florin, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **77** (1981), 2053
- ⁸² J.M. Harris, „Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications“, Plenum Press, New York (1992)
- ⁸³ A. Polson, G.M. Potgieter, *Biochim. Biophys. Acta* **82** (1964), 463
- ⁸⁴ P.W. Chun, M. Fried, E.E. Ellis, *Anal. Biochem.* **19** (1967), 481
- ⁸⁵ S. Zalipsky, *Adv. Drug Delivery Rev.* **16** (1995), 157
- ⁸⁶ F.M. Veronese, *Biomaterials* **22** (2001), 405
- ⁸⁷ R.A. Scott, N.A. Peppas, *Biomaterials* **20** (1999), 1371
- ⁸⁸ S.E. Dunn, A. Brindley, *Pharm. Res.* **11(7)** (1994), 1106
- ⁸⁹ V. Carelli, G. Di Colo, *J. Controlled Release* **33** (1995), 153
- ⁹⁰ S. Zalipsky, C. Gillion, A. Zilkha, *Eur. Polym. J.* **19(12)** (1983), 1177
- ⁹¹ N.P. Desai, J.A. Hubbell, *J. Biomed. Mat. Res.* **25** (1991), 829
- ⁹² M. Amiji, K. Park, *J. Biomat. Sci. Polymer Ed.* **4(3)** (1993), 217
- ⁹³ E. Tziampazis, J. Kohn, *Biomaterials* **21** (2000), 511
- ⁹⁴ J.A. Neff, K.D. Caldwell, P.A. Tresco, *J. Biomed. Mat. Res.* **40** (1998), 511
- ⁹⁵ M. Malmsten, B. Lassen, K. Holmberg, V. Thomas, *J. Colloid Interface Sci.* **177** (1996), 70
- ⁹⁶ L. Lestel, H. Cheradame, S. Boileau, *Polymer* **31** (1990), 1154
- ⁹⁷ D.W. Grainger, S.W. Kim, J. Feijen, *J. Biomed. Mat. Res.* **22** (1988), 231
- ⁹⁸ M.S. Sheu, A.S. Hoffman, J. Feijen, *J. Adhesion Sci. Technol.* **6** (1992), 95

-
- ⁹⁹ J.H. Lee, H.B. Lee, J.D. Andrade, *Prog. Polym. Sci.* **20** (1995), 1043
- ¹⁰⁰ E. Brinkman, A. Poot, L.vd Does, A. Bantjes, *Biomaterials* **11** (1990),200
- ¹⁰¹ K. Fuimoto, H. Inoue, Y. Ikada, *J. Biomed. Mat. Res.* **27** (1993), 1559
- ¹⁰² J.H. Lee, B.J. Jeong, H.B. Lee, *J. Biomed. Mat. Res.* **34** (1997), 105
- ¹⁰³ K. Bergström, K. Holmberg, A. Safran, A.S. Hoffman, M.J. Edgell, A. Kozlowski, B.A. Hovanes, J.M. Haris, *J.Biomed. Mat. Res.* **26** (1992),779
- ¹⁰⁴ L. Litauszki, L. Howard, L. Salvati, P.J. Tarcha, *J. Biomed. Mat. Res.* **35** (1997), 1
- ¹⁰⁵ D.H. Napper, *J. Colloid Interf. Sci.* **58** (1977), 390
- ¹⁰⁶ A. Mansoor, K. Park, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **4** (1993), 217
- ¹⁰⁷ E.W. Merrill, E.W. Salzman, S. Wan, N. Mahmud, L. Kushner, J.N. Lindon, J. Curme, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **28** (1982), 482
- ¹⁰⁸ Y. Ito, Y. Imanishi, *CRC Crit. Revs. Biocomp.* **5** (1989), 45
- ¹⁰⁹ J.D. Andrade, V. Hlady, S.-I. Jeon, „Hydrophilic Polymers, Performance with Environmental Acceptance“, J.E. Glas (ed.), Am. Chem. Soc. Advances in Chemistry Series (1996)
- ¹¹⁰ C. Foa, M. Soler, A.M. Benoliel, B. Bongrand, *J. Mat. Sci.: Mater. Med.* **7** (1996), 141
- ¹¹¹ J.H. Lee, H.B. Lee, J.D. Andrade, *Prog. Polym. Sci.* **20** (1995), 1043
- ¹¹² J.D. Andrade, V. Hlady, S.I. Jeon, *Adv. Chem. Ser.* **248** (1996), 51
- ¹¹³ J.N. Israelachvili, *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (1997), 8399
- ¹¹⁴ S. Nagaoka, A. Nakao, *Biomaterials* **11** (1990), 119
- ¹¹⁵ S.I. Jeon, J.H. Lee, J.D. Andrade, P.G. de Gennes, *J. Colloid Interface Sci.* **142** (1991), 149
- ¹¹⁶ S.I. Jeon, .D. Andrade, *J. Colloid Interface Sci.* **142** (1991), 159
- ¹¹⁷ I. Szleifer, *Physica A* **244** (1997), 370
- ¹¹⁸ T. Mc Pherson, A. Kidane, I. Szleifer, K. Park, *Langmuir* **14** (1998), 176
- ¹¹⁹ A. Halperin, *Langmuir* **15** (1999), 2525
- ¹²⁰ S.L. NeGurk, R.J. Green, G.H.W. Sanders, M.C. Davies, C.J. Roberts, S.J.B. Tendler, P.M. Williams, *Langmuir* **15** (1999), 5136
- ¹²¹ K.L. Prime, G.M. Whitesides, *Science* **252** (1991), 1164
- ¹²² P. Harder, M. Grunze, R. Dahint, G.M. Whitesides, P.E. Laibins, *J. Phys. Chem.* **102** (1998), 426
- ¹²³ C.G. Golender, J.N. Herron, K. Lim, P. Claesson, P. Stenius, J.D. Andrade, Biotechnical and Biomedical Applications in Polyethylene Glycol Chemistry, J.M. Harris (ed.), Plenum Press, New York (1992), 221
- ¹²⁴ T. de Vringer, J Joosten, H. Junginger, *Colloid Polym. Sci.* **264** (1986), 264

- ¹²⁵ P.R. Sundararajan, in *Physical Properties of Polymer Handbook*, J.E. Mark (ed.), AIP Press, New York (1996), 218
- ¹²⁶ D.J. Irvine, A.M. Mayes, S.K. Satija, J.G. Barker, S.J. Sofia-Allgor, L.G. Griffith, *J. Biomed. Mater. Res.* **40** (1998), 498
- ¹²⁷ F.E. Baley, J.V. Koleske, *Non-ionic Surfactants: Physical Chemistry*, M.J. Schick (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York (1987), 927
- ¹²⁸ R.E. Marchant, S. Yuan, G. Szakalas-Gratzl, *J. Biomat.er. Sci. Polym. Edn.* **6** (1994), 549
- ¹²⁹ E. Österberg, K. Bergström, K. Holmberg, J.A. Riggs, J.M. van Alstine, T.P. Schuman, N.L. Burns, J.M. Haris, *Colloid Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* **77** (1995), 159
- ¹³⁰ O. Larm, R. Larsson, P. Olsson, *Biomat. Med. Dev. Art. Org.* **29** (1983), 161
- ¹³¹ M Morra, C. Cassineli, *J. Biomater.Sci. Polymer Edn.* **10(10)** (1999), 1107
- ¹³² E. Österberg, K. Bergström, K. Holmberg, T.P. Schuman, J.A. Riggs, N.L. Burns, J.M. van Alstine, J.M. Harris, *J. Biomed. Mat. Res.* **29** (1995), 741
- ¹³³ S.P. Massia, J. Stark, D.S. Letbetter, *Biomaterials* **21** (2000), 2253
- ¹³⁴ N. Weiß, D. Klee, H. Höcker, *Biomaterialien* **2 (2/3)** (2001), 81
- ¹³⁵ Du Pont de Nemours, Brit. Patent 590 817 (1947), *Chem. Abstr.* **42**, 794a
- ¹³⁶ Pennsalt, U.S. Patent 3 031 437 (1962); H. Iseron *Chem. Abstr.* **56**, 3638f
- ¹³⁷ Kureha Chem. Ind., Jap. Patent 6937 607 (1969); Y. Toyota, N. Sakakuki, *Chem. Abstr.* **80**, 27691a
- ¹³⁸ J.L. Koenig, „Chemical Microstructure of Polymer Chains“, Willey-Interscience: New York (1980), 288
- ¹³⁹ G.B. Butler, K.G. Olson, C.-L. Tu, *Macromolekules* **17** (1984), 1887
- ¹⁴⁰ J.S. Humphrey, Jr., *The Polymeric Materials Encyclopedia*, J.C. Salomone (ed.), CRC Press Inc. (1996)
- ¹⁴¹ L.E. Nielsen, R.F. Landel, „Stress-Strain behavior and strength“ in “Mechanical Properties of Polymers and Composites, 2nd ed.“, L.L. Faulkner (ed.), Marcel Decker Inc., New York (1994), Chapter 5, 233
- ¹⁴² R. Gregorio, M. Cestari, *J. Polymer Sci.: Part B: Physics* **32** (1994), 859
- ¹⁴³ G.T. Davis, J.E. McKinney, M.G. Broadhurst, S.C. Roth, *J. Appl. Phys.* **49** (1978), 4998
- ¹⁴⁴ R. Hasegawa, M. Kobayashi, H. Tadokoro, *Polym. J.* **3** (1972), 591
- ¹⁴⁵ J.B. Lando, H.G. Olf, A. Peterlin, *J. Polym. Sci. Part. A-1* **4** (1966), 941
- ¹⁴⁶ W.W. Doll, J.B. Lando, *J. Macromol. Sci., Phys.* **B2(2)** (1968), 219
- ¹⁴⁷ W.M. Prest, Jr., D.J. Luca, *J. Appl. Phys.* **49(10)** (1978), 5042
- ¹⁴⁸ G.T. Davis, J.E. Mc Kinney, M.G. Broadhurst, S.C. Roth, *J. Appl. Phys.* **49** (1978), 4998
- ¹⁴⁹ M.A. Bachmann, W.L. Gordon, S. Weinhold, J.B. Lando, *J. Appl. Phys.* **51** (1980), 5095

-
- ¹⁵⁰ N. Karaswa, W.A. Goddard, *Macromolecules* **25** (1992), 7268
- ¹⁵¹ B.J. Jungnickel, „Poly(vinylidene fluoride)“ in *The Polymeric Materials Encyclopedia*, CRC Press, Inc. (1996)
- ¹⁵² Solvay Produktinformation
- ¹⁵³ E. Bernd, persönliche Mitteilung
- ¹⁵⁴ K. Matsushige, T. Takemura, *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* **16** (1978), 921
- ¹⁵⁵ B.-E. El Mohajir, N. Heymans, *Polymer* **42** (2001), 5661
- ¹⁵⁶ K. Nakagawa, Y. Ishida, *J. Polym. Sci., Polym. Physics Ed. Band 11* (1973), 2153
- ¹⁵⁷ K. Knutson, D.J. Lyman, „Surface Infrared Spectroscopy“ in „Surface and Interfacial Aspects of Biomedical polymers“, J.D. Andrade (ed.), Plenum Press, New York, Vol. 1: „Surface Chemistry and Physics“ (1985), 105
- ¹⁵⁸ M. Kobayashi, K. Tashiro, H. Tadokoro, *Macromolekules* **8** (1975), 158
- ¹⁵⁹ L. Lauchlan, J.F. Rabolt, *Macromolecules* **19** (1986), 1049
- ¹⁶⁰ W.F. Gorham, *J. Polym. Sci. Part A-1* **4**, (1966), S. 3027.
- ¹⁶¹ P. Kramer, H. Yasuda, *J. Polymer Sci. Part A* **22** (1984), 475.
- ¹⁶² J. Lahann: Verfahren zur Ausrüstung von Metallimplantaten mit bioaktiven Oberflächen. Shaker-Verlag, Dissertation an der RWTH-Aachen, 1998, ISBN 3-8265-4496-X.
- ¹⁶³ J. Lahann, D. Klee, H. Höcker, *Macromol. Rapid Commun.* **19** (1998), 441-4.
- ¹⁶⁴ C.A. Coulson, D.P. Craig, A. Maccoll, A. Pullman, *Discuss. Faraday Soc.* **2**, (1947), S. 36.
- ¹⁶⁵ V. Bockelheide, *Top. Curr. Chem.* **113**, 1983, 87-139.
- ¹⁶⁶ M. Swarc, *J. Polym. Sci.* **6** (1951), 319.
- ¹⁶⁷ V. Bokelheide, *Top. Curr. Chem.* **113** (1983), 87
- ¹⁶⁸ C.A. Coulson, D.P. Craig, A. Maccoli, A. Pullman, *Discuss. Faraday Soc.* **2** (1947), 36
- ¹⁶⁹ M. Avram, G. Mateescu, in „Infrared Spectroscopy“, Wiley Interscience, New York, 1972, S. 206
- ¹⁷⁰ F.E. Bailey, J.V. Koleske (Eds.), *Alkylene Oxides and Their Polymers*, Surfactants Sci. Series **35**, Marcel Dekker, New York (1991)
- ¹⁷¹ M. Malmsten, K. Emoto, J.M. van Alsten, *J. Colloid Interf. Sci.* **202** (1998), 507
- ¹⁷² M.-S. Sheu, A.S. Hoffman, J.G.A. Terlingen, J. Feijen, *Clinical Mater.* **13** (1993), 41
- ¹⁷³ P. Wang, K.L. Tan, T. Kang, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **11** (2000), 169
- ¹⁷⁴ P.R. Sundararajan, „Physical Properties of Polymers Handbook“, (J.E. Mark, ed.), AIP Press, New York (1996), 197
- ¹⁷⁵ J.F. Robyt, in *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, H.F. Mark, N.M Bikales, C.G. Overberger, G. Menges (ed.), Wiley, New York Vol.4 (1985), 752

-
- ¹⁷⁶ Whistler, Paschell, „Starch: Chemistry and Technology“, Vol. **1**, New York- London, Academic Press(1965), 451
- ¹⁷⁷ G.C.M. Steffens, L. Nothdurft, G. Buse, H. Thissen, H. Höcker, D. Klee, *Biomaterials*, in Press
- ¹⁷⁸ S.Sano, K. Kato, Y. Ikada, *Biomaterials* **14** (1993), 817
- ¹⁷⁹ C.J. van Delden, J.M. Bezemer, G.H.M. Engbers, J. Feijen, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **8(4)** (1996), 251
- ¹⁸⁰ J. Lahiri, L. Isaacs, J. Tien, M. Whitesides, *Anal. Chem.* **71** (1999), 777
- ¹⁸¹ J.J. Chance, W.C. Purdy, *Langmuir* **13** (1997), 4487
- ¹⁸² N. Weiß, Dissertation RWTH Aachen (2002), in Vorbereitung
- ¹⁸³ D.J. Irvine, A.M. Mayes, S.K. Satija, J.G. Barker, S.J. Sofia-Allgor, L.G. Griffith, *J. Biomed. Mater. Res.* **40** (1998), 498
- ¹⁸⁴ S.L. Mc Arthur, K.M. Mc Lean, P. Kingshott, H.A.W. St John, R.C. Chatelier, H.J. Griesser, *Colloids and Surf. B: Biointerfaces* **17** (2000), 37
- ¹⁸⁵ B. Zhu, T. Eurell, R. Gunawan, D. Leckbrand, *J. Biomed. Mater. Res.* **56** (2001), 406
- ¹⁸⁶ M. Hanna: Matrix-unterstützte laser-desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) und dynamische Kontaktwinkelmessungen nach Wilhelmy zur Charakterisierung von Biomaterialien, Verlag Mainz, Dissertation an der RWTH-Aachen, 2000, ISBN 3-89653-711-3
- ¹⁸⁷ P.B. van Wachem, T. Beugeling, J. Feijen, A.Bantjes, J.D. Detmers, W.G. van Aken, *Biomaterials* **6** (1985), 403
- ¹⁸⁸ H. Shirahama, J. Lyklema, W. Norde, *J. Colloid Interface Sci.* **139(1)** (1990), 177
- ¹⁸⁹ J. Andrade, V. Hlady, *Adv. Polym. Sci.* **79** (1986), 1
- ¹⁹⁰ A.S. Hoffman, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **10** (1999), 1011
- ¹⁹¹ T. Blundell, G. Dodson, D. Hodgkin, D. Mercola, *Adv. Protein Chem.* **26** (1972), 279
- ¹⁹² T. Imoto, L.N. Johnson, A.C.T. North, D.C. Phillips, J.A. Rupley, The enzymes, P.D. Boyer, (ed.), **3**, Academic Press New York, (1972) 665
- ¹⁹³ H.P. Erickson, „Plasma Fibronectin“, J. Mc Donagh (ed.), Marcel Dekker Inc. New York-Basel (1985) 8
- ¹⁹⁴ W. Norde, J. Lyklema, *J. Biomater. Polym. Sci.: Polym. Ed.* **2** (1991), 183
- ¹⁹⁵ N.L. Burns, K. Holmberg, C. Brink, *J. Colloid Interface Sci.* **178** (1996), 116
- ¹⁹⁶ W. Norde, A.C.I. Anusiem, *Colloid Surf.* **66** (1992), 73
- ¹⁹⁷ M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **60** (1988), 2299
- ¹⁹⁸ C.E. McPhee, G.J. Howlett, W.H. Sawyer, *Anal. Biochem.* **275** (1999), 22
- ¹⁹⁹ Y. Feng, D. Klee, H. Höcker, *Macromol. Chem. Phys.* **200** (1999), 2276

-
- ²⁰⁰ M. Karas, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **92** (1989), 805
- ²⁰¹ J.C. Chou, M.J. Kreek, B.T. Chait, *J. Am. Soc. Mass Specrom.* **5** (1994), 10
- ²⁰² S. Rao, F. Aberg, E. Nieves, S.B. Horwitz, G.A. Orr, *Biochemistry* **40** (2001), 2096
- ²⁰³ C.T. Hanston, J.P. Reilly, *Anal. Chem.* **71** (1999), 3397
- ²⁰⁴ M.E. McComb, R.D. Oleschuk, A. Chow, W. Ens, K.G. Standing, H. Perreault, *Anal. Chem.* **70** (1998), 5142
- ²⁰⁵ E.M. Leize, E.J. Leize, M.C. Leize, J.-C. Voegel, A. Van Dorsselaer, *Anal. Biochem.* **272** (1999), 19
- ²⁰⁶ T. Miliotis, G. Makro-Varga, J. Nilsson, T. Canrell, *J. Neurosci. Methods* **109** (2001), 41
- ²⁰⁷ J.S. Andersen, M. Mann, *FEBS Letters* **480** (2000), 25
- ²⁰⁸ O. Vorn, P. Roepstorff, M. Mann, *Anal. Chem.* **66** (1994), 3281
- ²⁰⁹ P. Kingshott, H.A.W. St. John, H.J. Griesser, *Anal. Biochem.* **273** (1999), 156
- ²¹⁰ T. Tarvainen, B. Svarfar, S. Akerman, J. Savolainen, M. Karhu, P. Paronen, K. Järvinen, *Biomaterials* **20** (1999), 2177
- ²¹¹ Hersteller Angabe SIGMA
- ²¹² M. Balcells Camps: Quantitative Beschreibung von Proteinadsorptionsprozessen an Polymeroberflächen mittels ELISA, Shaker-Verlag, Dissertation RWTH Aachen, 1999, ISBN 3-8265-6066-3
- ²¹³ J. Ferrebee, B. Johnson, J. Miethofer, J. Gardella, *Endocrinology* **48** (1951), 270
- ²¹⁴ J.R. Keogh, F.F. Velander, J.W. Eaton, *J. Biomed. Mat. Res.* **26** (1992), 441
- ²¹⁵ A. Kidane, J.M. Szabocsik, K. Park, *Biomaterials* **19** (1998), 2051
- ²¹⁶ J.G. Steele, B.A. Dalton, G. Johnson, P.A. Underwood, *Biomaterials* **16** (1995), 1057
- ²¹⁷ L.C. Knight, S.S. Harwig, M.J. Welch, *J. Nucl. Med.* **18** (1976), 282
- ²¹⁸ J. Wirsching: Kovalente Immobilisierung des Zelladhäsionsmediators Fibronectin an oberflächenfunktionalisiertes PVC-Copolymer für den Einsatz als medizinischer Implantatwerkstoff, Shaker-Verlag, Dissertation an der RWTH Aachen, 1996, ISBN 3-8265-2982-0
- ²¹⁹ Q. Garrett, R.C. Chatelier, H.J. Griesser, B.K. Milthrope, *Biomaterials* **19** (1998), 2175
- ²²⁰ M.V. Sefton, G.M. Antonacci, *Diabetes* **33** (1984), 674

Lebenslauf

Name Zahida Ademovic
Geburtsdatum 17. Mai 1969
Geburtsort Odzak, Bosnien-Herzegowina
Staatsangehörigkeit kroatisch

Schulbildung

1975 - 1983 Grundschule Odzak
1983 - 1987 Mittlere Schule Odzak
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

10/1987 Beginn des Studiums zum
Diplom-Ingenieur der Chemischen Technologie an der
Universität Zagreb, Zagreb, Kroatien

03/1993 - 09/1993 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Elektrochemie
Thema: „*Heterocyclic organic compounds as iron pickling
inhibitors*“

09/1993 Abschlussprüfung zum Dipl.-Ing. der Chemischen Technologie

05/1999 – 09/2002 Promotionsstudium am Lehrstuhl für Textilchemie und
Makromolekulare Chemie der Rheinisch-
Westfälischen Technischen Hochschule Aachen,
Prof. Dr. rer. nat. Hartwig Höcker
*"Oberflächenmodifizierung von Polyvinylidenfluorid zur
Minimierung der Proteinadsorption"*

13.09.2002 Tag der mündlichen Prüfung