

Aus dem Bereich
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Entwicklung eines Implantat- und Biomaterials auf Basis von Polydimethylsiloxan und Alginat

Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Theoretischen Medizin (Dr. rer. med.)

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2016

vorgelegt von: KATRIN BIERKANDT, geb. PETER
geboren am: 09.05.1982 in Ilmenau

Tag des Kolloquiums:

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:

Berichterstatter:

Prof. Dr. Günter R. Fuhr

Prof. Dr. Jutta Engel

Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Kompositmaterial mit interpenetrierendem Netzwerk auf Basis von Polydimethylsiloxan und Alginat entwickelt. Im Vergleich zu reinem Silikon weist das neue Material eine deutlich verbesserte Benetzbarkeit auf und ist zudem durchlässig für wässrige Substanzen. Es wurde eingehend auf seine chemischen, mechanischen und elektrischen Eigenschaften untersucht. Zytotoxizitätstests belegten eine gute Zellverträglichkeit. In *in-vitro*-Tests konnte das Komposit erfolgreich mit in Wasser gelösten Wachstumsfaktoren funktionalisiert werden. Des Weiteren ist es gelungen, das Material mit Zellen zu besiedeln und diese im Inneren des Komposits wachsen zu lassen. Mittels eines mehrtägigen HET-CAMs wurde die Biokompatibilität des PDMS-Alginat-Komposits nachgewiesen. Das Komposit wäre daher grundsätzlich als Implantatmaterial geeignet und könnte darüber hinaus als diffusionsbasiertes Wirkstoffabgabesystem, wie auch als zellbasiertes Wirkstoffabgabesystem genutzt werden. Seine praktische Tauglichkeit wurde über den Aufbau eines Prototyp-Implantats demonstriert. Neben seiner Nutzung als Implantatwerkstoff besitzt das Komposit das Potential, auch in anderen Bereichen der Medizintechnik, beispielsweise als Wundverbandsmaterial, eingesetzt zu werden.

Abstract

In the present thesis, a composite material comprising an interpenetrating network based on poly(dimethylsiloxane) and alginate was developed. Compared to native silicone, the new material exhibits a considerably increased wettability and is additionally permeable for water soluble substances. Its chemical, mechanical and electrical properties were closely examined. The testing of its cytotoxicity revealed a good cell tolerance. Furthermore, in *in-vitro* tests the composite could be successfully functionalized with growth factors dissolved in water. It was also possible to colonize the material with cells that were able to grow inside the composite. The biocompatibility of the PDMS-alginate-composite was proved by means of a several days lasting HET-CAM. Therefore, the composite is a valid candidate to be used as an implant material and might be additionally deployed as a diffusion based drug delivery system as well as a cell based drug delivery system. Its functional suitability was verified by the manufacture of a prototype implant. Besides its application as an implant material, the composite exhibits the potential to be used also in other areas of medical engineering, e.g. as wound dressing material.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Polydimethylsiloxan (PDMS)	1
1.2	Biokompatibilität von PDMS und Fremdkörperreaktionen	3
1.3	Biofunktionalisierung	5
1.4	Besiedelung mit Zellen	7
1.5	Interpenetrierende Netzwerke (IPNs)	8
1.6	Alginat	9
1.7	Zielstellung	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Materialien	13
2.1.1	Geräte	13
2.1.2	Einwegmaterialien	15
2.1.3	Software	16
2.1.4	Reagenzien	17
2.1.5	Kits und Gebrauchslösungen	19
2.1.6	Zellen und Nährmedien	19
2.1.7	Fertilisierte Hühnereier	19
2.2	Methoden	20
2.2.1	Herstellung von Silikon-Alginat-Kompositen	20
2.2.2	Herstellung von Gussformen	20
2.2.3	Viskositätsmessung	21
2.2.4	Konfokale Raman-Mikroskopie	21
2.2.5	Fluoreszenz-Mikroskopie	22
2.2.6	Rasterelektronenmikroskopie	22
2.2.7	Zeitrafferaufnahmen	22
2.2.8	Härtemessung	23
2.2.9	Zugprüfung	23
2.2.10	Diffusionstests	25
2.2.11	Widerstandsmessung und elektrischen Leitfähigkeit	27
2.2.12	Wasserkontaktwinkelmessung	29
2.2.13	Zytotoxizitätstest	30
2.2.14	Biofunktionalisierung des Komposits mit NGF	31
2.2.15	Oberflächenmodifikation von PDMS	32
2.2.16	Besiedelung von PDMS-Schwämmen mit Zellen	33
2.2.17	Einbettung von Zellen in die Alginatphase des Komposits	34
2.2.18	HET-CAM	35

2.2.19	Anfertigung und Auswertung von Gewebeschnitten	36
2.2.20	Aufbau einer implantierbaren Elektrode aus Komposit	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Vernetzung von PDMS und Alginatlösung zu einem Komposit	41
3.1.1	Zusammensetzung des Komposits	41
3.1.2	Innere Struktur	43
3.1.3	Vernetzungsprozess und Oberflächengrenzschicht	46
3.2	Charakterisierung des PDMS-Alginat-Komposits	49
3.2.1	Porengrößen	50
3.2.2	Diffusion wässriger Moleküle	52
3.2.3	Mechanische Stabilität	56
3.2.4	Spezifischer Widerstand und elektrische Leitfähigkeit	59
3.2.5	Wasserkontaktwinkel	62
3.2.6	Zytotoxizitätstest	65
3.3	Biofunktionalisierung des Komposits	67
3.3.1	NGF-Diffusion aus dem Komposit: <i>In-vitro</i> -Test	67
3.3.2	Bioaktivierung der PDMS-Oberfläche	71
3.4	Besiedelung des Komposits mit Zellen	73
3.4.1	Wachstum von Zellen im bioaktivierten PDMS-Schwamm	73
3.4.2	Einbettung von Zellen in die Alginatphase des Komposits	76
3.5	Körperverträglichkeit des Komposits: HET-CAM	78
3.6	Implantierbare Elektrode aus Silikon-Alginat-Komposit	86
4	Diskussion	91
4.1	Silikon-Alginat-Komposit als Biomaterial	92
4.2	Biofunktionalisierung und Wirkstoffabgabe	94
4.3	Zellbesiedelung	96
4.4	Körperverträglichkeit	98
4.5	Silikon-Alginat-Komposit als Implantatwerkstoff	101
4.6	Weitere Anwendungsmöglichkeiten	103
4.6.1	Anwendung als Gradientenmaterial	103
4.6.2	Anwendung als Wundverbandsmaterial	105
4.6.3	Anwendung als Mikroträger für Zellen in Bioreaktoren	109
5	Zusammenfassung und Ausblick	113
A	Anhang	117
A.1	Korrelation Raman-mikroskopischer Bilder	117
A.2	Herstellung von Kompositen mit Härtegradient	118
A.3	Bestimmung der MVTR und Absorptionsfähigkeit	119
A.4	Herstellung von Wundaufgabenbeispielen	120
A.5	Herstellung von Mikroträgern	121
	Literaturverzeichnis	123

Inhaltsverzeichnis**v****Veröffentlichungen****137****Danksagung****139**

Abkürzungsverzeichnis

ABS	Acrylnitril-Butadien-Styrol
APTES	3-(Triethoxysilyl)-propylamin
BaCl₂	Bariumchlorid
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
CAM	Chorion-Allantois-Membran
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix
ED	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiographie
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fötale Kälberserum
GA	Glutaraldehyd
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HET-CAM	Hühnerei-Test an der Chorion-Allantois-Membran
HS	Pferdeserum
hUC-MSCs	human umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stem cells
IPN	interpenetrierendes Netzwerk
Laser	light amplification by stimulated emission of radiation
LSL	Lohmann selected Leghorn
NaCl	Natriumchlorid
NGF	Nervenwachstumsfaktor
PAAc	Polyacrylsäure
PAAm	Polyacrylamid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDMS	Polydimethylsiloxan
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin-Lösung
PHEMA	Polyhydroxyethylmethacrylat
PLGA	Polylactid-Co-Glycolid
PNIPAAm	Poly-N-Isopropylacrylamid
PMAA	Polymethacrylsäure
PMPC	Polymethacryloyloxyethylphosphorylcholin
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrrolidon

REM	Rasterelektronenmikroskopie
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
semi-IPN	semi-interpenetrierendes Netzwerk
SDS	Natriumdodecylsulfat
VN	Vitronectin
MVTR	Wasserdampftransmissionsrate

1 Einleitung

Silikone kommen in der (Bio-)Medizintechnik sehr vielfältig zum Einsatz. Ihr Spektrum reicht von mikrofluidischen Systemen für Molekularbiologie und Zellkultur über äußerlich am Menschen angewandte Produkte bis hin zu dauerhaft in den Körper eingebrachte Prothesen. Hierzu zählen beispielsweise Drainagen, intraokulare Linsen, die Ummantelung von Weichteilimplantaten wie Brust-, Muskel- oder Hodenimplantaten, Implantate für Mund-, Kiefer- und Gesichtsrekonstruktionen, künstliche Speiseröhren, Herzklappen und Fingergelenke [19, 182]. Implantate mit elektronischen Komponenten werden zum Schutz vor im Körper auftretenden Kräften und Flüssigkeiten ebenfalls häufig mit Silikon gekapselt. Beispiele hierfür sind die Beschichtung von Herzschrittmachern, Cochlea-Implantaten und Spulen von Mikroimplantaten [182, 89].

Obwohl Silikon allgemein als biokompatibel gilt, erfährt es durch einige seiner Eigenschaften Nachteile, die seine Verträglichkeit mit dem biologischen System einschränken können. Dies kann bei implantierten Produkten narbige, teilweise schmerzhafte Verhärtungen des Bindegewebes, chronische Entzündungen oder einen Funktionsverlust des Implantats bedeuten.

Für ein besseres Verständnis, weshalb es zu solchen Fremdkörperreaktionen kommen kann, werden in den folgenden einleitenden Abschnitten die Eigenschaften des Silikons PDMS und das Verhalten des Organismus bei einer Implantation beschrieben. Anschließend folgt ein Überblick über Möglichkeiten zur Verbesserung der Biokompatibilität. Weiterführend wird das Hydrogel Alginat näher vorgestellt. Es ist ein Polymer, das ebenfalls häufig in der Medizintechnik Anwendung findet. Unter anderem wird es für die Entwicklung und Herstellung von Kontaktlinsen, Kathetern, Biosensoren, Wundabdeckungen und Wirkstoffabgabesystemen eingesetzt, sowie für die Kryokonservierung und Geweberegeneration verwendet [113, 137, 96]. Gegenüber dem Silikon besitzt es einige konträre Eigenschaften, die sich jedoch bei einer Kombination beider Materialien miteinander ergänzen könnten.

Auf Grundlage der nachstehenden Informationen werden im Anschluss die Ziele der Arbeit definiert.

1.1 Polydimethylsiloxan (PDMS)

Polydimethylsiloxan, kurz PDMS, ist das einfachste Silikon. Es ist Ausgangsmaterial vieler Medizinprodukte und das bevorzugte Silikon für Implantate auf Silikonbasis. An seinem anorganisches Rückgrat, bestehend aus sich abwechselnden Silizium- und Sauerstoffatomen (-Si-O-, Siloxan), sind zwei Methylgruppen gebunden (Abb. 1.1a).

PDMS besitzt die klassischen Eigenschaften der Silikone und ist damit ein thermisch und physikalisch sehr stabiles Polymer, wasserabweisend und ein guter Isolator.

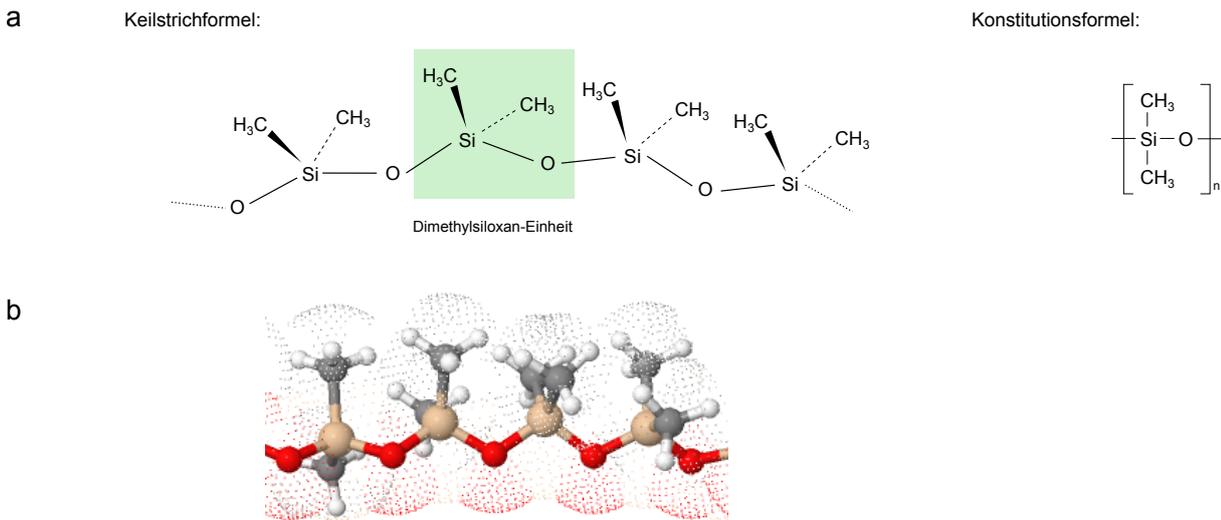


Abbildung 1.1: a) chemische Darstellung von Polydimethylsiloxan; b) im entsprechenden 3-dimensionalen Model sind die relativ großen Abstände zwischen den Siliziumatomen (sandfarben) und Sauerstoffatomen (rot) verdeutlicht. Die Kohlenstoffatome sind grau und die Wasserstoffatome weiß; die Oberfläche der Atome ist durch Punkte symbolisiert.

Es hat seinen Glasübergang bei -125°C , ist geruchlos, farblos-transparent und – außer bei extremen pH-Werten – chemisch unreaktiv [22].

Im linearen, unvernetzten Zustand ist PDMS von viskoser, öliger Konsistenz. Solches Silikonöl wird in der Medizin vor allem als gasreduzierendes Mittel im Magen-Darm-Trakt, als Entschäumer bei Tensidvergiftungen, als Gleitmittel, als Zusatz für topische Produkte und bei Läusebefall eingesetzt [23]. Durch Vernetzung (Vulkanisierung) der linearen Polymerketten des PDMS können diese zu einem 3-dimensionalen Netzwerk verknüpft werden. Vollständig vernetztes PDMS weist ein gummiartiges Verhalten auf. Die hohe Elastizität und Biegsamkeit, die auch bei tiefen Temperaturen bis zu -120°C erhalten bleibt, resultiert aus einem sehr großem Si-O-Si-Bindungswinkel von 130° – 150° , relativ großen Bindungsabständen zwischen den Si-O-Atomen von $0,163\text{ nm}$, schwachen zwischenmolekularen Kräften und einer nahezu freien Rotationsmöglichkeit der Methylgruppen um die Si-O-Kette (Abb. 1.1b) [19, 82]. Die sehr beweglichen Methylgruppen sind unpolar und orientieren sich leicht zur Oberfläche. Sie schirmen die wegen der Elektronegativität des Sauerstoffs polare Si-O-Kette ab und führen dazu, dass PDMS eine niedrige Oberflächenspannung und einen wasserabweisenden Charakter besitzt [19].

Aufgrund der offenen Struktur des PDMS – bedingt durch die großen Bindungswinkel, die Stellung der Methylgruppen und die schwachen Van-der-Waals-Kräfte – ist viel freies Volumen zwischen den Molekülgruppen vorhanden. Dadurch ist PDMS im Vergleich zu anderen Polymeren sehr gut durchlässig für Gase wie Sauerstoff, Stickstoff, Kohlenstoffdioxid und auch für Wasserdampf, obwohl Wasser in kondensierter Form vom Material abgewiesen wird. Beispielsweise liegt die Permeabilität für Sauerstoff bei

600–800 Barrer¹ und für Kohlenstoffdioxid bei 3.000–3.230 Barrer [122, 148, 15]. Im Vergleich dazu besitzen Polyethylen und Polystyrol für Sauerstoff nur eine Durchlässigkeit von etwa 1–8 Barrer [122]. Die Permeabilität von PDMS für Wasserdampf ist noch wesentlich höher und wird mit 36.000–40.000 Barrer angegeben [122, 121]. Auch für verschiedene niedermolekulare lipophile und hydrophobe Moleküle, wie beispielsweise Steroide, ist PDMS permeabel. Für hochmolekulare und polare Substanzen, wie Proteine und viele andere Wirkstoffe, ist es jedoch nicht durchlässig [99].

1.2 Biokompatibilität von PDMS und Fremdkörperreaktionen

Während der Synthese des PDMS werden hochreine Chlorsilane verwendet, so dass es weitgehend kontaminationsfrei ist und keine Verunreinigungen durch organische Verbindungen oder Schwermetalle enthält [19]. Durch seine Reinheit und Unreaktivität ist es bioinert und wird allgemein gut vom Körper vertragen. Trotzdem können an PDMS-Implantaten Fremdkörperreaktionen auftreten.

Beim Einsetzen eines Materials in einen Körper kommt es noch vor dem direkten Kontakt mit den Körperzellen zu einer spontanen Adhäsion von extrazellulären Proteinen an die Materialoberfläche. Zu diesen zählen vor allem Albumin, Fibrinogen, Fibronectin und Immunglobuline. Zusammen mit koagulierten Blutkörperchen bilden sie eine erste vorübergehende Schicht um den Fremdkörper [9]. Die Proteine üben dabei die Funktion einer provisorischen extrazellulären Matrix aus und werden von den Bindungsrezeptoren einwandernder Immunzellen erkannt. Durch die Abgabe von Cytokinen, Wachstumsfaktoren und chemotaktischen Stoffen wird die lokale Immunantwort aktiviert, wodurch zunächst die akute und später die chronische Entzündungsreaktion einsetzt.

Die Art der sich anfänglich anlagernden Proteine, ihre Menge und Konformation hängen von den Oberflächeneigenschaften des Implantats ab. So scheinen hydrophile, geladene Oberflächen grundsätzlich einen günstigeren Verlauf der Fremdkörperreaktion zu bewirken [176]. An die hydrophobe Oberfläche von PDMS hingegen adsorbieren vor allem ebenfalls hydrophobe Moleküle, die teilweise auch irreversibel adsorbiert werden können [35, 150].

Während der akuten Inflammation wandern innerhalb weniger Stunden bis Tage Neutrophile und Leukozyten zur Implantatstelle. Dort leiten sie die Phagozytose an der Materialoberfläche ein. Da PDMS ein inertes Material und als Implantat für die einzelnen Phagozyten zu groß ist, wird es jedoch nicht abgebaut. Während die Zellen verschiedene Botenstoffe ausschütten, kann am Implantat noch mehr Fibrinogen adsorbieren [134]. Es kommt zur Einwanderung weiterer Immunzellen, wie Monozyten, und die chronische Inflammation als Teil der Fremdkörperreaktion wird ausgelöst. Da-

¹Barrer ist definiert als das Volumen eines Gases, das unter Standardbedingungen pro Zeiteinheit durch eine Membran bestimmter Dicke und Fläche bei gegebener Druckdifferenz durchströmt [143].

$1 \text{ Barrer} = 10^{-10} \frac{\text{cm}^3}{\text{s}} \cdot \frac{\text{cm}}{\text{cm}^2 \cdot \text{cmHg}} \approx 7,5006 \cdot 10^{-18} \frac{\text{m}^3}{\text{s} \cdot \text{m} \cdot \text{Pa}}$

bei differenzieren die Monozyten zu entzündungsregulierenden Makrophagen [9, 104]. Sie beginnen darüber hinaus, zu mehrkernigen Riesenzellen ("foreign body giant cells") zu fusionieren. Gleichzeitig beschleunigen sich neu bildende Blutgefäße die Einwanderung von Zellen. Fibroblasten beginnen, an der Grenzfläche zum Implantat neues Gewebe zu bilden (Granulationsgewebe). Während dieser Phase, die etwa 2–3 Wochen dauert, versuchen die Makrophagen weiterhin den Fremdkörper abzubauen. Da dies bei Implantatmaterialien wie PDMS nicht gelingt, möchte der Organismus den Fremdkörper isolieren. Fibroblasten wandern weiter in das Granulationsgewebe ein und die mehrkernigen Makrophagen entwickeln sich zu mehrkernigen Granulomen. Mit der Zeit wandeln sich einige Fibroblasten zu Myofibroblasten um und sekretieren Prokollagen, das im Extrazellularraum zu Kollagen vernetzt. Das Gewebe wird dadurch zusammengezogen und bildet eine dichte fibröse Kapsel um das Implantat, die nur für wenige Moleküle durchlässig ist [9, 105].

Die Stärke der fibrösen Abkapselung wird von der Ausprägung des Granulationsgewebes beeinflusst [9]. Dabei spielen neben der Regenerationsfähigkeit des Gewebes die Oberflächenstruktur des Implantats, dessen physikalische Eigenschaften (z.B. Gewicht und Materialstruktur) und die mechanische Belastung des neuen Gewebes bei Bewegung eine entscheidende Rolle [177, 142]. Weitergehende, schmerzhafte Verhärtungen des Gewebes oder ein Ansiedeln von Bakterien im Raum zwischen Gewebe und Implantat können letztlich eine Entfernung des Implantats bedingen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Kapselbildung bei Brustimplantaten [11, 25]. Ein anderes Beispiel ist die Entzündung der inneren Schicht von Gelenkkapseln (Synovitis) bei Finger- und Handgelenkprothesen aus Silikon. Sie wird durch kleine Silikonteilchen verursacht, die sich aufgrund der ständigen Druck- und Scherbelastung vom Implantat gelöst haben [138].

Des Weiteren können mechanische Strapazen des Gewebes und chemische Stoffe, die vom Implantatmaterial abgegeben werden, zum Absterben von Zellen an der Implantatseite führen [109]. An diesen Stellen kann der Phosphor der Zellmembranen nicht mehr mit dem Calcium der extrazellulären Flüssigkeit reagieren und es kommt zu Ablagerungen von Calciumphosphat-Kristallen auf der Oberfläche des Implantats (Abb. 1.2). Die Calcifizierungen können die Funktionalität von Implantaten, insbesondere von Implantaten mit beweglichen Teilen, stark einschränken. Bei der Untersuchung von Implantaten für Nasenplastiken wurde herausgefunden, dass Silikon eine Calcifizierung mit der Zeit induziert, die wiederum zu einer morphologischen Veränderung der Zellen führt [65].

Aufgrund der Hydrophobie und geringen Oberflächenenergie des PDMS können viele Zelltypen nicht an der Oberfläche von PDMS anheften [160]. Wenn die umgebenden Zellen nicht adhären können, führt das zur Einleitung ihres Zelltodes (Anoikis). Dies wiederum verstärkt die Makrophagenfusion und Bildung von mehrkernigen Granulomen [9]. Darüber hinaus konnten Vijaya Bhaskar et al. zeigen, dass verschiedene Typen von Makrophagen auf Silikon mit einer signifikant höheren Ausschüttung von entzündlichen und chemotaktischen Cytokinen reagieren als auf das Polystyrol von Zellkulturplatten [165].

An glatten Silikonflächen bildet sich eher eine kontraktile Kapsel als an struktu-

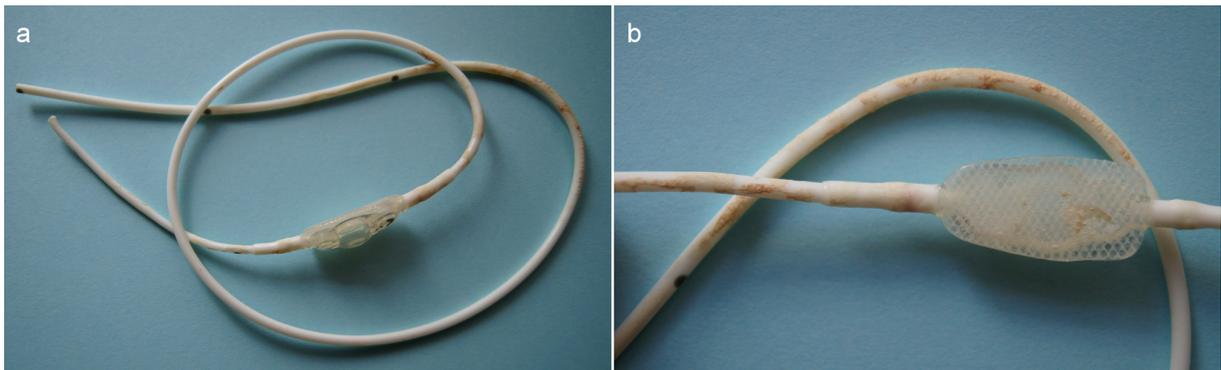


Abbildung 1.2: a) Shuntsystem, das nach 11 Jahren explantiert werden musste, da fibröse Abkapselungen die Schlauch- und Drainageöffnungen verschlossen haben; b) in der Detailansicht sind Calcifizierungen am Schlauch und am Ventil deutlich zu erkennen. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Arnim Zerche, Klinikum Erfurt.

rierten Silikonem. Als Folge besitzen viele Silikonimplantate, v.a. Brustimplantate, mittlerweile eine raue Oberfläche. Dadurch kann sich das Implantat durch “Einwachsen” besser in das umliegende Gewebe integrieren. Kapselbildungen lassen sich damit zwar reduzieren, jedoch nicht vermeiden [47, 159].

Das Ausmaß der Fremdkörperreaktion wird also von der Stärke der akuten und chronischen Entzündung beeinflusst. Für diese spielt die erste adsorbierende Proteinschicht am Implantat eine wichtige Rolle. Die Art der sich anlagernden Proteine, ihre Menge und Konformation hängen wiederum stark von den Oberflächen- und Materialeigenschaften des Implantats ab.

1.3 Biofunktionalisierung

Um die Biokompatibilität zu erhöhen, kann das PDMS auf verschiedene Weise so modifiziert werden, dass es biologische Vorgänge gezielt beeinflusst. Dabei wird das Silikon mit für die jeweiligen Anwendungen maßgeschneiderten Eigenschaften versehen, ohne dass es seine notwendige Beschaffenheit (z.B. optisch, mechanisch, elektrisch) verliert [163]. Entsprechend seines Bestimmungszwecks kann die Biofunktionalisierung beispielsweise eine entzündungshemmende oder antibakterielle Wirkung, eine schnelle Regeneration von Zellen oder eine verbesserte Zellanheftung zum Ziel haben. Ein Schwerpunkt für die Erhöhung der Biokompatibilität liegt häufig in der Reduzierung der Hydrophobizität [52, 1].

Die Biofunktionalisierung von Materialien ist auf verschiedene Weise möglich. Zum einen können Oberflächen durch Änderung ihrer Struktur (z.B. Porosität) oder durch Anbindung biologisch aktiver Moleküle modifiziert werden. Zum anderen gibt es die Möglichkeit, Wirkstoffe in das Material einzubringen, die anschließend freigesetzt werden. Ihre Abgabe kann dabei in Abhängigkeit von der Materialart über verschiedene Mechanismen erfolgen (Abb. 1.3). In den meisten Fällen findet sie über Diffusion statt.

PDMS-basierte diffusive Wirkstofffreisetzungen werden beispielsweise in intravaginalen und subdermalen Kontrazeptiva und in transdermalen Schmerzmittel- und Hormonpflastern angewandt [99, 23]. Andere Materialien hingegen geben ihre Wirkstoffe durch Degradierung des Materials selbst ab, z.B. Polylactid-co-Glycolid (PLGA) [13] oder verschiedene Polyanhydride [86]. Des Weiteren ermöglichen einige Substanzen die Abgabe von Wirkstoffen als Reaktion auf einen äußeren Reiz, beispielsweise bei Änderung des pH-Wertes, der Temperatur, bei Lichtzufuhr oder Anlegen eines elektrischen Feldes [119, 116].

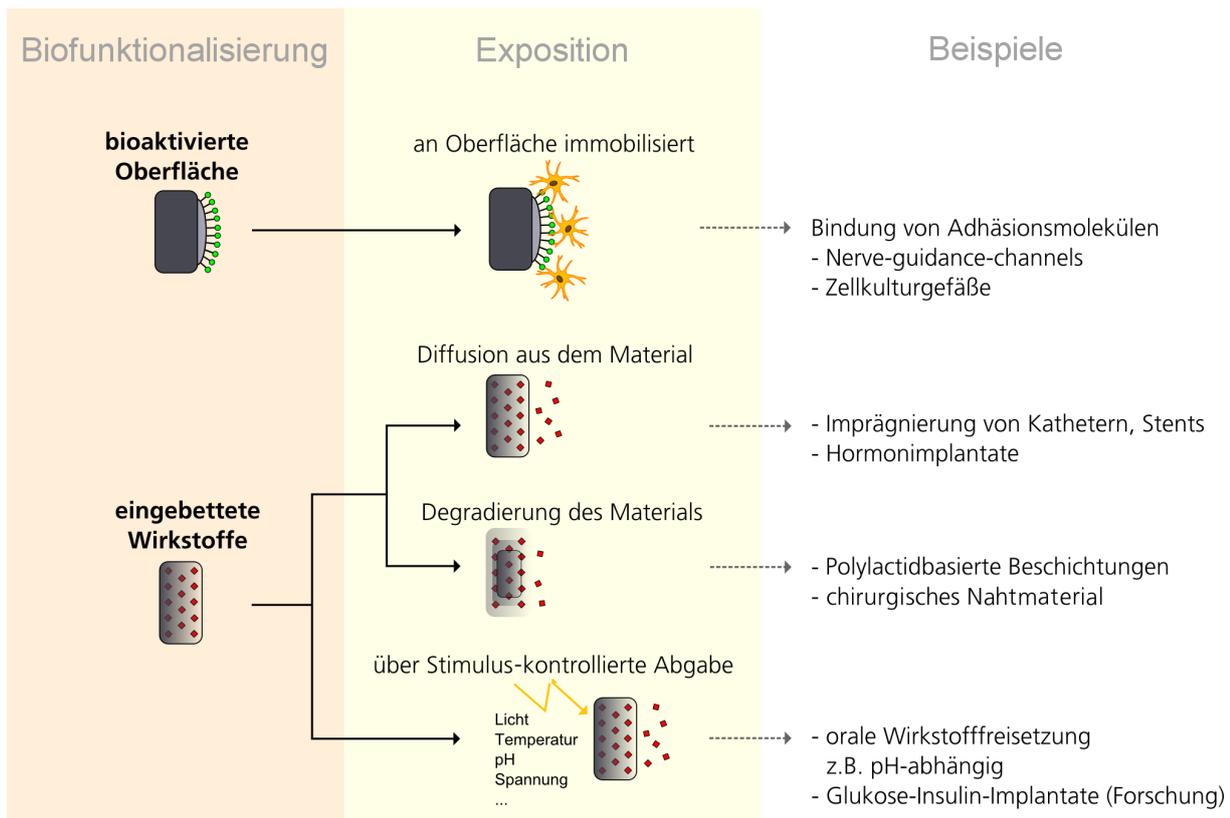


Abbildung 1.3: Möglichkeiten der Biofunktionalisierung eines Materials.

Für die chemische Behandlung der PDMS-Oberfläche gibt es verschiedene Verfahren. So können über oxidative Gasphasenverfahren, wie Niederdruckplasma, UV-Strahlung und Koronaentladung, freie chemische Bindungen und reaktive, funktionelle Gruppen an der PDMS-Oberfläche erzeugt werden. Die Oberflächenenergie wird dabei erhöht und die Benetzbarkeit mit Wasser verbessert [126]. Anschließend werden häufig nasschemische Methoden angewandt, um Moleküle an der PDMS-Oberfläche zu verankern. Zu den nasschemischen Verfahren zählen z.B. die Propfpolymerisation und die Silanisierung mit Alkoxysilanen. Neben der kovalenten Anbindung können Substanzen auch über physikalische Adsorption am PDMS angelagert werden. Hierbei werden ionische Wechselwirkungen und die spezifische Anbindung hydrophober Molekülstrukturen am PDMS genutzt [188, 179].

Chemische Modifikationen der PDMS-Oberfläche sind jedoch häufig nicht langzeitstabil und unterliegen dem Effekt des "hydrophobic recovery". Dafür verantwortlich ist die hohe Beweglichkeit der Molekülketten im PDMS. Zudem können unvernetzte PDMS-Oligomere aus dem Materialinneren des PDMS an dessen Oberfläche diffundieren und die dort aufgebrachtten Moleküle überlagern. Schon leichte thermische und mechanische Beanspruchungen führen zu Rissen in den aufgebrachtten Schichten, durch die die niedermolekularen PDMS-Moleküle an die Oberfläche migrieren können. Diese Reorientierungsprozesse führen meist innerhalb weniger Stunden bis Tage zum Verlust der gewünschten Hydrophilizität [111, 18].

Biofunktionalisierte Materialien haben gegenüber konventionellen Produkten eine höhere Leistungsfähigkeit und besitzen das Potential, dass sowohl der Patientennutzen als auch die Kosteneffizienz von Behandlungen verbessert werden kann. Durch die Möglichkeit lokaler Medikamentenabgabe spielen biofunktionalisierte Materialien in der Medizintechnik eine immer größere Rolle. Die Nachfrage an biofunktionalisierten Materialien für unterschiedliche medizinische Bereiche wächst stetig. Als Beispiel können "drug-eluting" Stents genannt werden: sie wurden 2003 auf dem Markt eingeführt und machen mittlerweile einen großen Teil des Marktes aller koronaren Stents aus [163]. Insgesamt lag der globale Umsatz für implantierbare Wirkstoffabgabesysteme im Jahr 2011 bei etwa 11,6 Milliarden US-Dollar. Mit einer durchschnittlichen jährlichen Wachstumsrate von etwa 8,8% wird er sich bis zum Jahre 2018 voraussichtlich nahezu verdoppeln [151]. Nach wie vor besteht jedoch ein hoher Bedarf an Grundlagenforschung in den verschiedenen Bereichen biofunktionalisierter Materialien, um deren Effektivität und/oder Langzeitwirkung zu steigern und Spätfolgen, wie z.B. späte Thrombosen, zu vermeiden.

1.4 Besiedelung mit Zellen

Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Biokompatibilität von Implantaten bietet deren Besiedelung mit Zellen. Solche "biologisierten" Materialien besitzen eine nicht-degradierbare Trägerstruktur, die mit Zellen bewachsen ist. Während das Trägermaterial die mechanische Stabilität liefert und eventuell weitere technische Funktionen erfüllt, führt die Anwesenheit der Zellen zu einer verbesserten Akzeptanz im Nachbargewebe. Durch die meist präoperative, *in-vitro* induzierte Zellbesiedelung der Trägerstrukturen bilden "biologisierte" Implantate eine wichtige Stufe in der individualisierten Medizintechnik [163].

Besiedelte Implantate dienen vor allem der Geweberekonstruktion, z.B. Stents, Herzklappenprothesen und künstliche Harnblasen. Hier stellen biofunktionalisierte Implantate, die eine gezielte *in-vivo*-Besiedelung von beispielsweise Endothel-, Epithelzellen oder entsprechender Vorläuferzellen herbeiführen, einen Grenzfall dar. Mit Zellen bewachsene Materialien kommen aber auch bei Biohybrid-Systemen zum Einsatz, die eine temporäre oder dauerhafte Organunterstützung zum Ziel haben. Dabei übernehmen die an/in den Systemen angesiedelten Zellen die Aufgaben der Organe, so z.B. fungieren an Membranen angeheftete Hepatozyten als extrakorporale künstliche

Leber [6]. Daneben werden im Bereich des Tissue Engineering Oberflächen und Matrizen spezifisch mit Zellen besiedelt.

Materialien werden auch für einen weiteren Anwendungsbereich mit Zellen besiedelt: zellbasierte Wirkstoffabgabesysteme. Hierbei sind am Implantatmaterial immobilisierte Zellen befähigt, Wirkstoffe kontinuierlich zu produzieren und dauerhaft an ihre Umgebung abgeben [46]. Die zellbasierten Wirkstoffabgabesysteme stellen daher eine Alternative zu biofunktionalisierten Implantaten dar, deren Wirkstoffmenge und -abgabezeit begrenzt sind.

Auf lebenden Zellen basierende Wirkstoffabgabesysteme an Implantaten müssen häufig so gestaltet sein, dass die Zellen von einer biokompatiblen Matrix eingeschlossen sind. Diese verhindert, dass die Zellen unbeabsichtigt in umgebendes Gewebe migrieren oder sich unkontrolliert vermehren können. Sie unterbindet zudem den direkten Kontakt der Wirtszellen mit den eingebrachten Zellen, so dass eine Immunabwehr gegen die wirkstoffabgebenden Zellen und damit ein mögliches Versagen des Implantats vermieden wird.

Als Matrizen zur Einbettung von Zellen werden u.a. Agarose, Polyethylenglycol, Poly-L-Lysin, Poly-L-Ornithin, Chitosan, Polyacrylate und diverse Copolymere dieser Substanzen verwendet [79]. Eine weitere geeignete biokompatible Zellmatrix stellt Alginate dar. In Mikrokapseln aus Alginate wurden bereits Langerhans'sche Inseln mit der Fähigkeit der Insulinproduktion immobilisiert und in Tiere implantiert, um Aufgaben der Bauchspeicheldrüse zu übernehmen [61]. Ebenso gibt es Untersuchungen zur Immobilisierung von Hepatozyten, mesenchymalen Stammzellen oder Chondrozyten [12, 83, 51]. Zudem konnte gezeigt werden, dass den Wachstumsfaktor BDNF produzierende Fibroblastenzellen, welche in hochmolekulares Alginate eingebettet wurden, in diesem über 30 Tage lang überlebten und in dieser Zeit kontinuierlich den Wachstumsfaktor in ihre Umgebung freisetzten [59].

1.5 Interpenetrierende Netzwerke (IPNs)

Für die Einbettung von Wirkstoffen in Silikon sind fast nur niedermolekulare und lipophile Substanzen geeignet, da es für andere Moleküle kaum durchlässig ist. Um die Diffusibilität für biologisch wirksame Proteine zu erhöhen, kann das Silikonmaterial an sich mit permeablen Stoffen über Copolymerisation, Polymermischungen (Blends) und die Herstellung von interpenetrierenden Netzwerken (IPNs) verändert werden [99].

IPNs entstehen, wenn zwei oder mehr dreidimensionale Polymernetzwerke miteinander verwoben werden, ohne dass sie kovalent verbunden sind. Mindestens eins dieser Netzwerke muss dabei in Anwesenheit des/der anderen polymerisiert sein [36]. Durch ein IPN werden die Eigenschaften der beteiligten Polymere miteinander kombiniert. Im Vergleich zu physikalisch vernetzten Blendmaterialien können sich durchdringende Polymernetzwerke zu einer synergetischen Verbesserung der Eigenschaften ihrer Einzelkomponenten führen [39].

IPNs auf Basis von Silikon sind zur Erhöhung der Hydrophilizität bereits mit verschiedenen organischen Polymeren, wie Thermoplasten und synthetischen Hydroge-

len, hergestellt worden. Die Herstellung der IPNs mit den Hydrogelen kann dabei auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen. Eine Methode besteht darin, vulkanisiertes PDMS in organischen Lösungsmitteln zu quellen, welche die Monomere der Hydrogele enthalten. Die Vernetzung der Hydrogele kann anschließend z.B. durch weitere Bäder mit Vernetzer- und/oder Initiator-molekülen oder mit UV-Licht erfolgen. Auf diese Weise sind IPNs u.a. mit Polyhydroxyethylmethacrylat (PHEMA), Polyacrylsäure (PAAc), Polyvinylalkohol (PVA), Polyvinylpyrrolidon (PVP), Polymethacryloyloxyethylphosphorylcholin (PMPC) und Polymethacrylsäure (PMAA) möglich [5, 112, 53, 136, 155]. Der Fokus liegt dabei häufig auf der Entwicklung transparenter elastischer Materialien mit hoher Reißfestigkeit, die gleichzeitig gut benetzbar sind und sich somit für ophthalmische Anwendungen, wie beispielsweise Kontaktlinsen, eignen könnten. Um die Lichtbrechung im Material so gering wie möglich zu halten und damit Transparenz zu gewährleisten, müssen diese IPNs eine hohe Netzwerkdicke mit sehr kleinen Poren besitzen [39, 112].

Durch die Integration bereits vernetzter Hydrogele in das Silikon können IPN-Materialien erhalten werden, deren Poren groß genug sind, um für wässrige Moleküle diffusibel zu sein. Untersuchungen hierzu wurden u.a. mit vernetztem Polyacrylamid (PAAm) und PHEMA durchgeführt, die als hydrophilisiertes Pulver mit Silikon-Präpolymeren vermischt wurden. War das Silikon vulkanisiert, schollen die Komposite bei Kontakt mit Wasser an und die Hydrogele bildeten ein permeables Netz für wasserlösliche Moleküle [168]. Für die Herstellung von Silikon-Materialien mit Temperatur-aktivierbarer Wirkstoffabgabe wurden gelierte Mikropartikel aus Poly-N-Isopropylacrylamid (PNIPAAm) in das Silikon gemischt [57].

Es gibt jedoch noch keine Untersuchungen zu Herstellung von IPNs mit natürlichen Hydrogelen, wie beispielsweise Alginat. Dieses Hydrogel hat den Vorteil, dass es neben seiner Diffusibilität für wässrige Moleküle die Fähigkeit besitzt, als Matrix für die Einbettung lebender, als Wirkstofflieferanten dienender Zellen eingesetzt werden zu können [190, 8].

1.6 Alginat

Alginat ist ein lineares, unverzweigtes Polysaccharid bestehend aus 1,4-glycosidisch miteinander verbundenen β -D-Mannuronsäure (M)-Monomeren und α -L-Guluronsäure (G)-Monomeren (Abb. 1.4a und b).

Alginat kommen natürlicherweise vor allem in Braunalgen, u.a. *Lessionia*, *Laminaria* und *Ascophyllum*, vor. Sie werden aber auch von einigen Bakterien, wie *Azotobacter* oder *Pseudomonas*, produziert. Niedermolekulare Alginat haben eine durchschnittliche Molmasse zwischen 48.000 und 186.000 g/mol. Hochmolekulare Alginat können Molmassen über $1 \cdot 10^6$ g/mol besitzen. Die Molmasse ist dabei von der Algenspezies, deren Alter und dem bearbeiteten Algenteil abhängig, aus dem das Alginat gewonnen wurde [28].

Im gelierten Zustand sind Alginat Hydrogele. Sie sind für viele Moleküle permeabel und in der Lage, große Mengen Wasser in sich aufzunehmen ohne jedoch wasserlös-

lich zu sein. Dabei schwellen sie unter Volumenzunahme um ein Vielfaches an, behalten aber ihre dreidimensionale Struktur bei. Die Vernetzung zu Gelen erfolgt durch die Interaktion mit 2-wertigen Kationen, wie beispielsweise Calcium (Ca^{2+}), Strontium (Sr^{2+}) oder Barium (Ba^{2+}). Dabei wechselwirken die Kationen mit den Sauerstoffatomen der Hydroxyl- und Carboxygruppen sowie mit dem Ringsauerstoff des Polysaccharids, so dass sich ionische Brücken zwischen den Polymeren bilden (Abb. 1.4c).

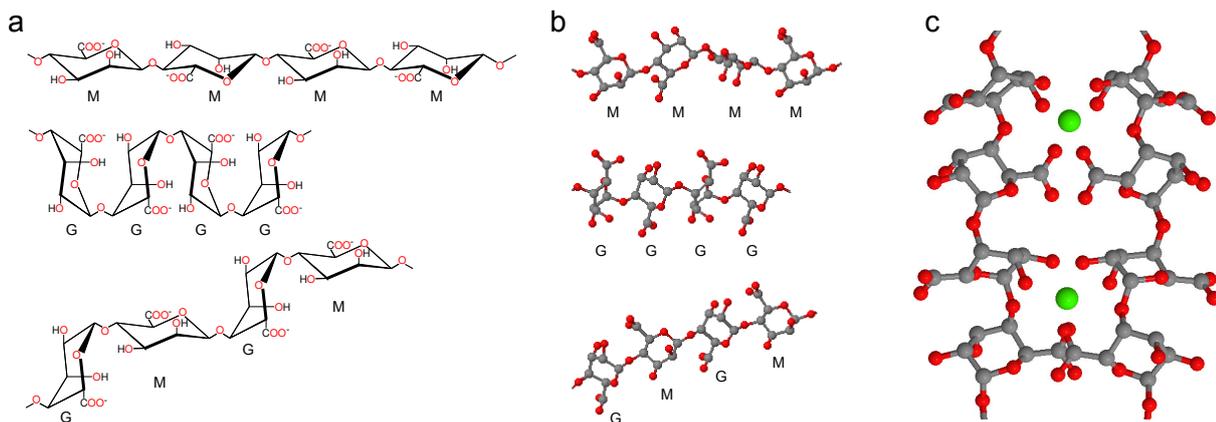


Abbildung 1.4: a) Strukturformeln von Ketten aus Mannuronsäure (M)- und Guluronsäure (G)-Einheiten als Bestandteile von Alginate; b) entsprechende 3-dimensionale Strukturen; c) vergrößertes 3-dimensionales Modell von vernetztem Alginate am Beispiel von G-Einheiten, zwischen denen zweiwertige Ionen eingelagert sind (nach [21]). Die Kohlenstoffatome sind grau, die Sauerstoffatome rot und die Ionen grün. Die Wasserstoffatome sind nicht dargestellt.

Die Beschaffenheit eines Alginategels wird stark vom Verhältnis von Mannuron- zu Guluronsäure beeinflusst. Alginat mit hohem G-Anteil bilden im Allgemeinen festere und weniger flexible Gele als Alginat mit hohem M-Anteil. Die Menge und Verteilung der Monomerblöcke sind von der Spezies, aus der das Alginate gewonnen wurde, abhängig – und im Falle der Algen – auch von Alter und Algenteil. Die Wahl des Vernetzkations wirkt sich ebenfalls auf die Stabilität von Alginategelen aus. So werden beispielsweise Ba^{2+} -Ionen fester in das Polymer eingebunden als Ca^{2+} -Ionen, und diese wiederum stabiler als Mg^{2+} -Ionen [49]. Zudem sind hochmolekulare Alginat gegenüber Degradation beständiger als niedermolekulare Alginat [73].

Der Vernetzungsprozess für Alginategele kann unter nahezu physiologischen Bedingungen stattfinden. Es ist daher möglich, lebende Zellen unter hoher Vitalität in das Netzwerk eines Alginategels einzubetten. Aufgrund der Biokompatibilität und der Permeabilität, die einen guten Stoffaustausch ermöglicht, können verschiedene Zellarten über längere Zeit im Alginate überleben. In den letzten Jahren sind Alginat deshalb vermehrt für die Immobilisierung von lebenden Zellen in Mikrokapseln, beispielsweise für die Kryokonservierung oder – wie bereits in 1.4 erwähnt – als zellbasierte Wirkstoffabgabesysteme, untersucht worden [190, 12].

Die Ähnlichkeit von Alginate in Struktur und Zusammensetzung mit der extrazellulären Matrix (ECM) von Zellen sowie das Vermögen, Zellen zur Proliferation und zum

Überleben anzuregen, machen es für die regenerative Medizin attraktiv [8]. Zusätzlich ist Alginat ein nachgiebiges Material, welches sich gut an organisches Gewebe anpassen kann. Bei besonders hochmolekularen Alginaten, wie dem aus den Braunalgen *Lessionia negrescens* und *Lessionia trabeculata*, ist die Biokompatibilität höher gegenüber niedermolekularen Alginaten. Saccharide besitzen grundsätzlich die Fähigkeit, mit Proteinen, Nukleotiden und Lipiden ihrer Umgebung nicht-enzymatisch reagieren zu können. Die entstehenden Glykierungsprodukte können eine Immunreaktion hervorrufen. Hochmolekulare Alginat besitzen wesentlich weniger freie Zuckerreste als niedermolekulare Alginat, und die Bildung von Glykierungsprodukten ist damit für transplantierte Alginatmaterialien stark herabgesetzt oder komplett eliminiert. Die bessere Biokompatibilität hochmolekularer Alginat konnte sowohl *in-vitro* wie auch *in-vivo* mit dem Fehlen signifikanter Fremdkörperreaktionen nachgewiesen werden [192][8].

1.7 Zielstellung

PDMS ist ein bioinertes, elastisches und sehr beständiges Material, das in der Medizintechnik sehr oft eingesetzt wird. Seine starke Hydrophobizität kann jedoch Fremdkörperreaktionen hervorrufen. Zudem ist es für viele wässrige Moleküle nicht permeabel, so dass es als Wirkstoffabgabesystem auf lipophile und niedermolekulare Substanzen beschränkt ist. Alginat hingegen ist hydrophil, biokompatibel und für viele wasserlösliche Stoffe diffusibel. Es besitzt für eine Biofunktionalisierung von PDMS sehr gute Voraussetzungen. Das Hauptziel dieser Arbeit ist daher der Versuch der Entwicklung eines neuen Implantatmaterials auf Basis des Silikons PDMS in Kombination mit dem Hydrogel Alginat. Durch die Bildung eines interpenetrierenden Netzwerks sollen die Charakteristika beider Stoffe miteinander vereint und somit die Biokompatibilität des PDMS erhöht werden.

Über die Einbindung des Hydrogels soll zunächst die Hydrophobizität des PDMS reduziert werden. Gleichzeitig soll die Integration und Freisetzung wasserlöslicher Moleküle aus dem PDMS-Material ermöglicht werden. Der Nachweis zur Nutzung als Wirkstoffabgabesystem ist anhand von *in-vitro*-Experimenten zu führen.

Für biomedizinische Zwecke sind Silikon-Hydrogel-Gemische bisher nur mit einigen synthetischen Hydrogelen entwickelt worden. Einzig im Bereich der Biotechnologie fanden PDMS-Gemische mit Alginat bislang Anwendung. Es handelte sich jedoch um einfache Mischungen ohne Netzwerkbildung. Sie wurden als Matrix zur Einbettung von Epoxid-produzierenden Bakterien [68] und Benzylalkohol-produzierenden Hefen [106] genutzt, die in Reaktoren kultiviert wurden. Die Alginatlösung im PDMS diente dabei als Reaktionsmedium zur Steigerung der Produktivität der Mikroorganismen. Inwieweit sich ein PDMS-Alginat-Gemisch für den Einsatz in der Medizintechnik und speziell als Implantatmaterial eignet, ist unbekannt. Die Nutzbarkeit als Werkstoff soll daher durch eine eingehende Untersuchung seiner chemisch-physikalischen, elektrischen und bioverträglichen Eigenschaften erfolgen.

Des Weiteren sollen Möglichkeiten gefunden werden, das Material mit Zellen zu besiedeln. Hierbei werden sowohl die direkte Zelladhäsion wie auch die Immobilisie-

zung von Zellen innerhalb einer Matrix berücksichtigt. Durch eine derartige Biologisierung wäre eine bessere Gewebeintegration des Implantats oder eine lokale Medikation durch wirkstoffsekretierende Zellen denkbar. Da viele Zellen aufgrund der Hydrophobizität des PDMS nur schlecht adhärieren, soll über verschiedene Oberflächenmodifizierungen die direkte Anbindung der Zellen verbessert werden. Das Alginat wiederum eignet sich als Matrix zur Einbettung von Zellen. Die Anbindung von Zellen enthaltendem Alginat an ein Implantat aus Silikon ist jedoch mit Herausforderungen verbunden, da das Alginat nicht kovalent an die Silikonoberfläche geknüpft werden kann, ohne die Zellen zu schädigen. Wird PDMS mit Alginat nur eingekapselt, können Zug- und Dehnungsbeanspruchungen zu einem Reißen der Alginatkapsel führen. Es gilt daher die Frage zu klären, ob durch die Integration des Alginats in das Materialinnere des PDMS eine stabile Verankerung der Alginatphase ermöglicht wird, in welcher lebende Zellen eingebettet werden können.

Zur eingehenderen Überprüfung der Biokompatibilität des PDMS-Alginat-Materials bietet sich ein mehrtägiger Hühnerei-Test an. Dabei werden die biologischen Reaktionen an embryonalem Membrangewebe beurteilt und mit denen von reinem PDMS verglichen.

Abschließend soll die Praxistauglichkeit des PDMS-Alginat-Materials demonstriert werden. Hierfür wird aus dem neuen Biomaterial ein funktionelles Prototyp-Implantat mit integrierten Elektroden zur Erfassung von kardiogenen Signalen aufgebaut.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

Name	Hersteller
3D-Drucker Dimension Elite	Alphacam GmbH, Schorndorf, Deutschland
Auswaschanlage UW-20	Alphacam GmbH, Schorndorf, Deutschland
BioStation IM	Nikon Instruments Europe BV, Niederlande
Brutschrank Top-Profi 300	J. Hemel Brutgeräte GmbH & Co.KG, Verl, Deutschland
EKG Simulator Phantom 320	Müller & Sebastiani Elektronik GmbH, Ottonbrunn, Deutschland
Elektrochemische Schnittstelle SI 1287	Solartron analytical, Farnborough, UK
ELISA-Reader Infinite F200	Tecan Austria GmbH, Groedig, Österreich
Exsikkator Nalgene	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Frequenzgang-Analysator 1255 HF	Solartron analytical, Farnborough, UK
Mikroliter-Spritze 100 µl	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Kryostat Leica CM3050	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Laser Compass 315M	Coherent Inc., Santa Clara, USA
Lötstation WS 51	Weller Tools GmbH, Besigheim, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte IKA RCT basic	IKA Labortechnik GmbH, Staufen, Deutschland
Mikroskop Axio Imager.M2m	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskop Nikon Eclipse LV100	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Niederlande
Mikroskop Olympus IX70	Olympus Corporation, Tokyo, Japan

Geräte – Fortsetzung

Name	Hersteller
Objektträger-Strecktisch OTS40	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Plasmaanlage Nano-RF	Diener electronic GmbH & Co.KG, Nagold, Deutschland
Plasmaanlage Sentech SE 220	Sentech Instruments GmbH, Berlin, Deutschland
PowerLab 4/25 T	ADInstruments Ltd., Oxford, UK
REM EVO MA 10	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
REM Neon 40 EsB	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Rheometer MCR 101	Anton Paar GmbH, Graz, Österreich
Rührwerk Eurostar power digi-visc	IKA Labortechnik GmbH, Staufen, Deutschland
Shore-A-Härteprüfgerät	Messwelk GmbH, Kleinostheim, Deutschland
SpeedMixer DAC 150 SP	Hauschild Engineering, Hamm, Deutschland
Sputteranlage (REM) Edwards Scancoat Six	HHV Ltd., Crawley, UK
Spektrometer Shamrock 303	Andor Technology Ltd., Belfast, UK
Stereomikroskop Olympus SZX16	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Sterilbank BDK S 1200	Weiss Pharmatechnik GmbH – Werk Sonnenbühl, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Sterilbank Hera Safe KS 18	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co.KG, Braunschweig, Deutschland
Trockenschrank FD 115	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Turbinenrührer PR 31	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Ultraschallbad SONOREX RK 31	Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Berlin, Deutschland
UV-Vis Spektrophotometer DU 730	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
Vakuumkammer ULC 5/01	SLM Solutions GmbH, Lübeck, Deutschland
Vakuumpumpe Value V-i280sv	Technika Chłodzenia Spółka z o.o., Zabrze, Polen

Geräte – Fortsetzung

Name	Hersteller
Waage Kern PLS 4000-2N	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Wasserkontaktwinkelmessgerät OCA 20	DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Deutschland
Zellinkubator BBD 6220	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co.KG, Braunschweig, Deutschland
Zugtester Z.25	Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland

2.1.2 Einwegmaterialien**Tabelle 2.2:** Relevante Einwegmaterialien neben Standardlaborbedarf

Name	Hersteller
24-Well-Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
24-Well-Suspensionskultur- platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-Well-Zellkulturplatten Nunc	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
μ-Slides	Ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland
Cellulose-Spritzenfilter 0,2 μm Chromafil MV	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Deutschland
Edelstahldraht AS 631, Teflon-isoliert	Cooner Wire CO, Chatsworth, USA
Edelstahlkontakte, tiefgezogen	Boes GmbH, Neulingen-Bauschlott, Deutsch- land
Frischhaltefolie	Lakeland, Cumbria, UK
Küvetten UVette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Luer-Adapter w 3,2 mm	Ark-Plas Products Inc., Flippin, USA
Luer-Spritzen Norm-Ject 2 ml	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutsch- land
Objektträger Superfrost ultra plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland

Einwegmaterialien – Fortsetzung

Name	Hersteller
Polypropylen-Becher	Hauschild & Co.KG, Hamm, Deutschland
Polypropylen-Folie Velofilm, selbstklebend	Veloflex Carsten Thormählen GmbH & Co.KG, Kölln-Reisiek, Deutschland
Silikonschlauch 3 x 5 mm	VWR International BVBA, Leuven, Belgien
Silikonschlauch Silastic RX-50	Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Y-Schlauchtüllen PP 3-5 mm	Bürkle GmbH, Bad Bellingen, Deutschland

2.1.3 Software**Tabelle 2.3:** Verwendete Software

Name	Hersteller
AxioVision; Mikroskopsoftware	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
cellSens; Mikroskopsoftware	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Chemtool; Zeichnung chemischer Strukturen	open source: http://ruby.chemie.uni-freiburg.de/martin/chemtool/chemtool.html
CORINA; Erstellung von 3D-Modellen chemischer Strukturen	Molecular Networks GmbH – Computerchemie, Erlangen, Deutschland
FreeCAD; 3D CAD Modellierung	open source: http://freecadweb.org/
GIMP; Bildbearbeitung	open source: http://www.gimp.org/
Grace; Grafische Darstellung	open source: http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/
i-control; ELISA Software	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Inkscape; Vektorgrafik	open source: http://inkscape.org/
Jmol; 3D-Betrachtung chemischer Strukturen	open source: http://www.jmol.org/
LabChart; PowerLab-Software	ADInstruments Ltd., Oxford, UK
Rheoplus; Rheometer-Software	Anton Paar GmbH, Graz, Österreich
SCA 20; Wasserkontaktwinkel-messung	DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Deutschland

Software – Fortsetzung

Name	Hersteller
SmartSEM; REM-Software	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
SolidWorks; 3D CAD Modellierung	Dassault Systèmes SolidWorks Corp., Waltham, USA
TXPERT; Zwick-Software	Zwick GmbH & Co.KG, Ulm, Deutschland
Z-Plot/Z-View; Impedanzmessung	Scribner Associates Inc., Southern Pines, USA

2.1.4 Reagenzien**Tabelle 2.4:** Verwendete Chemikalien, Lösungen und Proteine

Name	Hersteller
ABSplus	Stratasys Inc., Eden Prairie, USA
Aceton	BASF Electronic Materials GmbH, Ludwigshafen, Deutschland
Agar	VWR International BVBA, Leuven, Belgien
Alginat, hochmolekular	Alginatec GmbH, Riedenheim, Deutschland
Alginat, hochmolekular	Algisano GmbH, Riedenheim, Deutschland
Alginat, niedermolekular, Manugel DJB	Kelco, Hamburg, Deutschland
APTES	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
BaCl ₂	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
bFGF	Gibco, Life Technologies Ltd., Paisley, UK
DMEM	Gibco, Life Technologies Corp., Grand Island, USA
DMEM/F-12	Gibco, Life Technologies Corp., Grand Island, USA
Eosin G	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure 100%, Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 96%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FBS gold	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland

Chemikalien, Lösungen und Proteine – Fortsetzung

Name	Hersteller
Fluorescein	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Fluoresceindiacetat	Life Technologies Corp., Grand Island, USA
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
HS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Kollagen Typ I, Rat Tail	Gibco, Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methylenblau	VWR International BVBA, Leuven, Belgien
NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NGF-7S, murin	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, USA
P400 SC, Lauge	Stratasys Inc., Eden Prairie, USA
P400 SR, Stützmaterial	Stratasys Inc., Eden Prairie, USA
PBS	Gibco, Life Technologies Ltd., Paisley, UK
PDMS MED-6015, Komponente A + B	NuSil Technology LLC, Carpinteria, USA
Pen/Strep	Gibco, Life Technologies Corp., Grand Island, USA
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Propidiumiodid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Roti-Histokitt Eindeck- medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Rotisolv Wasser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	Gibco, Life Technologies Ltd., Paisley, UK
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Silikonkleber MED-1000	NuSil Technology LLC, Carpinteria, USA
Tissue-Tek O.C.T. Ein- bettmedium	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Nie- derlande
Vitronectin XF	Primorigen Biosciences, Madison, USA

2.1.5 Kits und Gebrauchslösungen

WST-1-Kit: Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland.

BrdU-Kit: Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland.

Lösung für Lebend/Tot-Färbung: 8 µl einer Fluoresceindiacetat-Lösung (5 mg/ml Aceton) und 50 µl einer Propidiumiodid-Lösung (2 mg/ml PBS) wurden in 5 ml Basalmedium gegeben und vermischt. Für die Lebend/Tot-Färbung wurde das Zellkulturmedium von den Zellen abgenommen und durch die Färbelösung ersetzt.

2.1.6 Zellen und Nährmedien

L929-Zellen: L929-Zellen sind adhärent wachsende Fibroblastenzellen der Maus, die jedoch auch in Suspension überleben. In dieser Arbeit wurden sie für Zytotoxizitätstests und zur Untersuchung ihres Überlebens nach einer Immobilisierung im zu untersuchenden Material verwendet. Ihr Medium enthielt 90% RPMI 1640, 10% FBS gold und 1% Pen/Strep.

hUC-MSC: Die kommerziellen "human umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stem cells" (hUC-MSCs) wurden zur Überprüfung ihrer Adhäsion auf und im zu untersuchenden Material eingesetzt. Das Medium der mesenchymalen Stammzellen bestand aus DMEM/F-12 mit 1% Pen/Strep und 0,05% Fibroblasten-Wachstumsfaktor bFGF.

PC12-Zellen: Diese Zellen sind in Suspension wachsende Tumorzellen der Nebennierenrinde einer Ratte. Bei Zugabe des Nervenwachstumsfaktors NGF in das Kulturmedium adhärieren sie und beginnen eine neuronale Differenzierung mit Neuritenbildung [44]. Die PC12-Zellen wurden zur Evaluierung von Wirkstoffabgaben aus dem zu untersuchenden Material genutzt. Das Anzuchtmedium enthielt 85% RPMI 1640, 10% HS, 5% FBS und 1% Pen/Strep. Das Differenzierungsmedium bestand aus 97,5% RPMI 1640, 0,5% HS, 0,25% FBS, 0,75% Pen/Strep und 1% NGF (10 µg/ml). Es wurde zusätzlich reduziertes Differenzierungsmedium verwendet, welches sich wie das Differenzierungsmedium zusammensetzte, jedoch kein NGF enthielt.

2.1.7 Fertilisierte Hühnereier

Befruchtete Hühnereier wurden für den HET-CAM Test verwendet und von LSL Rhein-Main Geflügelvermehrungsbetriebe GmbH & Co.KG, Dieburg, Deutschland, bezogen. Es handelte sich um Eier der Legehennenlinie Lohmann Selected Leghorn (LSL).

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Silikon-Alginat-Kompositen

Als Basis für die Herstellung der Silikon-Alginat-Komposite wurden das PDMS MED-6015, sowie zunächst verschiedene Alginatlösungen verwendet. MED-6015 ist ein transparentes, biokompatibles Silikon, welches medizinisch bis zu 29 Tage zugelassen ist [108]. Aufgrund seiner relativ niedrigen Viskosität lässt es sich gut mischen und entgasen. Die Alginatlösungen unterschiedlicher Konzentrationen bestanden aus niedermolekularem Alginat diverser Braunalgen und aus hochmolekularem Alginat der Braunalgen *Lessonia trabeculata*, Charge SE 57, und *Lessonia nigrescens*, Charge SE 58 (beide Algisano). Später wurden die Komposite ausschließlich mit niedermolekularem Alginat hergestellt.

Die Standardprozedur zur Herstellung der Komposite war folgendermaßen: Zunächst wurden die benötigten Mengen an PDMS-Präpolymer des zweikomponentigen Silikons MED-6015 im Verhältnis 10:1 (Komponente A zu Komponente B) in einen Becher aus Polypropylen eingewogen und miteinander vermengt. Es folgte eine schrittweise Zugabe der Alginatlösung (à 20 mg), bis der gewünschte Alginatgehalt erreicht war. Nach jeder Alginatbeigabe wurde die Mischung für 10 s bei 3.500 rpm und am Schluss für weitere 60 s bei 3.500 rpm im SpeedMixer (unter Zuhilfenahme zweier Edelstahl-Rührkugeln mit 5 mm Durchmesser) gemischt. Alternativ zum SpeedMixer erfolgten Vermischungen mit einem Rührwerk mit Turbinenrührer bei 2.000 rpm. Zur Verbesserung der Mischbarkeit wurden die Alginatlösungen vor ihrer Anwendung auf 40 °C erwärmt. Eine höhere Erwärmung musste vermieden werden, um ein vorzeitiges Vernetzen des PDMS während des Mischvorgangs zu vermeiden.

Die noch unvernetzte Polymermischung wurde im Unterdruck bei 70 ± 5 mbar (abs.) in einer Vakuumkammer für maximal 10 min entgast. Anstelle der Vakuumkammer fand die Entgasung auch teilweise in einem Exsikkator mit angeschlossener Vakuumpumpe statt. Die Vernetzung der PDMS-Phase erfolgte anschließend in einem Trockenschrank bei 80 °C für 30 min.

Die Alginatphase konnte mit einer 20 mmol BaCl_2 -Lösung vernetzt werden. Die Vernetzungszeit hing von der jeweiligen Versuchsanordnung ab. Für einige Anwendungen wurde nach der Vernetzung des Silikons die noch flüssige Alginatphase mit MilliQ-Wasser aus dem PDMS-Material ausgespült. Für andere Versuche wurde in den verbliebenen PDMS-Schwamm eine Lösung aus 0,65%igem hochmolekularem Alginat einer 1:1 Mischung der Algen *L. trabeculata* und *L. nigrescens* aufgesogen. Die Chargen dieser Alginate sind in den entsprechenden Versuchsbeschreibungen angegeben.

Zur Aufrechterhaltung physiologischer Bedingungen wurden für einige Versuche die verwendeten Alginatlösungen und die BaCl_2 -Lösung mit 0,9 % NaCl angesetzt.

2.2.2 Herstellung von Gussformen

Für mehrere Versuchsaufbauten mussten die Komposite in Formen verschiedener Geometrien gegossen und darin vernetzt werden. Die Gussformen hierfür wurden

in einem CAD-Programm entworfen und mit einem 3D-Drucker hergestellt. Das Material der Gussformen bestand aus Acrylnitril-Butadien-Styrol (ABS). Nach dem Ausdruck folgte das Entfernen des Stützmaterials in einer Auswaschanlage mit der Lauge "P400 SC". Die fertigen ABS-Teile wurden anschließend mit Wasser abgespült und getrocknet.

2.2.3 Viskositätsmessung

Die Viskosität (Zähflüssigkeit) ist ein Maß für den inneren Widerstand einer Substanz gegen das Fließen bei mechanischer Verformung durch Schub. Sie ist ein Teilmerkmal der Konsistenz. Über die Schubspannung τ und die Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}$ ergibt sich die dynamische Viskosität η :

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (2.1)$$

Die Bestimmung der dynamischen Viskositäten von Alginatlösungen aus nieder- und hochmolekularen Alginaten (*L. trabeculata* Charge SE 57, *L. nigrescens* Charge SE 58; beide Algisano) in unterschiedlichen Konzentrationen erfolgte mit einer Rotationsviskositätsmessung. Sie wurden über die Vorgabe der Schergeschwindigkeit mit $\dot{\gamma} = 1/s$ über einen Zeitraum von 120 s mit je einem Messpunkt pro Sekunde durchgeführt. Die Auswertung erfolgte ab dem 20. Messpunkt. Die Temperatur betrug 20 °C. Jede Messung wurde mindestens 3-mal wiederholt.

2.2.4 Konfokale Raman-Mikroskopie

Bei der konfokalen Raman-Mikroskopie wird die Raman-Spektroskopie mit der optischen Mikroskopie kombiniert. Die durch ein Laserlicht angeregten charakteristischen Schwingungen von Molekülen werden mit einem Spektrometer erfasst und können identifiziert werden. Gleichzeitig werden die Raman-Spektren durch die Mikroskopie lokal der Probe zugeordnet, wodurch die räumliche Verteilung der Verbindungen sichtbar wird. Die instrumentelle Anordnung ist in Kreiner-Møller et al. (2013) [74] beschrieben. Dabei wurden ein Spektrometer und ein konfokales Mikroskop (Nikon) zusammengeschlossen. Als Lichtquelle für die Raman-Untersuchung diente ein grüner Laser mit 532 nm Wellenlänge. Die Erstellung der Bilder erfolgte nach Kreiner-Møller et al. (2014) [75].

Für die konfokale Raman-Mikroskopie wurden die Materialproben (Komposite mit 60–80% Alginatanteil) zwischen zwei Deckgläser gelegt, die mit Klebestreifen gegen ein Verrutschen fixiert wurden. Über Lichtmikroskopie erfolgte zunächst eine Fokussierung auf die Materialoberfläche. Anschließend fand die Einstellung des Lasers für die Raman-Mikroskopie statt.

Bei der Messung wurden die Intensitäten der spezifischen Schwingungsfrequenzen von Molekülverbindungen bei deren Anregung über einen zweidimensionalen Ausschnitt der Probe aufgenommen. In den Aufnahmen stellt daher jedes Pixel die Messung eines kompletten Spektrums dar. Um einzelne Molekülverbindungen der Auf-

nahme bildlich darstellen zu können, wurden die Bilder nur über den für die Verbindung typischen Frequenzbereich generiert. Daraus ergab sich, dass aus der Raman-mikroskopischen Aufnahme einer Probe mehrere Bilder für die jeweils interessierenden Verbindungen generiert werden konnten. Zur Überprüfung der örtlichen Gleichverteilung zweier unterschiedlicher Verbindungen erfolgte eine Korrelation der aufgenommenen Bilder (siehe Anhang A.1).

2.2.5 Fluoreszenz-Mikroskopie

Zur Untersuchung der Komposite fand neben der Raman-Mikroskopie auch die Fluoreszenz-Mikroskopie Anwendung. Um die Alginatephase besser zu erkennen, erfolgte die Herstellung der Komposite mit einer Alginatelösung, der 1 µg/ml Fluorescein beigelegt wurde. Ebenfalls mit Fluoreszenz fanden die Untersuchungen späterer Lebend/Tot-Färbungen von Zellen statt. Für die Aufnahmen kam ein Mikroskop mit UV-Licht (Olympus) und entsprechenden Filtern zum Einsatz.

2.2.6 Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde ein Elektronenstrahl unter einer Spannung von 5–10 kV auf die Oberfläche der Probenmaterialien geleitet und die von den Proben abgestrahlten Sekundärelektronen detektiert. Die Sekundärelektronen erlaubten durch ihre gestreute Flugbahn die Betrachtung auch abgeschatteter Bereiche. Zudem konnten Reflexionen an den Proben, wie sie bei der Lichtmikroskopie der Komposite teilweise auftraten, umgangen werden.

Für die REM-Aufnahmen wurden die Komposite nach der Vulkanisierung des PDMS vollständig bei 80 °C getrocknet. Bei einigen Untersuchungen war ein vorangegangenes Spülen mit Wasser zur Entfernung der noch flüssigen Alginatephase nötig. Anschließend erfolgte ein Besputtern der Proben mit wahlweise Kohlenstoff oder Gold, um ein Aufladen ihrer Oberfläche während der Bestrahlung mit den Elektronen zu vermeiden.

2.2.7 Zeitrafferaufnahmen

Der Vernetzungsprozess der Komposite wurde im Zeitraffer beobachtet. Noch unvernetzte Mischungen aus PDMS-Präpolymeren und Alginatelösung (60–80%) wurden hierzu in die Durchflussskammern von µ-Slides eingespritzt. Die Proben härteten anschließend in einem Inkubator mit integriertem Mikroskop und Kameraanschluss (BioStation) bei 37 °C für 20 h aus. In dieser Zeit erfolgte alle 5 min eine Ablichtung der Proben.

2.2.8 Härtemessung

Für die Messung des mechanischen Widerstandes, den das Kompositmaterial einem mechanisch eindringenden Fremdkörper entgegenbringt, kam eine Härteprüfung nach Shore-A zum Einsatz.

Für die Probenanfertigung erfolgte zunächst die Herstellung einer aus Ringen bestehenden Gusskammer aus ABS-Material. Der innere Durchmesser der Ringe betrug 36 mm. Die Gusskammer konnte in einen Halter geklemmt werden (Abb. 2.1), so dass die Ringe während des Eingießens der Polymermischungen (mit einem Alginatanteil von 60–80%) nicht verrutschten. Nach der Entgasung der Proben und Vulkanisierung des Silikonanteils wurden die Komposite entlang der Gusskammerringe quer in 2 mm dicke Scheiben geschnitten.

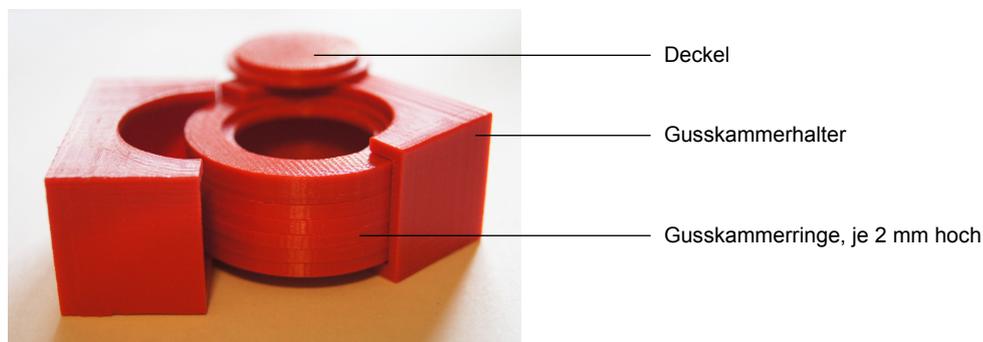


Abbildung 2.1: Gusskammer für die Herstellung von Kompositproben für den Härte-test.

Die stumpfe Spitze der Indenternadel eines analogen Shore-A-Härteprüfgeräts wurde senkrecht mit einem Auflagegewicht von 1 kg auf drei eng übereinanderliegenden Kompositscheiben positioniert. Lufteinschlüsse zwischen den Probenstücken mussten dabei vermieden werden. Die Messungen fanden zunächst an Kompositen mit unvernetztem Alginat statt. Sie wurden nach einer Lagerung der Proben für 3, 48 und 96 h in 20 mmol BaCl₂-Lösung wiederholt. Aus einigen der 75%igen Komposite mit noch unvernetzter Alginatphase folgte ein Ausspülen des niedermolekularen Alginats mit anschließender Aufnahme von hochmolekularem Alginat (*L. trabeculata* Charge SE A010, *L. nigrescens* Charge SE A011; beide Alginattec). Die Härte dieser Proben wurde nach 30 min und nach 24 h Inkubation in BaCl₂-Lösung gemessen. Zusätzlich fand eine Härtemessung von reinem PDMS (10:1 Verhältnis von Komponente A zu Komponente B) statt.

Für jede Probenart wurden mindestens 3 Proben hergestellt, deren Härtemessung an mindestens 5 verschiedenen Stellen erfolgte. Die Messwerte wurden 3 s nach Auflage der Indenternadel auf die Probe abgelesen.

2.2.9 Zugprüfung

Der Zugtest diente neben dem Härte-test zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften der Silikon-Alginat-Komposite. Die Messung erfolgte mit einer Zugprüfma-

schine bei einachsiger Belastung. Sie detektierte die auftretende Zugspannung σ , die die Kraft F bezogen auf den Probenquerschnitt A bezeichnet, bei Dehnung ε der Probe (Verhältnis der Längenänderung ΔL zur Ausgangslänge L_0). Die aufgenommenen Daten wurden in Spannungs-Dehnungsdiagrammen dargestellt. Aus dem Anstieg der Kurven bis 10% Dehnung ergab sich nach dem Hookeschen Gesetz der Elastizitätsmodul E der Proben (Gl. 2.2). Nach Überschreiten der maximalen Dehnung ε_{max} zerriss die Probe. Die hierfür benötigte Kraft bestimmte die Zugfestigkeit R_m des Materials.

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad \text{mit} \quad \sigma = \frac{F}{A} \quad \text{und} \quad \varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0} \quad (2.2)$$

Für die Herstellung der Zugteststreifen wurden zunächst Gussformen aus ABS mit einem Innenraumvolumen von $75 \times 36 \times 2 \text{ mm}^3$ (Abb. 2.2a) und passenden Deckeln (Abb. 2.2b) gefertigt. Zur Erzeugung einer glatten Oberfläche erfolgte eine Bedampfung der Gussformen für 15 min mit Aceton. Die Komposite (mit 60–80% Alginatanteil) wurden in die Formen bis zum oberen Rand eingegossen und entgast. Nach der Vulkanisierung des Silikonanteils hatten die Komposite eine Dicke von 2 mm und konnten mit Hilfe einer Schablone (Abb. 2.2c) und eines Skalpell's zu Dehnungsmessstreifen mit 70 mm Länge und 4 mm Breite geschnitten werden.

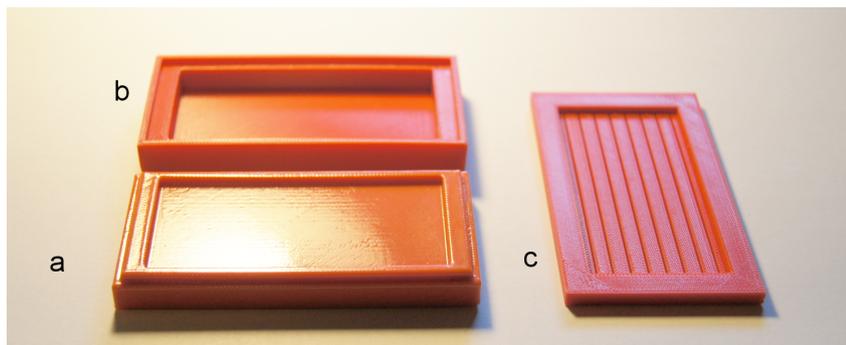


Abbildung 2.2: a) Geglättete, 2 mm tiefe Gussform für die Herstellung von Kompositproben für die Zugprüfung mit b) Deckel und c) Schablone zum Schneiden der Dehnungsmessstreifen.

Ein Teil der Dehnungsmessstreifen wurde für 48 h und ein weiterer für 96 h mit 20 mmol BaCl_2 -Lösung vernetzt. Zudem erfolgte bei einigen der Streifen mit 75% unvernetztem Alginatanteil eine Ausspülung des niedermolekularen Alginats und Ersetzen durch hochmolekulares Alginat (*L. trabeculata* Charge SE A010, *L. nigrescens* Charge SE A011; beide Alginatec). Die halbe Menge dieser Streifen wurde für 30 min mit BaCl_2 -Lösung behandelt, die andere Hälfte für 24 h. Alle Streifen wurden so in die Zugprüfmaschine eingespannt, dass die Ausgangslänge 50 mm betrug. Die Dehnung erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 50 mm/min.

Neben den Kompositen fand zum Vergleich die Testung von reinem PDMS (Verhältnis 10:1 von Komponente A zu Komponente B) statt. Die Anfertigung der PDMS-Dehnungsmessstreifen erfolgte auf die gleiche Weise. Für jede Probenart wurden mindestens 6 Messstreifen hergestellt.

2.2.10 Diffusionstests

Um die Durchlässigkeit der Komposite für wässrige Moleküle zu messen, fanden zunächst Diffusionsmessungen in einem Zwei-Kammersystem nach Zimmermann et al. [191] statt. Hierfür wurden Komposite in einer zylindrischen Gussform hergestellt. Die Form setzte sich aus 1 und 3 mm dicken Ringen mit einem Innendurchmesser von 12 mm zusammen, die sich in einen Gusskammerhalter befanden (Abb. 2.3a). Nach dem Einfüllen der Kompositmischung und Vulkanisierung des PDMS wurde die Gussform aus dem Halter geschoben und der oberste Ring abgenommen. Anschließend konnte mit einer scharfen Klinge entlang des nun zuoberst liegenden Ringes eine Scheibe des Komposits abgeschnitten werden (Abb. 2.3b). Auf diese Weise gelangen Kompositscheiben der gleichen Dicke, wie sie die abgenommenen Gussformringe hatten.

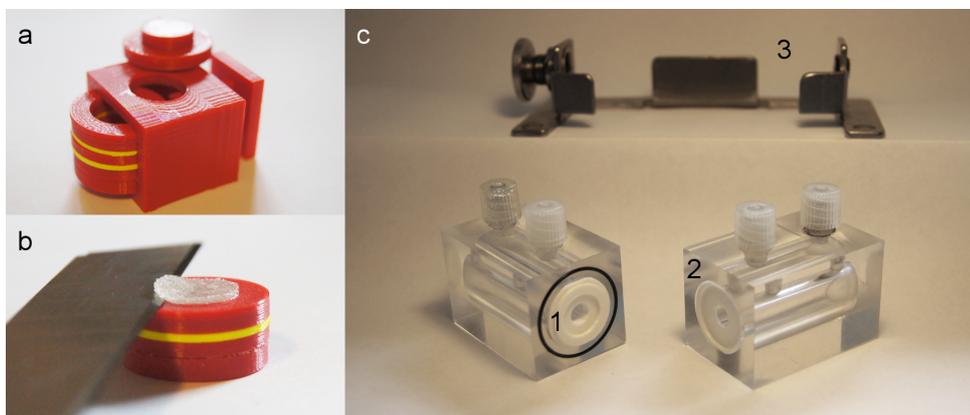


Abbildung 2.3: a) Gusskammer für die Herstellung der Kompositproben zur Diffusionsmessung; b) Schnitt einer 1 mm dicken Probe; c) Vorrichtung zur Diffusionsmessung mit Probenhalter (1), Diffusionskammern (2) und Kammernklemme (3).

Für die Diffusionsversuche im Zwei-Kammersystem kamen die 1 mm dicken Scheiben der Komposite (mit 60–80% Alginatanteil) zum Einsatz. Aus diesen wurde die Alginatphase ausgespült, so dass die Diffusion nur durch den verbliebenen porösen PDMS-Schwamm erfolgte. Die Probe wurde in einen Probenhalter aus ABS zwischen die zwei Diffusionskammern eingelegt und die Kammern mit einer Klemme zusammengedrückt (Abb. 2.3c). Für den Test enthielt die erste Kammer eine 3%ige NaCl-Lösung mit 0,005% Methylenblau als detektierbaren Farbstoff, während sich in der zweiten Kammer H_2O dest. befand. Mehrmals während des Versuchs wurden mit einer Mikroliter-Spritze aus beiden Kammern je 100 μl Flüssigkeit entnommen, mit 900 μl destillierten Wassers versetzt und bei 665 nm photometrisch vermessen. Der Absorptionswert des Methylenblaus ist proportional zur Konzentration der NaCl-Lösung.

Wie schnell die Salzionen in die zweite Kammer diffundieren, wird über die Teilchenstromdichte J ausgedrückt. Sie gibt an, wie viele Teilchen N sich in der Zeit t durch eine zur Diffusionsrichtung senkrecht stehende Fläche A bewegen. Bezieht man das Flüssigkeitsvolumen V mit ein, so wird sie über die Änderung der Konzentration c

mit der Zeit berechnet:

$$J = \frac{1}{A} \frac{dN}{dt} = \frac{V}{A} \frac{dc}{dt} \quad (2.3)$$

Die Flüssigkeiten in den jeweiligen Kammern wurden zwar nicht durchgehend gerührt, jedoch regelmäßig gemischt. So konnte eine homogene Konzentration innerhalb der Kammern angenähert werden. Der Fluss der Teilchen ist dann auch nach dem 1. Fick'schen Gesetz beschreibbar (Gl. 2.4). Er ist proportional zum räumlichen Gradienten der Konzentration $\frac{\partial c}{\partial x}$ entgegen der Diffusionsrichtung. Die Proportionalitätskonstante ist der temperaturabhängige Diffusionskoeffizient D . In der hiesigen Versuchsanordnung entspricht die Änderung der Konzentration ∂c gleich der Differenz der Konzentration c von Kammer 1 ($K1$) und Kammer 2 ($K2$) zum Zeitpunkt t . Die Änderung des Ortes ∂x ist gleich der Dicke l des PDMS-Schwamms. Der Diffusionskoeffizient D ist durch die poröse Beschaffenheit des PDMS-Schwamms beeinflusst und wird daher als effektiver Diffusionskoeffizient D_{eff} bezeichnet.

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} = \frac{D_{eff}}{l} \cdot (c_{t,K1} - c_{t,K2}) \quad (2.4)$$

Da der Fluss von Kammer 1 nach Kammer 2 verläuft (bei gleich großen Volumina der Kammern und Querschnittsflächen der Probe) können für die zwei Kammern folgende Gleichungen aufgestellt werden:

$$J = -\frac{V}{A} \frac{dc_{t,K1}}{dt} \quad \text{und} \quad J = \frac{V}{A} \frac{dc_{t,K2}}{dt} \quad (2.5)$$

Um die gesamte Massenbilanz der Kammern zu erhalten, werden zunächst beide Gleichungen jeweils mit der Fläche multipliziert und durch das Volumen geteilt. Anschließend erfolgt eine Subtraktion der Gleichungen voneinander. In das Ergebnis wird nun die Teilchenstromdichte J aus Gl. 2.4 eingesetzt, so dass man Folgendes erhält:

$$\frac{d(c_{t,K1} - c_{t,K2})}{dt} = -2 \cdot \frac{A}{V} \frac{D_{eff}}{l} \cdot (c_{t,K1} - c_{t,K2}) \quad (2.6)$$

Der Ausdruck $2 \cdot \frac{A}{V} \frac{1}{l}$ kann zu einer vom Versuchsaufbau abhängigen Konstante κ zusammengefasst werden. Durch Integration der Gleichung ergibt sich:

$$c_{t,K1} - c_{t,K2} = e^{-D_{eff} \cdot \kappa t} + C \quad (2.7)$$

Zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Konzentrationsdifferenz in den zwei Kammern gleich dem anfänglichen Konzentrationsunterschied zwischen Kammer 1 und 2. Mit diesen Anfangsbedingungen ist $C = c_{0,K1} - c_{0,K2}$ und man erhält:

$$\ln \left(\frac{c_{t,K1} - c_{t,K2}}{c_{0,K1} - c_{0,K2}} \right) = -D_{eff} \cdot \kappa t \quad (2.8)$$

Wird $\ln\left(\frac{c_{t,K1}-c_{t,K2}}{c_{0,K1}-c_{0,K2}}\right)$ gegen κt aufgetragen, so kann durch die Punkte eine Gerade gelegt werden. Ihr Anstieg entspricht dem durchschnittlichen effektiven Diffusionskoeffizienten D_{eff} durch die Poren des PDMS-Schwamms.

Um den Einfluss der Molekularität des Alginats und der Dauer der Alginatvernetzung auf die Diffusion von Molekülen zu untersuchen, wurden Farbstoffe in die Komposite eingebracht und deren Abgabe über die Zeit gemessen. Hierfür kamen Kompositescheiben zum Einsatz, die einen Alginatanteil von 75% und eine Dicke von 3 mm besaßen. Aus einem Teil der Proben wurde das niedermolekulare Alginat ausgespült und durch hochmolekulares (*L. trabeculata* Charge SE A010, *L. nigrescens* Charge SE A011; beide Alginattec) ersetzt. Danach folgte eine Vernetzung des Alginats der Proben mit 20 mmol BaCl₂-Lösung. Die Vernetzungsdauer betrug für Komposite mit niedermolekularem Alginat 3 h, 48 h und 96 h und für Komposite mit hochmolekularem Alginat 30 min und 24 h. Die Aufnahme des Farbstoffs in die Komposite erfolgte durch Einlegen der Proben in 0,5%ige Farblösungen. Um die Wechselwirkungen des Farbstoffs mit dem Alginat zu berücksichtigen, wurden die Proben in zwei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe kam in eine Lösung mit basischem Methylenblau, die zweite in eine Lösung mit saurem Eosin. Nach 48 h wurden die Proben den Farbbädern entnommen und zur Entfernung überschüssiger Farblösung kurz mit deionisiertem Wasser gespült.

Die Freisetzungsversuche begannen mit dem Einlegen der Komposite in jeweils 10 ml deionisiertes Wasser. Über einen Zeitraum von 5^{1/2} h wurden mehrmals je 100 µl des sich anfärbenden Wassers entnommen. 24 h nach Versuchsbeginn gab es eine letzte Entnahme von 100 µl Flüssigkeit. Sämtliche Flüssigkeitsproben wurden mit 900 µl destillierten Wassers versetzt und photometrisch vermessen. Das Maximum des Methylenblaus liegt bei 665 nm, das des Eosins bei 515 nm. Die Auswertung der Daten erfolgte prozentual bezogen auf die Menge an Farbstoff, die nach 24 h von den einzelnen Proben abgegeben wurde.

Alle Versuchsansätze (Diffusionskammer und Farbstofffreisetzung) fanden in dreifacher Ausführung bei 20 °C statt.

2.2.11 Widerstandsmessung und elektrischen Leitfähigkeit

Zur Untersuchung der elektrischen Eigenschaften der Komposite kam eine Impedanzspektroskopie im Frequenzbereich von 0,1–100.000 Hz zum Einsatz. Dadurch ließ sich der Wechselstromwiderstand (Impedanz) \underline{Z} bestimmen. Gleichzeitig wurde untersucht, ob es frequenzabhängig zu einer Verschiebung des Phasenwinkels φ zwischen der Wechselspannung $\underline{u}(t)$ und dem Wechselstrom $\underline{i}(t)$ kam. Als komplexe Größe lässt sich die Impedanz \underline{Z} mit

$$\underline{Z} = \frac{\underline{u}(t)}{\underline{i}(t)} = R + jX \quad (2.9)$$

beschreiben. R ist der Realteil der Impedanz und wird als Wirkwiderstand oder ohmscher Widerstand bezeichnet, da er nicht phasenverschiebend ist. X beschreibt den

Imaginärteil mit frequenzabhängiger Phasenverschiebung und entspricht dem Blindwiderstand. Dieser kann durch induktive oder kapazitive Effekte positive bzw. negative Werte annehmen, je nachdem, ob der Strom der Spannung (induktiv, positiv) oder die Spannung dem Strom (kapazitiv, negativ) nacheilt. Durch Bildung der geometrischen Summe von Wirk- und Blindwiderstand wird der Betrag der Impedanz, der Scheinwiderstand, $|\underline{Z}|$ bestimmt:

$$|\underline{Z}| = \sqrt{R^2 + X^2} \quad (2.10)$$

Besitzen Spannung und Stromstärke den gleichen Phasenwinkel ($\varphi = 0$), so ist die Impedanz der Probe gleich dem rein ohmschen Widerstand R und der Betrag der Impedanz $|\underline{Z}|$ ist gleich dem Widerstand R_P der Probe. Der Phasenverschiebungswinkel φ zwischen $\underline{u}(t)$ und $\underline{i}(t)$ errechnet sich geometrisch aus:

$$\varphi = \arctan\left(\frac{X}{R}\right) \quad (2.11)$$

Die Messanordnung erfolgte analog einer Vierleitermessung. Dabei wurden an zu untersuchenden Material vier Elektroden angelegt. Über die äußeren Elektroden wurde ein bekannter Strom eingespeist, während über die inneren die Messung des entstehenden Spannungsabfalls stattfand (Abb. 2.4a). Das Vierleitermessverfahren nutzt demnach separate Leitungen für die Stromzufuhr und für die Spannungsmessung und ist so weitgehend unabhängig von Übergangs- und Leitungswiderständen R_{Ltg} .

Aus dem Widerstand der Probe R_P , der Querschnittsfläche A der Proben und dem Abstand l der inneren (Mess-)Elektroden zueinander wurde der spezifische elektrische Widerstand ρ ermittelt, dessen Kehrwert die elektrische Leitfähigkeit σ ist:

$$\rho = R_P \cdot \frac{A}{l} = \frac{1}{\sigma} \quad (2.12)$$

Die Querschnittsfläche der Kompositproben betrug $A = 48 \text{ mm}^2$. Hierfür erfolgte ein Verguss der Proben in eine ABS-Gusskammer (Abb. 2.4b) auf eine Breite von 8 mm und eine Höhe von 6 mm mit anschließender Vernetzung. Für die Messung wurde ein Deckel mit mehreren Schlitzern auf die Kammer gesetzt. Durch diesen wurden 5 mm breite und 0,5 mm dicke Elektroden in die Proben hineingeschoben (Abb. 2.4c). Die Elektroden waren an ihren Enden schräg angeschliffen, so dass sie einen scharfen Grat besaßen und ohne Materialquetschungen in die Proben eindringen konnten. Die Innenelektroden besaßen einen Abstand von $l = 1 \text{ cm}$.

Der Messaufbau bestand weiterhin aus einer elektrochemischen Schnittstelle und einem Frequenzgang-Analysator. Die Messungen erfolgten bei einem an den Außen Elektroden angelegten konstanten Wechselstrom von 0,5 mA. Über die Software "Z-Plot" wurden der Realteil R und der Imaginärteil X der Impedanz \underline{Z} ausgegeben.

Die Kompositproben hatten einen Alginatanteil von 60–80%. Pro Kompositzusammensetzung wurden mindestens 5 Proben untersucht. Die zur Herstellung der Komposite verwendete Alginatlösung enthielt 0,9% NaCl. Des Weiteren wurden die

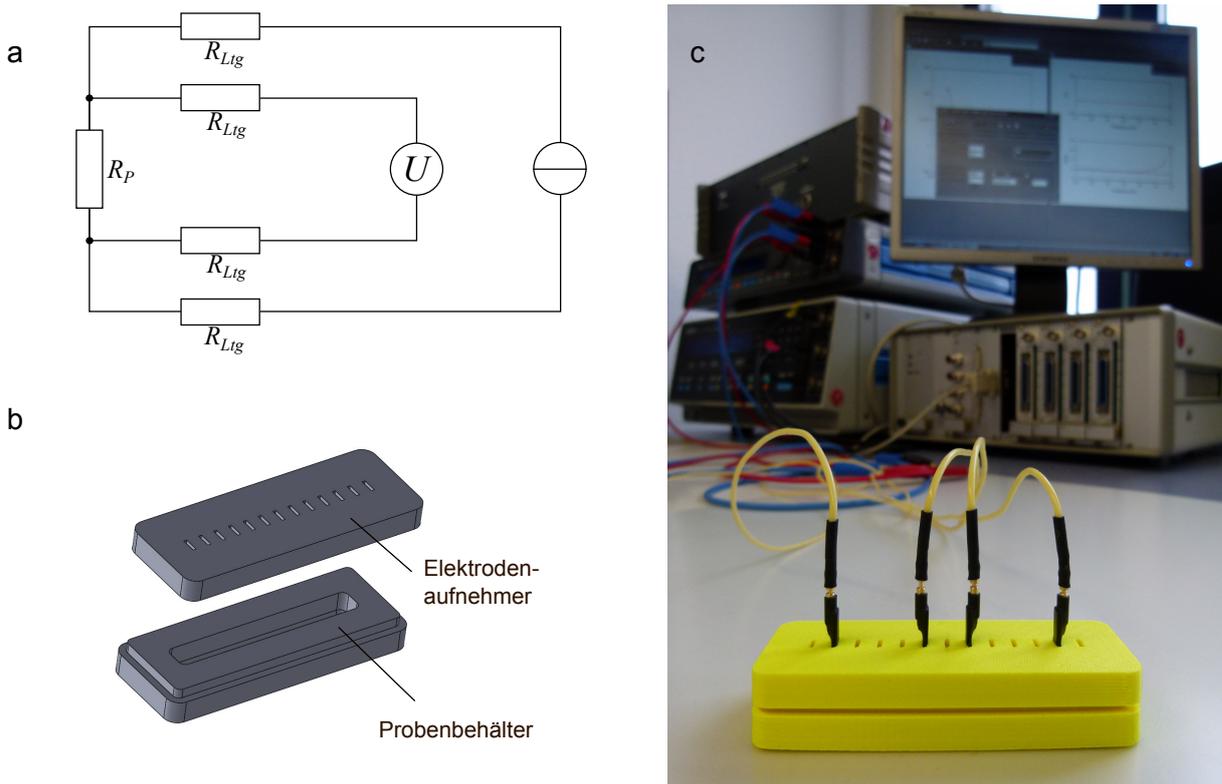


Abbildung 2.4: a) Schaltbild, b) Probenbehälter und c) Messaufbau der Vierleitermessung.

Impedanzen von 6%igen Lösungen aus niedermolekularem Alginat mit und ohne 0,9% NaCl, einer 0,65%igen Lösung aus hochmolekularem Alginat (*L. trabeculata* Charge SE A010, *L. nigrescens* Charge SE A011; beide Alginattec) mit 0,9% NaCl, sowie von reiner 0,9%iger NaCl-Lösung gemessen.

2.2.12 Wasserkontaktwinkelmessung

Die Benetzbarkeit eines Stoffes kann über den Kontaktwinkel θ , den ein Flüssigkeitstropfen an der Grenzfläche zu einem festen Untergrund ausbildet, quantifiziert werden.

Wasserkontaktwinkelmessungen wurden auf der Oberfläche der Komposite, an ihrem Querschnitt und an den Flächen, an denen sie während der Vernetzung des Silikonanteils in Kontakt zu ihrer Gussform standen, durchgeführt. Bei den Gussformen handelte es sich um Becher aus Polypropylen und um Gefäße aus ABS. Die Polypropylen-Becher wurden für einen Teil der Proben unbehandelt verwendet und waren für den anderen Teil mit Sauerstoffplasma für 5 min hydrophilisiert worden (99 sccm, 0,013 mbar Arbeitsdruck, 100 W; Sentech). Zur Glättung der Oberfläche der ABS-Behälter fand eine 15-minütige Bedampfung mit Aceton statt.

Nach dem Verguss der Komposite und Vulkanisierung ihres Silikonanteils wurden die Proben den Gefäßen entnommen und für 30 s in 20 mmol BaCl_2 -Lösung getaucht, um das Alginat an der Oberfläche zu vernetzen. Für die Messungen am Querschnitt

fand zuvor eine vertikale Zerteilung der Komposite mit einem Skalpell statt. Auf den Proben verbliebene BaCl_2 -Lösung wurde vorsichtig abgetupft.

Die Komposite besaßen einen Alginatanteil von 60–80%. Vergleichend hierzu erfolgten Wasserkontaktwinkelmessungen auf reinem PDMS (Verhältnis 10:1 von Komponente A zu Komponente B). An den Gefäßen, in welche die Komposite vergossen wurden, fand ebenfalls eine Bestimmung des Wasserkontaktwinkels statt.

Die Messungen wurden mit 2 μl Wassertropfen (Rotisolv) durchgeführt, die auf den Proben abgesetzt und nach einer Relaxationszeit von 5 s vermessen wurden. Von jeder Probensorte erfolgten Messungen mit mindestens 3 Proben und an mindestens 3 unterschiedlichen Stellen je Probe.

2.2.13 Zytotoxizitätstest

Bevor die PDMS-Alginat-Komposite in *in-vitro*-Versuchen eingesetzt werden konnten, musste eine schädliche Wirkung der Materialien auf die Zellen ausgeschlossen werden. Daher wurden Zytotoxizitätstests nach ISO 10993-12 durchgeführt.

Alle getesteten Kompositproben enthielten einen Alginatanteil von 75%, jedoch mit drei verschiedenen Arten von Alginat: unbehandeltes niedermolekulares 6%iges Alginat, aufgereinigtes niedermolekulares 6%iges Alginat und hochmolekulares 0,65%iges Alginat (*L. trabeculata* Charge SE A010, *L. nigrescens* Charge SE A011; beide Alginatec).

Die Aufreinigung und Sterilisierung des niedermolekularen Alginats erfolgte durch die Herstellung einer 1%igen Lösung aus unbehandeltem niedermolekularem Alginat, welche über einen 0,2 μm Cellulose-Spritzenfilter filtriert wurde. Anschließend wurde diese 1%ige Lösung durch Eindampfen bei 80 °C auf 6% aufkonzentriert. Die Kompositherstellung aus den beiden niedermolekularen Alginaten erfolgte gemäß 2.2.1. Die Proben wurden auf eine Größe von 5 x 5 x 5 mm^3 zugeschnitten. Bei einigen dieser Probenkörper folgte ein Auswaschen der noch unvernetzten Alginatphase mit anschließender Aufnahme von steriler hochmolekularer Alginatlösung.

Vor Versuchsbeginn wurden sämtliche Proben für 10 min mit BaCl_2 -Lösung versetzt und danach in PBS gespült. Für die Komposite mit unbehandeltem niedermolekularem Alginat fand zusätzlich eine 10-minütige Sterilisation unter UV-Licht statt. Die Alginatlösungen aller verwendeten Komposite, wie auch die BaCl_2 -Lösung, waren zur Vermeidung osmotischer Gefälle auf eine NaCl-Konzentration von 0,9% eingestellt.

Die fertigen Proben wurden nun in 1 ml L929-Zellkulturmedium gelegt und bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h erfolgte eine Abnahme des Mediums, welches anschließend als Kulturmedium für L929-Zellen, die 24 h zuvor mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^4$ Zellen/ml zu je 100 μl in 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät wurden, diente. Auf die Zellen von 12 besiedelten Wells pro Kompositprobe wurden je 70 μl des Probenüberstandes gegeben. Als Kontrolle kam reines Kulturmedium zum Einsatz, welches zu je 70 μl auf 12 weitere besiedelte Wells gegeben wurde. Es folgte eine Inkubation aller Zellen für 24 h bei 37 °C. Zur Vermeidung von Flüssigkeitsverlust durch Verdampfung enthielten die restlichen Wells der Zellkulturplatte je 100 μl PBS.

Die Auswertung des Tests erfolgte mit Hilfe von WST-1- und BrdU-Testkits nach Kit-Protokoll [124, 123]. Hierfür wurde das Medium von den Zellen abgezogen und durch 100 µl frisches Kulturmedium ersetzt. Je 6 Wells jeder Probe (und der Zellkontrolle) wurden mit den entsprechenden Reagenzien der Testkits versetzt und inkubiert. Die Messung des Farbumschlags der Medien erfolgte mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm.

2.2.14 Biofunktionalisierung des Komposits mit NGF

Als Nachweis für die Funktionalisierung von Silikon-Alginat-Kompositen mit bioaktiven Wirkstoffen wurde der Nervenwachstumsfaktor NGF in die Komposite eingebracht. Es fand eine Messung seines Einflusses auf das Differenzierungsverhalten von PC12-Zellen in Abhängigkeit von der Diffusion aus den Kompositen statt.

Für diesen Test wurden Probenstücke mit einem Gesamtanteil an Alginat von 75% und 80% hergestellt und auf eine Größe von 5 x 3 x 3 mm³ zugeschnitten. Nach der Vulkanisierung des Silikons erfolgte zunächst ein Auswaschen des niedermolekularen Alginats aus den Kompositen und eine anschließende 10-minütige Sterilisation der verbliebenen PDMS-Schwämme unter UV-Licht. In diese Schwämme wurde nun steriles hochmolekulares Alginat (*L. trabeculata* Charge SE 57, *L. nigrescens* Charge SE 58; beide Algisano) aufgenommen. Es folgte eine Aufteilung der Komposite in zwei Gruppen, wobei das Alginat der einen Gruppe für 20 min und das der anderen für 22 h in 20 mmol BaCl₂-Lösung vernetzt wurde. Nach einem Spülvorgang in PBS wurden sämtliche Proben für 24 h bei 4 °C in einer PBS-Lösung, die 5 µg NGF/ml enthielt, gelagert.

Vorbereitend auf die Kultur der PC12-Zellen wurden die Wells von 24-Well-Zellkulturplatten für 20 min mit einer 0,01%igen Lösung aus Poly-L-Lysin beschichtet und anschließend für 2 h trocknen gelassen. In diese Wells wurde jeweils 1 ml Zellsuspension mit 3,6 · 10⁴ PC12-Zellen vorgelegt. Dabei bestand das Medium der Positivkontrolle aus normalem Differenzierungsmedium mit 100 ng/ml NGF, während die Zellen in den anderen Wells reduziertes Differenzierungsmedium (ohne NGF) hatten. Außer zur Positivkontrolle wurde in jedes Well eine der verschieden behandelten Kompositproben gegeben. Zu den 75%igen Kompositen wurden weiterhin 680 µl und zu den 80%igen Kompositen 800 µl reduziertes Differenzierungsmedium hinzugefügt, so dass bei vollständiger Abgabe des NGF aus den Proben unabhängig von deren Alginatanteil eine Konzentration von 100 ng/ml im Medium vorgelegen hätte. Die Kompositproben wurden anschließend für entweder 30 oder 90 min zusammen mit den Zellen bei 37 °C inkubiert. Nach ihrer Entfernung erfolgte eine Weiterkultivierung der Zellen für 72 h. Als Negativkontrolle dienten PC12-Zellen in reduziertem Differenzierungsmedium mit Kompositproben, die kein NGF enthielten.

Die Versuche fanden in 3-facher Ausführung für jede Probenart statt. Aus jeweils fünf unterschiedlichen mikroskopischen Aufnahmen pro Probenansatz wurden die Zellen gezählt und das Verhältnis differenzierter zu undifferenzierten Zellen ermittelt. Dabei galten nur solche Zellen als differenziert, deren zelluläre Auswüchse mindestens 20 µm lang waren. Weiterhin erfolgte eine Lebend/Tot-Färbung der Zellen (siehe 2.1.5).

2.2.15 Oberflächenmodifikation von PDMS

Die Biofunktionalisierung von Silikon kann neben der Modifikation des Materials an sich auch über die Veränderung der Silikonoberfläche erfolgen. Das Ziel dieses Versuches war es, die Oberfläche von PDMS so zu aktivieren, dass sich Zellen verstärkt an sie anhefteten. Hierfür fand zum einen eine Silanisierung des PDMS mit dem Molekül APTES statt. Zum anderen wurde das Glykoprotein Vitronectin sowohl über chemische Verfahren kovalent als auch über Physisorption an das PDMS gebunden². Die Oberflächenmodifikation von planarem Silikon diente als Vorstufe für Versuche mit PDMS-Schwämmen.

Zunächst wurde reines PDMS mit einem Verhältnis 10:1 der Komponente A zu Komponente B angesetzt und in die ABS-Form aus 2.2.9 auf eine Dicke von 1 mm gegossen. Nach dem Entgasen des Silikons erfolgte eine Vulkanisierung bei 80 °C. Mit einem Locheisen wurden Proben von 6 mm Durchmesser ausgestochen. Es folgte eine Reinigung der planaren Scheiben sukzessiv mit 50%igem Ethanol und deionisiertem Wasser und eine anschließende Trocknung.

Für die Modifizierung der Oberfläche wurden die PDMS-Proben in 4 Gruppen eingeteilt (Abb. 2.5). Die 1. Gruppe bestand aus nicht veränderten Proben ("natives PDMS"). Auch die 2. Gruppe, an die später eine physikalische Adsorption von Vitronectin erfolgte, blieb vorerst unverändert. Die Probenbehandlung der Gruppen 3 und 4 ("PDMS+Plasma+APTES" und "PDMS+Plasma+APTES+GA+VN") war an das Verfahren von Kuddannaya et al. [78] angelehnt. Zunächst fand eine Aktivierung ihrer Oberfläche für 3 min mit Sauerstoffplasma (10 sccm, 1,1 mbar, danach für 30 s mit N₂ gespült; Diener) statt. Anschließend wurden sie in eine 10%ige 3-(Triethoxysilyl)-propylamin (APTES)-Lösung gegeben, darin für 2 h bei 50 °C belassen und danach mit deionisiertem Wasser gespült. Für eine der beiden Gruppen ("PDMS+Plasma+APTES+GA+VN") folgte ein 1-stündiges Bad in einer 2,5%igen Glutaraldehyd (GA)-Lösung bei Raumtemperatur mit anschließender Spülung in deionisiertem Wasser. Die Proben aller Gruppen wurden nun für 10 min unter UV-Licht sterilisiert. Auf die unbehandelte Gruppe 2 ("PDMS+VN"), sowie auf die modifizierte Gruppe 4 folgte eine Zugabe von 20 µg/ml Vitronectin (VN) unter aseptischen Bedingungen. Das VN wurde für 1 h bei Raumtemperatur auf den Proben belassen und danach abgezogen. Es fand kein weiteres Spülen statt.

Eine erste Prüfung der unterschiedlichen Beschichtungen erfolgte über die Messung des Wasserkontaktwinkels nach 2.2.12. Um die Wirkung der PDMS-Modifikation auf das Adhäsionsvermögen von Zellen zu untersuchen, wurden die Proben in 96-Well-Zellkulturplatten gelegt. Auf jede Probe kamen 100 µl einer Zellsuspension mit hUC-MSCs (7,5·10³ Zellen/ml; Passage 7). Die umgebenden leeren Wells waren mit 100 µl PBS aufgefüllt, um ein übermäßiges Verdunsten von Zellmedium zu vermeiden. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C. Zur Abtrennung nicht adhärierter Zellen wurden die PDMS-Proben nach 24 h in neue Wells mit frischem Medium überführt und für weitere 4 Tage inkubiert.

²Vitronectin kommt u.a. im Serum und in der extrazellulären Matrix vor und vermittelt aufgrund seiner Arginin-Glycin-Asparagin-Sequenz eine gute Zellanbindung [50]

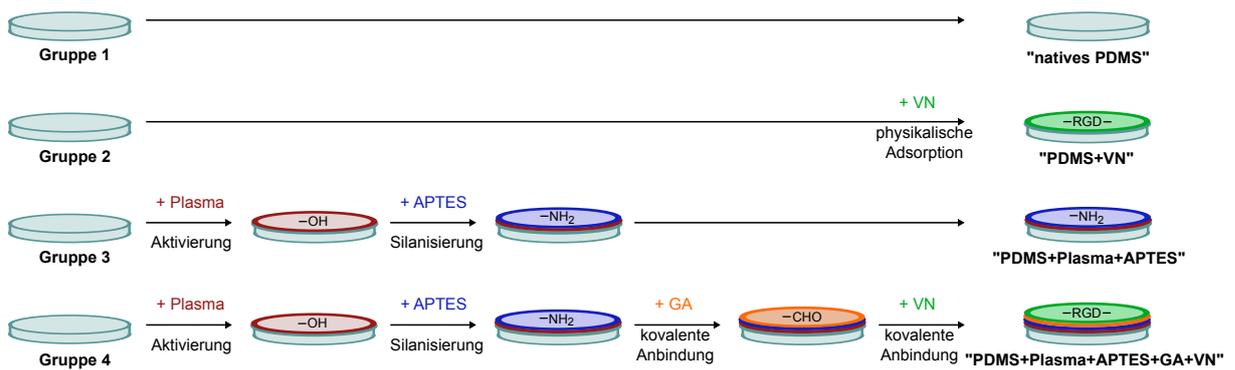


Abbildung 2.5: Schema der Oberflächenmodifikation von PDMS-Proben: unbehandeltes PDMS (Gruppe 1), physikalische Adsorption von VN an unmodifiziertes PDMS (Gruppe 2), kovalente Anbindung von APTES und kovalente Anbindung von VN über GA und APTES an plasmaaktivierte PDMS-Oberflächen (Gruppen 3 und 4). Nach jedem Modifikationsschritt sind auf den Probenoberflächen die entsprechenden funktionellen Gruppen dargestellt. APTES steht für 3-(Triethoxysilyl)-propylamin, GA für Glutaraldehyd und VN für Vitronectin. RGD bezeichnet die Arginin-Glycin-Asparagin-Sequenz des Vitronectins.

Am 2. und 5. Tag fand eine mikroskopische Kontrolle der Zellen statt. Von drei unterschiedlichen fotografischen Aufnahmen pro Probe wurden die adhärenierten Zellen gezählt, gemittelt und auf eine Fläche von 1 cm² hochgerechnet. An Tag 5 fand zudem eine Ermittlung der Vitalität der Zellen über die Bildung von Formazan statt. Hierfür wurden sämtliche Proben in 100 µl frisches Kulturmedium überführt und mit 10 µl Reagenz eines WST-1-Testkits versetzt. Der Testablauf und die Auswertung erfolgten nach Kit-Protokoll [124] und wie in 2.2.13 beschrieben. Anschließend wurde eine Lebend/Tot-Färbung nach 2.1.5 durchgeführt.

Die Versuche fanden in 5-facher Ausführung für jede Probe statt. Als Referenz zu den planaren PDMS-Proben dienten parallel auf Zellkulturplatten gewachsene hUC-MSCs.

2.2.16 Besiedelung von PDMS-Schwämmen mit Zellen

Neben der Biofunktionalisierung von PDMS-Alginat-Kompositen fand eine Überprüfung der Möglichkeit zur Zellbesiedelung ausgespülter Komposite statt. Nach bereits erfolgter Evaluierung des Adhäsionsverhaltens von hUC-MSCs auf bioaktivierten planaren PDMS-Oberflächen wurde die Anheftung der Zellen auf und in den PDMS-Schwämmen untersucht.

Die verwendeten Schwämme entstammten 70%igen Kompositen, aus denen die Alginatphase ausgespült wurde. Die Anfertigung der Komposite erfolgte analog der Herstellung von Diffusionstestproben nach 2.2.10 zu 1 mm dicken Scheiben. Daraus wurden mit einem Locheisen die Proben mit einem Durchmesser von 6 mm gestochen.

Die Vorbereitung der PDMS-Schwämme, ihre Modifikation und der grundsätzliche Versuchsablauf erfolgten analog zu den planaren PDMS-Proben, wie sie in 2.2.15

beschrieben sind. Die Waschlösungen und Reagenzien wurden durch wiederholtes Aufsaugen in die PDMS-Schwämme aufgenommen. Mit 100 μl einer hUC-MSC-Zellsuspension ($7,5 \cdot 10^3$ Zellen/ml; Passage 7) wurden die präparierten Schwämme beimpft. Nach 24 h erfolgte eine Überführung der Proben in neue Wells mit frischem Kulturmedium. An Tag 5 fand die Auswertung des Versuchs über die Zellviitalität statt, wofür das WST-1-Reagenz nach Kit-Protokoll [124] zugegeben, jedoch nicht aufgesaugt wurde. Ebenso verhielt es sich mit den Reagenzien der anschließenden Lebend/Tot-Färbung (siehe 2.1.5) zur Sichtbarmachung der Zellen innerhalb der Schwämme. Als Referenz dienten auf Zellkulturplatten gewachsene hUC-MSCs.

In weiteren Versuchen wurden PDMS-Schwämme mit PC12-Zellen besiedelt. Die Adhäsion dieser Zellen wird u.a. durch das Matrixprotein Kollagen stimuliert [154]. Daher fand eine Vorbehandlung der Schwämme mit 0,1 mg/ml Kollagen Typ I (anstelle von Vitronectin) bei 4°C über Nacht statt. Anschließend wurde eine PC12-Zellsuspension mit $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml in die Schwämme aufgenommen. Nach 5 Tagen Inkubation in Differenzierungsmedium erfolgte eine Lebend/Tot-Färbung der Zellen nach 2.1.5.

2.2.17 Einbettung von Zellen in die Alginatphase des Komposits

Die Zellbesiedelung eines Materials ist neben der direkten Anheftung mit Zellen auch über eine Einbettung von Zellen möglich. Das PDMS-Alginat-Komposit könnte als Matrix für die Immobilisierung von Zellen dienen. Um dies zu untersuchen, wurde das Langzeitüberleben von L929-Zellen beobachtet, welche in der Alginatphase des Kompositmaterials eingebettet waren.

Für diesen Versuch kamen Komposite mit 79% Alginatanteil zum Einsatz. Nach der Vernetzung des PDMS wurden die Komposite in Stücke geschnitten, welche $5 \times 5 \text{ mm}^2$ maßen und eine Dicke von 1, 2 und 3 mm besaßen. Für jede Dicke lagen 18 Proben vor, aus denen das niedermolekulare Alginat ausgespült wurde. Durch eine 10-minütige Bestrahlung mit UV-Licht wurden die PDMS-Schwämme sterilisiert. Anschließend wurde steriles hochmolekulares Alginat (*L. trabeculata* Charge SE 57, *L. nigrescens* Charge SE 58; beide Algisano), in welches zuvor L929-Zellen zu $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml Alginat dispergiert worden waren, in die Proben aufgesaugt. Die Immobilisierung der Zellen erfolgte durch die Vernetzung des Alginats für 20 min in 20 mmol BaCl_2 -Lösung. Danach wurden die Komposite in PBS gespült und separiert in 24-Well-Suspensionskulturplatten gelegt. Es folgte eine Inkubation der Proben in L929-Medium bei 37°C bis zu 25 Tage. Jeden dritten Tag fand eine Überführung der Komposite in frisches Medium statt. An Tag 0, sowie nach 1, 3, 7, 15 und 25 Tagen wurden jeweils drei Proben jeder Größe entnommen, kurz in PBS gespült und eine Lebend/Tot-Färbung nach 2.1.5 für 20 min durchgeführt. Um die Zellen im Inneren der Komposite sehen und die Zellzahlen ermitteln zu können wurden die Proben nach der Färbung mit einem Skalpell quer geschnitten.

2.2.18 HET-CAM

Damit das PDMS-Alginat-Komposit als möglicher Implantatwerkstoff genutzt werden kann, musste dessen Biokompatibilität überprüft werden. Neben den bereits erfolgten Zytotoxizitätstests fand daher eine Untersuchung der Körperverträglichkeit mittels eines Hühnerei-Tests an der Chorion-Allantois-Membran (HET-CAM) statt. Hierfür wurden Materialproben auf die Chorion-Allantois-Membran (CAM) von Hühnerembryonen gelegt und diese über mehrere Tage hinweg beobachtet.

Die Hühnerembryonenkultur erfolgte nach dem Protokoll von Perry [114] und Rowlett & Simkiss [128]. Die Präparation und spätere Untersuchung der Hühnereier fand unter einer Sterilbank statt. Die Versuche richteten sich am "Guide for the care and use of agricultural animals in research and teaching" [100] aus. Unnötiger Stress für die Embryonen wurde vermieden.

Zunächst wurden 26 fertilisierte Hühnereier von Embryonaltag (ED) 0 bis ED3 bei 37,5°C und 65% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Dabei wurden sie alle 2 h um einen Winkel von 30° mit einer Geschwindigkeit von 0,6%/s gewendet. An ED3 erfolgte ein Umsetzen der Embryonen in Fremdschaleneier. Hierfür wurden handelsübliche Eier der Größe L, die 23–26 g schwerer waren als die Spendereier, an ihrem stumpfen Ende mit einem Dremel aufgeschnitten. Aus der entstandenen Öffnung von 42 mm Durchmesser wurde der Inhalt der Eier verworfen. Es folgte eine Untersuchung der leeren Eierschalen auf Risse und ein Abspülen der Außenseiten mit destilliertem Wasser. Ein befruchtetes Spenderei wurde nun geöffnet und sein Inhalt mit Hilfe einer Frischhaltefolie als Auffang in ein großes Fremdschalenei überführt. Nach dem Entfernen der Folie erfolgte ein Auftragen von flüssigem Eiweiß ("Eiweißkleber") mit einem sterilen Wattestäbchen um die Öffnung des Fremdschaleneis. Anschließend wurde ein Stück Frischhaltefolie faltenfrei über die Eiöffnung gespannt und über den Eiweißkleber gestrichen. Dieser Vorgang fand ein zweites Mal mit einem weiteren Stück Folie statt. Zum Schluss wurden die zwei übereinanderliegenden Folien mit einem Skalpell etwa 8 mm unterhalb der Öffnung um das Ei herum abgeschnitten (Abb. 2.6a). Es folgte eine Inkubation der umgesetzten Eier für weitere 7 Tage bis ED10.

An ED10 fand die Bestückung der CAMs mit den Materialproben statt. Von ED6 auf ED7 verstarben zwei Embryonen, so dass noch 24 Eier zur Verfügung standen. Insgesamt wurden die Embryonen mit 8 Proben aus Kompositmaterial und zum Vergleich mit 8 Proben aus reinem PDMS (10:1 Verhältnis von Komponente A zu Komponente B) versehen. Die verbliebenen 8 Eier dienten als Kontrolle. Sie enthielten keine Proben, durchliefen jedoch die gleichen Behandlungsprozesse wie die beprobten Eier. Die Herstellung sowohl der Kompositproben als auch der reinen PDMS-Proben erfolgte wie in 2.2.10 für den Zwei-Kammer-Diffusionsversuch beschrieben. Sie waren daher kreisförmig mit einem Durchmesser von 12 mm und einer Dicke von 1 mm. Nach dem Vernetzen des Silikons wurde aus den Kompositen das niedermolekulare Alginat ausgespült. Um eventuelle Silikonölreste zu entfernen, wurden alle Proben für 30 min in 50%igem Ethanol gereinigt und danach für 1 h bei 80°C gebacken. Anschließend fand eine Sterilisation im Autoklaven statt. Für die Komposite folgte eine aseptische Aufnahme von sterilem hochmolekularem Alginat (*L. trabeculata* Charge A009, *L. ni-*

grescens Charge A012; beide Alginattec). Dieses Alginat wurde für 20 min mit 20 mmol BaCl_2 -Lösung vernetzt. Überschüssige Ionen konnten durch 10-minütiges Spülen in PBS entfernt werden.

Für die Beprobung eines Embryos musste zunächst die Folie vom Ei entfernt werden. Vorsichtig und unter Vermeidung von Lufteinschlüssen wurde die Materialprobe auf die CAM gelegt. Hierbei war darauf zu achten, dass die Probe nicht direkt über dem Embryo platziert wurde. Seine teilweise heftigen Bewegungen hätten sonst die Probe weit an den Rand des Eis drängen können, wo sie sich ungünstig vertikal zwischen CAM und Eischale hätte positionieren können. Nach dem Auflegen der Probe wurde das Ei wieder mit doppelter Folie, wie oben beschrieben, verschlossen und weiter bis ED17 inkubiert.

Während der Versuchsdauer erfolgte täglich eine Entnahme der Eier aus dem Brutschrank mit Überprüfung der Embryonen auf ihre Vitalität. Die Folien wurden entfernt (Abb. 2.6b), die Proben fotografisch unter einem Stereomikroskop dokumentiert und die Eier anschließend mit neu aufgebrauchten Folien weiter inkubiert (Abb. 2.6c).



Abbildung 2.6: a) Folienabdeckung eines Fremdschaleneis; b) offenes Fremdschalenei mit 12 Tage altem Hühnerembryo und auf der Chorion-Allantois-Membran (CAM) aufgelegter Kompositprobe; c) Eier mit 12 Tage alten Hühnerembryonen im Brutschrank.

Nach Abschluss der Dokumentation an ED17 wurden die CAMs mit einer Hautschere im Abstand von 3–5 mm um die Proben herum ausgeschnitten. Auch Teile der CAMs von unbeprobten Eiern wurden exzidiert (Stücke einer Größe von 5 x 5 und 10 x 5 mm²). Mit einer Pinzette konnten die Proben auf einen Objektträger gezogen und in PBS transferiert werden. Direkt im Anschluss einer jeden Entnahme erfolgte die Dekapitation des Hühnerembryos. Die Proben mit dem Gewebe wurden zur Entfernung von Blut- und Eiweißresten vorsichtig in PBS gespült.

2.2.19 Anfertigen von Gewebeschnitten, histologische Färbung und Bestimmung der CAM-Dicke

Nach Beendigung des HET-CAMs erfolgte eine histologische Untersuchung des CAM-Gewebes unterhalb der Materialproben. Hierfür mussten zunächst Dünnschnitte mit

einem Kryostaten angefertigt werden.

Die in PBS gespülten Proben wurden in ein mit Einbettmedium vorgelegtes Einbettförmchen überführt. Es wurde weiter Einbettmedium so weit aufgefüllt, dass zwar das Gewebe komplett bedeckt war, die Materialprobenoberfläche jedoch frei blieb. Nach Ausrichten der Probe und Entfernen eventueller Luftblasen folgte ihr Einfrieren für mindestens 1 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Waren das Einbettmedium und das Gewebe komplett gefroren, konnten nun die Materialproben entfernt werden. Dies war nötig, da das Silikon in der gefrorenen Probe elastisch blieb³ und bei Dünnschnitten unter $100\text{ }\mu\text{m}$ zum Abrutschen der Klinge und zum Zerreißen der Gewebeschnitte führte.

Die reinen PDMS-Proben ließen sich mit einer Nadel und einer Pinzette leicht vom gefrorenen Gewebe ablösen. Die Kompositproben mussten dagegen erst durch Auflegen eines auf $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmten Metallzylinders mit 10 mm Kreisdurchmesser für etwa 5 s leicht angetaut werden. Dabei wurde das Alginat in den Kompositen, welches am Gewebe angefroren war, so weit aufgetaut, dass ein Abziehen der Probe vom Gewebe möglich war. Das Gewebe selbst durfte jedoch nicht mit auftauen, da es sonst am Komposit klebte und ebenfalls abgezogen wurde.

War die Materialprobe entfernt, wurde nochmals Einbettmedium aufgetragen, bis das Gewebe vollständig bedeckt war. Danach konnten die Proben wieder eingefroren werden. Aus den tiefgefrorenen Präparaten erfolgte in einem Kryostaten die Anfertigung von $10\text{ }\mu\text{m}$ dicken Dünnschnitten (Schnitttemperatur: $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Bei einer der Kompositproben wurden vor der Entfernung des Materials fünf Schnitte mit einer Dicke von $100\text{ }\mu\text{m}$ angefertigt. Danach wurde das Komposit entfernt und wie bei den anderen Proben fortgefahren.

Das Aufziehen der Dünnschnitte auf Objektträger erfolgte nachdem jeweils etwa $300\text{ }\mu\text{m}$ des Gewebes durchschnitten wurden. So ergaben sich $N = 35 \pm 5$ Schnitte pro Probe. Die Schnitte wurden anschließend auf einem Objektträger-Strecktisch bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet und danach für 1 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Methanol fixiert. Direkt im Anschluss konnten die Objektträger in einer Box bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Die Strukturen im Gewebe der Kryoschnitte wurden mit einer Zweifachfärbung, der Hämatoxylin-Eosin-Färbung ("H&E-Färbung"), verdeutlicht. Hierfür wurden die tiefgekühlten Objektträger auf dem Objektträger-Strecktisch bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min aufgetaut und getrocknet. Die erste Färbung, die Hämatoxylinfärbung, erfolgte in einem Bad aus saurer Hämalaulösung nach Mayer für 5 min . Zum Bläuen des gebundenen Hämatoxylins wurden die Schnitte danach für 2 min in Leitungswasser gespült. Für die zweite Färbung wurden die Objektträger zuerst für 3 s in mit 1% Eisessig versetztes deionisiertes Wasser getaucht. Anschließend folgte ein Bad für $12\text{--}15\text{ s}$ in $0,1\%$ iger Eosinlösung. Nach einem abschließenden Spülen in deionisiertem Wasser wurden die Schnitte auf dem Objektträger-Strecktisch erneut getrocknet. Die Konservierung erfolgte durch Überschichten mit Eindeckmedium und Auflegen eines Deckgläschens. Alle Schnitte wurden mikroskopiert und fotografisch dokumentiert.

³Silikon besitzt aufgrund seiner hohen Kettenbeweglichkeit eine sehr niedrige Glasübergangstemperatur von ca. $-125\text{ }^{\circ}\text{C}$. Erst bei Temperaturen unter $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ beginnt es, seine elastischen Eigenschaften zu verlieren [45].

Die Bestimmung der durchschnittlichen CAM-Dicken erfolgte mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms "GIMP". Hierfür wurden die Übersichtsbilder der 10 μm -Kryoschnitte digital so zugeschnitten, dass nur das CAM-Gewebe, welches sich unterhalb der Probe befand, übrig blieb (Abb. 2.7a und b, Schnitt S). Über die Histogrammfunktion wurde die Zahl der Bildpixel des Gewebes ermittelt (Abb. 2.7c). Auf die Länge der Probe des jeweiligen Schnittes bezogen konnte so die durchschnittliche Dicke des CAM-Gewebes in Bildpixel errechnet und mit Hilfe des Maßstabs in μm umgerechnet werden (in Abb. 2.7d ist diese durchschnittliche CAM-Dicke als $d_{S'}$ vom nivellierten Schnitt S' bezeichnet). Über die Länge zweier benachbarter Kryoschnitte der runden Probe ließ sich zudem die Fläche des dazwischenliegenden Kreisabschnitts geometrisch ermitteln (Abb. 2.7e). Auf diese Fläche wurde die durchschnittliche Dicke des jeweils längeren Probenschnitts extrapoliert (Abb. 2.7f). Die Dicke zu den Kreisabschnitten am Probenrand wurde durch die kürzesten Probenschnitte (in Abb. 2.7e als S'_1 und S'_N bezeichnet) bestimmt. Der gewichtete Mittelwert der CAM-Dicke \bar{d} unterhalb einer Materialprobe ergab sich aus der Summe der Kreisabschnittsdicken unter Berücksichtigung ihrer prozentualen Flächenanteile an der Gesamtfläche (Abb. 2.7g).

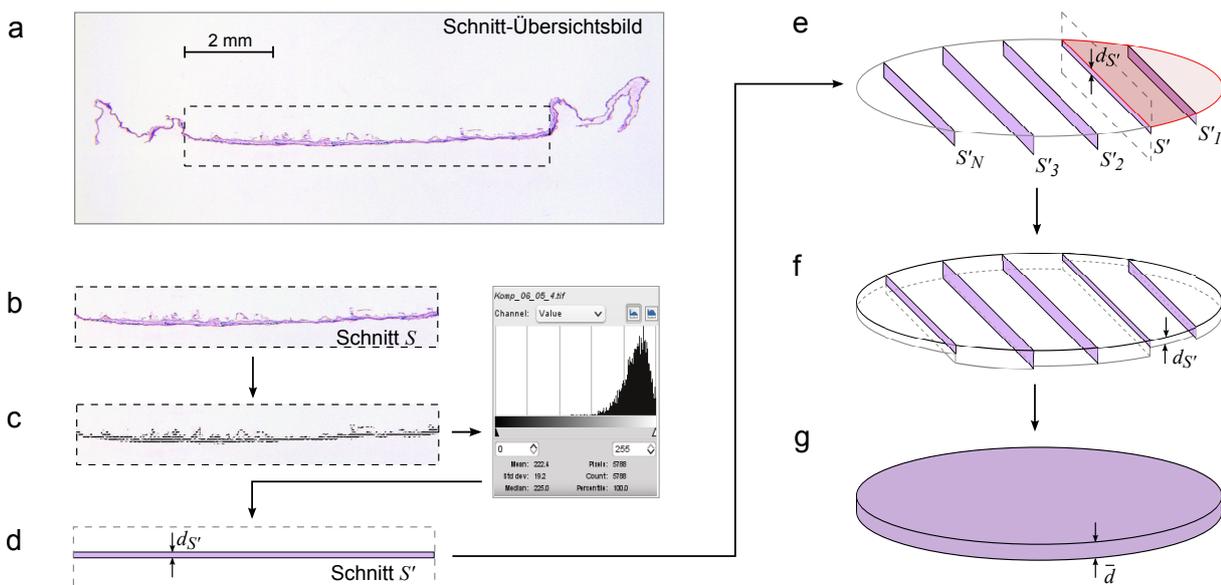


Abbildung 2.7: Schema einer Kryo-Auswertung: a) und b) Zuschnitt des Übersichtsbildes zu Schnitt S , so dass nur die CAM unterhalb der Probe zu sehen ist, c) Ermittlung der Bildpixel des CAM-Gewebes und deren Mengenanteil am Gesamtbild, d) Nivellierung des Schnittes S zu S' durch Bezug der Bildpixel auf die Bildlänge und Ermittlung der durchschnittlichen CAM-Dicke $d_{S'}$, e) Berechnung der Kreisabschnitte der runden Probe zwischen den einzelnen Kryoschnitten, f) Bezug der durchschnittlichen CAM-Dicken auf die berechneten Kreisabschnitte und g) Ermittlung des gewichteten CAM-Dicken-Mittelwertes \bar{d} der Probe.

Vergleichend zu den CAM-Dicken unterhalb der Proben wurde die Dicke von CAMs bestimmt, auf denen keine Probe auflag. Die Anfertigung der Kryoschnitte, die H&E-Färbung und die CAM-Dickenbestimmung erfolgten, wie sie für CAM-Gewebe unterhalb der Materialproben beschrieben wurden.

2.2.20 Aufbau einer implantierbaren Elektrode aus Komposit

Die Demonstration der praktischen Anwendbarkeit des Silikon-Alginat-Komposits als Implantatwerkstoff erfolgte anhand der Herstellung einer Elektrode. Als Vorbild diente eine implantierbare Silikonelektrode ("Myoplant-Elektrode") von Lewis et al., mit der myogene Signale erfasst werden können [89]. Diese Elektrode besteht aus zwei zusammengeklebten Silikonschichten. Sie besitzt eine ovale Form mit einer Länge von 27 mm, einer Breite von 8 mm und einer Dicke von 0,5–0,8 mm. Zwischen den Silikonschichten sind in einem Abstand von 10 mm zwei tiefgezogene Edelstahlkontakte eingebettet, an die jeweils ein isolierter Draht angebracht ist.

Der Aufbau des Kompositelektroden-Prototyps erfolgte analog zum Aufbau der Myoplant-Elektrode. Hierfür wurden zunächst flache Scheiben aus Komposit mit 70% Alginatanteil (die Alginatlösung wurde mit 0,9% NaCl hergestellt) in Dicken von 500 μm und 750 μm geschnitten. Die Methodik zum Anfertigen von Kompositscheiben wurde bereits in 2.2.10 beschrieben. Die Gussformen hierfür hatten jedoch die Geometrie der Silikonelektrode mit entsprechend geringerer Dicke der Gussformringe. Das Alginat der geschnittenen Kompositscheiben wurde für 30 min in 20 mmol BaCl_2 -Lösung vernetzt und die Scheiben anschließend im Ofen bei 80 °C für 30 min getrocknet. In die dünnere Scheibe erfolgte mit einem Locheisen ein Ausstanzen von zwei Löchern mit einem Durchmesser von 3 mm und einem Abstand von 10 mm (Abb. 2.8a und c). In diese Löcher wurden die Edelstahlkontakte mit Silikonkleber MED-1000 so geklebt, dass die Vertiefungen der Kontakte bündig in den ausgestanzten Löchern lagen. Anschließend folgte ein Anlöten von Teflon-isoliertem Edelstahldraht an jeden Kontakt unter Zuhilfenahme von Flussmittel. Die Leitungen wurden um die Kontakte herumgeführt und in einem dünnen Silikonschlauch (Dow Corning) gebündelt. Die halb fertige Prototyp-Elektrode konnte nun in eine Kunststoffform aus ABS gelegt werden, wobei der Silikonschlauch mit den Drähten in einer Vertiefung fixiert wurde (Abb. 2.8b). Die dickere Kompositscheibe wurde einseitig mit MED-1000 bestrichen und auf die dünnere Scheibe mit den Kontakten geklebt. Um eine stabile Verbindung der zwei Kompositschichten zu erzielen, wurde eine zweite, formschlüssige ABS-Form mit Zwingen auf die erste Form gepresst. Die Verklebung erfolgte für 2 h. Der Aufbau der Elektrode ist schematisch in Abb. 2.8c dargestellt.

Die Überprüfung der Funktion der Prototyp-Elektrode fand über die Messung von Elektrokardiographie (EKG)-Signalen statt. Hierfür wurde zunächst eine 70 x 15 x 15 mm³ große Messzelle mit Polymermaterial befüllt, dessen elektrische Leitfähigkeit der eines Muskels entsprechen sollte ("Muskelphantom"). Es bestand aus einer aufgekochten Lösung aus 2,5% Agar mit 0,17% NaCl [34]. Nach ihrem Abkühlen auf 40 °C wurden 10 g davon in die Messzelle gefüllt und gewartet, bis sie Raumtemperatur erreicht hat. Parallel wurde die Agarlösung in eine Gussform nach 2.2.11 gefüllt, so dass eine Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit des erkalteten Muskelphantoms erfolgen konnte.

Die Messzelle verfügte an ihren langen Enden über jeweils einen Elektrodenkontakt. Über diese Kontakte wurde durch das gelierte Phantom mittels eines Generators ein EKG-Signal mit 75 Herzschlägen pro Minute eingespeist. Das generierte Signal

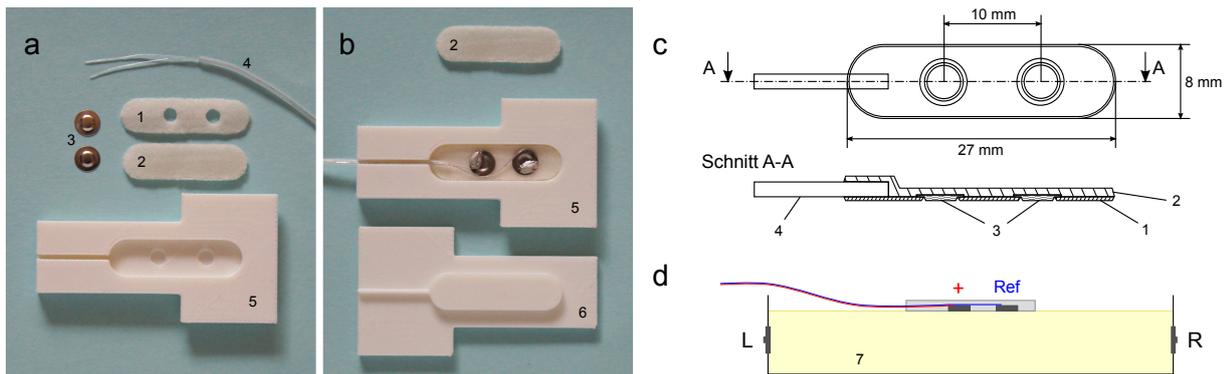


Abbildung 2.8: Aufbau einer Prototyp-Elektrode aus Silikon-Alginat-Komposit: a) benötigte Komponenten und b) halbfertige Prototyp-Elektrode mit angelöteten Drähten in ABS-Form; c) Aufbauschema der Prototyp-Elektrode; d) Schema der Elektrodenmessung: Über die Elektroden L und R wurde ein EKG-Signal in ein Muskelphantom eingespeist und von der Prototyp-Elektrode erfasst, wobei der Spannungsabfall zwischen dem aktiven Kontakt (+) und dem an den Referenzkanal des Verstärkers angebotenen Kontakt (Ref) gemessen wurde. (1) 500 µm dicke Kompositscheibe mit ausgestanzten Löchern, (2) 750 µm dicke Kompositscheibe, (3) Edelstahlkontakte, (4) Teflon-isolierte Drähte im Silikonschlauch, (5) ABS-Form mit formschlüssigem Gegenstück (6) als Aufbauhilfe, (7) Muskelphantom.

entsprach dabei der Ableitung I nach Einthoven⁴. Die Prototyp-Elektrode wurde auf das Muskelphantom gelegt und mit einem kleinen, 10 g schweren Gewicht leicht angedrückt. Mit Hilfe eines Verstärkers (PowerLab) konnte nun ein EKG-Signal über die Prototyp-Elektrode abgeleitet werden. Hierfür war ein Elektrodenkontakt an den Referenzkanal des Verstärkers angeschlossen, der als Masse diente (Abb. 2.8d). Auf diese Weise konnte der Spannungsabfall zwischen den zwei Kontakten gemessen werden.

Die ersten EKG-Signalmessungen wurden kurz nach der Herstellung der Prototyp-Elektrode mit getrocknetem Komposit durchgeführt. Danach wurde die Elektrode für 1 h bei Raumtemperatur in 0,9%iger NaCl-Lösung getränkt, um das Kompositmaterial zu befeuchten. Nach wiederholter Messung folgte eine erneute Inkubation der Prototyp-Elektrode für weitere 17 h in der NaCl-Lösung. Anschließend wurde noch einmal gemessen. Als Vergleich zu diesen Messungen diente bei gleichem Versuchsaufbau die Aufnahme der EKG-Signale mit der Myoplant-Elektrode. Die Aufzeichnung der Messsignale erfolgte mit der Software "LabChart". Die Abtastrate betrug 1.000/s, wobei ein Tiefpassfilter für Frequenzen über 5 kHz, ein Hochpassfilter für Frequenzen unter 1 Hz sowie ein Kerbfilter für 50 Hz eingesetzt wurden. Anschließend fand eine Analyse der EKG-Spektren mittels diskreter Fourier-Transformation statt.

⁴Die Ableitung I nach Einthoven ist eine bipolare Extremitätenableitung zwischen dem rechten und linken Arm und wird in der Elektrokardiographie standardmäßig eingesetzt [139]

3 Ergebnisse

3.1 Vernetzung von PDMS und Alginatlösung zu einem Komposit

Ausgangspunkt aller Versuche bildete die Verbindung der Polymere Polydimethylsiloxan (PDMS) und Alginat zu einem Kompositpolymer. Da PDMS und Alginat zwei nicht ineinander lösliche oder chemisch miteinander reagierende Stoffe sind, ergab das Vermischen von Silikon-Präpolymeren mit Alginatlösung zunächst eine Emulsion. Erst durch das Vernetzen der einzelnen Komponenten entstand aus der Emulsion ein elastisches Kompositpolymer (Abb. 3.1). Die Molekularität des Alginats und die Menge und Konzentration der Alginatlösung waren dabei entscheidend für das Gelingen der Vernetzung.



Abbildung 3.1: Elastisches PDMS-Alginat-Komposit mit 75% Alginatanteil.

3.1.1 Zusammensetzung des Komposits und Konzentration der Alginatlösung

Niedermolekulares und hochmolekulares Alginat wurden in verschiedenen konzentrierten Lösungen angesetzt und zu unterschiedlichen Anteilen mit den PDMS-Präpolymeren vermischt. Die Handhabbarkeit der Alginatlösungen begrenzte dabei deren maximale Konzentration: Die Viskosität der Lösungen stieg mit der Konzentration der Alginate

stark an. Lösungen aus hochmolekularem Alginat besaßen bei einer Konzentration von 2% bereits eine Viskosität von im Schnitt 130,8 Pa·s (Abb. 3.2). Die Viskosität von niedermolekularem 10%igen Alginat betrug durchschnittliche 364,0 Pa·s.

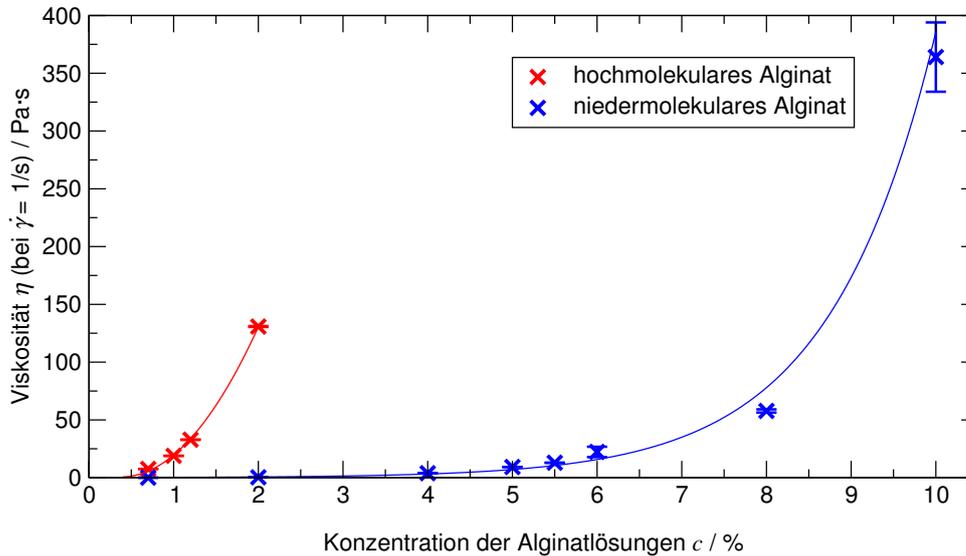


Abbildung 3.2: Viskositäten (bei 20 °C) von Lösungen aus hochmolekularen und niedermolekularen Alginaten in Abhängigkeit von ihrer Konzentration.

Grundsätzlich ließen sich höher konzentrierte Lösungen zu einem größeren Anteil mit PDMS mischen als niedrig konzentrierte. Das maximale Mischungsverhältnis war erreicht, wenn sich die Polymermischungen mit noch größerem Alginatanteil nicht mehr aushärten ließen und damit kein elastisches Komposit entstand (Tabelle 3.1). Eine 2%ige Lösung aus hochmolekularem Alginat war bis zu einem maximalen Anteil von 60% mit dem PDMS mischbar. Mit niedermolekularem Alginat hingegen waren wesentlich höhere Mischungsverhältnisse möglich. Der maximale Anteil an Alginat für vernetzende Mischungen lag bei 80%. Er wurde mit Alginatkonzentrationen von 6–10% erreicht. Höhere Anteile an Alginat führten auch hier dazu, dass sich die Polymermischungen nicht mehr aushärten ließen. Die Mischbarkeit des Alginats mit PDMS war demnach bei geringerer Molekularität der Alginat größer. Sie erhöhte sich zudem mit zunehmender Konzentration (und damit Viskosität) der Alginatlösung.

Für einige spätere Anwendungen musste die unvernetzte Alginatphase aus dem Komposit ausgewaschen werden, so dass ein reines PDMS-Grundgerüst („PDMS-Schwamm“) bestehen blieb. Für diesen Vorgang durfte das Alginat nicht zu hochviskos sein, da es sich sonst nicht vollständig aus dem PDMS-Schwamm entfernen ließ. Mit dieser Einschränkung zeigte die niedermolekulare Alginatlösung mit einer Konzentration von 6% die geeignetsten Eigenschaften für die Herstellung von Kompositen: Diese Konzentration (mit einer Viskosität von $26,8 \pm 4,6$ Pa·s) war zum einem hoch genug, um Komposite mit einem Gesamtanteil an Alginat von 80% zu erreichen, und zum anderen noch gering genug, um nach Vernetzung des Silikons vollständig aus dem Komposit herausgewaschen werden zu können. Die 6%ige niedermolekulare Alginatlösung wur-

Tabelle 3.1: Vernetzung von PDMS MED-6015 mit hochmolekularem (hm) und niedermolekularem (nm) Alginate verschiedener Konzentrationen: ○ vernetzend, ✗ nicht vernetzend.

Anteil an Alginatelösung im PDMS	Vernetzung der PDMS-Alginate-Mischungen										
	Konzentration hm Alginate				Konzentration nm Alginate						
	0,7%	1%	1,2%	2%	0,7%	2%	4%	6%	8%	10%	
20%	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
30%	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
40%	✗	✗	○	○	✗	✗	○	○	○	○	○
45%	✗	✗	✗	○	✗	✗	○	○	○	○	○
50%	✗	✗	✗	○	✗	✗	✗	○	○	○	○
60%	✗	✗	✗	○	✗	✗	✗	○	○	○	○
65%	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	○	○	○	○
70%	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	○	○	○	○
80%	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	○	○	○	○
85%	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗

de daher als Ausgangslösung für die Herstellung der PDMS-Alginate-Komposite verwendet.

3.1.2 Innere Struktur des Komposits

Die innere Struktur der Komposite wurde mittels konfokaler Raman-Mikroskopie an Proben mit unterschiedlichem Gesamtanteil an Alginate untersucht. In Abb. 3.3 ist das Raman-Spektrum eines Kompositausschnittes dargestellt. Die Banden für Alginate (C=O-Schwingung) liegen bei ca. $1.430\text{--}1.850\text{ cm}^{-1}$, die von PDMS (C-H-Schwingung) bei ca. $2.660\text{--}3.000\text{ cm}^{-1}$ und die von Wasser (O-H-Schwingung) bei ca. $3.000\text{--}3.760\text{ cm}^{-1}$. Die Intensität des Alginatepeaks ist jedoch wesentlich kleiner als die des Wasserpeaks. Eine Korrelation der aufgenommenen Bilder von Alginate und Wasser ergab, dass eine Übereinstimmung des lokalen Auftretens beider Stoffe vorlag (siehe Anhang A.1). Gleichzeitig war die Menge der zwei Stoffe linear miteinander verknüpft. Das Alginate war demnach vollständig und gleichmäßig in der wässrigen Phase verteilt und nur an den Stellen zu finden, an denen auch Wasser auftrat. Für die Raman-mikroskopischen Bilder wurden daher die durch die höheren Intensitäten wesentlich besser detektierbaren Wasserverbindungen genutzt.

Über eine normierte Skala konnten den Verbindungen entsprechend ihrer spektroskopisch ermittelten Intensitäten Farben zugeordnet werden. Helle Bildbereiche zeigen einen hohen Anteil an Alginate, dunkle Bereiche einen hohen Anteil an PDMS. Die Raman-mikroskopischen Aufnahmen in Abb. 3.4a lassen besonders ab einem Algi-

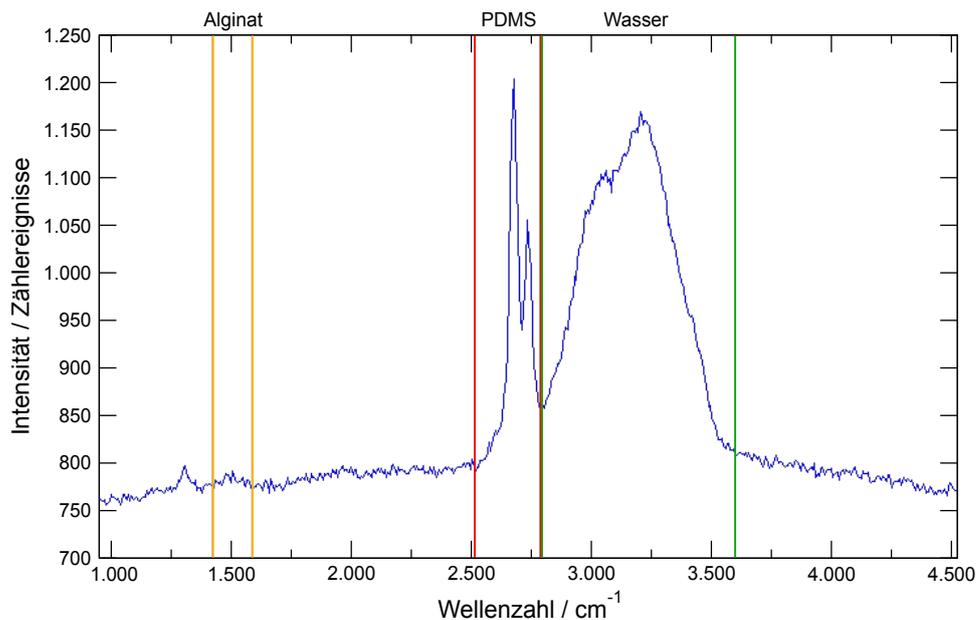


Abbildung 3.3: Spektrum eines Pixels einer Raman-mikroskopischen Aufnahme mit gekennzeichneten Frequenzbereichen für Alginate, PDMS und Wasser.

natanteil von 70% erkennen, dass die Alginatekomponente im Komposit klar von der PDMS-Komponente getrennt war. Das PDMS bildete dabei das Grundgerüst des Komposits, während das Alginate darin kugelförmig verteilt war. Mit Zunahme der Gesamtmenge an Alginate im Komposit wurden die Alginatekompartimente größer. Ab einem Alginateanteil von 70% begannen sie, sich zu berühren. An diesen Berührungspunkten verbanden sie sich, so dass sich ein Alginate Netzwerk innerhalb des PDMS ausbildete. Dies ist besonders gut in der Aufnahme des 75%igen Komposits in Abb. 3.4a zu sehen.

Vergleichend zur Raman-Mikroskopie wurden die Komposite lichtmikroskopisch mit Fluorescein-gefärbtem Alginate untersucht (Abb. 3.4b). Auch hier war deutlich zu erkennen, dass das Alginate (als grüne Kugeln sichtbar) im PDMS eingebettet war. Lichtspiegelungen und -streuungen führten jedoch dazu, dass sich die Ausbildung eines Alginate Netzwerks innerhalb des PDMS lichtmikroskopisch nicht darstellen ließ. Dennoch konnte das Vorhandensein des Alginate Netzwerks über einen einfachen Versuch bestätigt werden: Die Komposite wurden bei 80 °C getrocknet. Durch die erhöhte Temperatur diffundiert das Wasser gasförmig aus dem Material, so dass die Alginate Lösung austrocknete. Komposite mit einem Alginateanteil unter 70% schrumpften dabei ein. Da keine offene Porenstruktur im Komposit vorhanden war, durch die der Wasserdampf hätte entweichen können, diffundiert er aufgrund seines gestiegenen Partialdruckes durch das PDMS hindurch aus dem Material heraus. Der Dampfdruck des Wassers hinderte andere Gasmoleküle der Luft daran, in gleichem Maße in das PDMS hinein zu diffundieren. Das Austrocknen der Alginate Lösung führte deshalb zu einem Kollabieren der voneinander getrennten Alginatekompartimente (Abb. 3.5a). In Kompositen ab einem Alginateanteil von 70% war das Wasser zwar ebenfalls komplett verdunstet, sie behielten jedoch ihre Form bei. Durch das vorhandene offene Netzwerk der Alginate-

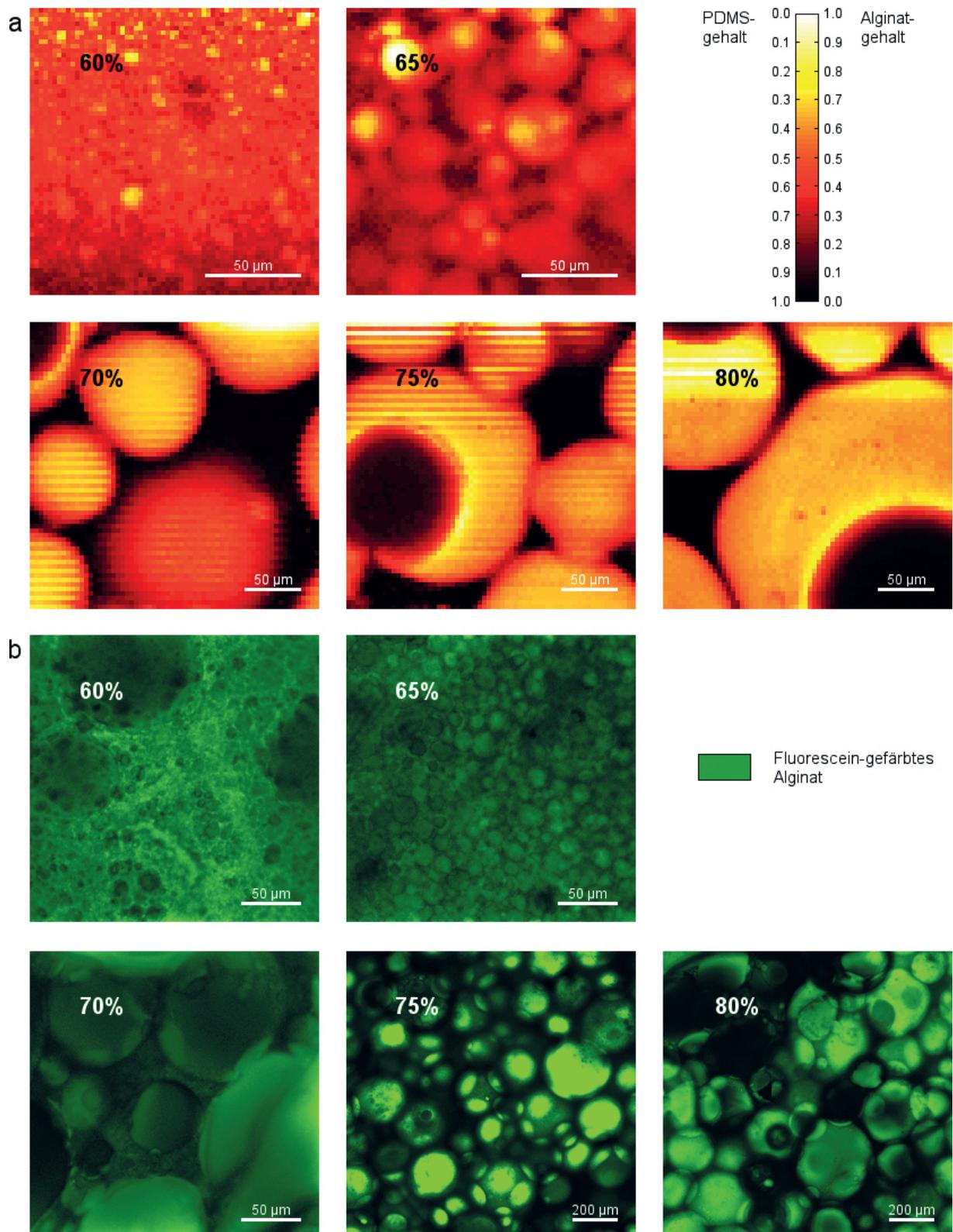


Abbildung 3.4: a) Raman-mikroskopische Aufnahmen von Kompositen und b) lichtmikroskopische Aufnahmen mit Fluorescein-gefärbtem Alginat in den Kompositen. Der Gesamtanteil an Alginat ist in den Bildern der jeweiligen Proben angegeben.

phase konnte gleichzeitig mit dem Entweichen des Wasserdampfes auch Luft in das Komposit einströmen. Das eingetrocknete Alginat legte sich daher als dünne Schicht an die Innenwände der Poren, welche es im PDMS hinterließ (Abb. 3.5b).

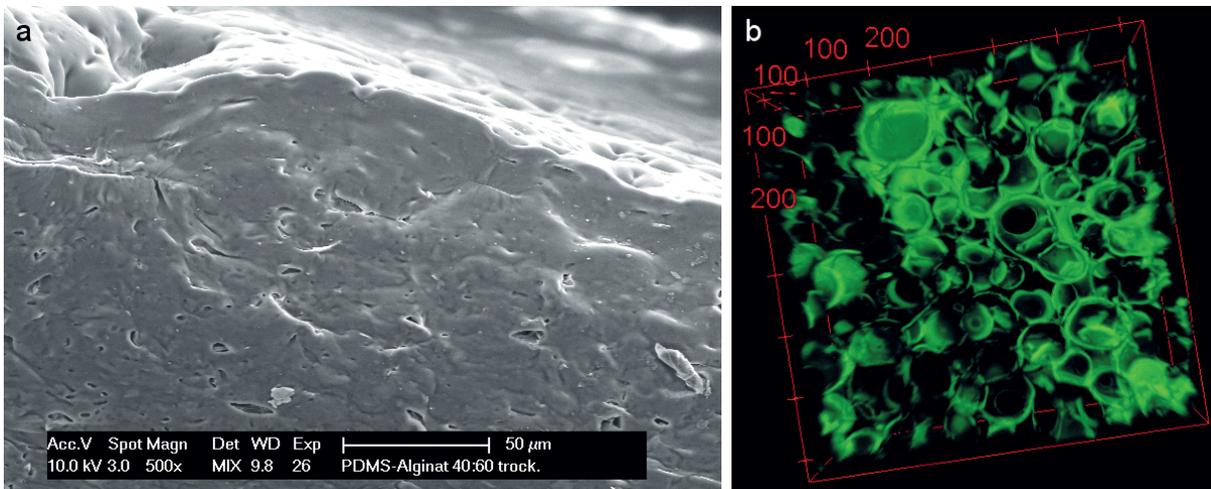


Abbildung 3.5: Komposite nach Trocknung: a) kollabierte Alginatporen im 60%igen Komposit (REM-Aufnahme), b) 75%iges Komposit mit Fluorescein gefärbtem Alginat, welches sich nach der Trocknung an die Innenwände der Poren legte (3D-Darstellung optischer Serienschritte).

Mit dem Zusammenschluss einzelner Alginatkompartimente ab einem Alginatanteil von 70% bildet sich also ein zusammenhängendes Alginatnetzwerk innerhalb des Silikons. Solange die Alginatphase flüssig ist, liegt demnach ein semi-IPN vor. Wird die Alginatphase ebenfalls vernetzt, bildet sich ein IPN. Obwohl das PDMS und das Alginat dabei nicht chemisch miteinander verbunden sind, können sie im vollständig vernetzten Zustand nicht voneinander getrennt werden, ohne dass die Vernetzung mindestens eines der Polymere aufgehoben wird.

3.1.3 Vernetzungsprozess und Oberflächengrenzschicht

Der Vorgang der Vernetzung von PDMS-Alginat-Kompositen zu einem semi-IPN konnte im Zeitraffer beobachtet werden. Hierzu wurden Mischungen mit unterschiedlichen Anteilen an PDMS-Präpolymeren und Alginatlösung bei 37 °C vernetzen gelassen. Bei dieser gerätetechnisch bedingten Temperatur war die Reaktionsgeschwindigkeit gering und das Silikon vulkanisierte nur langsam. Bis zur einsetzenden Aushärtung kam es in den Polymermischungen in unterschiedlichem Maße zu Bewegungen und Strukturveränderungen der beiden Phasen.

In Kompositmischungen mit einem Alginatanteil unter 70% bildeten die Alginatlösung und die PDMS-Präpolymere weitgehend stabile Emulsionen (Abb. 3.6). Dabei war die Alginatlösung als Tröpfchen fein im PDMS verteilt, wie es bereits in 3.1.2 gezeigt werden konnte. Nach etwa 6 h war das PDMS soweit vernetzt, dass sich die Alginatphase im Komposit kaum noch bewegte. Bis zur vollständigen Vernetzung des

Silikons nach 20 h kam es zu keinen weiteren signifikanten Positionsänderungen der Alginatröpfchen im PDMS.

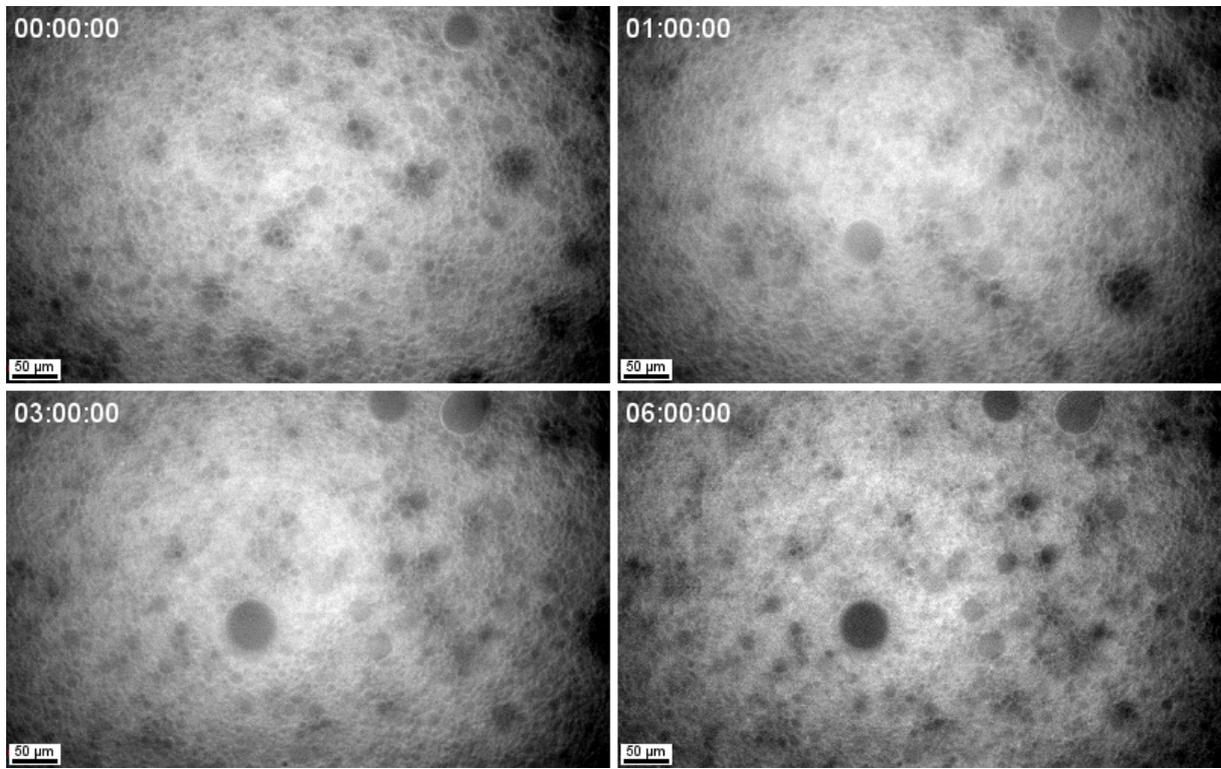


Abbildung 3.6: Zeitrafferaufnahmen über 6 Stunden vom Vernetzungsprozess eines 65%igen Komposits bei 37°C. Die Alginatphase liegt in Tröpfchenform (dunkle Flecken) im PDMS vor.

Anders verhielt es sich mit Kompositmischungen mit einem Alginatanteil über 70%. Direkt nach der Herstellung der Mischung aus den PDMS-Präpolymeren und der Alginatlösung war zwar auch hier die Alginatphase in feinen Tröpfchen im PDMS verteilt, jedoch schlossen sich die Tröpfchen mit der Zeit zusammen und formten größere Tropfen (Abb. 3.7). Dieser Zusammenschluss ist in den Aufnahmen nach 2 h Inkubation deutlich zu sehen. Nach 6 h gab es auch hier kaum noch Veränderungen in der Struktur der Komposite. Die kleinen Alginatröpfchen waren nach 20 h komplett zu großen Tropfen verschmolzen, wie sie auch in den Aufnahmen von Abb. 3.4 zu sehen sind.

Nach der Vernetzung des PDMS zeigten die Komposite in ihrem Inneren eine gleichmäßige Struktur aus PDMS mit darin verteilten Alginattropfen (vgl. 3.1.2). Die Struktur der Kompositoberfläche hing jedoch mit zunehmendem Alginatgehalt stark von der Hydrophobizität der angrenzenden Umgebung ab. Komposite mit einem Alginatanteil unter 70% besaßen unabhängig von den Umgebungsbedingungen eine Oberfläche, die in ihrer Struktur dem Materialinneren ähnelte (Abb. 3.8a). Bei höheren Alginatmengen bildete sich je nach Art der angrenzenden Kontaktfläche eine deutliche Grenzschicht aus. An hydrophoben Materialien, wie beispielsweise Gefäßwänden aus Polypropylen, entwickelte sich auf dem Komposit eine dünne Schicht aus Silikon. Diese Silikonschicht bedeckte das Komposit zu großen Teilen, so dass die Tropfen

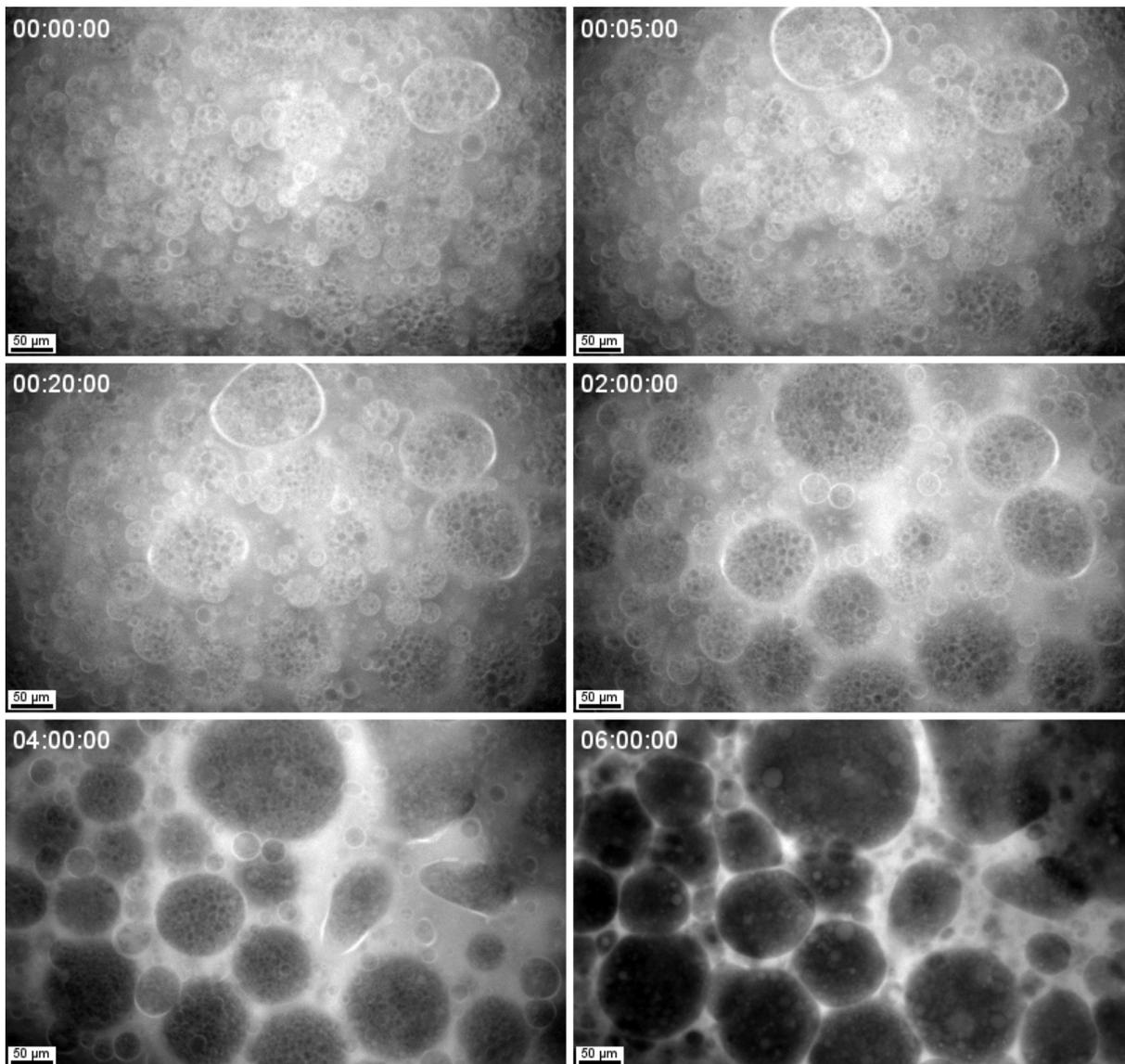


Abbildung 3.7: Zeitrafferaufnahmen über 6 Stunden vom Vernetzungsprozess eines 75%igen Komposits bei 37°C. Die Alginatphase liegt anfangs als fein verteilte Tröpfchen vor und schließt sich im Laufe der Stunden zu großen dunklen Flecken innerhalb des PDMS zusammen.

der Alginatphase nur an wenigen Stellen bis an die Oberfläche gelangten (Abb. 3.8b). Besonders an der Grenzfläche zur Luft konnte bei hohen Alginatanteilen die Silikon-grenzschicht stark ausgeprägt sein. Es entwickelte sich teilweise eine so dicke, mit Luftbläschen durchsetzte Schicht, dass diese die Oberfläche des Komposits komplett bedeckte (Abb. 3.9a). Wurde ein Komposit in eine hydrophile Form, z.B. bestehend aus Agar, gegossen, so bildete sich während der Vernetzung ein dünner Alginatfilm an der Kontaktfläche zur Gussform aus (Abb. 3.9b).

Für die Spezifizierung der Eigenschaften der Kompositoberfläche ist also eine genau definierte Umgebung notwendig, an deren Grenzfläche sich die hydrophilen und hydrophoben Bestandteile des Komposits während des Vernetzungsprozesses ausricht-

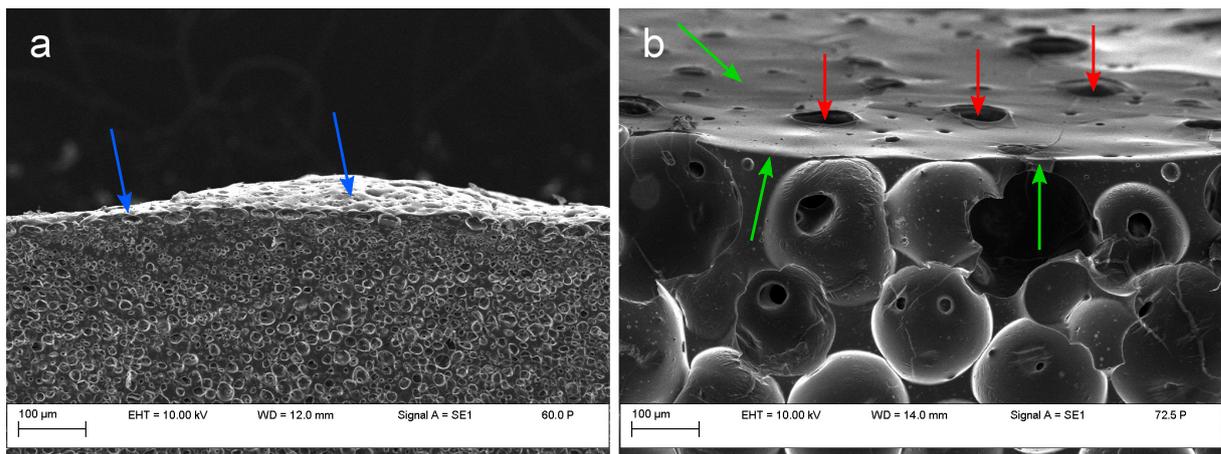


Abbildung 3.8: Kompositquerschnitte mit Sicht auf die Kompositoberfläche: a) Die Oberfläche eines 60%igen Komposits ähnelt in ihrer Struktur dem Materialinneren (blaue Pfeile), b) Komposit mit 72,5% Alginatanteil mit deutlich sichtbarer Silikongrenzschicht (grüne Pfeile), durch die nur vereinzelt Poren der Alginatphase an die Oberfläche treten (rote Pfeile).

ten können. Die Auswirkungen auf die resultierende Benetzbarkeit der Kompositoberfläche sind in 3.2.5 beschrieben.

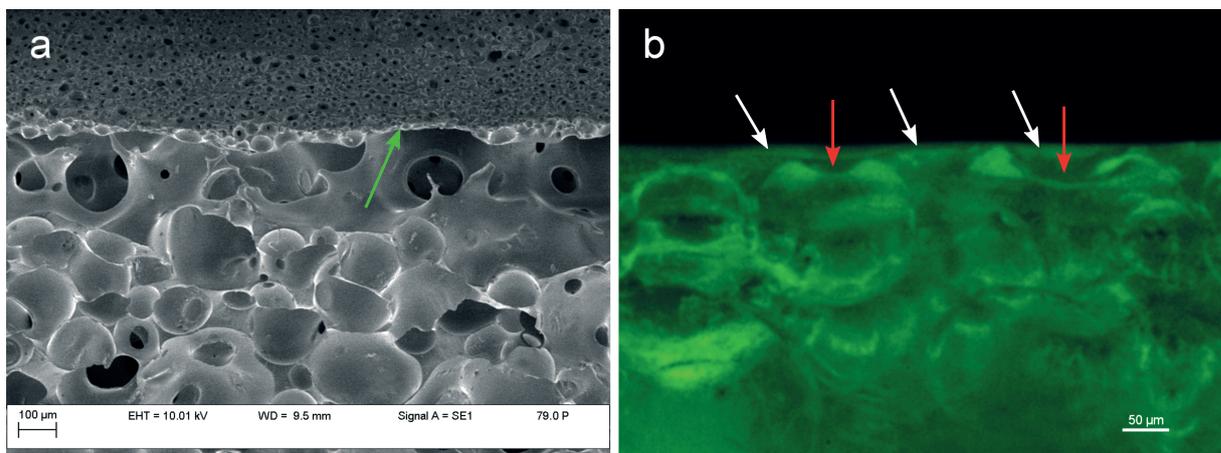


Abbildung 3.9: a) Dicke Silikongrenzschicht (grüner Pfeil) auf einem 79%igen Komposit nach Vernetzung an der Luft; b) Alginatgrenzschicht (weiße Pfeile) auf einem 75%igen Komposit nach Vernetzung in hydrophiler Umgebung. Die roten Pfeile markieren Öffnungen der Alginatporen mit Verbindung zur Alginatgrenzschicht.

3.2 Charakterisierung des PDMS-Alginat-Komposits

Nachdem es gelungen war, verschiedene Komposite aus PDMS und 6%iger Alginatlösung herzustellen, wurden diese hinsichtlich ihrer Eigenschaften untersucht. Beson-

deres Augenmerk galt der Frage, ob das Material als Implantatwerkstoff geeignet ist. Hierfür sollte geklärt werden, inwieweit die Komposite für wässrige Moleküle diffusibel waren. Zusätzlich wurden die mechanische Stabilität, der elektrische Widerstand, die Benetzbarkeit mit Wasser und die Wirkung auf lebende Zellen (Zytotoxizität) evaluiert.

3.2.1 Porengrößen

In den PDMS-Alginat-Kompositen ist das Alginat kugelförmig im PDMS verteilt (siehe 3.1.2). Die Untersuchung und Vermessung der Poren, die es dabei im Silikon bildet, erfolgte mittels Elektronenmikroskopie. Es wurden Komposite miteinander verglichen, die zum einen in einem SpeedMixer und zum anderem mit einem Turbinenrührer hergestellt wurden (Abb. 3.10).

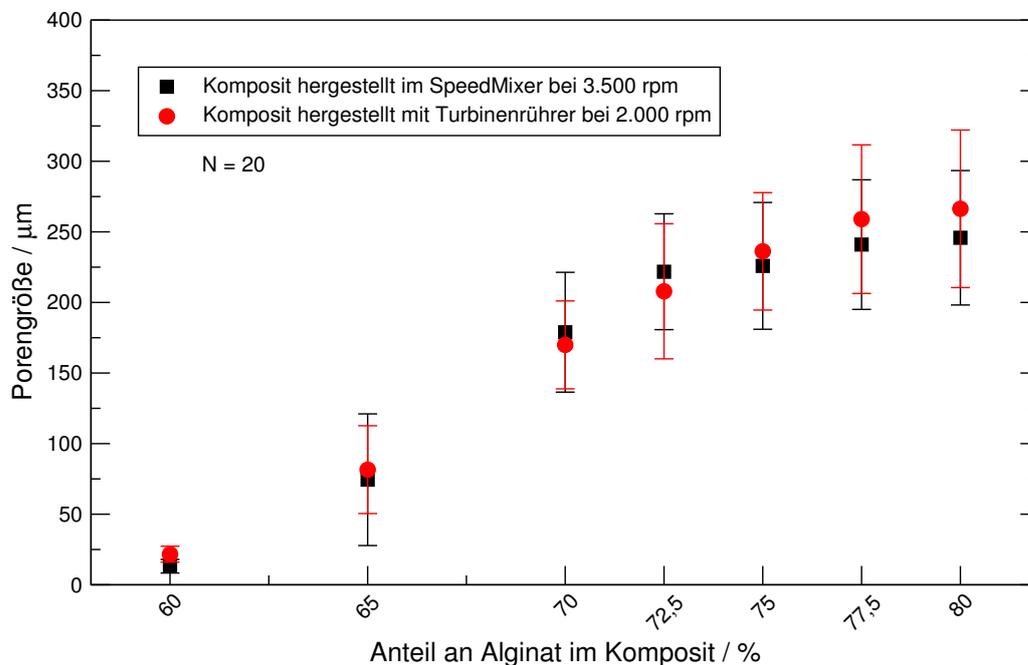


Abbildung 3.10: Porengrößen innerhalb der PDMS-Matrix in Abhängigkeit vom Gesamtanteil an Alginat im Komposit. Vergleich von Kompositen hergestellt in einem SpeedMixer (schwarz) und mit einem Turbinenrührer (rot).

Sowohl mit dem SpeedMixer als auch mit dem Turbinenrührer erhielt man Porengrößen, die stark mit der Menge des Alginatanteils korrelierten. Bei einem Alginatanteil von 60% formten sich im PDMS Kammern mit einer Größe von durchschnittlich 16,8 µm. Die Erhöhung des Alginatanteils um 5% ergab eine sprunghafte Vergrößerung der Kammern um etwa das 6-fache auf durchschnittliche 78 µm. Eine weitere Erhöhung des Alginatanteils führte zu einer steten Vergrößerung der Poren, jedoch nahm das Verhältnis von Alginatanteil zu Porengröße ab. Im Schnitt maßen die Poren bei 72,5% Alginatanteil bereits 214,8 µm und vergrößerten sich bei 80% auf durchschnittliche 256,1 µm. Außer bei den 60%igen Kompositen variierten die Porengrößen

jeweils um etwa 50 μm . Die bei den 77,5 und 80%igen Kompositen um durchschnittliche 20 μm größeren Poren beim Turbinenrührer lassen sich auf dessen geringere Umdrehungszahl und damit etwas schlechteres Emulgierungsvermögen bei sehr hohen Alginatanteilen zurückführen.

In den REM-Aufnahmen der Abb. 3.11 sind die kugelförmigen Poren gut erkennbar. Die bei Alginatanteilen unter 70% noch voneinander getrennten Poren berührten sich bei höheren Alginatanteilen zunehmend miteinander. Die Verbindung einzelner Poren ist in Abb. 3.11d deutlich zu sehen.

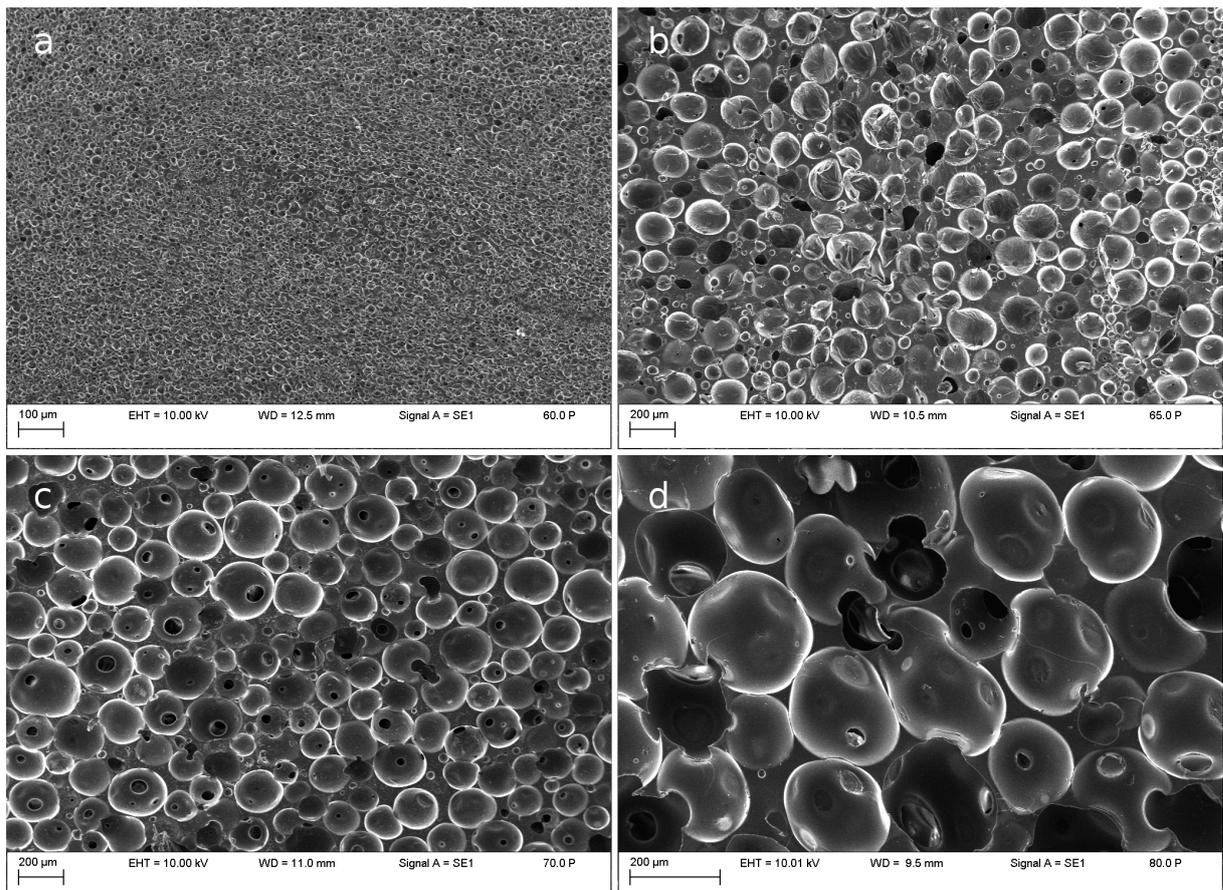


Abbildung 3.11: REM-Aufnahmen von Kompositen mit a) 60%, b) 65% , c) 70% und d) 80% Alginatanteil.

Neben dem Gesamtanteil an Alginat hatte auch die Konzentration der Alginatlösung einen Einfluss auf die Porengröße: Je höher das Alginat konzentriert war, desto kleinere Poren bildeten sich bei gleichem Alginatanteil im Silikon aus. Beispielhaft ist dies im Korrelationsbild für die Raman-Mikroskopie im Anhang A.1 zu sehen. Das verwendete 75%ige Komposit wurde mit einer 10%igen Alginatlösung hergestellt. Während ein Komposit mit gleichem Alginatanteil und 6%iger Alginatlösung eine durchschnittliche Porengröße von 231 μm aufwies (siehe Abb. 3.10), ergaben sich mit 10%iger Alginatlösung Poren von im Schnitt 145 μm Größe (siehe Abb. A.1) .

3.2.2 Diffusion wässriger Moleküle

Die Entstehung eines durchgehenden Porensystems innerhalb der Silikonmatrix ermöglicht den Transport von wässrigen Molekülen durch das Material hindurch. Mittels eines Zwei-Kammersystems mit Kompositproben als Membran wurde die Permeabilität zunächst nur in Abhängigkeit von der Porengröße – bedingt durch den Gesamtanteil an Alginat im PDMS – untersucht. Der Impuls zur Diffusion erfolgte durch einen NaCl-Konzentrationsgradienten zwischen den Kammern. Um die Diffusion optisch beobachten zu können, wurde Methylblau als Ablaufverfolger eingesetzt (Abb. 3.12).

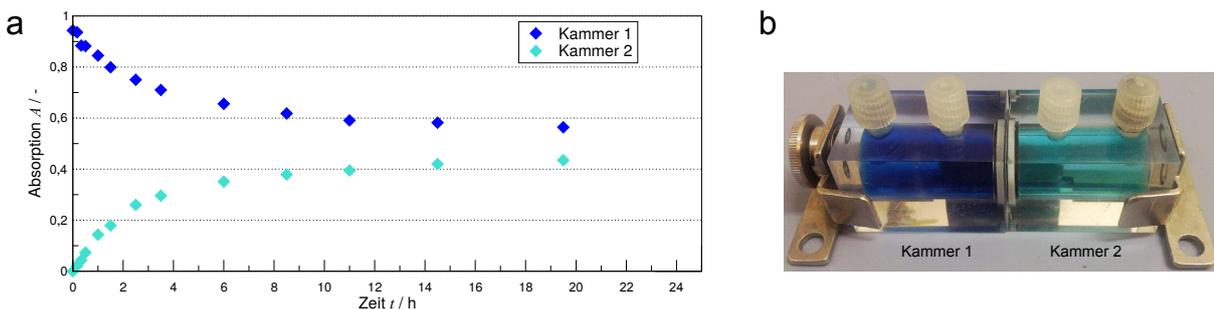


Abbildung 3.12: Beispiel eines Diffusionskammer-Versuchs: a) Absorptionswerte mit der Zeit, b) Diffusionskammern während des Versuchs, wobei die Moleküle aus Kammer 1 bereits teilweise in Kammer 2 diffundiert sind.

Komposite, die mit weniger als 70% Alginat hergestellt wurden, besaßen kein IPN und waren entsprechend nicht durchlässig. Erst mit einem höheren Alginatanteil konnten wasserlösliche Teilchen durch das entstandene Netzwerk hindurch diffundieren. Dabei stieg erwartungsgemäß die Geschwindigkeit des Teilchentransports mit zunehmendem Alginatanteil, da dieser größere Poren im PDMS hinterließ (Abb. 3.13a). Während bei Proben, die mit 80% Alginatanteil hergestellt wurden, nach 24 Stunden ein nahezu vollständiger Konzentrationsausgleich zwischen Kammern stattfand, waren bei den 70%igen Proben nur knapp die Hälfte der Moleküle diffundiert.

Über die Lichtabsorptionswerte des Methylblaus war es möglich, die NaCl-Konzentrationen in den Kammern zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu ermitteln. Nach dem Lösen der Differentialgleichung 2.7 zu 2.8 konnten die Werte graphisch aufgetragen werden. Durch sie hindurch wurden Regressionsgeraden gelegt, deren Anstieg den effektiven Diffusionskoeffizienten D_{eff} entspricht. Abb. 3.13b zeigt die Auftragung der Daten sowie beispielhaft für jede Probenart eine Regressionsgerade durch deren Mittelwerte. Neben dem Graph stehen die für jede Probenart ermittelten effektiven Diffusionskoeffizienten.

Im Graph von Abb. 3.13b ist zu sehen, dass die Werte der Proben bis 75% Alginatanteil einen linearen Verlauf haben. Die Werte der 77,5 und 80%igen Proben dagegen beschreiben eine leichte Krümmung. Grund hierfür ist vermutlich, dass die Flüssigkeiten in den jeweiligen Kammern nicht stetig gerührt, sondern nur periodisch vermischt wurden. Dadurch gab es nicht nur innerhalb der Proben ein Konzentrations-

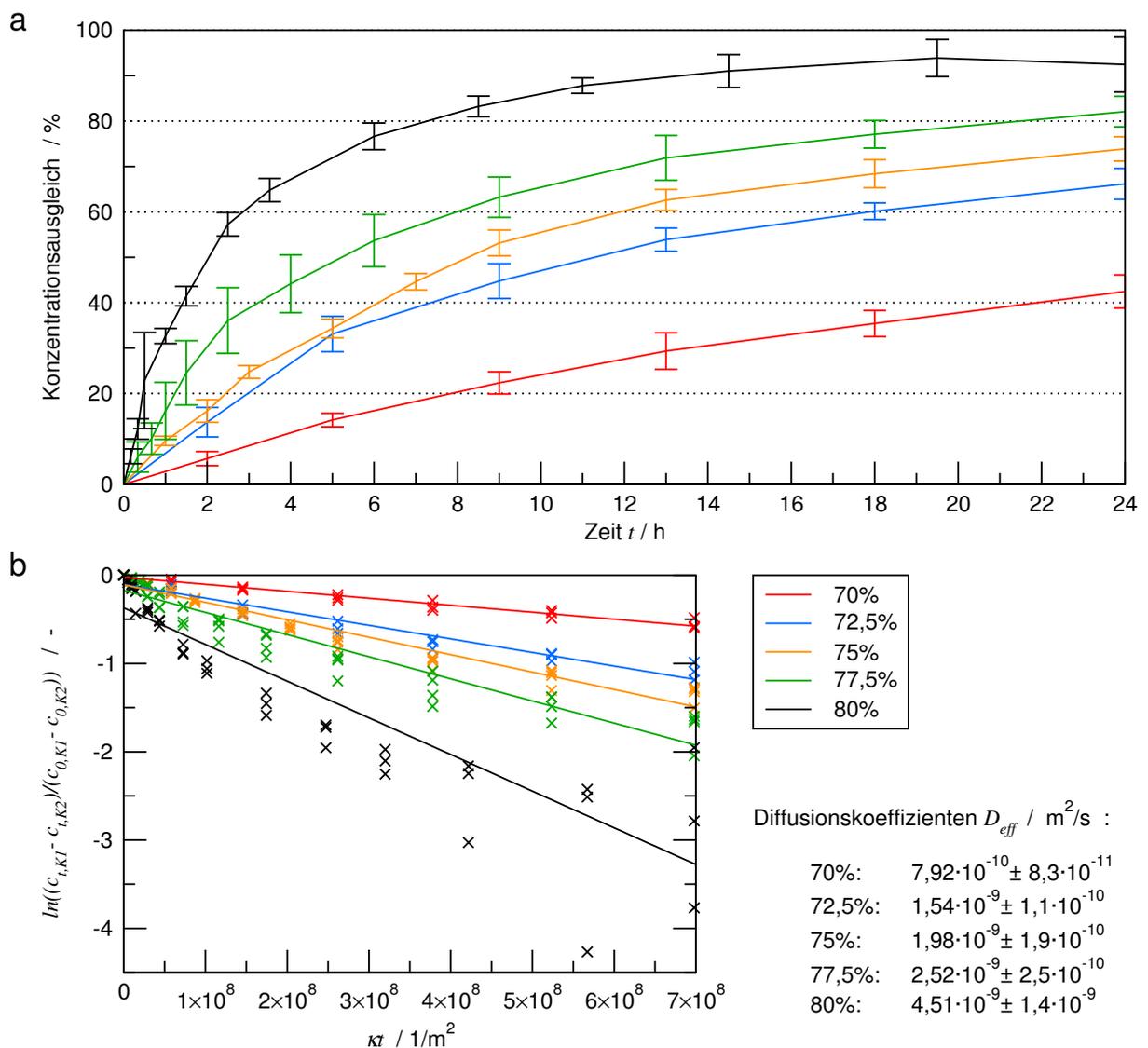


Abbildung 3.13: Ergebnisse des Diffusionskammer-Versuchs: a) prozentualer Anstieg der NaCl-Konzentration in Kammer 2 mit der Zeit in Abhängigkeit von der Porosität der Proben, b) Ermittlung der effektiven Diffusionskoeffizienten aus dem Anstieg der nach linearer Regression ermittelten Geraden über die Werte nach Gleichung 2.8: Im Graph sind die Regressionsgeraden über die Mittelwerte der dargestellten Daten zu sehen, rechts daneben stehen die für die jeweiligen Porositäten ermittelten effektiven Diffusionskoeffizienten. Die Legende gilt für beide Graphen.

gefälle, sondern auch teilweise in den Kammern. Zudem besaß die NaCl-Lösung eine höhere Dichte als Wasser, so dass sie nach Passieren der Probe zunächst auf den Boden der 2. Kammer sank. Dies hatte einen schnelleren Stofftransport vor allem innerhalb der ersten 1–2 Stunden zur Folge, der zu einem steileren Anstieg der Werte führte. Trotzdem konnten durch das Legen der Regressionsgeraden die effektiven Diffusionskoeffizienten abgeschätzt werden. Es zeigte sich deutlich eine Erhöhung

der Diffusionskoeffizienten mit Vergrößerung der Poren. Proben, die mit 80% Alginateil hergestellt wurden, besaßen einen etwa 5-fach höheren effektiven Diffusionskoeffizienten als 70%ige Proben. In der Literatur wird der Diffusionskoeffizient einer ähnlich konzentrierten NaCl-Lösung bei 25°C mit rund $1,5 \cdot 10^{-9}$ angegeben [166]. Die hier ermittelten Werte der effektiven Diffusionskoeffizienten bei Kompositen ab 75% Alginateil sind zwar aus den oben genannten Gründen etwas höher, haben jedoch die gleiche Größenordnung.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der Einfluss der Vernetzungszeit der Alginatephase auf die Diffusion von wasserlöslichen Molekülen aus den Kompositen heraus untersucht. Da bei der Diffusion auch die Wechselwirkungen der Substanzen mit dem Alginate eine Rolle spielen, kamen zwei verschiedene Farbstoffe zum Einsatz: Eosin und Methylenblau. Es wurden zunächst Komposite mit niedermolekularem Alginate untersucht (Abb. 3.14).

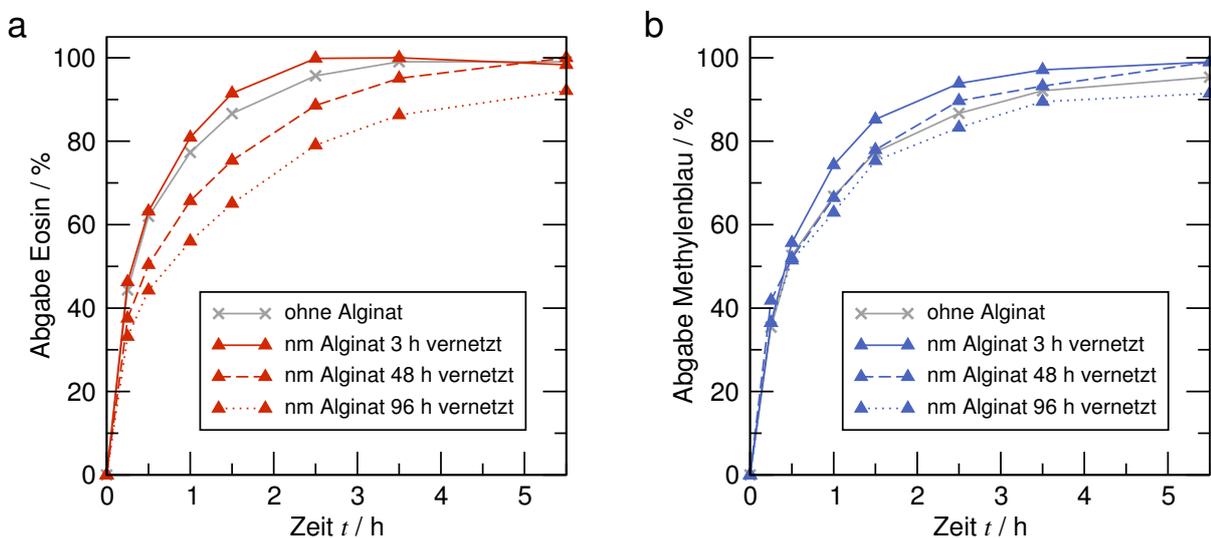


Abbildung 3.14: Prozentuale Freisetzung von Eosin (a) und Methylenblau (b) aus 75%igen Kompositen mit niedermolekularem (nm) Alginate. Neben den verschiedenen Farbstoffen wurde die Abhängigkeit von der Vernetzungszeit der Alginatephase untersucht. Zum Vergleich ist die Abgabe der Farbstoffe aus Kompositen mit ausgespültem Alginate dargestellt. Für eine bessere Übersichtlichkeit sind die Fehlerbalken der Standardabweichungen (durchschnittlich 2,1%) nicht mit aufgeführt.

Aus den Messungen geht deutlich hervor, dass die Abgabe der Farbstoffe umso langsamer erfolgte, je länger und damit stärker die Alginatephase vernetzt war. Dies wurde vor allem beim Eosin deutlich (Abb. 3.14a). Eosin besitzt bei neutralem pH-Wert eine negative Ladung. Die Wechselwirkungen dieses Farbstoffs mit dem ebenfalls negativ geladenen Alginate waren daher weniger stark als beim basischen Methylenblau. Durch seine positive Ladung band das Methylenblau teilweise an das Alginate und die Stärke der Alginatevernetzung hatte einen etwas geringeren Einfluss auf seine Diffusion (Abb. 3.15). Während die Differenz zwischen 3 h und 96 h lang vernetzten Proben nach 30 min beim Eosin etwa 19% betrug, waren es beim Methylenblau nur ca. 4%.

Nach 90 min hatte sich der Unterschied beim Eosin auf 27% gesteigert, näherte sich aber mit zunehmender Freisetzungzeit wieder an. Dagegen gaben für 96 h vernetzte Proben nach 90 min etwa 10% weniger Methyleneblau ab als für 3 h vernetzte Proben. Dieser Unterschied änderte sich jedoch auch nach 5 Stunden kaum.

Neben den Kompositen mit niedermolekularem Alginat wurde die Diffusion der beiden Farbstoffe aus Kompositen mit hochmolekularem Alginat untersucht (Abb. 3.15). Da das hochmolekulare Alginat eine geringere Konzentration als das niedermolekulare Alginat besaß, wurden hierfür kürzere Vernetzungszeiten als bei den Kompositen mit niedermolekularem Alginat gewählt.

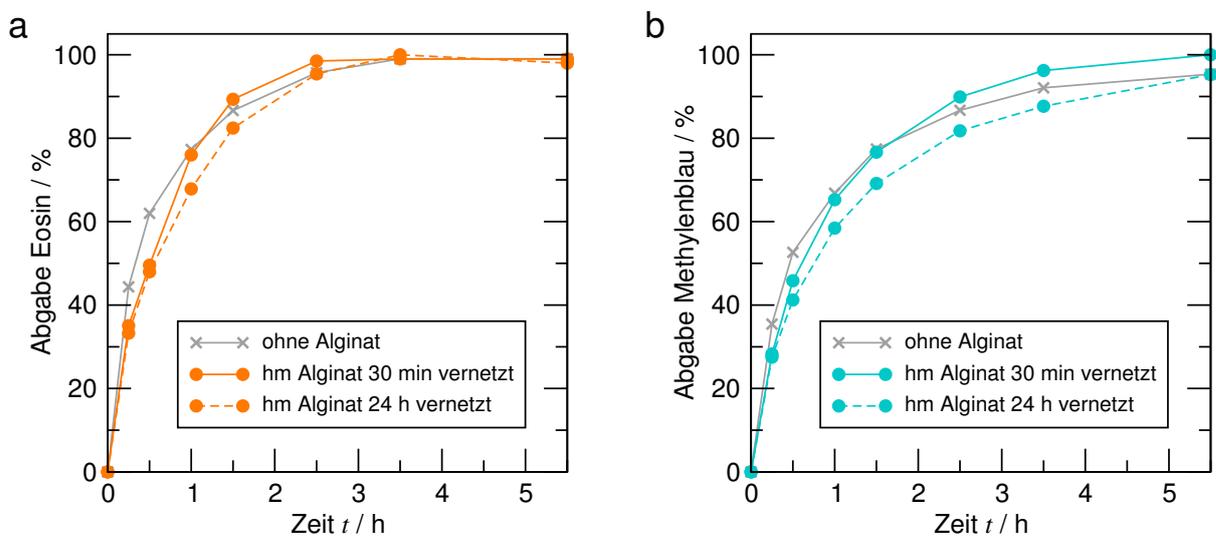


Abbildung 3.15: Prozentuale Freisetzung von Eosin (a) und Methyleneblau (b) aus 75%igen Kompositen mit hochmolekularem (hm) Alginat. Die Messungen wurden an Kompositen mit verschieden lang vernetzter Alginatphase durchgeführt. Zum Vergleich ist die Abgabe der Farbstoffe aus Kompositen mit ausgespültem Alginat dargestellt. Die Fehlerbalken der Standardabweichungen (durchschnittlich 2,2%) sind für eine bessere Übersichtlichkeit nicht mit aufgeführt.

Auch bei den Kompositen mit hochmolekularem Alginat war eine Verlangsamung der Diffusion mit zunehmender Vernetzungszeit zu sehen. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben waren jedoch weniger stark als beim niedermolekularem Alginat: Die Differenz zwischen 30 min und 24 h lang vernetzten Proben betrug 90 min nach Versuchsbeginn sowohl beim Eosin als auch beim Methyleneblau etwa 7%. Allerdings zeigte sich deutlich, dass das Eosin aufgrund der geringen Wechselwirkungen mit dem Alginat schneller aus den Kompositen freigesetzt wurde. Ähnlich wie bei Kompositen mit 3 h vernetztem niedermolekularem Alginat war dieser Farbstoff bereits $2\frac{1}{2}$ h nach Versuchsbeginn nahezu vollständig abgegeben.

Zusammengefasst waren die Komposite für wasserlösliche Substanzen sehr gut permeabel, wobei die Freisetzung der Stoffe über den Alginatanteil und damit die Porengröße, über die Vernetzungszeit der Alginatphase und über die elektrische Ladung der gelösten Moleküle beeinflusst werden konnte.

3.2.3 Mechanische Stabilität

Für die gewünschte Anwendung des Komposits als Implantatmaterial war es nötig, dessen Stabilität bei mechanischer Einwirkung zu ermitteln. Hierfür wurde zum einen die Härte der Komposite gemessen und zum anderen ihre Belastbarkeit, Elastizität und Dehnung bei Zugbeanspruchung untersucht.

Die Härte gibt den Widerstand an, den das Testmaterial dem mechanischen Eindringen eines Fremdkörpers entgegenbringt. Der Werkstoffkennwert für Weich-Elastomere, wie z.B. Silikon, ist die Härte nach Shore-A. An reinem PDMS ohne Alginat wurde eine Härte von $46,8 \pm 3,5$ Shore-A gemessen. Demgegenüber waren 60%ige Komposite mit einer Härte von rund 15 Shore-A nur etwa $\frac{1}{3}$ so hart. Bei den Kompositen mit unvernetztem Alginat sank mit zunehmendem Alginat- und abnehmendem Silikonanteil die Härte weiter stark ab (Abb. 3.16). Komposite mit einem Alginatanteil von 80% wiesen schließlich nur noch eine Härte $3,5 \pm 1,4$ Shore-A auf.

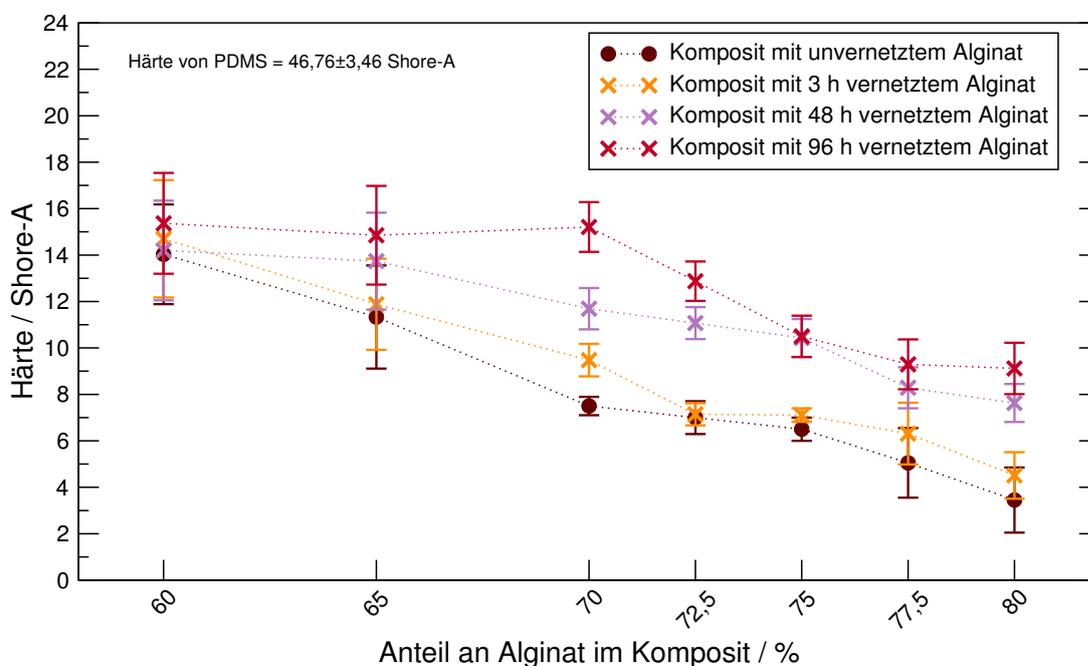


Abbildung 3.16: Härtemessung an Kompositen mit unvernetztem und vernetztem Alginat in Abhängigkeit vom Gesamtalginatanteil und der Dauer der Alginatvernetzung.

Die Vernetzung der Alginatphase mit BaCl_2 -Lösung für 3 h führte zu einer geringfügigen Verfestigung der Komposite um ca. 1–2 Shore-A-Härten. Deutlicher war der Unterschied bei den Kompositen zu sehen, deren Alginatphase für 48 h vernetzt wurde. Hier ergab sich bei fast allen Kompositzusammensetzungen eine Verhärtung um etwa 4 Shore-A. Am stärksten wirkte sich die Vernetzung des Alginats an Kompositen mit 70% Alginatanteil aus. Die Härte stieg hierbei nach 96-stündiger Vernetzung der Alginatphase um etwa das Doppelte von $7,5 \pm 0,4$ Shore-A auf $15,2 \pm 1,1$ Shore-A. Dagegen hatte die Vernetzung von 60%igen Kompositen mit Ba^{2+} -Ionen aufgrund des fehlenden IPNs kaum einen Einfluss auf die Härte. Die leicht gestiegene Härte bei

65%igen Kompositen, die ebenfalls kein IPN aufweisen, resultierte allein aus der Vernetzung und damit Verfestigung der an den Probenaußenflächen liegenden Alginat-kompartimente.

Ein weiteres Kriterium für die mechanische Stabilität eines Materials ist dessen Verhalten bei Zug- und Dehnungsbeanspruchung. Hierfür wurden schmale Kompositstreifen in einem Zugtester vermessen. Die Untersuchungen erfolgten ebenfalls an Kompositen mit 60–80% Alginatanteil. Ihre Alginatphase war entweder unvernetzt, oder für 48 bzw. 96 h vernetzt (Abb. 3.17).

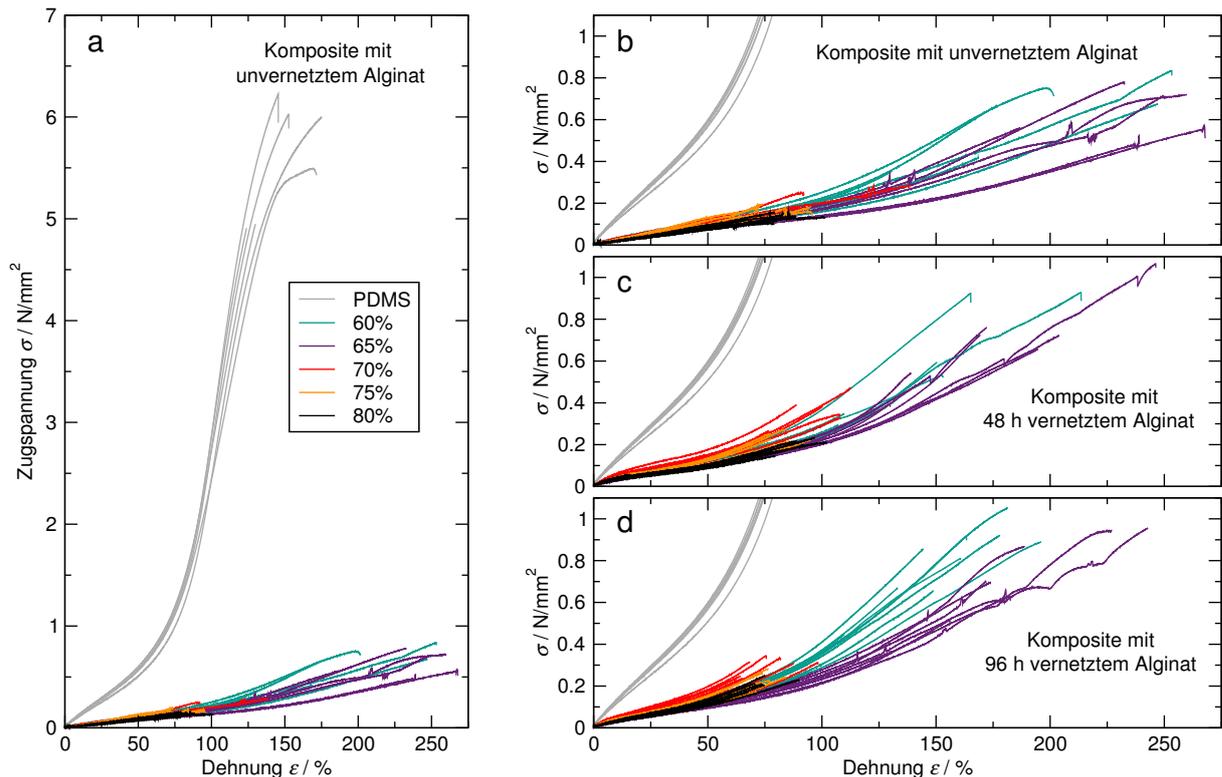


Abbildung 3.17: Spannungs-Dehnungsdiagramme: a) Übersicht von Kompositen mit unvernetztem Alginat im Vergleich zu reinem PDMS, b)-d) Detailansicht von Kompositen mit unvernetztem sowie für 48 respektive 96 Stunden vernetztem Alginat. Die Komposite enthielten einen Alginatanteil zwischen 60 und 80%. Die Legende gilt für alle 4 Graphen.

Um genauer beurteilen zu können, welchen Widerstand die Materialien der elastischen Verformung entgegenbringen, wurde ihr Elastizitätsmodul E berechnet (Abb. 3.18a). Der Elastizitätsmodul von reinem PDMS lag bei $1,61 \pm 0,07 \text{ N/mm}^2$. Bei allen getesteten Kompositen musste wesentlich weniger Kraft für die Dehnung der Proben aufgewandt werden. Mit steigendem Alginatgehalt vergrößerte sich die Porosität der Komposite. Daraus resultierte eine Verringerung des effektiven Querschnitts des PDMS im Komposit. Die ermittelten Elastizitätsmoduln waren annähernd proportional zu den effektiven PDMS-Querschnitten. Komposite mit unvernetzter Alginatphase mit 60% Alginatanteil wiesen einen Elastizitätsmodul von $0,24 \pm 0,02 \text{ N/mm}^2$. Dieser sank mit zunehmendem Alginatanteil auf fast $0,1 \text{ N/mm}^2$. Durch die Vernetzung der Alginat-

phase wurde der Elastizitätsmodul teilweise erhöht. Während die Ba^{2+} -Ionen auf die Elastizitätsmoduln von 60–65%igen Kompositen aufgrund des fehlenden IPNs wenig Auswirkung hatten, stiegen sie bei Kompositen ab 70% Alginatanteil um mehr als das Doppelte ihres Ausgangswertes. Hierbei gab es allerdings kaum Unterschiede zwischen solchen Proben, deren Alginatphase für 48 h vernetzt wurde, und jenen, die für 96 h vernetzt wurden. Die stärkste Erhöhung fand bei 70%igen Kompositen statt. Der Elastizitätsmodul steigerte sich hier von $0,21 \pm 0,03 \text{ N/mm}^2$ mit unvernetztem Alginat auf durchschnittliche $0,45 \text{ N/mm}^2$ mit vernetztem Alginat.

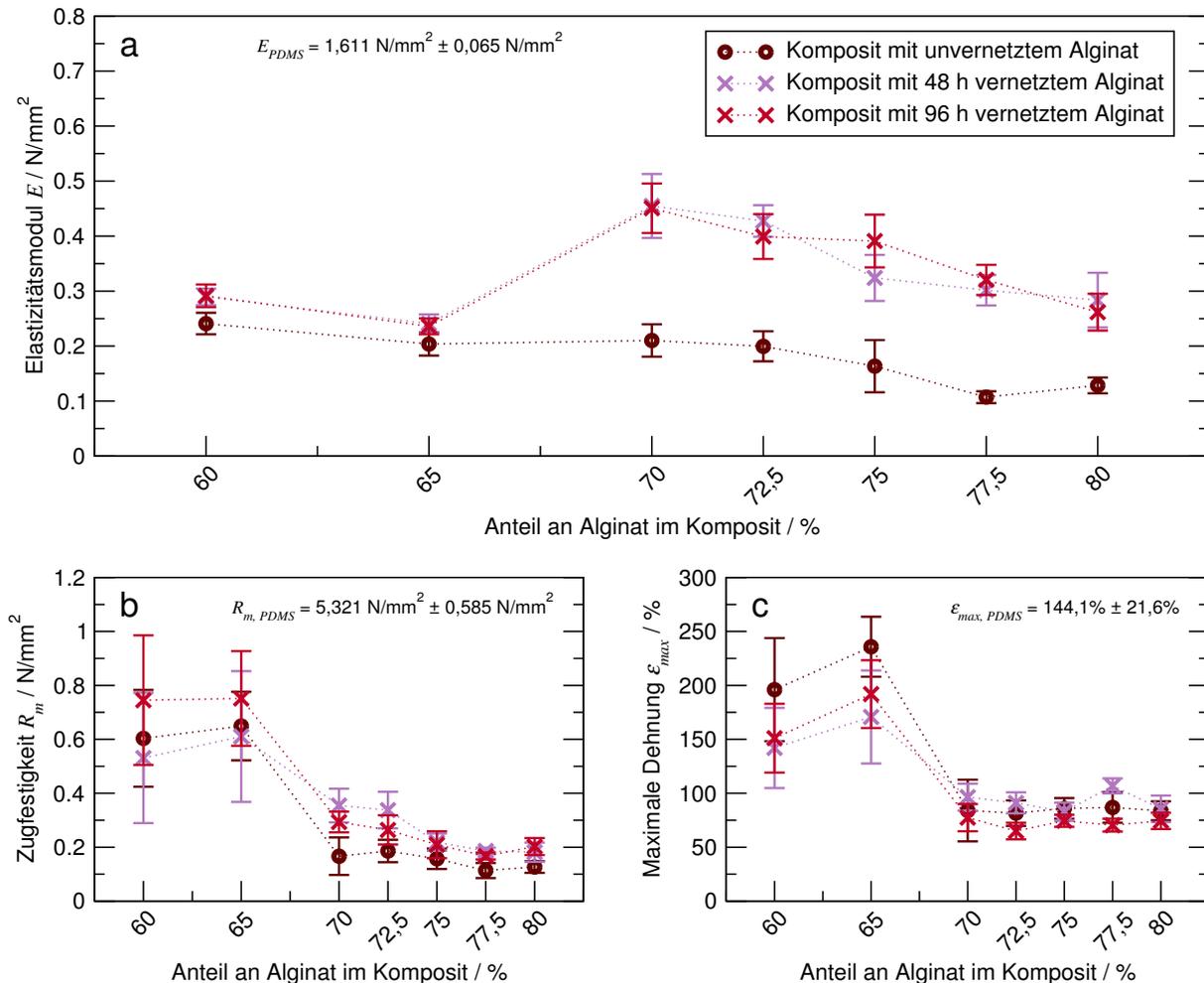


Abbildung 3.18: Elastizitätsmodul (a), Zugfestigkeit (b) und maximale Dehnung (c) von Kompositen mit vernetztem und unvernetztem Alginat bei verschiedenen Alginatanteilen.

Neben den Elastizitätsmoduln wurden die Zugfestigkeiten R_m der Proben bestimmt. Die Zugfestigkeit gibt dabei die Kraft an, die für eine Dehnung der Proben bis zu ihrem Riss benötigt wird. Diese lag für reines PDMS bei $5,32 \pm 0,59 \text{ N/mm}^2$. Die Zugfestigkeit der Komposite war mit unter $1,0 \text{ N/mm}^2$ wesentlich geringer, wobei sie mit zunehmendem Alginatgehalt weiter abnahm (Abb. 3.18b). Die Vernetzung der Alginatphase führte nur zu einer geringfügigen Erhöhung der Zugfestigkeit. Dagegen war ein deut-

licher Unterschied zwischen Kompositen mit 60–65% Alginatanteil und Kompositen mit 70–80% Alginatanteil zu sehen. Letztere waren mit einer Zugfestigkeit zwischen 0,1 und 0,4 N/mm² nur etwa $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ -mal so fest wie erstere.

Zusätzlich zum Elastizitätsmodul und der Zugfestigkeit wurde die maximale Dehnung ε_{max} bis zum Reißen der Proben ermittelt. Wie bei der Zugfestigkeit waren auch hier die Werte zwischen 60–65%igen und 70–80%igen Kompositen deutlich verschieden und der Einfluss der Alginatvernetzung eher gering. Komposite mit 60–65% Alginatanteil konnten auf über 250% ihrer Ausgangslänge gedehnt werden. Sie waren damit dehnbarer als reines PDMS (mit ε_{max} von im Schnitt 144%). Die maximale Dehnung von Kompositen mit 70–80% Alginatanteil besaß Mittelwerte zwischen 65% und 107%. Hierbei war keine Abhängigkeit vom Alginatanteil zu erkennen.

Vergleichend zu Kompositen mit niedermolekularem Alginat wurde die mechanische Stabilität von Kompositen mit hochmolekularem Alginat gemessen. Exemplarisch ist dies für Komposite, die mit 75% Alginatanteil hergestellt wurden, in Tabelle 3.2 gezeigt. Die Vernetzungszeiten mit BaCl₂-Lösung wurden kürzer gewählt, da das hochmolekulare Alginat eine geringere Konzentration besaß.

Tabelle 3.2: Härte, Elastizitätsmodul (E-Modul), Zugfestigkeit und maximale Dehnung von Kompositen mit hochmolekularem Alginat.

Vernetzung des Alginats	Härte / Shore-A	E-Modul / N/mm ²	Zugfestigkeit / N/mm ²	max. Dehnung / %
unvernetzt	6,3 ± 0,45	n.a.	n.a.	n.a.
30 min	6,4 ± 0,42	0,271 ± 0,05	0,216 ± 0,043	68,16 ± 6,99
24 h	8,9 ± 1,43	0,294 ± 0,054	0,185 ± 0,049	72,65 ± 7,82

Die 75%igen Komposite mit unvernetztem hochmolekularem Alginat wiesen mit im Schnitt 6,3 Shore-A etwa die gleiche Härte auf wie die 75%igen Komposite mit unvernetztem niedermolekularem Alginat. Es zeigte sich, dass eine 30-minütige Vernetzungszeit nur zu geringfügiger Verhärtung führte. Erst eine Vernetzung von 24 h ergab eine Erhöhung der Härte um etwa 2,5 Shore-A.

Bei den Kompositen mit unvernetzter Alginatphase war das PDMS-Netzwerk hauptverantwortlich für die mechanischen Eigenschaften der Komposite. Aus diesem Grund wurden die Komposite mit hochmolekularem Alginat im Zugversuch nur mit vernetzter Alginatphase getestet. Verglichen mit den Ergebnissen der 75%igen Komposite mit niedermolekularem Alginat befanden sich sämtliche Werte des Elastizitätsmoduls, der Zugfestigkeit und der maximalen Dehnung in den gleichen Bereichen.

3.2.4 Spezifischer Widerstand und elektrische Leitfähigkeit

Um die Tauglichkeit des Silikon-Alginat-Komposits als Trägermaterial für Implantate mit integrierten Elektroden zu überprüfen, wurde eine Impedanzspektroskopie durchgeführt.

Für die Komposite wurde zunächst der Betrag der Impedanz $|\underline{Z}|$ nach Gleichung 2.10 und der dazugehörige Phasenverschiebungswinkel φ mit Gleichung 2.11 berechnet (Abb. 3.19a und b). Die Impedanzen von Kompositen mit 60 und 65% Alginatanteil lagen außerhalb des messbaren Bereichs.

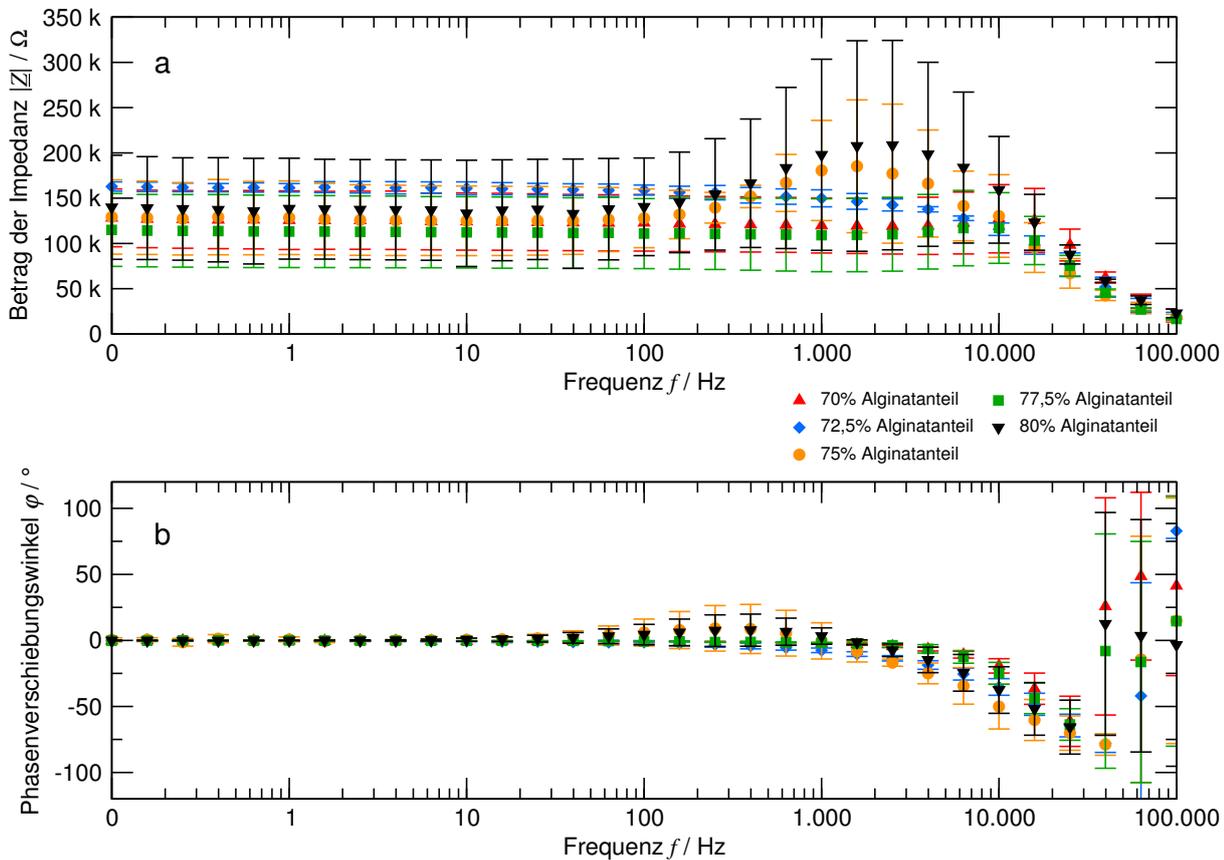


Abbildung 3.19: Bode-Diagramm mit a) dem Betrag der Impedanz und b) dem Phasenverschiebungswinkel für Komposite mit 70% bis 80% Gesamtanteil an Alginat. Die Legende gilt für beide Graphen.

Grundsätzlich zeigte sich, dass die Impedanzen bei den meisten Messungen von 0,1 bis 1.000 Hz konstant waren und bei sehr hohen Frequenzen stark sanken. Gleichzeitig wurden zwischen 1.000 und etwa 40.000 Hz bei allen Kompositen negative Phasenverschiebungswinkel aufgezeichnet. Die Impedanzen besaßen in diesem hochfrequenten Bereich daher einen kapazitiven Anteil.

Bei den meisten Kompositen stimmten die Phasen von Spannung und Strom bis zu einer Frequenz von 1.000 Hz überein. Der Imaginärteil X war hier annähernd null, so dass keine Phasenverschiebung vorlag ($\varphi = 0$). In diesen Bereich wurde die Impedanz \underline{Z} allein durch den rein ohmschen Widerstand R_P bestimmt und entsprach dem Widerstand R der Probe. Nur bei einigen Messungen von Kompositen mit 75 und 80% Alginatanteil traten zwischen 100 und 1.000 Hz positive Phasenwinkel auf mit gleichzeitig erhöhtem Betrag der Impedanz zwischen 1.000 und 10.000 Hz. Da sich jedoch

auch hier die Mehrheit der aufgenommenen Daten wie bei den anderen Kompositen verhielt, können diese Ausnahmen als Artefakte angesehen werden.

Der spezifische Widerstand und die elektrische Leitfähigkeit wurden nach Gleichung 2.12 berechnet. Grundlage für die Berechnung des spezifischen Widerstandes bildeten die Messwerte über die Frequenzen von 1–100 Hz. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.3: Spezifische Widerstände und elektrische Leitfähigkeiten von PDMS, Kompositen unterschiedlichen Alginatanteils, verschiedenen Lösungen aus niedermolekularem (nm) und hochmolekularem (hm) Alginat, sowie einigen biologischen Flüssigkeiten. Werte ohne Literaturangabe stammen aus eigenen Messungen.

Material	Spezifischer Widerstand ρ / Ωcm	Elektrische Leitfähigkeit σ / S/m	Lit.
PDMS	$3,8 \cdot 10^{14}$ – $4 \cdot 10^{15}$	$2,5 \cdot 10^{-14}$ – $2,63 \cdot 10^{-13}$	[170, 97]
60% Alginat-PDMS	außerhalb des Messbereichs, elektrisch isolierend		
65% Alginat-PDMS	außerhalb des Messbereichs, elektrisch isolierend		
70% Alginat-PDMS	$60.036,9 \pm 13.716,4$	$0,00167 \pm 0,00038$	
72,5% Alginat-PDMS	$77.331,5 \pm 2.569,6$	$0,00129 \pm 0,00004$	
75% Alginat-PDMS	$60.724,0 \pm 16.854,3$	$0,00164 \pm 0,00045$	
77,5% Alginat-PDMS	$54.142,2 \pm 17.115,1$	$0,00185 \pm 0,00058$	
80% Alginat-PDMS	$65.819,6 \pm 23.702,1$	$0,00152 \pm 0,00055$	
6% nm Alginatlösung in 0,9% NaCl	$53,99 \pm 3,43$	$1,852 \pm 0,118$	
6% nm Alginatlösung in MilliQ-H ₂ O	$94,12 \pm 5,17$	$1,06 \pm 0,06$	
6% hm Alginatlösung in 0,9% NaCl	$56,04 \pm 0,72$	$1,79 \pm 0,02$	
0,9% NaCl-Lösung	$55,57 \pm 2,02$	$1,80 \pm 0,07$	
Blut (22–40 °C)	100–300	0,33–1,00	[180, 102]
Extrazelluläre Flüssigkeit (37 °C)	37–47	2,13–2,70	[24, 189]
Intrazelluläre Flüssigkeit (37 °C)	108–270	0,37–0,93	[24, 189]

Die Messungen ergaben, dass Komposite mit 70–80% Alginatanteil spezifische Widerstände von etwa 40.000 bis etwa 90.000 Ωcm bzw. elektrischen Leitfähigkeiten zwischen etwa 0,0011 und 0,0025 S/m besaßen. Sie liegen damit im Halbleiterbereich. Bei den Kompositen mit 60–65% Alginatanteil waren die Impedanzen so hoch, dass keine stabilen Messungen durchgeführt werden konnten und hier demnach keine Werte vorliegen. In diesen Kompositen ist noch kein Netzwerk aus leitfähigem Alginat vorhanden, so dass die Alginatphase in voneinander getrennten Kompartimenten innerhalb des PDMS vorliegt (vgl. 3.1.2). Der elektrische Strom kann damit nicht durch das Material geleitet werden. Komposite mit weniger als 70% Alginatanteil sind daher als elektrisch isolierend anzusehen.

Komposite ab einem Alginatanteil von 70% hingegen besitzen ein durchgängiges Alginatnetzwerk, durch welches der Strom fließen kann. Bei diesen Kompositen konnte jedoch keine Korrelation der Messwerte mit dem Alginatanteil festgestellt werden. Die Zunahme der Querschnittsfläche leitfähiger Kompartimente mit Erhöhung des Alginatanteils hatte daher keinen sichtbaren Einfluss auf die Stromleitfähigkeit der Komposite.

Im Hinblick auf einen Einsatz als Implantatmaterial muss ein osmotisches Gefälle an der Alginatphase vermieden werden. Deshalb wurden die für die Impedanzmessung verwendeten Komposite mit einer Alginatlösung mit 0,9% NaCl hergestellt. Der spezifische Widerstand dieser Alginatlösung betrug 54 Ωcm . Er entsprach – ebenso wie bei der Alginatlösung aus hochmolekularem Alginat – dem spezifischen Widerstand einer reinen 0,9%igen NaCl-Lösung⁵. Die Hauptstromleiter in der Alginatphase der Komposite sind daher die Salzionen.

Salzionen sind auch die Hauptleiter von Strom in Körperflüssigkeiten wie z.B. Blut. Die Körperflüssigkeit des Menschen setzt sich aus zu etwa 67% der intrazellulären Flüssigkeit und zu etwa 33% der extrazellulären Flüssigkeit zusammen. Die extrazelluläre Flüssigkeit enthält u.a. Blutplasma, Lymphe und Liquor, besteht aber zum größten Teil aus der sogenannten interstitiellen Flüssigkeit, welche die Gewebszellen umgibt. Die spezifischen Widerstände dieser Körperflüssigkeiten hängen von verschiedenen Faktoren wie Proteingehalt oder Fließgeschwindigkeit ab, liegen jedoch mit 37–300 Ωcm im Halbleiterbereich [180, 102, 24, 189]. Vergleichsweise wurden die Werte für die spezifischen Widerstände und elektrischen Leitfähigkeiten von Blut, extrazellulärer und intrazellulärer Flüssigkeit in Tabelle 3.3 mit aufgeführt.

3.2.5 Wasserkontaktwinkel

Die Benetzbarkeit bzw. Hydrophobizität der Komposite wurde über den Wasserkontaktwinkel θ bestimmt. Die Messungen erfolgten zunächst am Querschnitt der Komposite (Abb. 3.20).

Generell werden Materialien mit einem Wasserkontaktwinkel von 0–90° als hydrophil und mit Winkeln >90° als hydrophob bezeichnet. Reines PDMS ist mit einem durchschnittlichen Kontaktwinkel von $117,3 \pm 1,0^\circ$ ein hydrophobes Material. Komposite mit

⁵Dieser Wert liegt nahe am theoretischen spezifischen Widerstand von $\rho = 51,33 \Omega\text{cm}$, wie er aus den molaren Grenzleitfähigkeiten von Na^+ - und Cl^- -Ionen [56] berechnet werden kann.

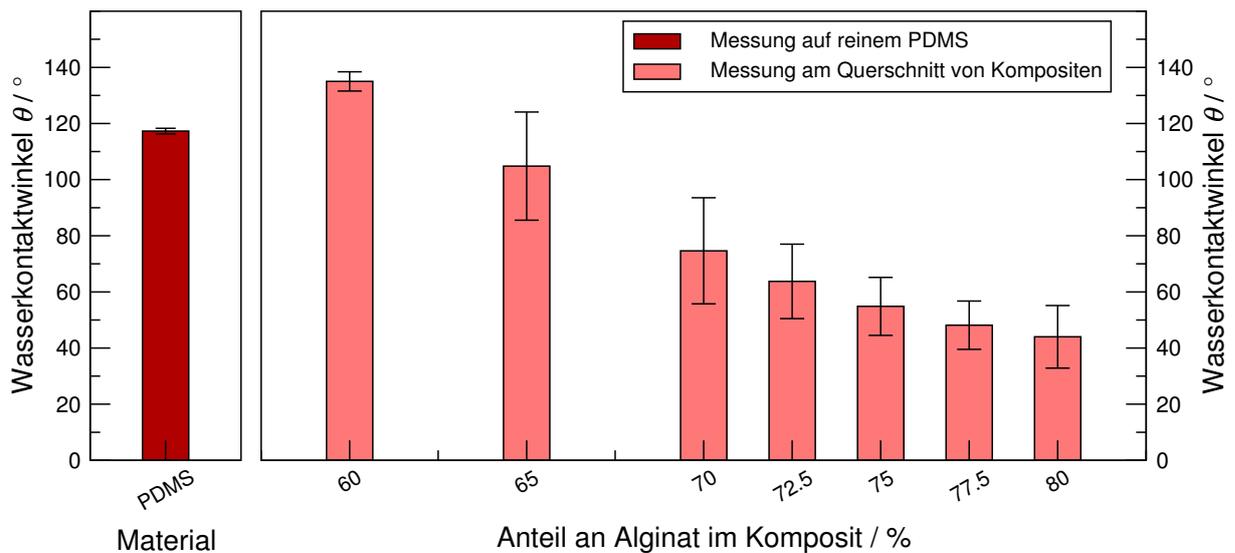


Abbildung 3.20: Wasserkontaktwinkel am Querschnitt von Kompositen mit vernetztem Alginat.

einem Anteil von 60% Alginat hatten mit $135 \pm 3,4^\circ$ zunächst einen noch größeren Kontaktwinkel als reines PDMS. Der Grund hierfür lag in der Oberflächenstruktur des Querschnitts: Während das reine PDMS eine glatte, ideale Oberfläche besaß (Abb. 3.21a), war die Oberfläche der Kompositquerschnitte rau und heterogen (Abb. 3.21b). Diese mikroporösen Unebenheiten sorgten durch die Verstärkung der hydrophoben Eigenschaften des PDMS [174] oder durch den Einschluss von Luftkammern unterhalb des Wassertropfens [20] für eine Erhöhung des Kontaktwinkels. Mit zunehmendem Alginatanteil sank der Kontaktwinkel der Komposite jedoch stetig. Ab 70% Alginatanteil überwogen die hydrophilen Eigenschaften des Alginats den hydrophoben Charakter des PDMS, so dass die Querschnittflächen der Komposite insgesamt und unabhängig von deren Rauigkeit hydrophil wurden. Mit 70% Alginatanteil erreichte das Material einen Kontaktwinkel von $74,6 \pm 18,9^\circ$. Bei einem Anteil von 80% Alginat betrug der Wasserkontaktwinkel nur noch $44 \pm 11,1^\circ$.

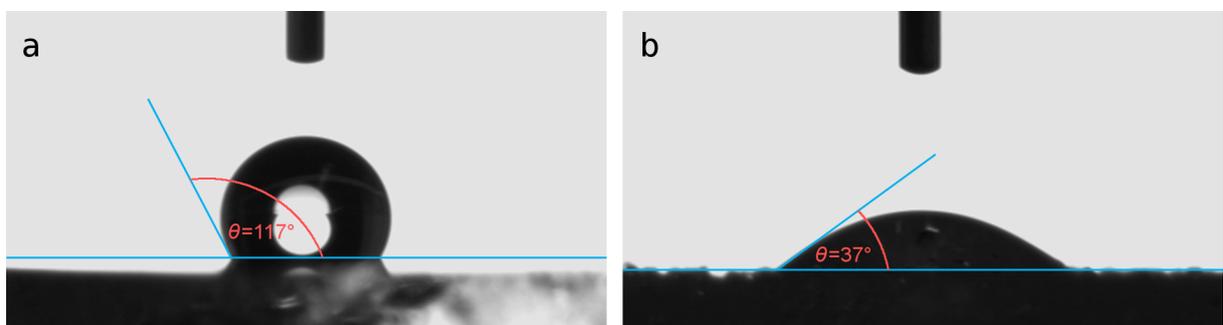


Abbildung 3.21: Ein 2 μ l Wassertropfen auf a) der hydrophoben Oberfläche von reinem PDMS und b) der hydrophilen Querschnittsfläche eines Komposits mit 80% Alginatanteil

In 3.1.3 wurde beschrieben, dass das Kompositmaterial während der Herstellung je nach Umgebungsbedingungen eine spezifische Grenzschicht ausbildet. In weiteren Versuchen wurde daher der Einfluss verschiedener angrenzender Medien auf die Hydrophobizität der Komposite evaluiert. Wasserkontaktwinkelmessungen erfolgten dabei an Kompositoberflächen, die während der Vernetzung des PDMS an Luft, ABS und Polypropylen grenzten (Abb. 3.22). Vergleichend zum Polypropylen wurde die Benetzbarkeit an Grenzflächen mit plasmabehandeltem Polypropylen gemessen. Zusätzlich fanden Kontaktwinkelmessungen an den verwendeten Polymeren selbst statt.

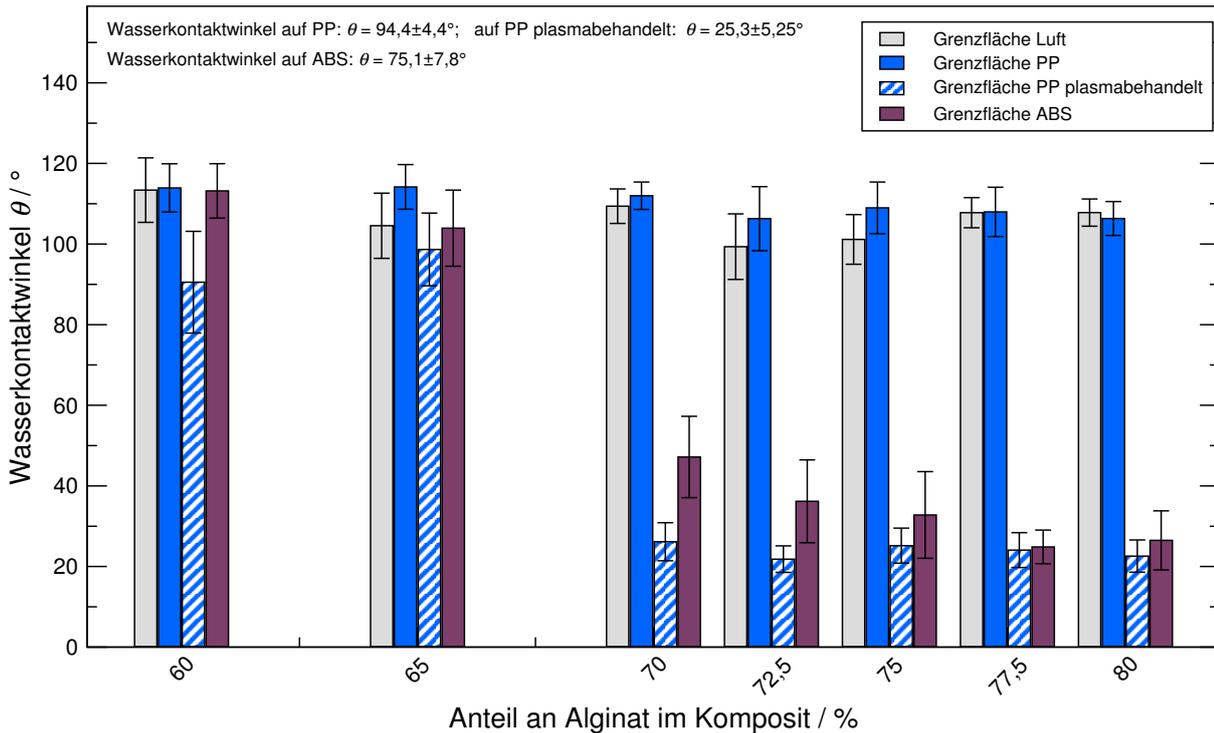


Abbildung 3.22: Wasserkontaktwinkel auf der Oberfläche von Kompositen, die während ihrer Vernetzung an verschiedene Materialien grenzten. Zusätzlich sind die Wasserkontaktwinkel der Materialien selbst angegeben. PP steht für Polypropylen und ABS für Acrylnitril-Butadien-Styrol.

Luft besteht aus unpolaren Gasen. Polypropylen ist ebenfalls unpolar. Sein Wasserkontaktwinkel betrug $94,4 \pm 4,4^\circ$. Durch die Behandlung mit Sauerstoffplasma wurde das Polypropylen hydrophilisiert, so dass sich der Kontaktwinkel auf $25,3 \pm 5,25^\circ$ verringerte. ABS ist eine Mischung bestehend aus 70–75% Acrylnitril-Butadien-Methylmethacrylat-Styrol-Copolymer und 25–30% Styrol-Acrylnitril-Copolymer [144]. Es ist teilweise polar und wies einen Wasserkontaktwinkel von $75,1 \pm 7,8^\circ$ auf.

Anhand der Kontaktwinkelmessungen bestätigten sich die in 3.1.3 beschriebenen Beobachtungen über die Abhängigkeit der Ausbildung der Kompositgrenzschichten von der Polarität/Hydrophobizität des angrenzenden Mediums. Komposite mit einem Alginatanteil von 60 und 65% wiesen unabhängig von ihrer Umgebung eine hydrophobe Grenzschicht mit Kontaktwinkeln über 90° auf. Die Art der Grenzfläche beginnt

sich ab einem Alginatanteil von 70% auf die Kompositgrenzschicht auszuwirken. An den Grenzflächen zu unpolaren Medien, wie beim Kontakt mit Luft und Polypropylen, bildeten sich hydrophobe Grenzschichten aus. Die Kontaktwinkel lagen auch bei hohem Alginatanteil von 80% meist über 100°. Bestand die Grenzfläche hingegen aus einem polaren und hydrophilen Material, so entstand auf dem Komposit eine hydrophile Grenzschicht. An der Grenzfläche Komposit-ABS verringerte sich der Wasserkontaktwinkel sprunghaft von $103,9 \pm 9,4^\circ$ bei 65%igen Kompositen auf $47,2 \pm 10,1^\circ$ bei 70%igen Kompositen. Mit weiterer Erhöhung des Alginatanteils sank der Kontaktwinkel auf unter 30°. Noch deutlicher zeigte sich die Auswirkung des plasmabehandelten und damit stark hydrophilen Polypropylens auf die Grenzschicht des Komposits: Die Wasserkontaktwinkel sanken ab 70% Alginatanteil direkt auf durchschnittliche $24,0 \pm 4,3^\circ$. Die Oberflächen der Komposite waren damit hydrophiler, als sie an den Querschnitten derselben Komposite gemessen wurden. Der Grund hierfür ist, dass sich das Alginat des Komposits während des Vernetzungsvorgangs zur hydrophilen Grenzfläche hin orientierte und das Materialinnere als durchgängige, homogene Schicht abschloss (vgl. Abb. 3.9b). Bei den Querschnitten der Komposite hingegen waren die Oberflächen inhomogen, da sowohl Teile der Alginatphase wie auch Teile der PDMS-Phase exponiert waren.

Über die Wahl der Grenzfläche – im Praktischen das Material des Gefäßes, in welches das Komposit vergossen wird – kann demnach kontrolliert werden, ob das Komposit eine hydrophobe oder eine hydrophile Oberfläche aufweist.

3.2.6 Zytotoxizitätstest

Bevor die mögliche Biofunktionalisierung von PDMS-Alginat-Kompositen mit Zellen getestet werden konnte, musste die grundsätzliche Zellverträglichkeit überprüft werden. Hierfür wurden die Zytotoxizitätstests WST-1 und BrdU durchgeführt. Bei der verwendeten Zelllinie handelte es sich um L929-Zellen.

Der WST-1-Test basiert auf der Umwandlung von farblosem Triphenyltetrazoliumchlorid zum Farbstoff Formazan. Da er von den Dehydrogenasen der Atmungskette reduziert wird, gilt er als Maß für die metabolische Aktivität und Vitalität der Zellen. Beim BrdU-Test wird während der Zellteilung Bromdesoxyuridin anstelle des Thymidins in die DNA eingebaut. Mit Hilfe von Antikörpern lässt sich das Bromdesoxyuridin in den Zellen detektieren und mit ihm das Zellwachstum und die Zellteilung beurteilen.

Die Zytotoxizitätstests wurden an Kompositen mit 3 verschiedenen Alginatsorten durchgeführt. Bei den ersten zwei Alginaten handelte es sich um 6%ige niedermolekulare Alginat, die zum einen unbehandelt und zum anderen über Filtration aufgereinigt verwendet wurden. Das dritte getestete Alginat war ein hochmolekulares aus *L. nigrescens* und *L. trabeculata* mit einer Konzentration von 0,65%.

Die Testergebnisse, bezogen auf die Zellkontrolle, sind in Abb. 3.23 dargestellt. Das Kompositmaterial mit dem unbehandelten niedermolekularen Alginat zeigte mit im Schnitt 69% beim WST-1 die geringsten Verträglichkeitswerte. Trotz eines reduzierten Stoffwechsels konnten sich die Zellen jedoch weiter vermehren, so dass beim BrdU-

Test durchschnittliche 80% erreicht wurden. Das Material wirkte daher nicht aktiv zell-tötend. Auf die Kompositmaterialien mit aufgereinigtem niedermolekularem Alginat und hochmolekularem Alginat reagierten die Zellen hingegen kaum. Alle Verträglichkeiten lagen über 95%. Der WST-1-Test beim hochmolekularen Alginat zeigte mit 107% sogar eine Verträglichkeit über dem Durchschnitt der Zellkontrolle an.

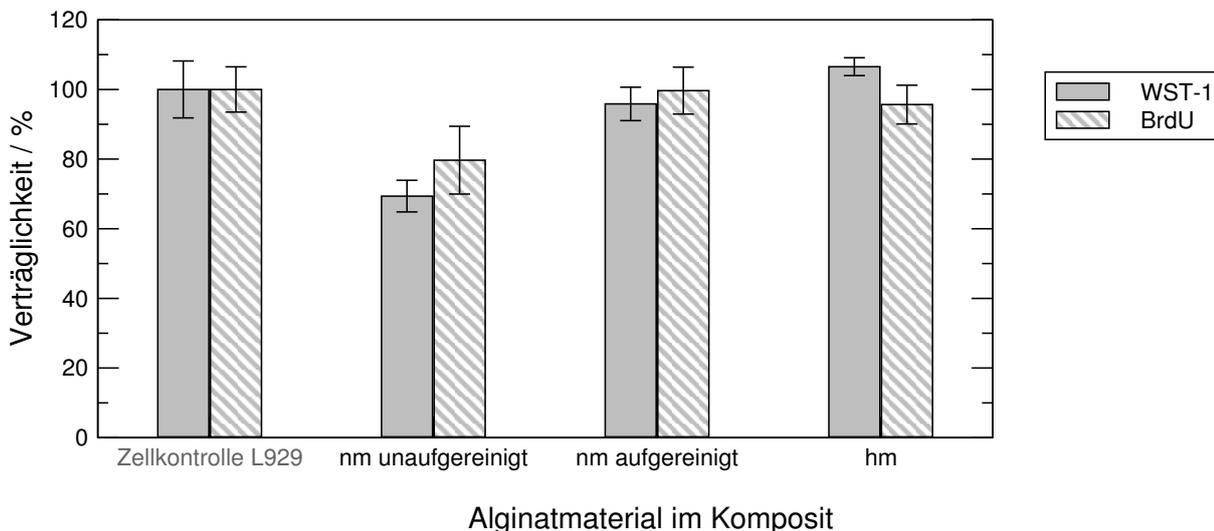


Abbildung 3.23: *In-vitro*-Zytotoxizitätstests von Kompositproben mit 75% Alginatanteil aus 6%igem unaufgereinigtem und aufgereinigtem niedermolekularem (nm) Alginat und aus 0,65%igem hochmolekularem (hm) Alginat.

Niedermolekulare Alginat, welche nicht speziell aufgereinigt sind, enthalten eine Reihe von Substanzen, wie Endotoxine, welche schädlich für Zellen sind [29]. Da das verwendete Silikon als klinisch zugelassen zertifiziert ist [108], sind die Verunreinigungen im unaufgereinigtem, niedermolekularem Alginat der Grund, weshalb dieses Komposit von den Zellen nicht ganz so gut vertragen wurde. Wird die Alginatlösung jedoch vor ihrer Verwendung über Cellulose filtriert, sind keine schädigenden Substanzen mehr vorhanden und das Alginat wird sehr gut von den Zellen vertragen. Aufgereinigte niedermolekulare Alginat können somit auch für Einkapselung und Kultivierung von z.B. Langerhans'schen Inseln genutzt werden [185].

Im hochmolekularen Alginat aus *L. trabeculata* und *L. nigrescens* waren keine schädlichen Substanzen vorhanden. Die Ergebnisse des *in-vitro*-Zytotoxizitätstests bestätigen damit die bereits von Zimmermann et al. nachgewiesene sehr gute Zellverträglichkeit [192]. Solches Alginat wurde bereits erfolgreich in verschiedenen Versuchen mit unterschiedlichen Zelllinien eingesetzt [96, 59, 32]. Es wurde daher entschieden, für alle nachfolgenden Versuche, in denen Komposite in Kontakt mit Zellen traten, das niedermolekulare Alginat nach der Vernetzung des PDMS gegen hochmolekulares Alginat auszutauschen.

3.3 Biofunktionalisierung des Komposits

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die PDMS-Alginat-Komposite in ihren Grundeigenschaften untersucht. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass sie für wässrige Substanzen diffusibel und untoxisch für Zellen sind. Zudem lässt sich die Alginatphase aus dem Komposit entfernen, so dass ein poröser PDMS-Schwamm bestehen bleibt.

Der folgende Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem Thema der Biofunktionalisierung der Komposite. In der Einleitung 1.3 wurden die verschiedenen Prinzipien, ein Material zu biofunktionalisieren, vorgestellt. Je nach Anwendung werden dafür Substanzen in das Material eingebettet oder an dessen Oberfläche gebunden. Im ersten Teil dieses Abschnitts wird die Nutzbarkeit des Kompositmaterials für eine diffusionsbasierte Wirkstofffreisetzung mit einer biologisch aktiven Substanz *in-vitro* demonstriert. Im Anschluss erfolgt eine Modifikation der Oberfläche von PDMS mit dem Ziel einer verbesserten Zellanheftung. Die Biofunktionalisierung ist dann eine Vorstufe für die Besiedelung des Materials mit Zellen. Sie wird zunächst an planaren PDMS-Proben untersucht und schließlich im nachfolgenden Abschnitt an PDMS-Schwämmen angewandt.

3.3.1 NGF-Diffusion aus dem Komposit: *In-vitro*-Test

Die Biofunktionalisierung des Komposits zu einem Wirkstoffabgabesystem erfolgte über die direkte Einbindung einer wachstumsstimulierenden Substanz in die Alginatphase des Komposits und deren Freisetzung durch Diffusion.

Wie in 3.2.2 beschrieben, ist die Diffusion von Molekülen aus der Alginatphase des Komposits heraus unter anderem von der Konzentration und Zusammensetzung des Alginats, der Größe der diffundierenden Stoffe und deren ionischen Wechselwirkungen im Komposit sowie von der Größe des Alginat-Netzwerks abhängig. Ein weiterer wichtiger Faktor, welcher die Diffusion von Substanzen aus dem Komposit beeinflusst, ist die Dauer, mit welcher das Alginat vernetzt wurde.

Für die folgenden *in-vitro*-Tests zur Abgabe von Wirkstoffen wurde sich auf den Vergleich der Abgabe aus Kompositen mit 75 und 80% Alginatanteil konzentriert. Die Durchführung der Versuche erfolgte mit PC12-Zellen. Als Wirkstoff wurde der Nervenwachstumsfaktor NGF in die Komposite aufgenommen. Seine Anwesenheit nach Freisetzung löste bei den PC12-Zellen eine neuronale Differenzierung aus. Es wurden der Einfluss der Inkubationszeit mit den NGF-funktionalisierten Kompositen und der Einfluss der Alginat-Vernetzungsdauer untersucht. Nach 3 Tagen wurde die Differenzierung der Zellen anhand der ausgebildeten Neuriten bewertet.

Erwartungsgemäß bildeten die Zellen der Negativkontrolle keine Neuriten aus (Abb. 3.24a), da weder im Medium Nervenwachstumsfaktor vorhanden war, noch in den Kompositproben, aus denen es hätte in das Medium diffundieren können. Die Positivkontrolle (Abb. 3.24b) enthielt im Schnitt 88% differenzierte Zellen. In allen Versuchsansätzen mit NGF-funktionalisierten Kompositen waren ebenfalls neuronale Differenzierungen, jedoch in unterschiedlichem Maße, zu beobachten (Abb. 3.24c und d).

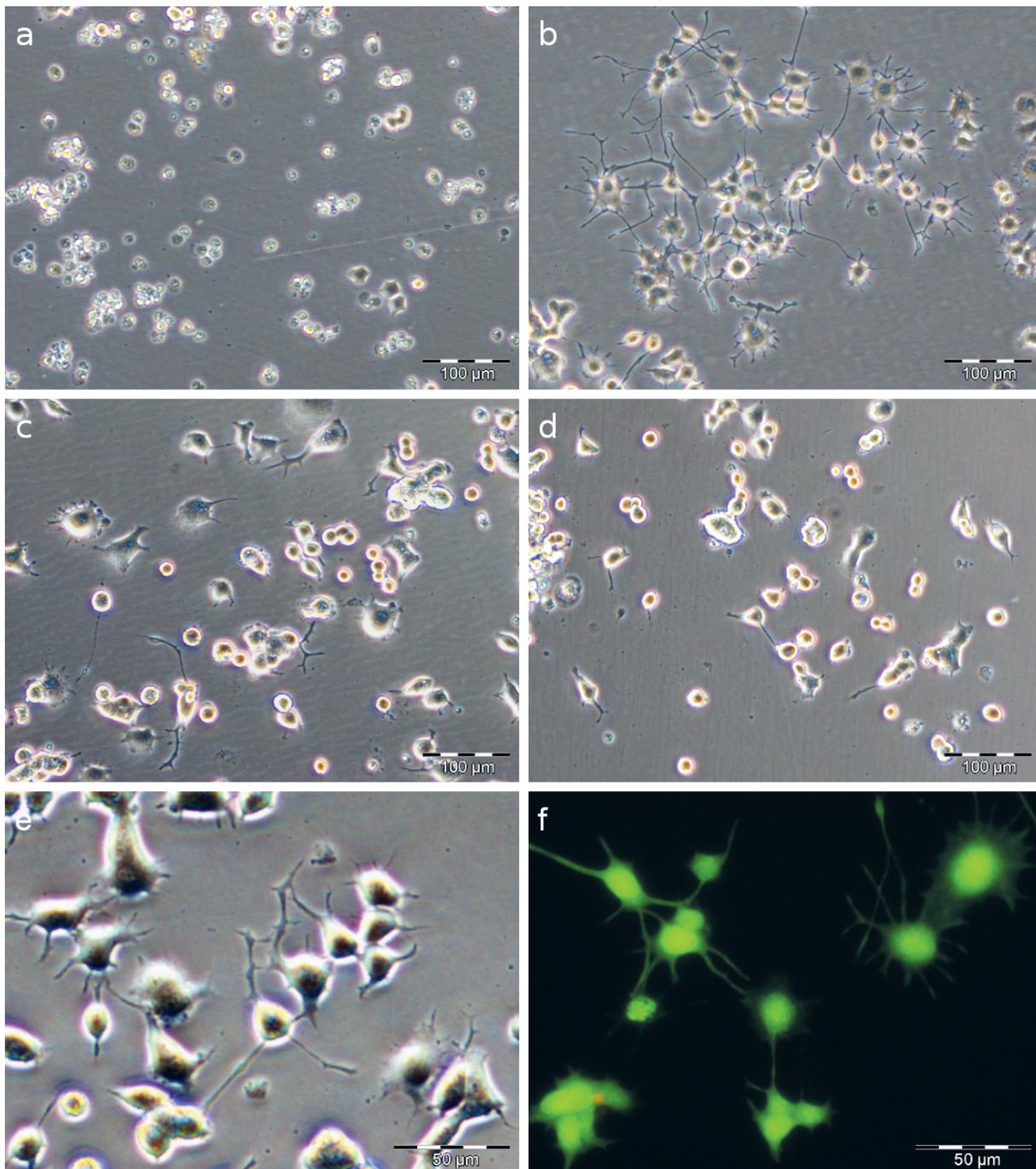


Abbildung 3.24: PC12-Zellen: a) undifferenzierte Zellen der Negativkontrolle gewachsen ohne NGF, b) differenzierte Zellen der Positivkontrolle bei 100 ng/ml NGF, c) differenzierte und undifferenzierte Zellen nach 90 min Inkubation mit NGF-funktionalisiertem Komposit bei 20 min vernetzter Alginatephase, d) wenig differenzierte Zellen nach 90 min Inkubation mit NGF-funktionalisiertem Komposit bei 22 h vernetzter Alginatephase, e) Detailansicht des Neuritenwachstums und f) Lebend (grün)/Tot (rot)-Färbung differenzierter PC12-Zellen. Als differenziert wurden nur jene Zellen betrachtet, deren Fortsätze mindestens 20 µm maßen.

Die differenzierten Zellen wiesen eine NGF-geförderte Adhäsion verbunden mit einem deutlichen Neuritenwachstum auf (Abb. 3.24e und f).

Zunächst wurde der Einfluss der NGF-Freisetzungzeit auf die Bildung der Neuriten untersucht. Verglichen wurden hierfür Komposite, deren Alginatephase für 20 min vernetzt worden war. Dabei zeigte sich deutlich die Abhängigkeit der Neuritenbildung von der Menge des abgegebenen Wachstumsfaktors mit der Zeit: Nach 90 Minuten Inkubation mit dem Kompositen war allgemein mehr NGF aus den Kompositen herausdiffundiert und konnte mehr Zellen zur Differenzierung anregen als nach 30 Minuten Inkubationszeit (Abb. 3.25). Des Weiteren ist ein deutlicher Unterschied bei der Zahl

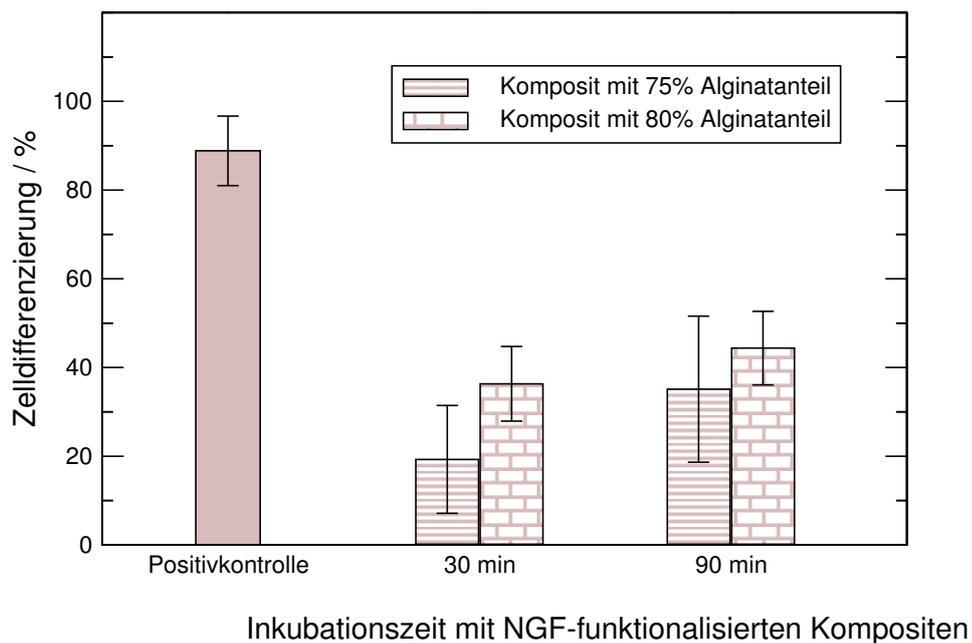


Abbildung 3.25: Prozentualer Anteil differenzierter PC12-Zellen nach 30 und nach 90 Minuten Inkubation mit NGF-funktionalisierten Kompositen mit 75% bzw. 80% Alginatanteil. Die Komposite wurden für 20 min in BaCl_2 -Lösung vernetzt.

differenzierter Zellen zwischen Kompositen mit 75 und 80% Alginatanteil zu sehen. Bei den 75%igen Proben waren nach 30 min Inkubation im Schnitt 19% aller Zellen differenziert, bei den 80%igen mit etwa 36% fast doppelt so viele. Der Unterschied glich sich mit höherer NGF-Inkubationszeit etwas an. Nach 90 min waren bei den 75%igen Kompositen etwa 35% aller Zellen differenziert. Dieser Wert schwankte jedoch recht stark um $\pm 16\%$. Bei den 80%igen Kompositen waren es $44 \pm 8\%$.

Eine weitere Möglichkeit zur Kontrolle der Abgabegeschwindigkeit von Wirkstoffen stellte der Vernetzungsgrad des Alginats innerhalb des Komposits dar. Die Alginatephase wurde daher in einem weiteren Versuchsansatz einmal für 20 min und einmal für 22 h mit BaCl_2 -Lösung vernetzt. Die NGF-funktionalisierten Komposite wurden danach für 90 min zusammen mit den PC12-Zellen inkubiert.

Im Ergebnis betrug die Differenzierung bei den für 22 h vernetzten Proben, sowohl für 75%ige als auch für 80%ige Komposite, nur rund 20%. Die Zellen dieser Proben

bildeten damit nur etwa halb so viele Neuriten aus als bei der wesentlich kürzeren Vernetzungszeit von nur 20 min (Abb. 3.26).

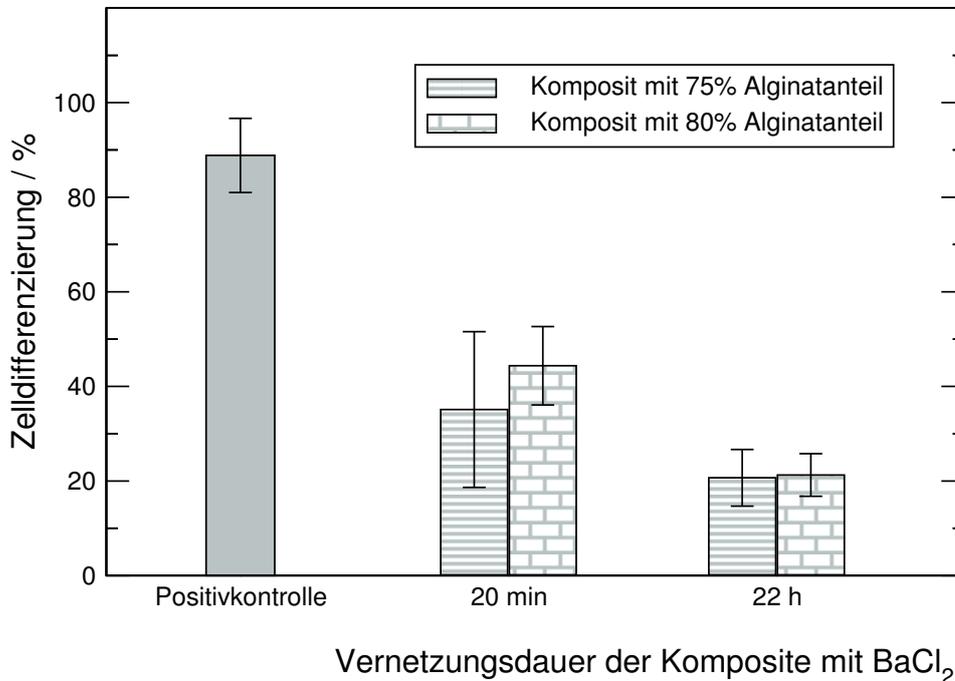


Abbildung 3.26: Prozentualer Anteil differenzierter PC12-Zellen nach 90 Minuten Inkubation mit NGF-funktionalisierten Kompositen mit 75% bzw. 80% Alginatanteil. Die Komposite wurden für entweder 20 min oder für 22 h in BaCl₂-Lösung vernetzt.

Insgesamt war die NGF-Freisetzung bei höherem Alginatgehalt, geringerer Vernetzungsdauer des Alginats und längerer NGF-Abgabedauer am größten. Der maximale Anteil differenzierter Zellen blieb jedoch weit unterhalb der Positivkontrolle. Während bei dieser das NGF direkt ins Medium gegeben wurde, konnte aus den Kompositproben nur teilweise NGF heraus diffundieren. Zudem besitzt NGF bei neutralem pH eine positive Ladung [87], so dass es mit dem Alginat teilweise ionische Wechselwirkungen eingegangen sein wird. Die Freisetzung war daher etwas langsamer, als sie bei einer neutralen oder negativ geladenen Substanz gewesen wäre. Die Wechselwirkungen könnten auch zu einer Hinderung bei der Beladung des Komposits mit NGF geführt haben, wodurch möglicherweise von vornherein weniger NGF in die Komposite aufgenommen wurde.

Sowohl die Unterschiede zwischen den Kompositen mit unterschiedlichem Alginatgehalt wie auch zwischen denen mit verschieden lang vernetzter Alginatphase bestätigen die Ergebnisse aus 3.2.2. Das biofunktionalisierte PDMS-Alginat-Komposit stellt damit ein über mehrere Parameter regulierbares, diffusionsbasiertes Wirkstoffabgabesystem dar.

3.3.2 Bioaktivierung der PDMS-Oberfläche

Neben der Biofunktionalisierung durch Einbindung von Wirkstoffen in ein Material gibt es noch die Möglichkeit der Anbindung von Substanzen an die Materialoberfläche. Ist eine Anheftung von Zellen gewünscht, so müssen an der Materialoberfläche Moleküle exponiert sein, an welche die Zellen adhären können.

Wird die Alginatephase aus den Kompositen ausgespült, könnte der verbleibende PDMS-Schwamm als Matrix für den Einwuchs von Zellen dienen. Silikon hat jedoch eine sehr hydrophobe Oberfläche, die von den meisten eukaryotischen Zellen nicht gut als Substrat zur Anheftung angenommen wird. Um die Adhäsion innerhalb des PDMS-Schwamms zu begünstigen, muss dessen Oberfläche – auch innerhalb der Poren – modifiziert werden.

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde mit dem späteren Ziel der Zellbesiedelung des PDMS-Schwamms die Oberfläche von zunächst planaren PDMS-Proben auf unterschiedliche Weise bioaktiviert. Zum Einsatz kamen hierbei Prozesse, bei denen die Anbindung von Adhäsionsmolekülen zum einen auf physikalischer Adsorption basierten, und zum anderen kovalent erfolgten. Insgesamt gab es 4 Gruppen an PDMS-Proben, die mit dem Polystyrol von Zellkulturplatten verglichen wurden. Bei der 1. Probengruppe handelte es sich um unmodifiziertes PDMS ("natives PDMS"). Auf die 2. Gruppe wurde ohne weitere Vorbehandlung das Glykoprotein Vitronectin gegeben ("PDMS+VN"). Die Gruppen 3 und 4 wurden mit Plasma und nachfolgend chemisch mit APTES modifiziert ("PDMS+Plasma+APTES"), wobei die 4. Gruppe weiter mit Glutaraldehyd und zum Schluss mit Vitronectin behandelt wurde ("PDMS+Plasma+APTES+GA+VN").

Die Auswirkung der jeweiligen Modifikation auf die Hydrophobizität der PDMS-Oberfläche wurde über den Wasserkontaktwinkel ermittelt (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Wasserkontaktwinkel einer Zellkulturplatte im Vergleich zu planarem PDMS mit unmodifizierter Oberfläche (natives PDMS) und modifizierter Oberfläche: PDMS mit Vitronectin (PDMS+VN), PDMS plasmaaktiviert mit APTES-Anbindung (PDMS+Plasma+APTES) und PDMS plasmaaktiviert mit APTES-Glutaraldehyd-Vitronectin-Anbindung (PDMS+Plasma+APTES+GA+VN).

Material	Wasserkontaktwinkel $\theta / ^\circ$
Zellkulturplatte	71,6±5,7
natives PDMS	113,9±1,7
PDMS+VN	98,2±3,5
PDMS+Plasma+APTES	62,0±10,5
PDMS+Plasma+APTES+GA+VN	51,2±7,5

Das native PDMS zeigte eine erwartungsgemäß hydrophobe Oberfläche mit ähnlich hohem Kontaktwinkel, wie er bereits in 3.2.5 gemessen wurde. Durch die Physisorption von Vitronectin an die Oberfläche des PDMS wurde der Wasserkontaktwinkel

um etwa 15° gesenkt. Die Benetzbarkeit befand sich jedoch mit $98,2 \pm 3,5^\circ$ trotzdem noch im hydrophoben Bereich. Die Reduktion in die Hydrophilie wurde über die chemische Anbindung von APTES an die zuvor plasmaaktivierte PDMS-Oberfläche erreicht. Der durchschnittliche Kontaktwinkel von 62° konnte durch die Anbindung von Vitronectin über eine Glutaraldehyd-Verlinkung weiter auf rund 50° gesenkt werden. Im Vergleich zu den PDMS-Proben besaß das Polystyrol einer Zellkulturplatte einen Wasserkontaktwinkel von etwa 70° .

Nach der Kontrolle des PDMS-Modifizierungserfolges anhand der Benetzbarkeit fand die Untersuchung hinsichtlich der Bioaktivierung statt. Hierfür wurden hUC-MSCs auf den Proben ausgesät und über 5 Tage kultiviert. Der Einfluss der Oberflächenmodifikation wurde über die Menge adhärenter Zellen am 2. und 5. Tag nach Inkubationsbeginn ermittelt (Abb. 3.27). Die Zellanheftung auf den Proben wurde mit der Menge an Zellen verglichen, die als Kontrolle auf Zellkulturplatten gewachsen waren.

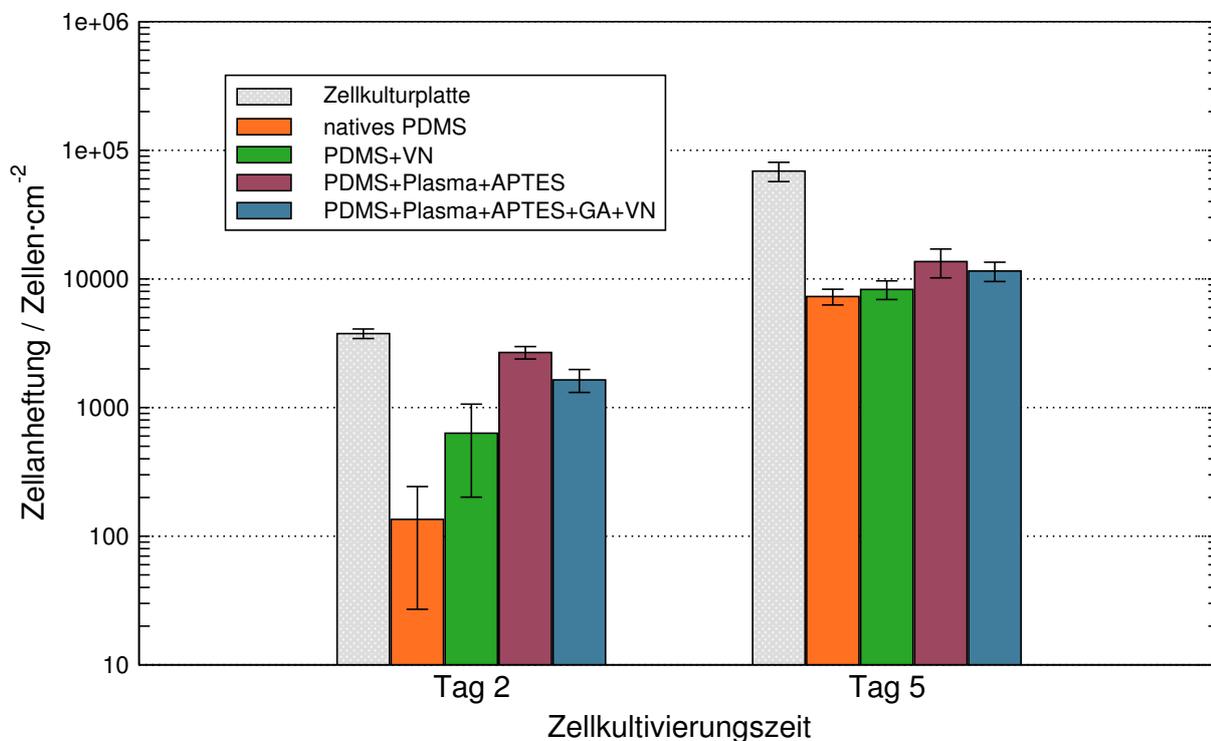


Abbildung 3.27: Anheftung von hUC-MSCs nach 2 und 5 Tagen Inkubation auf Zellkulturplatten und auf planaren PDMS-Proben mit verschiedenen Beschichtungen: PDMS mit Vitronectin (PDMS+VN), PDMS plasmaaktiviert mit APTES-Anbindung (PDMS+Plasma+APTES) und PDMS plasmaaktiviert mit APTES-Glutaraldehyd-Vitronectin-Anbindung (PDMS+Plasma+APTES+GA+VN).

Bereits an Tag 2 war ein deutlicher Unterschied zwischen den verschiedenen behandelten Proben und den Zellkulturplatten erkennbar. Während auf letzteren etwa $3,7 \cdot 10^3$ Zellen/cm² gezählt werden konnten, waren es auf allen PDMS-Proben deutlich weniger. Verglichen mit der Zellkontrolle wuchsen auf dem nativen PDMS mit durchschnittlichen $1,4 \cdot 10^2$ Zellen/cm² nur 1–4% der Zellen. Auf dem PDMS mit adsorbiertem

Vitronectin waren es bis zu 16%. Besser adhärten die hUC-MSCs an den chemisch modifizierten Proben. Mit etwa $2,7 \cdot 10^3$ Zellen/cm² wuchsen hier die meisten Zellen auf den Plasma+APTES-Proben. Bezogen auf die Zellkontrolle waren dies etwa 71%.

Nach 5 Tagen Inkubation glichen sich die Zellzahlen der verschiedenen PDMS-Proben untereinander etwas an. Jedoch hatte sich der Unterschied zur Zellkulturplatte vergrößert. Die Kontrolle enthielt etwa $6,9 \cdot 10^4$ Zellen/cm². Bezogen darauf wuchsen auf den Proben nur etwa 11% (natives PDMS mit $\approx 7,3 \cdot 10^3$ Zellen/cm²) bis maximal 20% (PDMS+Plasma+APTES mit $\approx 1,4 \cdot 10^4$ Zellen/cm²). In den mikroskopischen Aufnahmen von Abb. 3.29a und b ist die Differenz in der Zellanheftung zwischen Kontrolle und PDMS+Plasma+APTES-Probe noch einmal deutlich zu sehen.

Die Ergebnisse zeigen, dass es insbesondere bei der Erstzellbesiedelung Unterschiede zwischen den verschiedenen bioaktivierten PDMS-Proben gab. Die Zellen hefteten sich hier bevorzugt an das chemisch modifizierte PDMS an. Auch an Tag 5 waren auf diesen Proben die meisten Zellen vorhanden. Da jedoch im Laufe der Inkubation auch auf dem nativem PDMS und dem PDMS+VN zunehmend Zellen adhären wuchsen, wurden für die Besiedelung der PDMS-Schwämme im nachfolgenden Abschnitt alle getesteten PDMS-Modifikationen nochmals angewandt.

3.4 Besiedelung des Komposits mit Zellen

Bei einigen Implantatanwendungen ist eine gute Anheftung von Zellen an das Implantat gewünscht, z.B. damit sich die Implantate zur Erhöhung der Biokompatibilität besser in das Gewebe einfügen, wie bei Augenprothesen [129], oder bestimmte Zellen zum Wachstum an das Implantat angeregt werden, beispielsweise Nervenzellen an eine Elektrode [120] oder endotheliale Zellen an Gefäßprothesen [127]. Im ersten Teil dieses Abschnitts wurde überprüft, ob am PDMS-Schwamm ausgespülter Komposite Zellen adhären und wachsen können.

Eine weitere Form der Besiedelung von Implantaten besteht in der Einbettung und Immobilisierung von Zellen. Die Zellen sind hierbei befähigt, Wirkstoffe kontinuierlich zu produzieren und dauerhaft an ihre Umgebung abgeben [46]. Im zweiten Teil dieses Abschnitts wurde untersucht, ob sich das Komposit zur Einbettung lebender Zellen und damit als potentielles, zellbasiertes Wirkstoffabgabesystem eignet.

3.4.1 Wachstum von Zellen im bioaktivierten PDMS-Schwamm

Ausgangspunkt für die Besiedelung von PDMS-Schwämmen mit Zellen bildeten die Ergebnisse der Bioaktivierung von planarem PDMS aus dem vorangegangenen Unterabschnitt 3.3.2. Es wurden die gleichen Modifikationsprozesse durchgeführt. Entsprechend gab es PDMS-Schwämme ohne Vorbehandlung (nativ), Schwämme mit adsorbiertem Vitronectin (+VN), sowie plasmaaktivierte Schwämme mit kovalenter APTES-Anbindung (+Plasma+APTES) und nachfolgender Glutaraldehyd-Vitronectin-Anbindung (+Plasma+APTES+GA+VN). Die verwendeten Zellen gehörten wieder der Linie hUC-MSC an und wurden für ebenfalls 5 Tage auf den Schwämmen inkubiert.

Aufgrund der Dreidimensionalität der Schwämme konnten keine Zellzählungen durchgeführt werden. Stattdessen wurde am 5. Tag die Vitalität der Zellen anhand ihrer Formazan-Bildung beurteilt. Die Ergebnisse wurden mit Zellen auf planaren, analog modifizierten PDMS-Proben und Zellen auf Zellkulturplatten verglichen (Abb. 3.28).

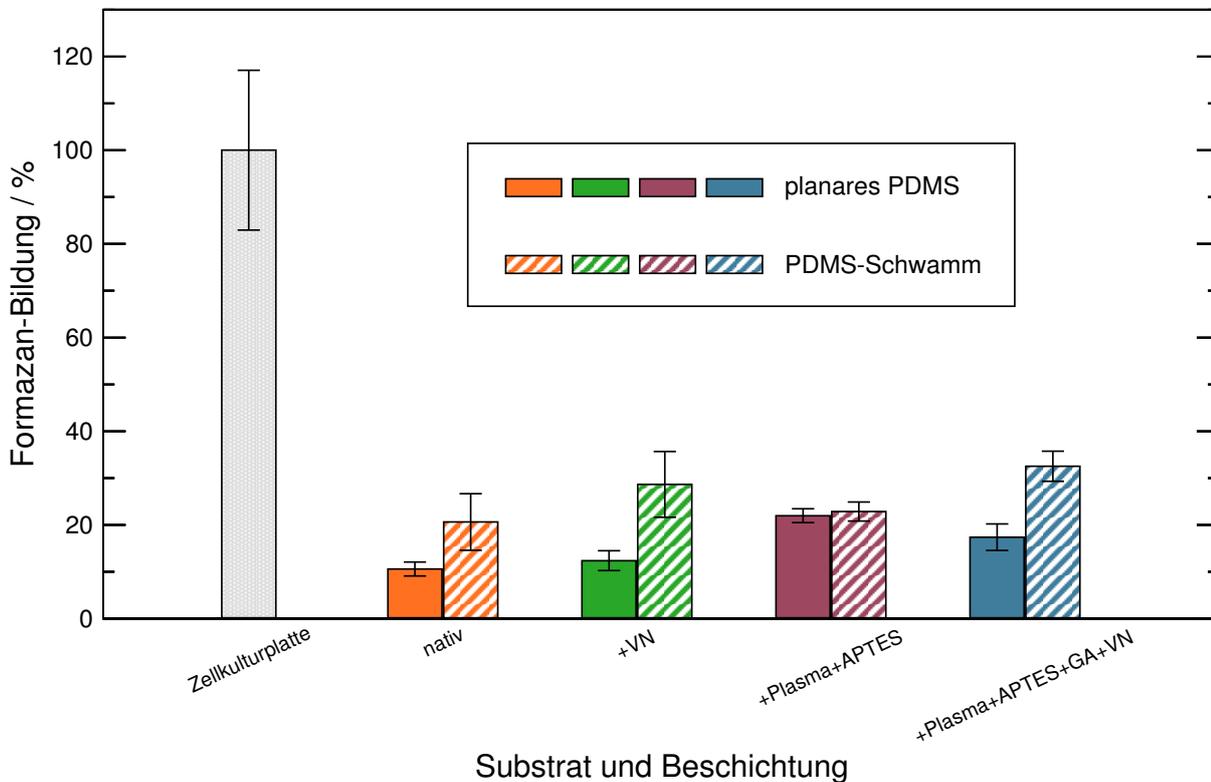


Abbildung 3.28: Formazan-Bildung von hUC-MSCs nach 5 Tagen Kultur auf planaren PDMS-Proben und PDMS-Schwämmen, die verschieden beschichtet wurden: mit Vitronectin (+VN), plasmaaktiviert mit APTES-Anbindung (+Plasma+APTES) und plasmaaktiviert mit APTES-Glutaraldehyd-Vitronectin-Anbindung (+Plasma+APTES+GA+VN). Die Werte beziehen sich auf die Formazan-Bildung von Zellen, die auf Zellkulturplatten wuchsen.

Außer bei den +Plasma+APTES-Proben wurde von den Zellen bei allen Schwamm-Proben nahezu doppelt soviel Formazan gebildet wie bei den planaren PDMS-Proben. Die höchsten Werte erreichten hierbei die +VN und +Plasma+APTES+GA+VN-Proben mit durchschnittlichen 33% bezogen auf die Kontrolle der Zellkulturplatten.

Während der mikroskopischen Kontrolle zeigte sich, dass nahezu alle Zellen lebten. In Abb. 3.29 sind Lebend/Tot-Färbungen von Zellen auf der Zellkulturplatte, auf planarem PDMS und in PDMS-Schwämmen zu sehen. Die Zahl der auf den planaren Proben adhärirten Zellen korrelierte direkt mit der Menge ihrer Formazan-Bildung. Überall dort, wo sich die Zellen anhefteten, konnten sie sich gut ausbreiten. Auch auf den Porenoberflächen innerhalb der PDMS-Schwämme wuchsen sehr vitale hUC-MSCs (Abb. 3.29c und d).

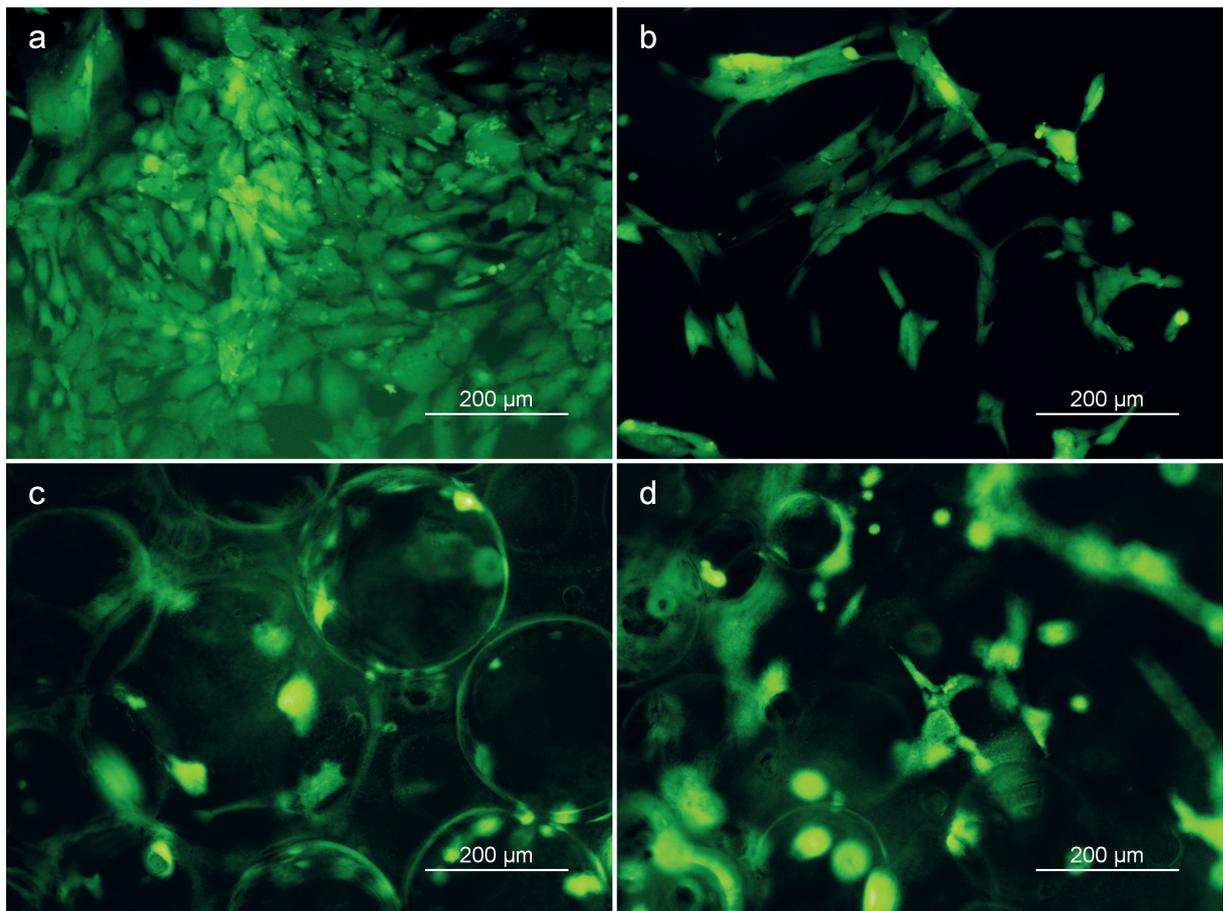


Abbildung 3.29: Lebend (grün)/Tot (rot)-Färbung adhärierter hUC-MSCs nach 5 Tagen Kultur auf verschiedenen Substraten: a) Zellkulturplatte, b) planares PDMS plasmaaktiviert mit APTES-Anbindung, c) PDMS-Schwamm mit Vitronectin, d) PDMS-Schwamm plasmaaktiviert mit APTES-Glutaraldehyd-Vitronectin-Anbindung.

Weitergehend wurde untersucht, ob sich die PDMS-Schwämme auch mit PC12-Zellen besiedeln lassen. Bei den hUC-MSCs konnte die alleinige Physisorption des Vitronectins mit im Schnitt 29% die zweithöchsten Formazan-Werte erreichen (siehe Abb. 3.28). Die Bioaktivierung der Schwämme für die Adhäsion der PC12-Zellen fand daher ebenfalls ohne chemische Modifikationen statt. Anstelle des Vitronectins wurde jedoch das Protein Kollagen Typ I verwendet. Die Kontrolle erfolgte über die Lebend/Tot-Färbung der Zellen (Abb. 3.30). Die zelluläre Anheftung der PC12-Zellen war insgesamt etwas geringer als bei den PDMS+VN-Proben der hUC-MSCs (vgl. Abb. 3.29c). Stattdessen bildeten sich innerhalb des Schwammes mehrere Zellagglomerate. Es gab jedoch auch gut adhärierte Zellen, an denen deutlich neuronale Differenzierungen mit Neuritenbildung erkennbar waren. Diese sind in Abb. 3.30 mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Die Verbindungen der Zellen untereinander über die Neuriten waren sowohl bei Zellen innerhalb einzelner Schwampfporen als auch bei Zellen von aneinandergrenzenden Poren sichtbar.

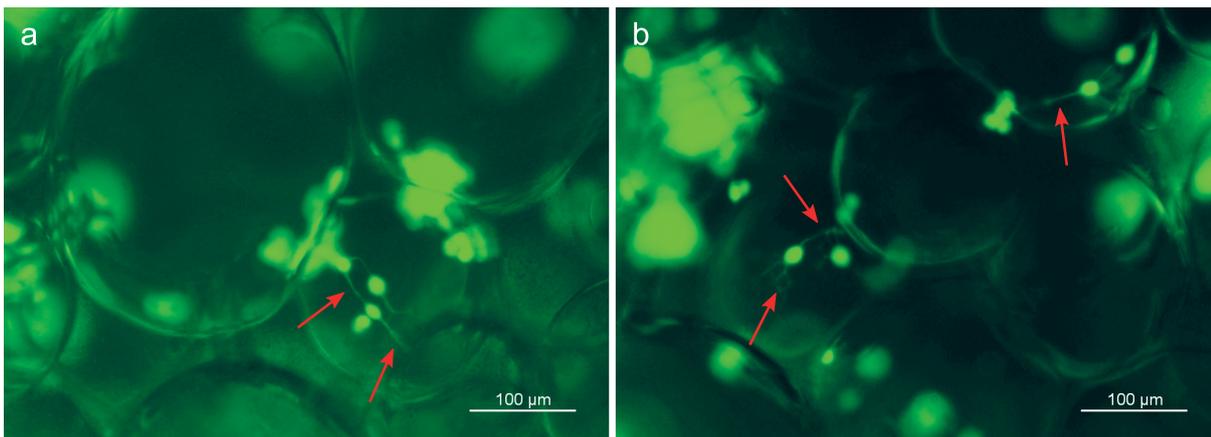


Abbildung 3.30: (a) und (b): Adhäsion, Wachstum und Differenzierung von PC12-Zellen auf den Porenoberflächen innerhalb eines PDMS-Schwamms. Der PDMS-Schwamm wurde zuvor mit Kollagen Typ I modifiziert. Lebend (grün)/Tot (rot)-Färbung der Zellen; die roten Pfeile markieren neuronale Differenzierungen der Zellen.

3.4.2 Einbettung von Zellen in die Alginatephase des Komposits

Auf lebenden Zellen basierende Wirkstoffabgabesysteme an Implantaten sollten so gestaltet sein, dass die Zellen von einer biokompatiblen Matrix eingeschlossen sind [59]. PDMS-Alginat-Komposite könnten als solch eine biokompatible Matrix eingesetzt werden. Um dies herauszufinden, wurden L929-Fibroblastenzellen in das Innere von unterschiedlich dicken Kompositen aufgenommen und immobilisiert. Ihre Entwicklung wurde über einen Zeitraum von 25 Tagen beobachtet (Abb. 3.31 und Abb. 3.32).

Den Immobilisierungsprozess überlebte nur knapp die Hälfte der eingebrachten Zellen (Abb. 3.32 Punkt-Linien-Diagramm), so dass die Ausgangszahl lebender Zellen in den Kompositen durchschnittliche 67 bis 86 Zellen/mm³ betrug (Abb. 3.32 Balkendiagramm). Während der ersten Tage der Inkubation vermehrten sich die Zellen stark und bildeten multizelluläre Sphäroide innerhalb der Komposite (Abb. 3.31b-c). Der Anteil lebender Zellen stieg auf über 80%. Nach 15 Tagen waren die Sphäroide bereits so groß, dass einzelne Zellen nicht mehr gezählt werden konnten (Abb. 3.31d-f). Ihre Zellzahl wurde daher geschätzt. Als Grundlage hierfür diente die Anzahl der Sphäroide innerhalb der Komposite und die Annahme, dass die Zellen exponentiell wuchsen [43]. Die Berechnungen ergaben eine Wachstumsrate von 0,4. Bis zum 15. Tag hatte sich damit die Zahl der lebenden Zellen auf ungefähr 10.000 Zellen/mm³ (bei 2 und 3 mm Probendicke) bis etwa 22.000 Zellen/mm³ (bei 1 mm Probendicke) erhöht. Mit zunehmender Sphäroidgröße kam es zu Nährstofflimitationen innerhalb der Sphäroide. Dies führte zu einem allmählichen Sterben der Zellen in ihrem Inneren, wie es in Abb. 3.31f deutlich zu sehen ist.

Grundsätzlich war die Überlebensrate in den dünnsten Kompositproben am höchsten, da bei diesen ein besserer Nährstoffaustausch mit dem umgebenden Medium stattfand. Die Zellen in den dickeren Proben überlebten vor allem in deren Randbereichen. An Tag 25 wurde jedoch der höchste Anteil lebender Zellen in den 3 mm

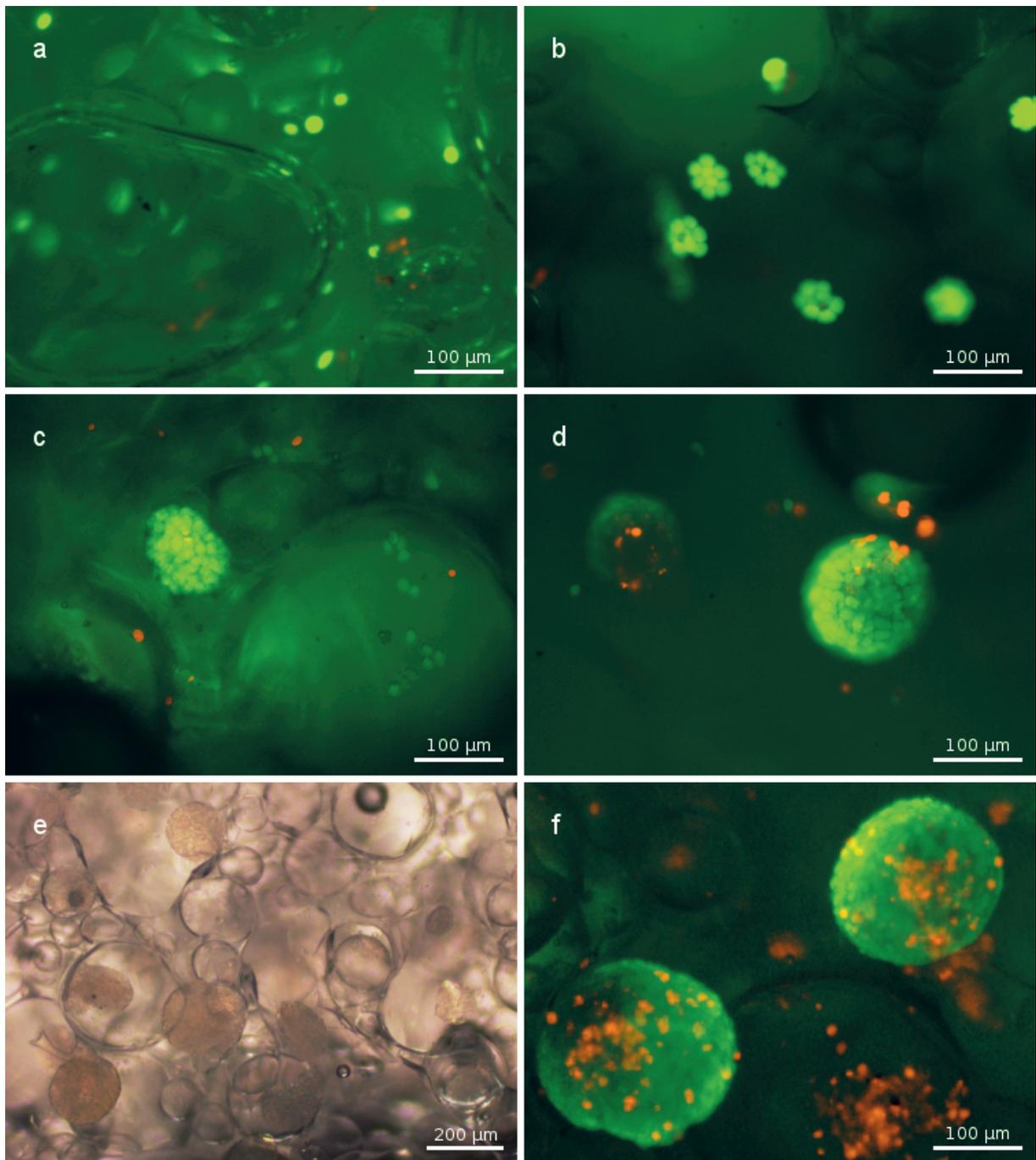


Abbildung 3.31: In der Alginatephase des Komposits immobilisierte L929-Zellen: a) Tag der Immobilisierung, b) nach drei Tagen, c) nach sieben Tagen, d) nach 15 Tagen und e)–f) nach 25 Tagen. Lebend (grün)/Tot (rot)-Färbung der Zellen in den Bildern a)–d) und f).

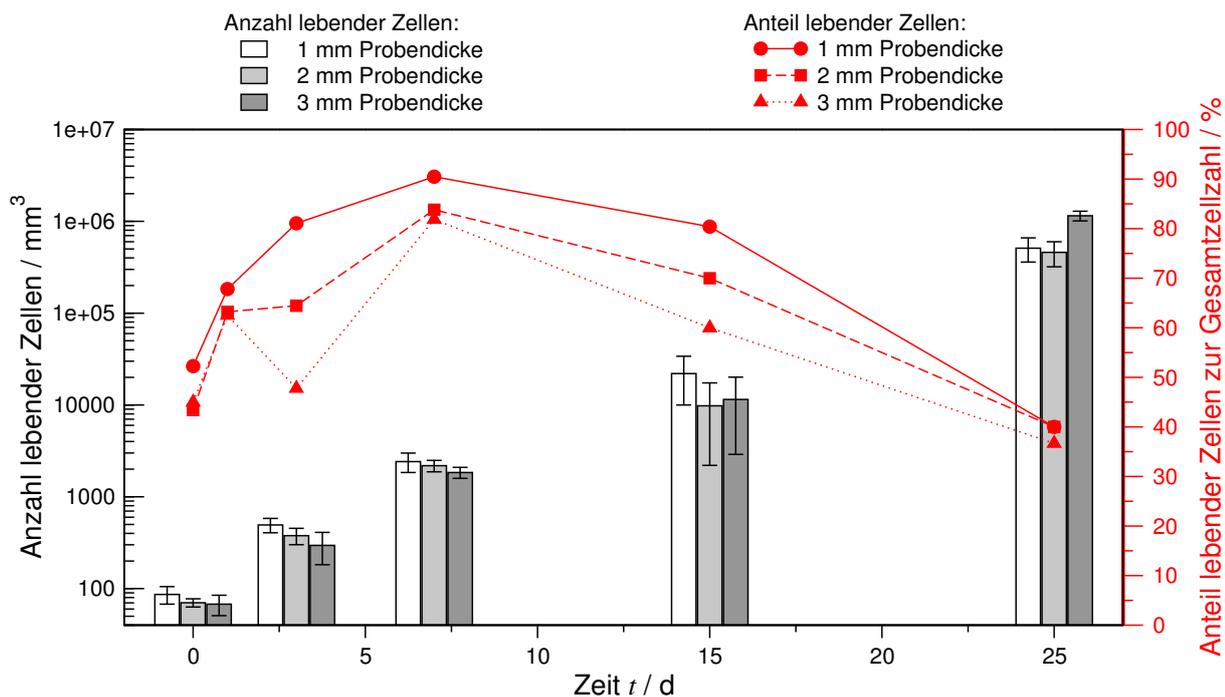


Abbildung 3.32: Anzahl lebender Zellen und Anteil lebender Zellen zur Gesamtzellzahl bei bis zu 25 Tage in Kompositen eingebetteten L929-Zellen. Die Komposite hatten eine Dicke von 1, 2 und 3 mm.

dicken Kompositen verzeichnet. Der Grund hierfür war, dass in einigen dieser Proben die Sphäroide hauptsächlich im Randbereich lokalisiert waren, wo mehr Zellen überlebten und sich vermehren konnten. Unabhängig davon lebten am Ende des Versuchs in allen Kompositen noch etwa 40% aller Zellen.

3.5 Körperverträglichkeit des Komposits: HET-CAM

Die Zytotoxizitätstests mit PDMS-Alginat-Kompositen verliefen bereits erfolgreich (siehe 3.2.6). Ergänzend hierzu und als Vortest zu *in-vivo*-Versuchen wurden Hühnereitests an der Chorion-Allantois-Membran durchgeführt. Hierfür wurden Proben auf die CAM von Hühnerembryonen gelegt und diese über 7 Tage hinweg beobachtet. Die Entwicklung der Embryonen diente dabei als hochsensibles System zur Detektion eventueller schädlicher Einflüsse durch die Proben. Gleichzeitig konnten mögliche Veränderungen an der CAM auf biologische Reaktionen auf das aufliegende Material hindeuten. Neben den Proben aus PDMS-Alginat-Komposit wurden reine PDMS-Proben als Vergleichsmaterial untersucht. Gleich behandelte aber unbeprobte Eier dienten als Kontrolle.

Insgesamt war die Überlebensrate der Embryonen sehr hoch. Von den anfänglich 26 fertilisierten Eiern starben 2 Embryonen noch vor Versuchsbeginn von ED6 auf ED7. Im Verlaufe des Versuchs verstarben nur noch 3 weitere Embryonen. Dies

geschah von ED12 auf ED13 mit jeweils einem Embryo von den Eiern mit Kompositproben, PDMS und ohne Proben. Die Gesamtüberlebensrate ab Beginn der Inkubation (ED0) bis zum Versuchsende (ED17) betrug damit unabhängig von der Beprobung der Eier 81%. Die Überlebensrate der Embryonen während des Versuchs (ED10–ED17) lag bei 87,5%.

In den ersten 24 Stunden nach Auflegen der Proben kam es aufgrund der Bewegungen der Embryonen meist zu einer Positionsverschiebung der Proben. Erst ab ED11 verblieben sie bis zum Ende des Versuchs an etwa der gleichen Stelle. In den Abbildungen 3.33 und 3.34 sind je zwei Beispiele der PDMS- und der Komposit-Proben über den zeitlichen Verlauf des Versuchs gezeigt.

An ED12 wurden erste Veränderungen sichtbar. Es kam zu milchigen Eintrübungen unterhalb der Proben, die vor allem durch die transparenten PDMS-Proben gut sichtbar waren. Die weißlichen Bereiche wurden mit zunehmendem Embryonalalter etwas kleiner und schienen sich zu verdichten. Sie ließen sich dabei aufgrund ihrer unscharfen Umrisse deutlich von gewöhnlichen Resten des Eiweißes, das während der Embryogenese abgebaut wird, unterscheiden. Zusätzlich zu den milchigen Stellen unterhalb der Proben waren an einigen Stellen der Probenränder Verdickungen der CAM zu beobachten (Abb. 3.35a–c). Es gab weder einen Rückgang noch ein verstärktes Wachstum von Blutgefäßen.

Bei den Kompositen gab es ebenfalls milchige Eintrübungen unterhalb der Proben. Hier traten jedoch teilweise auch ganz weiße Flecken auf den Proben auf. Dabei handelte es sich um Austrocknungen an der Kompositoberfläche. Bis ED17 verschwanden einige der ausgetrockneten Stellen wieder. Dagegen waren ab ED14/15 bei mehreren Kompositproben Einblutungen zu beobachten, die sich teilweise bis ED17 verstärkten. An den Probenrändern waren, wie beim PDMS, Verdickungen der CAM zu beobachten. Zusätzlich waren dort viele feine Blutgefäße zu erkennen (Abb. 3.35d–f).

Eine genauere Betrachtung der Veränderungen an der CAM erfolgte an Dünnschnitten, die mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt wurden. Dabei nahmen die Zellkerne eine dunkelblaue Farbe an, während sich das Zytoplasma rötlich verfärbte. So war es möglich, verschiedene Gewebestrukturen voneinander zu unterscheiden.

Das Chorionepithel, welches direkt unterhalb der Probe lag, und das dem Embryo zugewandte Allantoisepithel waren gut zu erkennen. Diese beiden Zellschichten lagen teilweise sehr eng zusammen, so dass hier die CAM sehr dünn war. An anderen Bereichen gab es deutliche Verdickungen des Gewebes. Bei den PDMS-Proben zeigte sich, dass die meisten Verdickungen genau in den Bereichen auftraten, wo zuvor die milchigen Eintrübungen zu beobachten waren (Abb. 3.36). Es handelte sich dabei um einen Zuwachs an Gewebe im Mesoderm zwischen dem Chorionepithel und dem Allantoisepithel. Innerhalb dieses Gewebes waren zudem häufig kleinere und größere Blutgefäße, die das Gefäßsystem der CAM bilden, vorhanden. Insgesamt war die CAM über die Länge der PDMS-Proben sehr eben. Die Gewebeverdickungen erfolgten in Richtung des Hühnerembryos, so dass das Chorionepithel eine nahezu glatte Fläche unterhalb der PDMS-Proben bildete.

Die CAM unterhalb der Kompositproben (Abb. 3.37a–d) wies ebenfalls Verdickun-

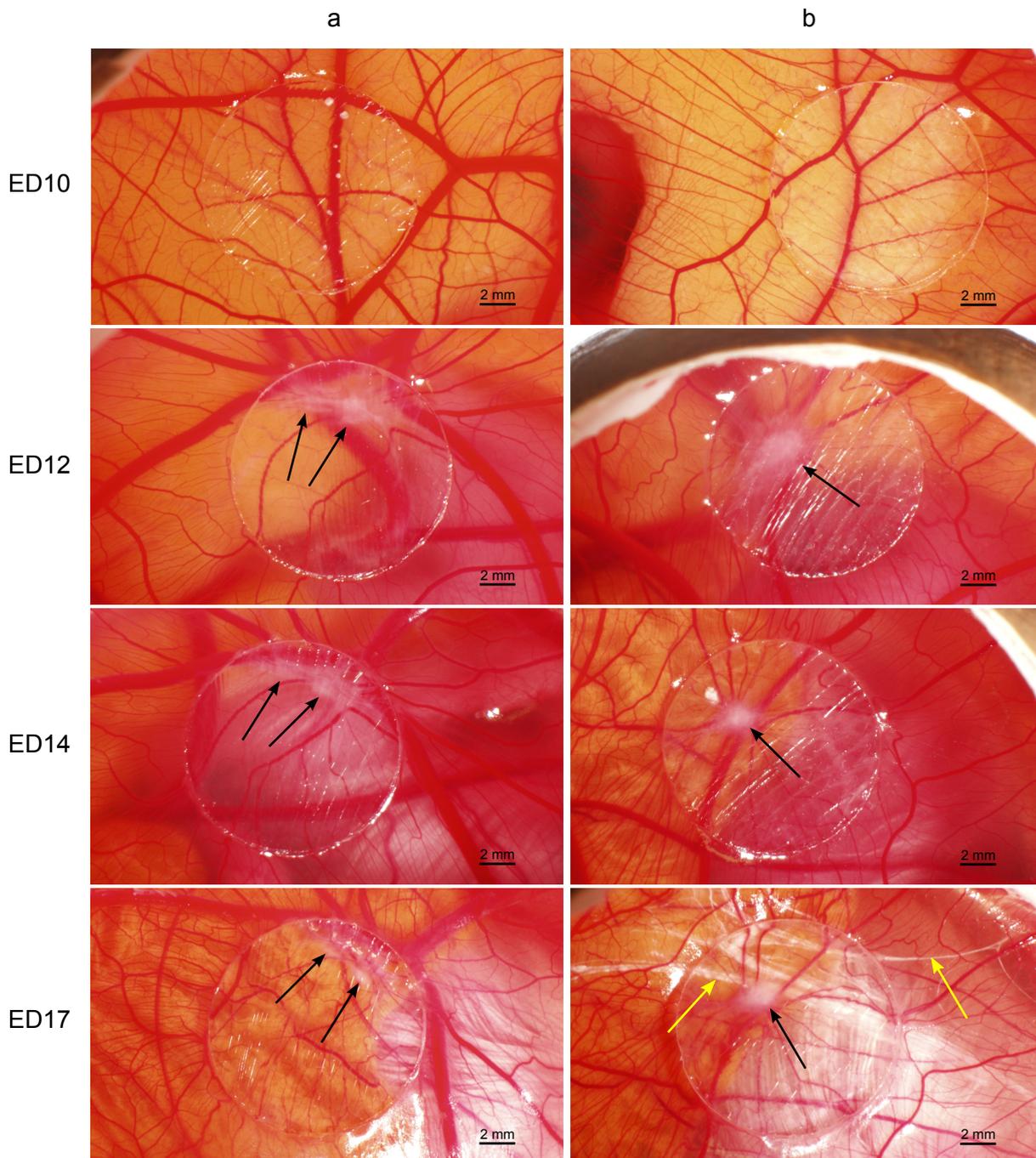


Abbildung 3.33: Reaktionen auf Material bestehend aus reinem PDMS nach Auflage auf die CAM von Hühnerembryonen anhand zweier Probenbeispiele (a und b). Die Proben wurden an ED10 auf die CAM gelegt und über eine Woche bis ED17 untersucht. Gewebeveränderungen der CAM unterhalb der PDMS-Proben sind durch schwarze Pfeile aufgezeigt. Die gelben Pfeile deuten auf gewöhnliche Reste des Eiweißes, welches von den Embryonen während ihrer Entwicklung abgebaut wird.

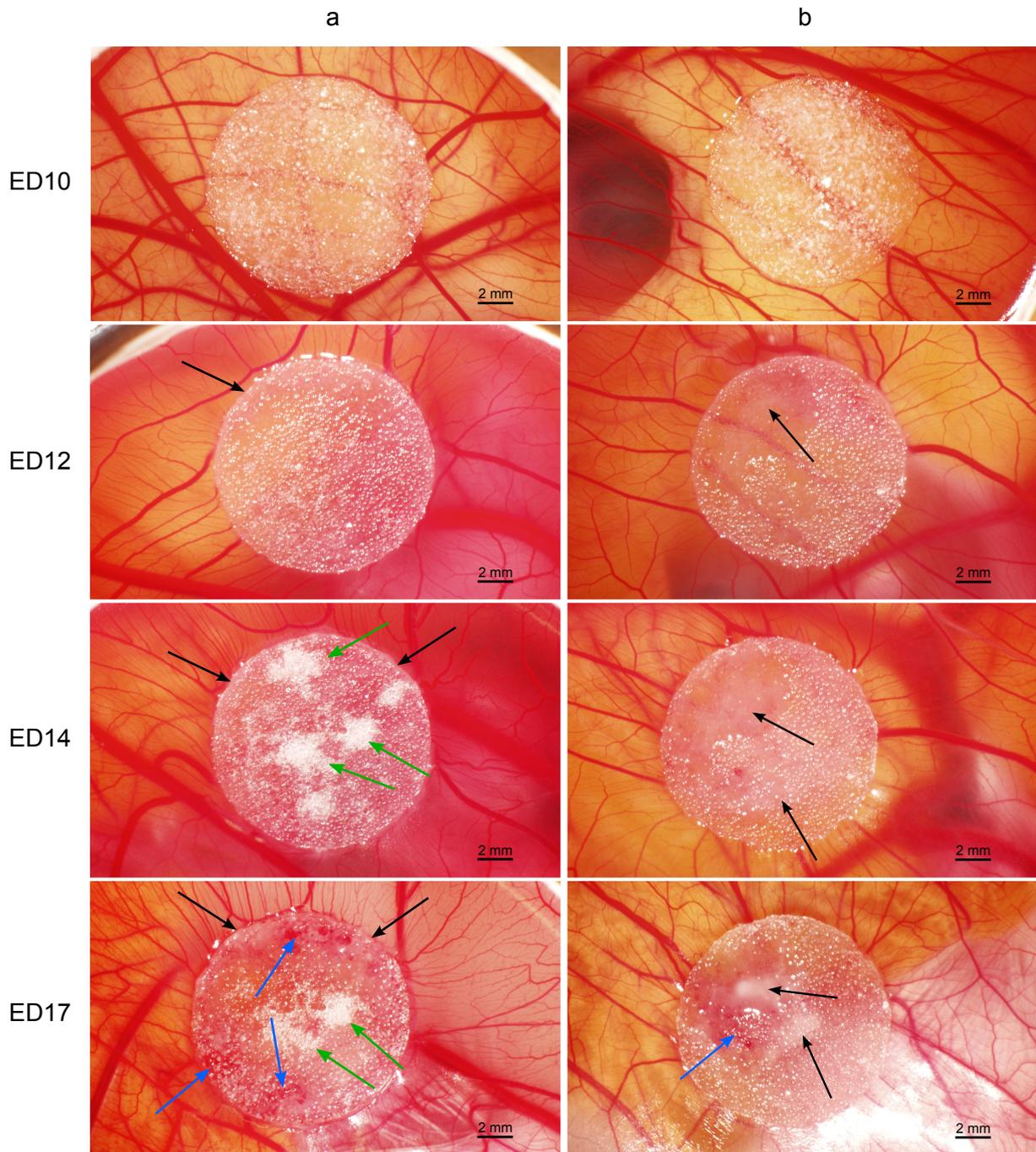


Abbildung 3.34: Reaktionen auf PDMS-Alginat-Komposite nach Auflage auf die CAM von Hühnerembryonen an zwei Probenbeispielen (a und b). An ED10 wurden die Proben auf die CAM gelegt und über eine Woche bis ED17 untersucht. Schwarze Pfeile deuten auf Gewebeveränderungen der CAM unterhalb der Proben, grüne Pfeile zeigen auf Austrocknungen der Oberfläche der Proben und blaue Pfeile markieren leichte Einblutungen.

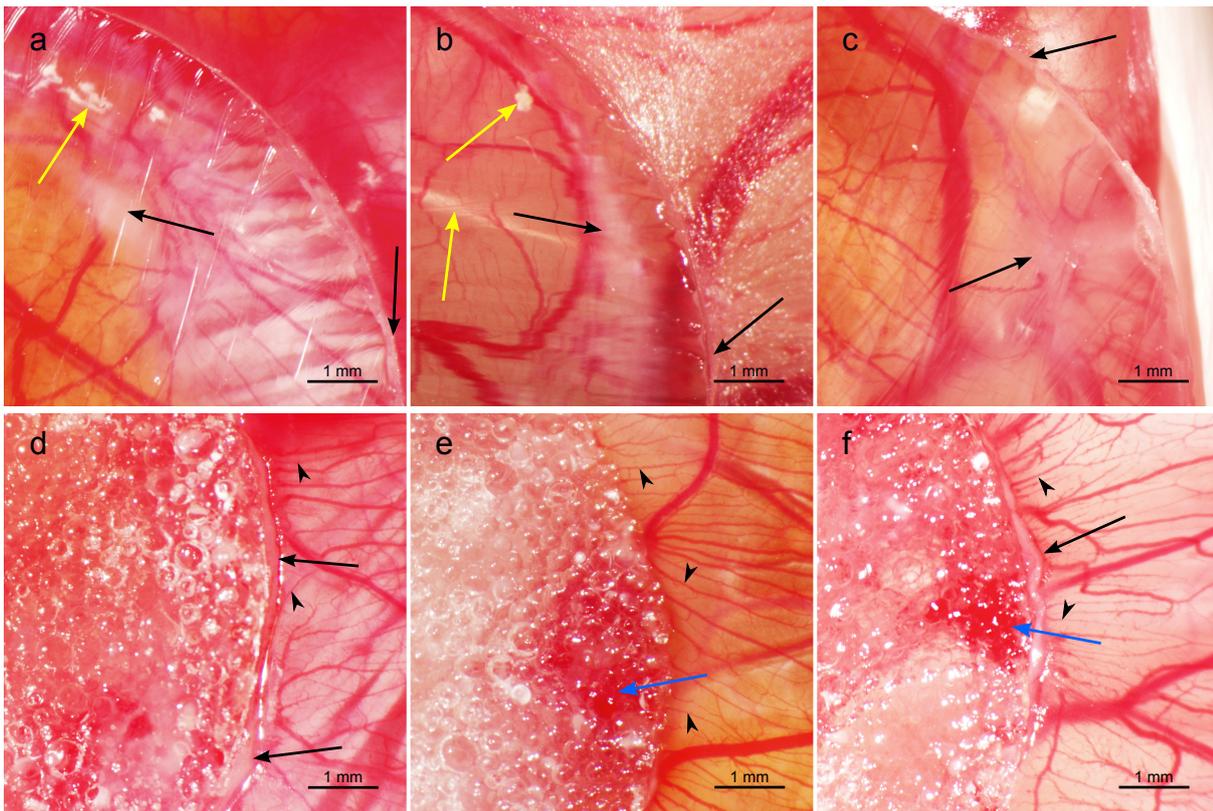


Abbildung 3.35: ED17: Veränderungen an der CAM nach einer Woche Inkubation mit Proben aus PDMS (a–c) und mit Kompositmaterial (d–f). Die schwarzen Pfeile deuten auf Gewebeveränderungen der CAM. Hühnereiweißreste sind durch gelbe Pfeile markiert, Blutungen durch blaue Pfeile. Die Pfeilspitzen weisen auf Beispiele verstärkt gebildeter Blutgefäße.

gen auf, die jedoch sowohl auf der Embryonenseite als auch vor allem auf der Proben­seite auftraten. Die CAM-Schnitte sahen daher in ihrer Struktur im Allgemeinen unregelmäßig und auf der Seite des Chorionepithels sogar teilweise zerklüftet aus. Stellenweise hafteten Reste der Alginatphase des Komposits auf der CAM an. Auch im Mesoderm waren an mehreren Stellen Alginatreste eingeschlossen. Zudem ragten einige zelluläre Strukturen baumartig in Richtung der Kompositprobe auf. Ein gehäu­f­tes Auftreten von Blutgefäßen, wie es die makroskopische Beobachtung an den Kom­posit­rändern vermuten ließ, war in den histologischen Schnitten nicht zu erkennen.

Aus den Detailaufnahmen wird deutlich, dass die eingewachsenen Alginatreste im direkten Kontakt zu den Zellen standen (Abb. 3.37g). Die Berührung mit dem Alginat hatte jedoch nicht zwangsläufig eine Verdickung der CAM zur Folge, da auch sehr dünne Membranen unterhalb der Kompositproben vorhanden waren, auf denen das Alginat eng auflag (Abb. 3.37b und h).

Die in die CAM eingebundenen Alginatreste lassen darauf schließen, dass das Alginat der Komposite von den Zellen teilweise abgebaut worden war. Stattdessen wuchsen in diesen Bereichen Zellen in die Poren der Komposite ein, wodurch sich die baumartigen Gewebestrukturen und zerklüfteten Ränder in den Dünnschnitten erklä-

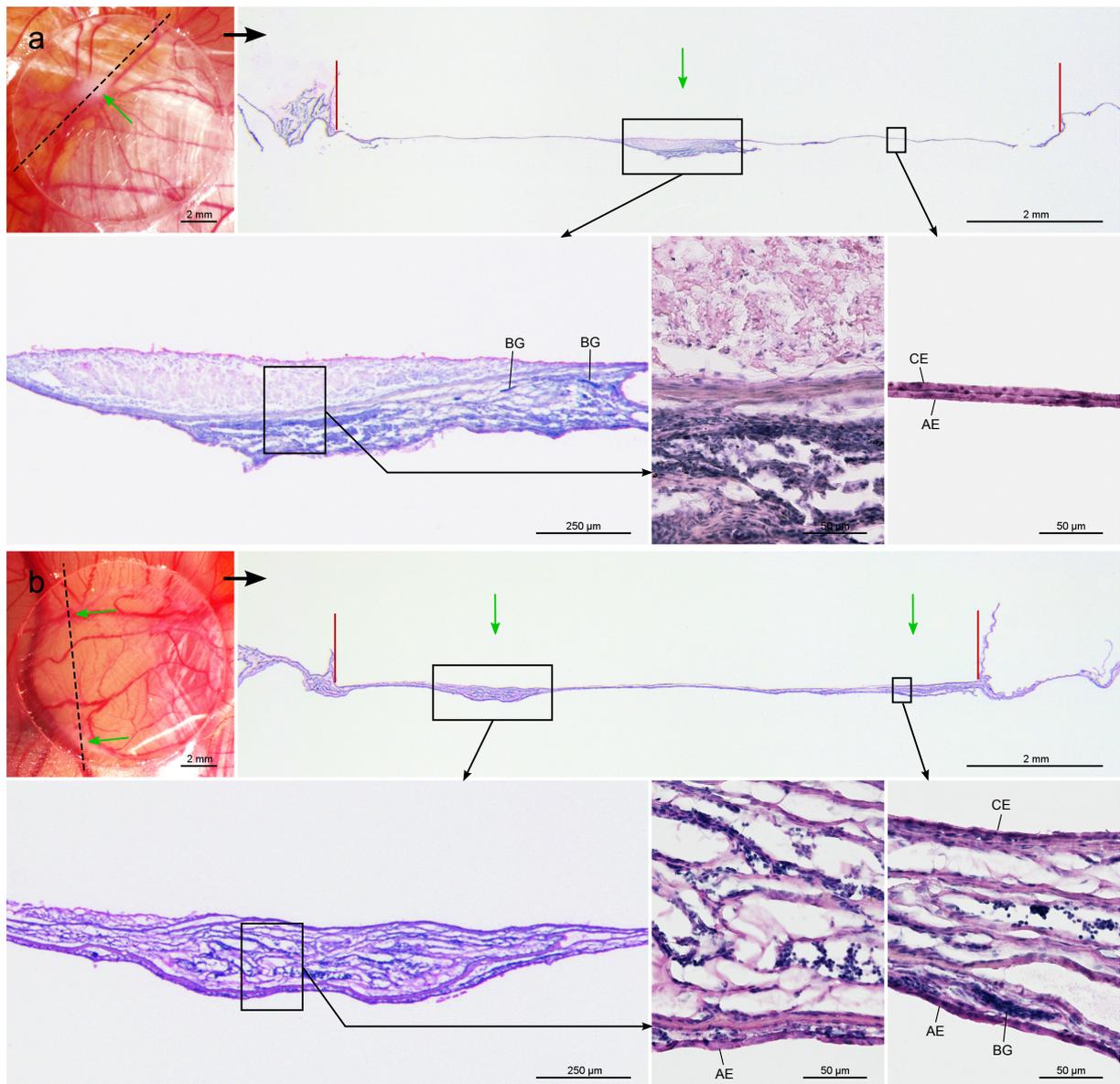


Abbildung 3.36: Dünnschnitte von H&E-gefärbtem CAM-Gewebe unterhalb von PDMS-Proben an zwei Beispielen (a und b). In den Ausgangsbildern ist die Schnittebene (gestrichelte Linie) mit makroskopisch sichtbaren, weißlichen Veränderungen der CAM (grüne Pfeile) gekennzeichnet. In den Übersichtsbildern der Dünnschnitte sind an den gleichen Stellen Verdickungen der CAM zu sehen. Die Lage der Proben ist durch rote Striche markiert. Detailbilder: Die Verdickungen resultieren aus Gewebezuwachst im Mesoderm zwischen dem Chorionepithel (CE) und dem Allantoisepithel (AE). BG steht für Blutgefäße.

ren lassen. Der Zelleinwuchs ist in 100 µm dicken Gewebeschnitten mit noch aufliegender Kompositprobe deutlich zu sehen (Abb. 3.38). An den Stellen, an denen das Alginate ganz oder teilweise fehlte, waren Zellen in die Poren migriert.

CAM-Gewebe, auf dem keine Probe auflag, hatte eine durchschnittliche Dicke von $51,4 \pm 15,5$ µm (Tabelle 3.5). Die CAMs unterhalb der PDMS-Proben waren im Schnitt

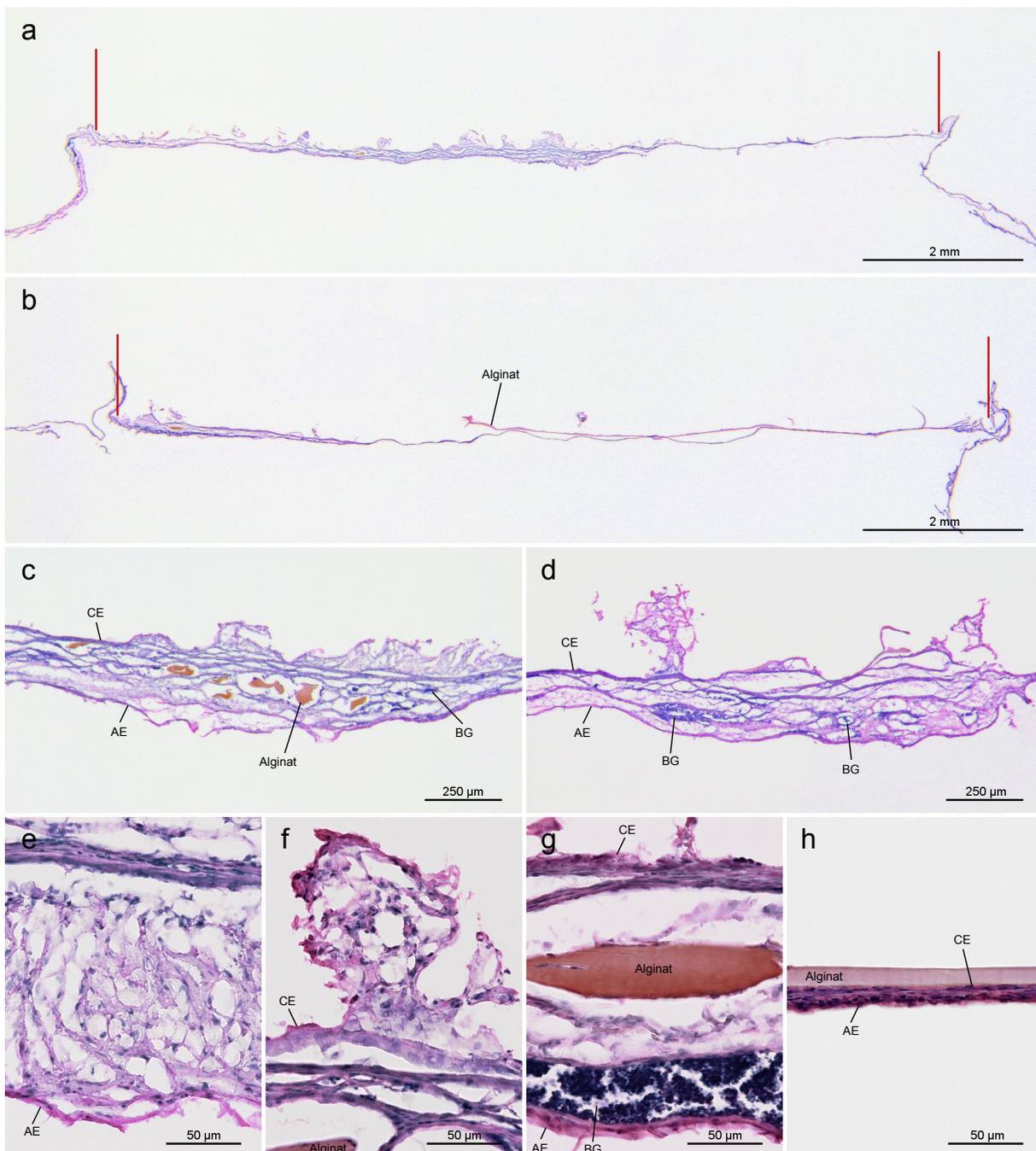


Abbildung 3.37: Dünnschnitte von H&E-gefärbtem CAM-Gewebe unterhalb von Kompositproben: a) und b) Übersicht über die gesamte Länge der Proben, die durch die roten Striche gekennzeichnet ist, c) Einschluss von Alginat (orange) in die CAM, d) Gewebeauswuchs in Richtung der Kompositprobe, e)–h) Detailaufnahmen verschiedener CAM-Bereiche. CE kennzeichnet das Chorionepithel, AE das Allantoisepithel, BG die Blutgefäße.

etwa 4 µm dicker. Sie wiesen jedoch eine recht hohe Standardabweichung von etwa 24 µm auf, was auf die eher punktuellen Gewebeverdickungen zurückzuführen ist (vgl. Abb. 3.36). Die CAMs unterhalb der Komposit-Proben wiederum waren im Durch-

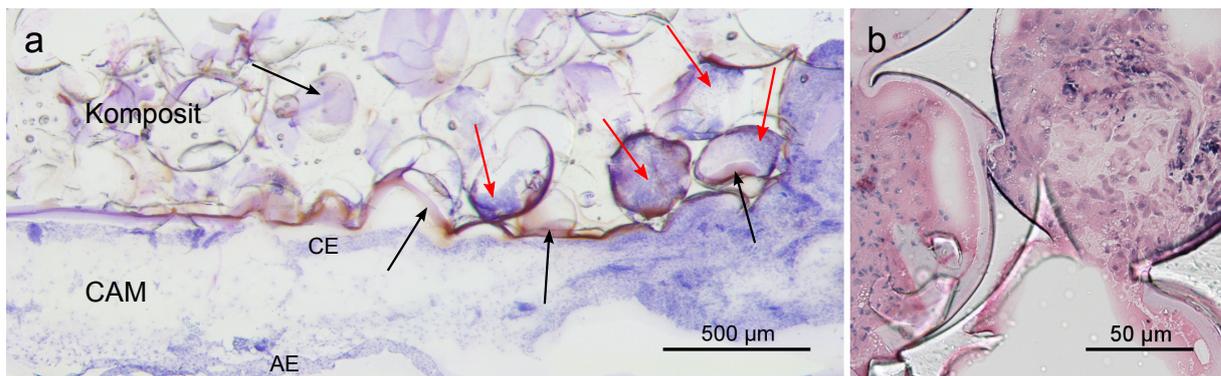


Abbildung 3.38: a) 100 µm dicker Schnitt durch H&E-gefärbtes CAM-Gewebe mit noch aufliegender Kompositprobe. Schwarze Pfeile markieren das Alginat der Kompositprobe. Die roten Pfeile weisen auf Gewebeeinwuchs in die Poren des Komposits. Das Chorionepithel ist mit CE und das Allantoisepithel mit AE gekennzeichnet. b) Detailaufnahme des Einwuchses von Zellen in die Kompositporen. Das PDMS des Komposits ist transparent und glattrandig.

Tabelle 3.5: Durchschnittliche Dicke der CAM unterhalb von PDMS- und Kompositproben verglichen mit der durchschnittlichen Dicke einer CAM, auf der keine Probe auflag.

Probentyp	CAM-Dicke \bar{d} / µm
ohne Probe	51,4±15,5
PDMS-Proben	55,3±23,9
Kompositproben	71,9±15,4

schnitt um etwa 17 µm dicker als die CAMs unterhalb der PDMS-Proben. Dieser Dickenzuwachs muss jedoch nicht aus einer biologischen Unverträglichkeit gegenüber der Materialproben resultieren. Da die Eier während ihrer Inkubation alle 2 h um 30° gekippt wurden, könnten die Verdickungen auch aufgrund des mechanischen Reizes, den die Proben beim Kippvorgang auf die Membranen ausübten, entstanden sein.

Zusammenfassend war das PDMS-Alginat-Komposit körperverträglich. Die Hühnerembryonen wiesen über die gesamte Zeit des Versuchs keinerlei gesundheitliche Beeinträchtigungen auf. An den CAMs traten zwar leichte Gewebeverdickungen auf, jedoch gab es keine Anzeichen von Veränderungen des Eiklars oder einen Rückgang der Blutgefäße. Es waren keine Anzeichen starker Entzündungsreaktionen des Gewebes, wie beispielsweise die Bildung von Riesenzellen, zu sehen. Stellenweise war Gewebe in die Poren des Komposits eingewachsen. Die gelegentlichen Einblutungen in die Kompositproben könnten durch feine Risse im eingewachsenen Gewebe direkt unter der Kompositprobe entstanden sein, wenn durch den mechanischen Zug des Materials auf die CAM während der Kippung der Eier die feinen Blutgefäße der Membran verletzt worden waren.

3.6 Implantierbare Elektrode mit Silikon-Alginat-Komposit als Trägermaterial

Das Komposit dieser Arbeit wurde mit dem Ziel entwickelt, als neues Implantatmaterial eingesetzt werden zu können. Seine Eignung wurde über die Herstellung eines Prototyp-Implantats mit integrierten Elektroden getestet.

Das Implantat bestand aus zwei Kompositschichten, zwischen denen zwei Elektrodenkontakte eingebettet lagen. Aufbau und Geometrie des Implantats waren dabei an eine implantierbare Silikonelektrode ("Myoplant-Elektrode") angelehnt, wie sie in Abb. 3.39a zu sehen ist. Mit Myoplant-Elektroden ließen sich bereits erfolgreich myogene Signale ableiten [89].

Das Alginat der für den Aufbau benötigten dünnen Kompositschichten wurde zunächst in BaCl_2 -Lösung vernetzt und anschließend getrocknet. In diesem Zustand ließen sie sich mit Silikonkleber fest zusammenkleben. Die fertige Elektrode – nachfolgend als "Prototyp-Elektrode" bezeichnet – war trocken, weiß und etwa 1,3 mm dick (Abb. 3.39b). Damit war sie ungefähr einen halben Millimeter dicker als die Myoplant-Elektrode.

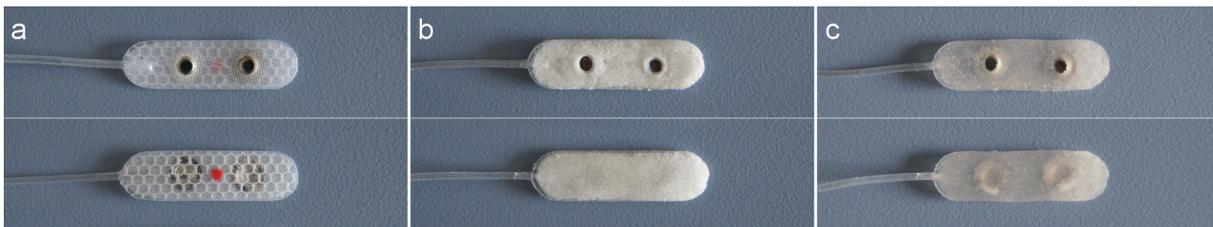


Abbildung 3.39: Originale Myoplant-Elektrode mit Elektrodenkontakten eingebettet in Silikon-schichten (a) im Vergleich zu Prototyp-Elektroden gleicher Geometrie aufgebaut mit Silikon-Alginat-Komposit kurz nach der Herstellung im getrockneten Zustand (b) und nach 18 Stunden Inkubation in 0,9%iger NaCl-Lösung (c).

Die Überprüfung der Funktion der Prototyp-Elektrode erfolgte über die Aufnahme eines künstlich generierten EKG-Signals. Hierfür wurde die Prototyp-Elektrode auf ein Muskelphantom aufgelegt, in welches das Signal eingespeist wurde. Das Muskelphantom bestand aus einem Agarosegel mit einer elektrischen Leitfähigkeit von $0,102 \pm 0,011$ S/m. Ein echter Skelettmuskel weist bei einer Frequenz zwischen 10 und 1.000 Hz eine Leitfähigkeit von 0,04 bis 0,7 S/m auf – je nachdem, ob longitudinal oder transversal zu den Muskelfasern gemessen wird [40, 125]. Die elektrische Leitfähigkeit des Muskelphantoms lag zwischen diesen Werten.

Der EKG-Generator simulierte 75 Herzschläge pro Minute. Die Signale konnten von der Prototyp-Elektrode sauber erfasst werden. Beim Vergleich mit einer Myoplant-Elektrode (Abb. 3.40) war kein Qualitätsunterschied in den EKG-Aufzeichnungen feststellbar. Um die Qualität besser beurteilen zu können, wurden die Signale Fourier-transformiert. Die erhaltenen Frequenzspektren sind bis 200 Hz in Abb. 3.41 dargestellt.

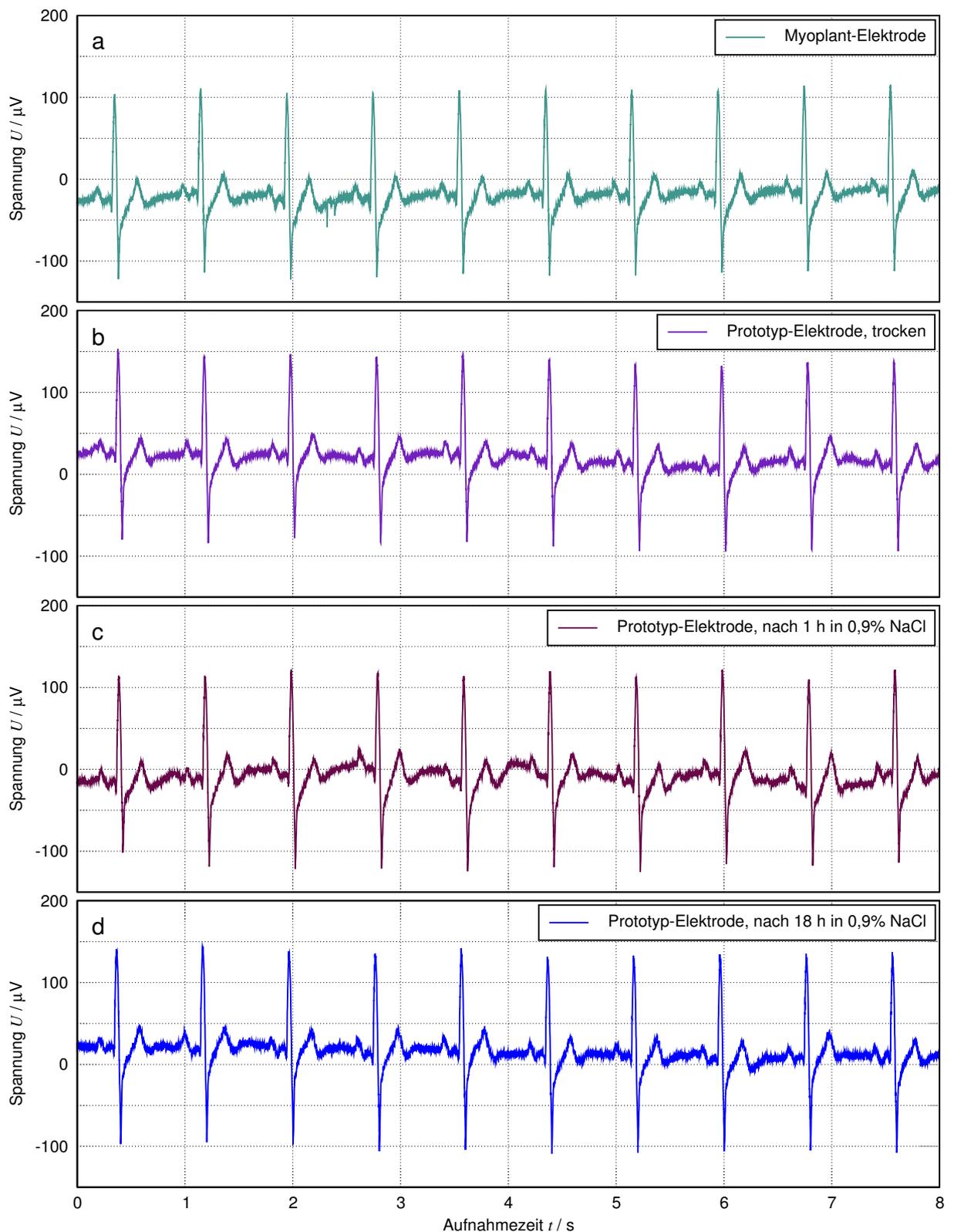


Abbildung 3.40: EKG-Aufzeichnungen von einer originalen Myopiant-Elektrode (a) und von einer Prototyp-Elektrode im getrockneten Zustand kurz nach der Herstellung (b), sowie nach 1 Stunde und nach 18 Stunden Inkubation in 0,9%iger NaCl-Lösung (c und d).

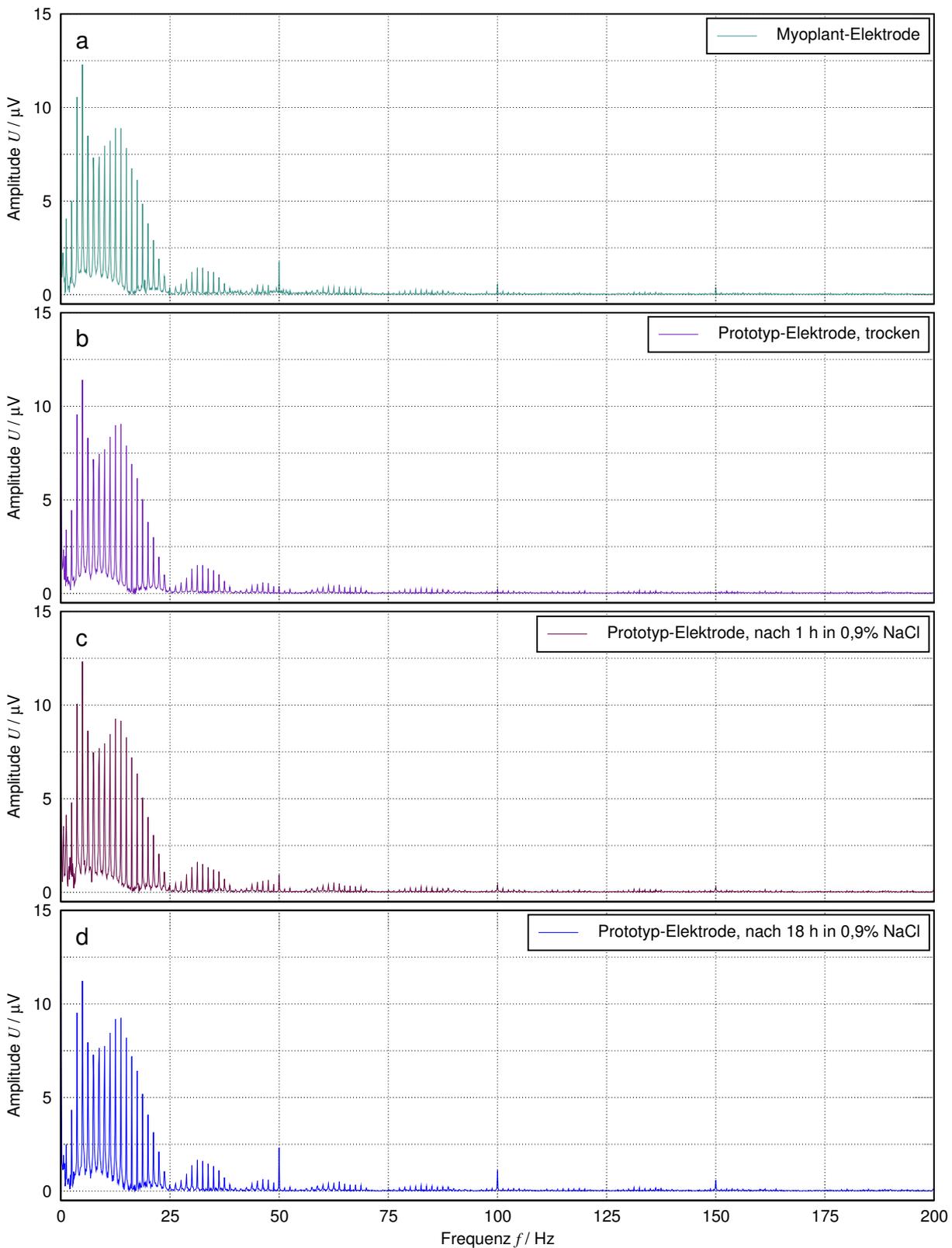


Abbildung 3.41: Spektrum-Analyse der aufgenommenen EKG-Signale der originalen Myopiant-Elektrode (a) und der Prototyp-Elektrode im getrockneten Zustand kurz nach der Herstellung (b), sowie nach 1 Stunde und nach 18 Stunden Inkubation in 0,9%iger NaCl-Lösung (c und d).

Zum Zeitpunkt der ersten Messungen bestand die Prototyp-Elektrode noch aus getrocknetem Komposit. Um die Funktion der Elektrode zu testen, wenn das Alginat des Komposits nicht ausgetrocknet ist, wurde sie in 0,9%iger NaCl-Lösung gelagert. Die physiologische Lösung ahmte die Salzkonzentration realer Körperflüssigkeiten nach. Das Komposit nahm die Flüssigkeit bis zur vollständigen Rehydrierung der Alginatphase auf. Die Prototyp-Elektrode war danach halbtransparent (Abb. 3.39c). Nach 1 h und nach 18 h Inkubation in der Salzlösung wurden die EKG-Messungen wiederholt. Die erfassten Signale waren ebenfalls ähnlich gut wie bei der Myoplant-Elektrode (Abb. 3.40c und d).

In den Frequenzspektren lagen bei allen Messungen die meisten Frequenzanteile im Bereich zwischen 0 und 25 Hz. Über 50 Hz waren die Signale i.A. kleiner als $0,1 \mu\text{V}$. Nur vereinzelt wurden Frequenzausschläge bei 50 Hz und dessen Vielfaches verzeichnet, was trotz Kerbfilter durch störende Anteile der Netzfrequenz verursacht wurde. Insgesamt waren die Frequenzspektren aller Prototyp-Messungen dem Spektrum der Myoplant-Elektrode sehr ähnlich. Sämtliche Amplituden der jeweiligen Frequenzen besaßen annähernd gleiche Werte. Die geringen Abweichungen sind in Abb. 3.42 verdeutlicht. Hierfür wurden zu jeder Frequenz der geringste und höchste Amplitudenwert aus den drei Spektren der Prototyp-Elektrode ermittelt. Als rote Kreise dargestellt geben sie die maximalen Amplituden-Abweichungen der Prototyp-Elektrode zum Spektrum der Myoplant-Elektrode an. Gleichzeitig ist über den geringen Abstand zwischen den vertikal übereinander stehenden roten Kreisen zu erkennen, dass sich die Amplitudenwerte der Prototyp-Elektroden nur sehr wenig voneinander unterscheiden.

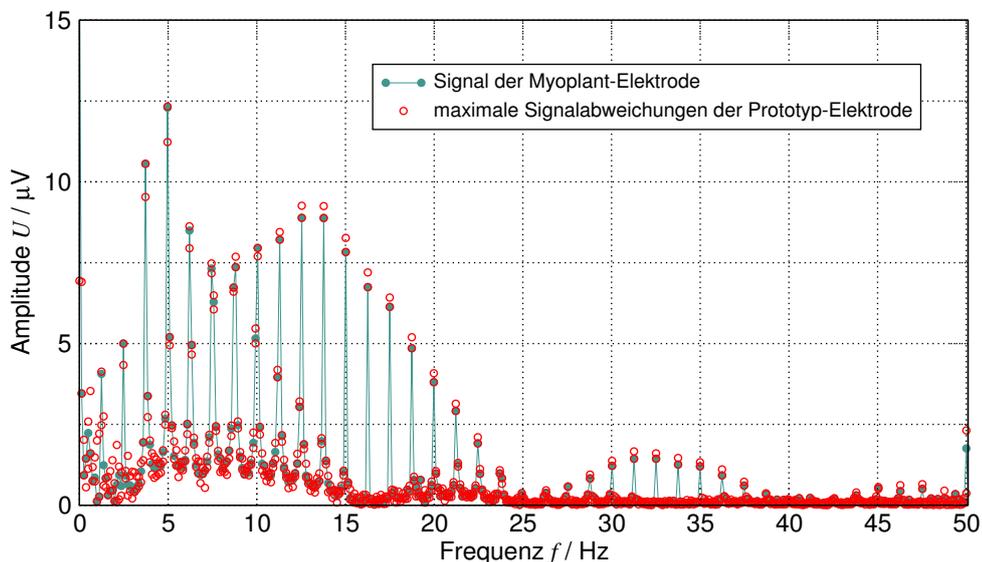


Abbildung 3.42: Signalspektrum der originalen Myoplant-Elektrode mit den maximalen Signalabweichungen der Prototyp-Elektrode.

Die Spektren der Prototyp-Elektrode waren trotz der Unterschiede im Feuchtigkeitsgehalt fast identisch. Die Qualität der mit dieser Elektrode erfassten Signale ist damit gleich gut wie die mit der Myoplant-Elektrode erfassten Signale.

4 Diskussion

Aus dem Silikon PDMS und dem Hydrogel Alginat lässt sich ein elastisches Komposit aus zwei nicht miteinander vernetzten Phasen herstellen. Die innere Struktur des Materials nach Aushärtung des Silikons wird vor allem durch die Konzentration der Alginatlösung, der Molekularität des Alginats und den Mengenanteil an Alginatlösung in der Gesamtmischung beeinflusst. Die Art und Weise, auf welche die Alginatphase im PDMS vorliegt, bestimmt die Eigenschaften des Komposits. Bei geringem Alginatanteil ist die Alginatlösung tröpfchenförmig im vernetzten PDMS eingebettet (Abb. 4.1a). Die Alginatkompartimente berühren einander nicht und die im PDMS eingeschlossene Alginatlösung kann nicht von außen mit Ionen vernetzt werden.

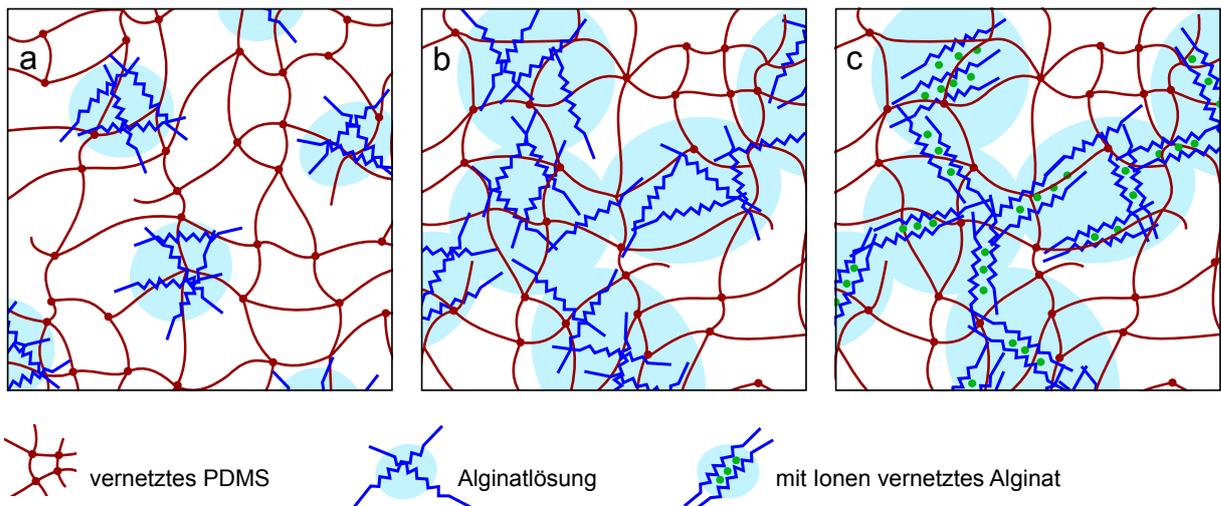


Abbildung 4.1: Schemata der inneren Struktur von PDMS-Alginat-Kompositen: a) Komposite mit geringem Alginatanteil, b) Komposite mit semi-interpenetrierendem Netzwerk aus PDMS und ungelierter Alginatlösung, c) Komposite mit interpenetrierendem Netzwerk aus PDMS und mit Ionen vernetztem Alginat.

In PDMS-Alginat-Kompositen mit hohem Alginatanteil schließen sich die Alginatkompartimente zu einem zusammenhängenden Netzwerk innerhalb des Silikons zusammen. Mit der Vulkanisierung des PDMS entsteht ein semi-IPN, wie es in Abb. 4.1b dargestellt ist. Durch das Netzwerk können über die Alginatphase Ionen in das Komposit gelangen und die Alginatmoleküle innerhalb des Komposits miteinander vernetzen (Abb. 4.1c). Sequenziell entsteht so ein IPN [36, 4].

4.1 Silikon-Alginat-Komposit als Biomaterial

Für die Herstellung der Komposite erwies sich die Verwendung einer 6%igen Lösung aus niedermolekularem Alginat als am geeignetsten. Die erhöhte Viskosität einer solchen Alginatlösung (≈ 27 Pa·s) verbunden mit einem Wasseranteil von 94% führt bei der Vermischung mit den PDMS-Präpolymeren zu einer gleichförmigen Emulsion. Sie ist bis zu einem Alginatanteil von 80% so stabil, dass nach der Aushärtung des PDMS ein elastisches Material mit homogener Phasenverteilung vorliegt. Trotzdem tritt während der Vulkanisierung des PDMS eine leichte Entmischung der Polymerphasen auf. Zeitrafferaufnahmen zeigten, dass es in Abhängigkeit vom Alginatgehalt zu einem Zusammenschluss von den zunächst fein im PDMS verteilten Alginattröpfchen kommt. Diese Phasentrennung erfolgt aufgrund der geringen Löslichkeitsparameter des Silikons⁶ [39]. Aus den kleinen Alginattropfen bilden sich größere Alginatkompartimente, die sich schließlich gegenseitig berühren. Ab einem Alginatanteil von 70% verbinden sich die Alginatkompartimente an ihren Berührungspunkten und formieren sich zu einem zusammenhängenden Netzwerk (siehe Abb. 4.1b). Diese Verschmelzung wurde mit Hilfe der konfokalen Raman-Mikroskopie visualisiert.

Das Alginatnetzwerk besitzt in Abhängigkeit seines Volumenanteils Porengrößen zwischen etwa 175 μm (70% Alginatanteil) und ca. 250 μm (80% Alginatanteil). Dies ist weitgehend unabhängig davon, ob für die Vermischung der PDMS-Präpolymere mit der Alginatlösung ein SpeedMixer bei 3.500 rpm oder ein Turbinenrührer bei 2.000 rpm verwendet wird. Verglichen mit den Netzwerken von anderen Silikon-Hydrogel-IPNs sind Poren des PDMS-Alginat-Komposits deutlich größer. IPNs, die durch Quellung des Silikons in Hydrogelmonomerlösungen hergestellt werden, besitzen meist Poren von 50 nm bis 1 μm Größe [92, 53, 112], in Ausnahmefällen auch bis zu 30 μm [155]. Aus bereits vernetzten Hydrogelen hergestellte Silikon-IPNs mit PAAm, PHEMA und PNIPAAm enthalten Netzwerke mit Porengrößen, die zwischen 1 μm und 20 μm liegen [85, 168, 57].

Die großen Poren des PDMS-Alginat-Komposits erlauben eine schnelle Diffusion wässriger Substanzen durch das Material hindurch. So kann zum einen die Alginatphase durch hinein diffundierende Ionen zügig vernetzt werden, woraufhin aus dem semi-IPN ein IPN entsteht. Zum anderen können in der vernetzten Alginatphase gelöste Moleküle rasch nach außen abgegeben werden. Komposite mit 80% Alginatanteil besitzen aufgrund der um das 1,4-fache größeren Poren einen etwa 5-fach höheren effektiven Diffusionskoeffizienten als 70%ige Komposite. Demgegenüber sind Komposite mit einem Alginatanteil unter 70% (und damit ohne IPN) aufgrund der vollständigen Isolierung der Alginattropfen innerhalb des Silikons für wasserlösliche Moleküle nicht permeabel. Die Diffusionseigenschaften der Komposite mit IPN sind damit allein von den Eigenschaften des Hydrogelnetzwerks abhängig. Der Transport der Moleküle in den Kompositen ähnelt entsprechend dem in reinen Hydrogelen [94, 168]. Ein

⁶Der Hildebrand-Löslichkeitsparameter von Silikon liegt bei 14,9 $\text{MPa}^{0,5}$ [98] und die Hansen-Löslichkeitsparameter betragen $\delta_d=17,0$ $\text{MPa}^{0,5}$, $\delta_p=2,9$ $\text{MPa}^{0,5}$ und $\delta_h=2,6$ $\text{MPa}^{0,5}$ [7]. Im Vergleich dazu hat Wasser einen Hildebrand-Löslichkeitsparameter von 47,9 $\text{MPa}^{0,5}$ [98] und Hansen-Löslichkeitsparameter von $\delta_d=15,5$ $\text{MPa}^{0,5}$, $\delta_p=16,0$ $\text{MPa}^{0,5}$ und $\delta_h=42,3$ $\text{MPa}^{0,5}$ [48].

wichtiger Faktor ist dabei der Vernetzungsgrad des Hydrogels. Mit zunehmender Vernetzungszeit wird Alginat dichter und die Diffusionsgeschwindigkeit nimmt ab [191]. Belegt wurde dies durch Freisetzungsversuche mit in Kompositen eingebrachten Farbstoffen. Proben, deren Hydrogelphase aus niedermolekularem Alginat für 3 h vernetzt wurde, haben nach 90 min etwa 27% mehr Eosin abgegeben als bei einer Vernetzung für 96 h. Bei Kompositen mit hochmolekularem Alginat war die Differenz weniger stark, jedoch gaben auch hier die kürzer vernetzten Proben den Farbstoff schneller ab. Daneben sind die Wechselwirkungen der Moleküle mit dem Hydrogel zu beachten. Positiv geladene Substanzen können ionische Bindungen mit dem Alginat eingehen und so die Abgabemenge reduzieren, wie mit dem Farbstoff Methylenblau gezeigt werden konnte.

Für die Biokompatibilität von Implantatmaterialien ist eine gute Benetzbarkeit ihrer Oberfläche von großer Bedeutung. Durch eine hydrophile Oberfläche können unspezifische Adsorptionen und irreversible Absorptionen von hydrophoben Molekülen vermindert werden [52, 1]. Im Querschnitt weisen die PDMS-Alginat-Komposite ab 70% Alginatanteil eine hydrophile Oberfläche auf. Die Benetzbarkeit steigt dabei mit zunehmendem Alginatanteil, so dass der Wasserkontaktwinkel von ca. 75° (70% Alginatanteil) auf etwa 45° (80% Alginatanteil) gesenkt werden kann. Während der Vulkanisierung der Silikonphase kommt es jedoch an den Kontaktflächen mit der Umgebung zur Ausbildung von Grenzschichten. Diese Grenzschichten bestimmen entscheidend die Wasserdurchlässigkeit und Benetzbarkeit der Materialoberfläche. Ihre Entstehung hängt von der Hydrophobizität des angrenzenden Mediums ab. Bei polarer Umgebung, wie es z.B. bei Behältern aus Polypropylen oder an der Luft der Fall ist, bildet sich eine Grenzschicht aus Silikon auf den Kompositen. Diese trennt das Materialinnere, welches ansonsten die Eigenschaften des IPNs trägt, von der Umgebung ab. Sie wird nur an wenigen Stellen von der Alginatphase durchbrochen und weist mit Wasserkontaktwinkeln $>90^\circ$ eine geringe Benetzbarkeit auf. Durch die Abschirmung des Materialinneren ist das Komposit trotz des Vorhandenseins des Alginatnetzwerks kaum für wässrige Moleküle permeabel. Bei hydrophiler Umgebung dagegen, beispielsweise an plasmabehandelten Flächen, wird eine glatte Alginatgrenzschicht erzeugt. Diese führt zu einer hohen Benetzbarkeit mit Wasserkontaktwinkeln unter 30° . Ist das angrenzende Medium von moderater Hydrophilizität, wie z.B. beim Kunststoff ABS, lässt sich der Wasserkontaktwinkel durch die Erhöhung des Alginatanteils im Komposit senken. Die Alginatgrenzschicht an der Kompositoberfläche ist über Poren mit dem Alginatnetzwerk im Materialinneren verbunden. Die Oberfläche ist jedoch nicht so offenporig wie die Fläche am Querschnitt des Komposits und damit weniger permeabel für wässrige Moleküle.

Eine Erhöhung des Hydrogelanteils führte auch bei Silikon-PMPC-Kompositen von Shimizu et al. zu einer verbesserten Benetzbarkeit [136]. Mittels mikroskopischer Infrarot-Spektroskopie konnten sie eine Anreicherung der Hydrogeleinheiten an der Oberfläche des IPN-Materials nachweisen. Eine ähnliche Abhängigkeit der Oberfläche von umgebenden Medien wie beim PDMS-Alginat-Komposit wurde für IPN-Komposite aus Silikon und PMAA beobachtet. Turner und Cheng stellten fest, dass es während

der Synthese bei Kontakt mit Glas oder Luft oberflächennah zu einer Auflösung des PMAA-Netzwerks in einzelne Einheiten kommt [155]. Diese sind vom PDMS umgeben und schirmen das darunterliegende IPN ab, so dass das Material nicht mehr für wasserlösliche Substanzen durchlässig ist. Die Autoren führten dies zum einen auf einen Monomer-Konzentrationsgradienten zurück, der sich während der Synthese durch Ausdampfen der Monomere bildet. Zum anderen sahen sie Substrat-abhängige, thermodynamische Oberflächeneffekte dafür verantwortlich. Hillerström und Kronberg haben beobachtet, dass die Benetzbarkeit von PDMS-PVP-Kompositen vom Löslichkeitsparameter des Lösungsmittels abhängt, mit welchem das PDMS während der IPN-Synthese aufgequollen wird [53]. Durch den Einsatz von Lösungsmitteln, die einen ähnlichen Löslichkeitsparameter wie das PVP aufweisen, wird die Benetzbarkeit der Komposite erhöht. Nur mit ausreichend polaren Lösungsmitteln konnten hydrophile IPNs gebildet werden [53].

Trotz der laut Literatur unterschiedlichen Polymere und Verfahren, die für die Herstellung der Silikon-IPNs verwendet wurden, scheinen ähnliche Effekte an den entsprechenden Kompositoberflächen aufzutreten. Die Polarität von Lösungsmitteln spielt dabei ebenso eine Rolle wie die Polarität und damit meist auch Hydrophobizität⁷ angrenzender Stoffe. Die genauen Ursachen sind jedoch noch nicht geklärt und bedürfen weitergehender Untersuchungen. Um die Theorie von Hillerström und Kronberg zu überprüfen, könnte man die PDMS-Alginat-Komposite beispielsweise während ihrer Herstellung mit Lösungen verschiedener Löslichkeitsparameter in Kontakt treten lassen. Das anwendungsorientierte Ziel wäre hierbei das Auffinden von Parametern, mit denen die Oberfläche von Silikon-IPNs je nach Fragestellung offenporig, hydrophil und frei der Diffusion zugänglich oder glatt, hydrophil/ hydrophob und weniger diffusibel gestaltet werden können. Durch den Einsatz von Gussformen aus entsprechenden Materialien könnten PDMS-Alginat-Komposite mit lokal wechselnden Oberflächeneigenschaften hergestellt werden. Die Geometrie der Gussformen kann dabei sehr variabel sein, da sich die Komposite in nahezu beliebige Gestalt gießen lassen.

4.2 Biofunktionalisierung und Wirkstoffabgabe

Durch das Alginatnetzwerk können wässrige Moleküle durch das Komposit hindurch wandern. Werden in die Hydrogelphase wasserlösliche Substanzen integriert, können diese nach außen abgegeben werden und das Umfeld lokal beeinflussen. Der Nachweis darüber gelang in einem *in-vitro*-Test durch die Einbindung und Freisetzung des biologisch aktiven Moleküls NGF. Dieser Nervenwachstumsfaktor wurde in die Alginatphase des Komposits aufgenommen. Seine Diffusion in das umgebende Zellmedium bewirkte die neuronale Differenzierung von PC12-Zellen. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Komposite und die Dauer der Alginatvernetzung einen großen Einfluss auf die Abgabegeschwindigkeit ausüben. Die meisten

⁷Die Hydrophobizität ist neben dem polaren Charakter eines Stoffes auch von der Länge des Dipols abhängig. Sehr kleine Dipollängen können zu sterischen Hinderungen mit den Wassermolekülen führen, so dass sich auch polare Substanzen hydrophob verhalten können [169].

differenzierten Zellen waren bei hohem Alginatanteil und kürzerer Vernetzungsdauer der Alginatphase zu finden. Über die Zusammensetzung des Komposits und den Vernetzungsgrad des Alginats kann demnach die Freisetzung von Wirkstoffen kontrolliert werden.

Grundsätzlich wirkt die Bildung einer Silikongrenzschicht während der Herstellung der Komposite den Vorteilen des Materials als Wirkstoffabgabesystem und Biomaterial entgegen, da sie die Diffusibilität behindert und Hydrophobizität verstärkt. Sie könnte jedoch genutzt werden, um gerade diese Eigenschaften nur an bestimmten Stellen des Materials zu gewährleisten. Hierfür ist eine hydrophil/hydrophob strukturierte Umgebung, in welcher das Komposit vernetzt, notwendig. Denkbar sind Gussformen, deren Oberfläche entsprechend modifiziert sind. So könnten Komposite hergestellt werden, die z.B. auf ihrer Oberfläche nur an bestimmten Stellen und in verschiedenen Größen Zugänge zum interpenetrierenden Alginatnetzwerk erlauben. Auf diese Weise könnten beispielsweise Diffusionsgradienten aufgebaut oder die Abgabe von Wirkstoffen lokal beschränkt werden, während das Kompositinnere als Wirkstoffspeicher dienen würde. Mit einer derartigen Strukturierung der Kompositoberfläche ließe sich das Spektrum der diffusionskontrollierten Wirkstoffabgabe aus dem Komposit heraus erweitern.

Solange das Alginat im Komposit unvernetzt ist, kann es durch Spülen mit Wasser aus dem Komposit ausgewaschen werden. Ist das Alginat bereits vernetzt, lässt es sich durch Komplexbildner, wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), wieder verflüssigen und aus dem Komposit herauslösen⁸. Das PDMS verbleibt danach als schwammartige elastische Matrix. Auf diese Weise lässt sich verhältnismäßig einfach poröses Silikon anfertigen. Andere Herstellungsverfahren für poröse Silikone nutzen die Softlithographie oder gepulsten Laser. Mit diesen Techniken lassen sich hauptsächlich poröse PDMS-Membranen und strukturierte Oberflächen gestalten, die häufig für mikrofluidische Systeme eingesetzt werden [172, 70]. Wieder andere Verfahren verwenden eine zweite flüssige Phase (Wasser [64], Paraffin [186]) oder feste Porenbildner (Salzkristalle [184, 187], Zucker [183], Polystyrol [110]), die – ähnlich wie beim PDMS-Alginat-Komposit – zunächst mit den PDMS-Präpolymeren vermischt und nach der Vulkanisierung des Silikons evaporiert oder ausgespült werden. Die Hauptanwendungen liegen ebenfalls in mikrofluidischen Systemen, aber auch der Einsatz als Gassensor und Absorber von Öl-Leckagen wird diskutiert.

Die Porengrößen der PDMS-Alginat-Komposite lassen sich über den Mengenanteil an Alginat variieren: Je höher der Alginatanteil, desto größer die Poren. Wird das Alginat aus den Poren ausgespült, verhält sich die verbliebene PDMS-Matrix ähnlich wie ein Schwamm, so dass flüssige bis zähflüssige Substanzen in sie aufgesogen werden können. Die ursprüngliche 6%ige Alginatphase ist damit gegen einen anderen Stoff austauschbar, der – sofern er vernetzungsfähig ist – das IPN des Komposits vervollständigen kann. Beispielsweise wäre es möglich, ein weiteres Material, das Wirkstoffe enthält, in das Alginat zu integrieren und anschließend in das Komposit aufzunehmen. Ein solches Material könnte z.B. in Form von Mikropartikeln oder als zusätzli-

⁸EDTA entzieht dem Alginat die in ihm gebundenen Ionen, wie z.B. Ca^{2+} - oder Ba^{2+} -Ionen, und bildet mit ihnen stabile Chelatkomplexe. Das Auslösen der Ionen führt zur Verflüssigung des Alginatgels.

ches Polymernetzwerk in das Alginat eingebracht werden. Das Alginat würde als biokompatible Matrix dienen, während das eingebrachte Material andere Mechanismen der Wirkstofffreisetzung (Degradation, Reiz-aktivierte Abgabe) beisteuern könnte. Die nachträgliche Aufnahme der Substanzen in die Alginatphase des PDMS-Schwamm würde die Einbettung auch sensibler Wirkstoffe erlauben, die z.B. die hohen Temperaturen von 80 °C während der Vulkanisierung des PDMS nicht tolerieren würden.

Eine Medikamentenabgabe über Degradation ist z.B. durch die Integration von abbaubaren Nano- oder Mikropartikeln denkbar, die einen Wirkstoff enthalten. Ausgangspunkt für die Herstellung solcher biodegradierbarer Partikeln ist häufig PLGA. Dieses Material wurde bereits vielfach als partikulärer Wirkstofftransporter eingesetzt [13]. Auch Partikeln aus PAAc könnten in die Alginatphase aufgenommen werden. Sawahata et al. konnten zeigen, dass beladene PAAc-Mikropartikeln ihre Substanzen bei Anlegen eines elektrischen Feldes abgeben [131]. Durch die Einbindung von Stimulusresponsiven Stoffen in das Alginat könnte die Abgabe von Wirkstoffen daher in definierten Situationen bzw. zu selbstbestimmten Zeitpunkten erfolgen. Ein anderes, sehr häufig untersuchtes responsives Polymer ist PNIPAAm, das in Abhängigkeit von der Temperatur eine starke Änderung seines Quellgrades erfährt [132]. Wird Alginatlösung mit wässriger PNIPAAm-Lösung gemischt, können durch anschließendes Eintropfen in eine ionische Vernetztlösung Alginat-PNIPAAm-Kügelchen hergestellt werden, die eine Kontrolle der Wirkstoffabgabe sowohl über den pH-Wert als auch über die Temperatur erlauben [135]. Denkbar ist demnach auch die Herstellung von Reiz-aktivierbaren PDMS-Alginat-PNIPAAm-Kompositen, die aus der Mischung der noch unvernetzten Polymerlösungen hervorgehen und nach ihrer Vernetzung drei IPNs enthalten.

4.3 Zellbesiedelung

Das Komposit erlaubt die Möglichkeit sowohl einer adhärennten Besiedelung des PDMS-Schwamms als auch einer Einbettung von Zellen in die Alginatphase des Komposits.

Für die Adhäsion von Zellen ist das Ausspülen der Alginatphase notwendig. Der verbleibende PDMS-Schwamm besitzt ein Porensystem, dessen Oberflächen hydrophob sind. Da Zellen im Allgemeinen eher an hydrophile und geladene Oberflächen adhären [176], wurde die PDMS-Oberfläche vor der Zellbesiedelung bioaktiviert. Hierbei fand über verschiedene Verfahren eine Anbindung der Moleküle APTES und Vitronectin statt. Das Wachstum von MSC-Zellen auf den modifizierten Materialien wurde zunächst auf planaren PDMS-Proben evaluiert und anschließend mit den Zellen in den PDMS-Schwämmen verglichen. Wasserkontaktwinkelmessungen an den planaren Proben belegten, dass die Silikonoberfläche durch die verschiedenen Behandlungsverfahren hydrophilisiert werden konnte. Beim *in-vitro*-Test zeigte sich, dass bei gleicher Ausgangszellzahl nach 5 Tagen Inkubation in den Schwämmen meist etwa doppelt so viele Zellen vorhanden waren wie auf den planaren Proben. Es stellte sich zudem heraus, dass sich in den Schwämmen vor allem das Vorhandensein des Vitronectins positiv auf die Zelladhäsion auswirkte, wohingegen auf den planaren Proben die meis-

ten Zellen auf der APTES-Beschichtung wuchsen. Die Art der Vitronectin-Anbindung, also ob es kovalent gebunden oder physikalisch adsorbiert war, schien in den Schwämmen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Interessant ist auch, dass in den unbehandelten, nativen PDMS-Schwämmen nahezu gleich viele Zellen wuchsen wie in den APTES-modifizierten Schwämmen. Diese Ergebnisse lassen erkennen, dass neben der Aktivierung der PDMS-Oberfläche mit Molekülen noch weitere Faktoren die Zelladhäsion beeinflussten.

Seit längerem ist bereits bekannt, dass die Oberflächenstruktur von Silikonmaterialien die Anheftung, Proliferation und Morphologie von Zellen entscheidend beeinflussen kann. Die Fähigkeit der Zellen, zu adhären, hängt jedoch stark vom Phänotyp der Zellen ab. Zudem spielen auch die Art der porösen Struktur und ihr Größenverhältnis zu den Zellen eine große Rolle [10]. So weisen beispielsweise Fibroblasten bei einer PDMS-Rauheit um 100 nm eine bevorzugte Adhäsion auf [117]. Hingegen bevorzugten Osteoblasten gröbere Oberflächen [80], deren Vertiefungen bis zu ihrer eigenen Zellgröße (ca. 30 μm) reichen können [193]. Bei MSCs wurde festgestellt, dass sich zusätzlich zu ihrer Adhäsion auch ihre Differenzierung über die Mikrostrukturierung von Oberflächen steuern lässt. Die Aktivität der Zellen war bei Vertiefungen mit einer Breite von 180 μm signifikant höher als bei weniger breiten Vertiefungen [71].

Neben der Topographie spielen die mechanischen Eigenschaften des Substrates eine wichtige Rolle. Schon seit einigen Jahren ist bekannt, dass verschiedene Zelltypen spezifisch auf die physikalische Beschaffenheit ihrer Untergründe, auf denen sie kultiviert werden, reagieren. Insbesondere der Elastizitätsmodul kann die Adhäsion, Ausbreitung, Morphologie und Funktion von Zellen beeinflussen [153]. So konnte für neuronale Stammzellen und MSCs nachgewiesen werden, dass sie in Abhängigkeit von der Steifheit des Substrates zu verschiedenen Zelllinien differenzieren [130, 37, 153]. Auch endotheliale, hepatozytische und fibroblastische Zellen besitzen die Fähigkeit, die mechanischen Eigenschaften von Substraten über spezifische Rezeptoren zu erkennen [181, 173, 115]. Bei primären humanen Hautfibroblastenzellen scheint die Elastizität sogar einen stärkeren Effekt auf die Adhäsion, Morphologie und Zellteilung auszuüben als die Chemie und Hydrophobizität der Materialoberfläche [55].

Die Oberflächenstruktur und die mechanischen Eigenschaften des PDMS-Schwamms werden also dazu beigetragen haben, dass die Zellen in den Schwämmen besser wuchsen als auf planarem PDMS. Im Vergleich zu den Referenzkulturplatten war die Zahl adhärenter Zellen in den Schwämmen jedoch eher gering: Sie enthielten nur etwa $\frac{1}{3}$ so viele Zellen wie die Kontrolle. Für eine effektive Besiedelung sind daher weitere Untersuchungen zur Optimierung der Oberflächenmodifizierung der Schwämme durchzuführen. Neben der in dieser Arbeit durchgeführten Plasmaaktivierung, Silanisierung, kovalenten Proteinanbindung und Physisorption könnten weitere Techniken angewandt werden, um funktionelle Moleküle anzubinden. Grundsätzlich sind jedoch nur Verfahren sinnvoll, die auch im Inneren des PDMS-Schwamms wirken. Zu diesen zählt z.B. die "Layer-by-Layer"-Technik, bei der die Polyelektrolyten nacheinander in den Schwamm aufgesaugt werden könnten. Eine prinzipielle Herausforderung bei der

Behandlung der PDMS-Oberflächen besteht darin, die neu erhaltenen Eigenschaften langzeitstabil aufzubringen und den Effekt des "hydrophobic recovery" zu umgehen. Denn neben der hohen Kettenbeweglichkeit des PDMS selbst bestimmen auch die Art und Morphologie aufgebracht chemischer Strukturen die Langzeitstabilität der Modifizierungen [18].

Eine effektive und dauerhafte Zellbesiedelung von Implantaten mit PDMS-Schwamm-Beschichtung sollte sowohl *in-vitro* induziert als auch *in-vivo* erfolgen können. Sie würde die Integration des Materials in das Gewebe begünstigen und zu einer schnelleren Regeneration führen. Zudem könnten chronische Fremdkörperreaktionen und damit verbundene Fibrosen reduziert werden.

In anderen Anwendungen zellbesiedelter Implantate ist eine Kapselung der eingebrachten Zellen notwendig, um beispielsweise die Migration dieser Zellen in umliegendes Gewebe zu verhindern. Auch für solche Anwendungen ist das PDMS-Alginat-Komposit geeignet: Ein Langzeitversuch zeigte, dass L929-Zellen über 25 Tage lang in Silikon-Kompositen mit hochmolekularem Alginat überleben konnten. Die Poren des Alginatnetzwerks innerhalb der Komposite waren groß genug, um einen guten Nährstoffaustausch zu den Zellen bis zu einer Kompositdicke von 1–2 mm zu gewährleisten. Eine Limitation in dickeren Kompositen erfolgte vor allem durch den höheren Nähr- und Sauerstoffverbrauch der wachsenden Zellsphäroide.

Neben dem Langzeitüberleben von Zellen innerhalb einer Matrix ist auch die Stabilität der Matrix bei mechanischer Belastung wichtig. Eine nur aus Alginat bestehende Matrix, in der Zellen enthalten sind, kann chemisch nicht an eine Materialoberfläche gebunden werden, ohne dabei die Zellen zu schädigen. Durch die fehlende feste Fixierung können sich daher Alginatmatrizen bei Dehn- und Spannungsbeanspruchung von der Implantatoberfläche lösen. Durch das IPN des PDMS-Alginat-Komposits war die Alginatphase mechanisch fest im PDMS verankert, so dass keine Ablösungen des Alginats vom Komposit auftraten. Die Verwendung von PDMS-Alginat-Kompositen bietet daher eine gute Möglichkeit, die Fixierungsprobleme von Zellmatrizen auf eine Implantatoberfläche zu umgehen.

Durch die Immobilisierung wirkstoffsekretierender Zellen in die Kompositbeschichtung eines Implantats könnten diese örtlich über einen Zeitraum von mehreren Tagen bis Wochen biologisch wirksame Substanzen in ihre Umgebung abgeben. Das Langzeitverhalten solcher Zellen könnte *in-vitro* mit in Suspension wachsenden Zelllinien überprüft werden, deren sekretierter Stoff über ELISA oder HPLC nachweisbar ist. Auch die Einbettung metabolisch aktiver Zellen zur Unterstützung von Organen mit Funktionsstörungen oder die Immobilisierung von Stammzellen zur Regeneration von zerstörtem oder kranken Gewebe sind denkbar.

4.4 Körperverträglichkeit

Beim Kontakt von einem Silikonprodukt mit lebenden Zellen und Gewebe muss gewährleistet sein, dass sich das Material nicht schädigend auf das biologische System auswirkt. Besonders im Bereich medizinischer Implantate ist eine Verträglichkeit zwi-

schen dem technischen Werkstoff des Implantats und dem Organismus, in welchen das Implantat eingesetzt wird, unerlässlich. Dabei muss das Implantat in der Lage sein, bei adäquater Wirtsreaktion eine spezifische Funktion auszuüben [175].

Zur Bestimmung der Biokompatibilität eines Implantats werden zunächst *in-vitro*-Tests in Zellkulturen und anschließend *in-vivo*-Tests an Versuchstieren durchgeführt. Sind diese Tests mit Kurzzeit- wie auch Langzeitexposition erfolgreich verlaufen, wird die Verträglichkeit des Implantats mit klinischen Studien am menschlichen Körper überprüft. Die Normen für die Beurteilung der Biokompatibilität von medizinischen Werkstoffen und Produkten sind in ISO 10993 1–20 festgelegt.

Die Verträglichkeit der PDMS-Alginat-Komposite wurde zuerst mit *in-vitro*-Zytotoxizitätstests nach ISO 10993-12 untersucht. Dabei wurde der Einfluss von Kompositen verschiedener Zusammensetzung auf die Vitalität und Proliferation von L929-Zellen beurteilt. Es zeigte sich, dass bei Verwendung von aufgereinigten Alginaten keinerlei schädlicher Einfluss vom Kompositmaterial auf die Zellen ausging.

Als weitergehende Untersuchung zur Körperverträglichkeit der PDMS-Alginat-Komposite wurde ein HET-CAM durchgeführt. Dieser Test nimmt eine Grenzstellung zwischen *in-vitro*- und *in-vivo*-Versuchen ein. Die CAM bildet sich während der Embryonalentwicklung eines Huhns ab dem 4. bis 5. Bebrütungstag durch Verschmelzung der ektodermalen Chorion mit der endodermalen Allantois (Harnsack). Zwischen dem Chorion- und dem Allantoisepithel befindet sich eine mesodermale Schicht, in der sich zahlreiche Blutgefäße entwickeln [16]. Die Membran ist somit stark vaskularisiert und zudem schmerzempfindlich und leicht zugänglich. Darüber hinaus ist es ein Gewebe mit schwacher Immunantwort, weil das Abwehrsystem des Hühnerembryos noch nicht voll entwickelt ist. Die CAM findet daher als Modellsystem in den Forschungsbereichen der Biologie, Onkologie, Pharmazie und Geweberegeneration breite Anwendung [107]. Der klassische HET-CAM, bei dem die zu testenden Stoffe für kurze Zeit auf die CAM aufgetragen werden, wird häufig als Alternative zu Tierversuchen in der Kosmetikindustrie angewandt und dient dort zur Überprüfung der Schleimhautverträglichkeit der Produkte [60]. 1989 setzte Spaniel-Borowsky den HET-CAM erstmals zur Beurteilung von Fremdkörperreaktionen ein [141]. Hierfür verblieben die zu testenden Biomaterialien über mehrere Tage auf der CAM, deren Veränderung anschließend mit klinischen Ergebnissen verglichen wurde. Valdes et al. konnten 2002 zeigen, dass die Reaktion der CAM auf einen Fremdkörper ähnlich der von Säugetiermodellen ist [158]. Eder et al. untersuchten mit Hilfe eines HET-CAMs die Biokompatibilität verschiedener Kollagenmaterialien und erklärten dieses Verfahren als sinnvolle Ersatz- bzw. Ergänzungsmethode zu Tierversuchen [31].

Im HET-CAM der vorliegenden Arbeit verblieben die Materialproben für 7 Tage auf der CAM der Hühnerembryonen. Parallel zum Kompositmaterial wurde der Test mit Proben aus reinem PDMS durchgeführt. Im Laufe des Versuchs zeigten weder das PDMS noch das Komposit einen schädigenden Einfluss auf die Embryonen. Zwar verstarben von ED12 auf ED13 drei Embryonen aus ungeklärter Ursache. Da es sich dabei jedoch um jeweils 1 Ei der verschiedenen Probensorten und die Kontrolle handelte, kann eine Unverträglichkeit der Materialien als Grund ausgeschlossen werden.

Bis zum Ende des Versuchs waren die verbliebenen 21 Embryonen gesund und agil.

Am Rand und unterhalb sowohl der PDMS-Proben wie auch der Kompositproben kam es stellenweise zu milchigen Eintrübungen der CAM. Die ersten opaken Bereiche erschienen etwa 48 h nach Auflegen der Proben. Durch die transparenten PDMS-Proben ließ sich erkennen, dass sich diese Eintrübungen im weiteren Verlauf des Versuchs zu gänzlich undurchsichtigen, aber kleinflächigeren Flecken entwickelten. Die Reaktion des Gewebes auf die Proben schien sich demnach mit der Zeit auf bestimmte Stellen zu verdichten. Die histologischen Auswertungen ergaben eine lokale Korrelation der milchigen Flächen mit Verdickungen des CAM-Gewebes und lassen auf eine leichte Fremdkörperreaktion schließen.

Die CAM unterhalb der Kompositproben war im Durchschnitt etwas dicker als unterhalb der PDMS-Proben. Dies lässt sich u.a. darauf zurückführen, dass das Alginat des Komposits teilweise abgebaut wurde und es stattdessen zu Einwüchsen des Gewebes in die Poren des Materials kam. Resultierend aus dem Gewebewuchs könnte es bei der 2-stündlichen Kippung der Eier während ihrer Inkubation zu verstärkter mechanischer Reizung der CAM gekommen sein. Diese wiederum könnte das Dickenwachstum der CAM begünstigt haben. Die im Vergleich zu den PDMS-Proben dickere CAM resultiert daher nicht zwangsläufig aus einer schlechteren Verträglichkeit. Zudem wurden an den Rändern der Kompositproben makroskopisch gehäuft feine Blutgefäße beobachtet, die auf eine angiogene Wirkung des Materials deuten. An den Kompositproben selbst waren leichte Einblutungen sichtbar. Eine Veränderung der Blutgefäße unterhalb der CAM konnte histologisch jedoch nicht beobachtet werden. Die Einblutungen könnten daher auch durch den bereits erwähnten mechanischen Reiz auf das eingewachsene CAM-Gewebe bedingt sein.

Dass aus dem makroskopischen Bild des HET-CAMs alleine nicht auf die Verträglichkeit bzw. Unverträglichkeit einer Substanz geschlossen werden kann, zeigten bereits Djabari et al. [27]. Auch Eder et al. meinten, dass die visuelle Beobachtung des HET-CAMs mit histologischen Befunden kombiniert werden muss, um die volle Aussagekraft des Tests erhalten zu können [30]. Seit einigen Jahren gibt es daher Anstrengungen, über Biosensoren quantifizierbare Daten bei der Entwicklung von Abwehrreaktionen an der CAM aufzunehmen. Die Messungen umfassen u.a. die Bestimmung des pH-Wertes und der Impedanz des Gewebes [157, 66, 77]. Die erhaltenen Daten sind jedoch teilweise verschieden, da es noch keine für den HET-CAM standardisierten Parameter gibt. So maßen Karp et al. beispielsweise ein Sinken der Impedanz mit der Zeit, wie es auch in klinischen Studien auftritt [66, 88], während Kubon et al. eine Erhöhung der Impedanz mit zunehmender Versuchsdauer beobachteten [77]. Die histologischen Untersuchungen der CAM zusammen mit der makroskopischen Beobachtung liefern daher bisher die verlässlichsten Aussagen über die Biokompatibilität eines Materials.

Überraschend war der schnelle Abbau, den das Alginat im Komposit erfuhr. Die verwendeten Proben enthielten hochmolekulares Alginat, das mit Ba^{2+} -Ionen vernetzt wurde. Solches Alginat weist gewöhnlich eine höhere Stabilität auf als niedermolekulares oder mit anderen Ionen vernetztes Alginat [73, 62]. Es wurde bereits von Schnei-

der et al. erfolgreich über mehrere Monate in die Bauchhöhle von Mäusen transplantiert [133]. Die Vernetzung des Alginats erfolgte dabei – wie auch in dieser Arbeit – für 20 min in 20 mmol BaCl_2 -Lösung bei ähnlicher Konzentration der verwendeten Alginatlösungen. In der Literatur sind kaum Angaben über CAM-Tests von Materialien aus Alginat zu finden. Einzig als Einkapselungsmaterial für Antibiotika und Entzündungshemmer wurde es für bis zu maximal 24 h im HET-CAM getestet [42, 69, 164]. Eine Degradation des Alginats wurde dabei nicht beschrieben. Es bleibt daher in zukünftigen Versuchen zu ergründen, weshalb das Alginat in den Kompositen während des HET-CAMs abgebaut wurde.

4.5 Silikon-Alginat-Komposit als Implantatwerkstoff

Die Biokompatibilität eines Implantatmaterials hängt nicht nur von seinen Oberflächeneigenschaften ab (Oberflächenkompatibilität), sondern wird auch durch dessen Strukturkompatibilität beeinflusst [177]. Diese definiert die Anpassung der Implantatstruktur an das mechanische Verhalten des Wirtsgewebes. Dabei gehören die äußere Form und innere Struktur (z.B. Ausrichtung und Stärke der Materialfasern) des Implantats ebenso zur Strukturverträglichkeit wie Gewicht, Flexibilität und mechanische Interaktionen.

Das Kompositmaterial ist wesentlich elastischer und weicher als reines PDMS. Der Elastizitätsmodul beträgt für 70%ige Komposite mit unvernetzter Alginatphase etwas mehr als $0,2 \text{ N/mm}^2$ und sinkt mit zunehmendem Alginatanteil bis auf ca. $0,1 \text{ N/mm}^2$. Im Vergleich dazu wurde an reinem PDMS ein Elastizitätsmodul von rund $1,6 \text{ N/mm}^2$ ermittelt. Durch Vernetzung des Alginats kann der Elastizitätsmodul der Komposite bis über das Doppelte seines Ausgangswertes gesteigert werden. Gleichzeitig erhöht sich dabei die Zugfestigkeit des Materials leicht, während die maximale Dehnung etwas sinkt. Gegenüber reinem PDMS kann das Kompositmaterial einem eindringendem Gegenstand entsprechend weniger Widerstand entgegenbringen. Im unvernetzten Zustand sind Komposite mit einem Alginatanteil über 70% und etwa 7,5 Shore-A annähernd so weich wie ein Gummibärchen [41]. Ähnlich wie beim Elastizitätsmodul kann durch die Vernetzung des Alginats (in Abhängigkeit von der Vernetzungsdauer) die Härte der Komposite mehr als verdoppelt werden.

Im Vergleich zu anderen Silikon-Hydrogel-IPNs handelt es sich bei den PDMS-Alginat-Kompositen um verhältnismäßig weiche und elastische Materialien. Die mechanischen Eigenschaften der IPNs werden vor allem durch die Wahl des Silikons und Art des zweiten Polymers beeinflusst. Weiterhin spielen der Mengenanteil des Hydrogels im Silikon und sein Wassergehalt eine Rolle. So z.B. sind für Silikon-Komposite, die ein IPN mit PMPC bilden, Elastizitätsmoduln von etwa 40 MPa ($\text{MPa} = \text{N/mm}^2$) angegeben, wobei das verwendete Silikon schon einen Elastizitätsmodul von etwa 57 MPa besitzt [136]. Silikon-IPNs mit PVA weisen dagegen deutlich kleinere Elastizitätsmoduln zwischen 0,7 und 3 MPa auf [112]. An getrockneten Silikon-IPNs mit 30%igem Anteil an PAAm- und PHEMA-basierten Hydrogelen wurden Elastizitätsmoduln von 1–2,9 MPa gemessen [168]. Sind die Hydrogele dieser Komposite mit Wasser

aufgequollen, besitzen sie nur noch einen Wert von 0,5 MPa. Noch kleinere Festigkeitswerte wurden an Silikon-IPNs mit PNIPAAm ermittelt. Die Komposite mit PNIPAAm-Anteilen zwischen 75 und 80% weisen Elastizitätsmoduln von etwa 0,1 MPa auf [57]⁹.

Die mechanischen Eigenschaften der oben genannten Materialien ist auf deren Anwendungsgebiet abgestimmt: Die festeren Komposite sind als Kontaktlinsenmaterial entwickelt worden [136, 112], wohingegen sich die IPNs mit kleineren Elastizitätsmoduln als Wirkstoffabgabesysteme einsetzen ließen [168, 57]. Das PDMS-Alginat-Komposit ist etwas fester als Haut [81] und annähernd so fest wie angespannte Muskulatur [162]. Eine mögliche Anwendung liegt daher in der Herstellung nichtaktiver chirurgischer Implantate (z.B. Weichteilimplantate). Es könnte auch als zusätzliche biofunktionalisierte oder mit Zellen besiedelte Beschichtung auf anderen Silikon-basierten Implantaten angebracht werden (siehe 4.2 und 4.3). Darüber hinaus ist eine Nutzung als Trägermaterial für aktive Implantate denkbar. So ein Implantat könnte beispielsweise eine Elektrode zur elektrischen Stimulation von Zellen oder zur Ableitung myogener oder nervaler Zellsignale sein. Um diese Anwendbarkeit zu demonstrieren, wurde ein Elektrodenprototyp nach dem Vorbild einer Silikonelektrode zur Ableitung myogener Signale aufgebaut. Statt aus reinem Silikon bestand das Trägermaterial aus 70%igem Komposit; ansonsten enthielt die Prototyp-Elektrode die gleichen Bauteile und besaß die gleichen Geometrien. Die Überprüfung ihrer Funktion fand über die Ableitung von EKG-Signalen an einem Muskelphantom statt. Es zeigte sich, dass die Qualität der von der Kompositelektrode erfassten Signale genauso gut war wie die der Silikonelektrode.

Das Trägermaterial von Elektroden zur Stimulation oder Ableitung von myogenen oder nervalen Signalen besteht typischerweise aus Isolatorstoffen wie Polyimid, Silizium oder nichtleitendem Silikon [54, 88]. Dadurch soll gewährleistet sein, dass bei Stimulationselektroden keine Leckströme zwischen den Elektroden auftreten. Zudem soll verhindert werden, dass der eingespeiste Strom teilweise durch das Trägermaterial abfließt, wodurch er am Gewebe weniger fokussiert wäre. Bei Ableitelektroden könnte es zu einer Minderung der Signalqualität kommen, falls vermehrt Signale der mittelbaren Umgebung durch das Trägermaterial von den Elektroden erfasst würden.

Die PDMS-Alginat-Komposite sind mit Entstehung des IPNs keine isolierenden Materialien mehr, sondern besitzen halbleitende Eigenschaften mit Leitfähigkeiten um 0,0016 S/m. Trotzdem war es möglich, die über den Phantommuskel eingespeisten EKG-Signale ebenso gut abzuleiten wie bei einer Elektrode mit isolierendem Silikon als Trägermaterial. Dabei scheint die im Material enthaltene Feuchtigkeit keinen Einfluss auf die Signalaufnahmequalität auszuüben.

Die PDMS-Alginat-Komposite leiten den Strom etwa um das 1.000-fache schlechter als die reinen Alginatlösungen, mit denen sie hergestellt werden ($\approx 1,8$ S/m). Ebenfalls groß ist die Differenz zu den Leitfähigkeiten verschiedener Körperflüssigkeiten wie Blut oder extrazellulärer Flüssigkeit (0,3–2,7 S/m). Implantierte Elektroden können mit verschiedenen dieser Körperflüssigkeiten in Kontakt stehen. Beispielsweise sind auf einem Muskel aufliegende Elektroden immer auch von interstitieller Flüssigkeit umge-

⁹Hu et al. [57] bestimmten nur die Schubmoduln G der Materialien. Zur Umrechnung in die Elastizitätsmoduln E mit $G = E \cdot \frac{1}{2(1+\nu)}$ wurde eine Poissonzahl ν zwischen 0,4–0,5 eingesetzt.

ben, die die Muskelfasern bedeckt. Eventuell reicht der spezifische Widerstand der Komposite aus, um die oben aufgeführten möglichen Nachteile nicht vollständig isolierender Materialien zu vermeiden. Allerdings können nur weiterführende Tests an einem realen Signal zeigen, welchen Einfluss Artefakte, z.B. durch Bewegung, auf die Ableitqualität ausüben. Des Weiteren bliebe für eine Anwendung als implantierbare Elektrode das Bestehen der Biokompatibilität zu untersuchen: Für den Prototyp wurden die isolierten Drähte mit Hilfe von Flussmittel an die Elektrodenkontakte gelötet. Sowohl Lötzinn als auch Flussmittel sollten ausreichend gekapselt sein oder besser noch durch Alternativen, wie biokompatible leitfähige Epoxidharze, ersetzt werden. Zu überdenken ist auch die Einbindung der Drähte selbst, so dass an diesen keine mechanischen Spannungen auftreten, sobald die Elektrode gedehnt wird. Hier könnte der Draht zur Zugentlastung z.B. in mäanderförmigen Windungen integriert werden.

Neben dem Nachweis der Funktion der Prototyp-Elektrode konnte mit ihrer Entwicklung auch gezeigt werden, dass sich das PDMS-Alginat-Komposit variabel in seiner Form bearbeiten lässt. Hier wurden flache, für wässrige Moleküle permeable Schichten bzw. Membranen hergestellt, die in ihrer Dicke gerade einmal 500 μm maßen. Als äußere Beschichtung auf anderen Implantatmaterialien aufgebracht wären sie dünn genug, um z.B. eingebettete wirkstoffsekretierende Zellen (siehe 4.3) ausreichend mit Nährstoffen der Umgebung versorgen zu können.

4.6 Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Ergänzend zu den bereits genannten Anwendungen von Silikon-Alginat-Kompositen werden im Folgenden einige weitere Möglichkeiten, wie das Material genutzt werden kann, aufgezeigt und diskutiert.

4.6.1 Anwendung als Gradientenmaterial

Wie in 3.2.3 demonstriert werden konnte, lässt sich das PDMS-Alginat-Komposit in Abhängigkeit vom Alginatanteil in verschiedenen Härten herstellen. Je mehr Alginat das Komposit enthält, desto weicher ist das Material. So können, ausgehend vom reinen PDMS, Härten zwischen knapp 50 und etwa 3 Shore-A erhalten werden (Tabelle 4.1). Gleichzeitig ergeben sich mit der Änderung des Alginatanteils auch Änderungen in der Elastizität der Komposite. Werden verschiedene, noch unvernetzte Kompositmischungen schichtweise übereinander aufgetragen, können nach der Vernetzung des Silikons Materialien mit Härte- und Elastizitätsgradienten erhalten werden. In Abb. 4.2 sind zwei Beispiele für den Aufbau solcher Gradientenmaterialien zu sehen.

Viele natürliche Materialien besitzen Gradienten in ihrer Zusammensetzung oder in ihrer Struktur. Dadurch sind sie entsprechend ihrer Funktion im biologischen System angepasst. Die gradierte lokale Verteilung ihrer Baueinheiten kann hierarchisch angeordnet oder geometrisch- bzw. größenoptimiert sein, ortsspezifisch abgestufte Funktionalitäten erzeugen oder bündige Übergänge an weich/festen Grenzflächen schaffen [145]. Natürliche Gradienten sind auch zwischen verschiedenen Materialarten zu

Tabelle 4.1: Shore-A-Härte von reinem PDMS und von Kompositen mit unterschiedlichem prozentualen Anteil an Alginat.

	PDMS	20%	40%	60%	70%	80%
Härte / Shore-A	46,8±3,5	24,6±0,9	18,9±0,7	14,0±2,1	7,5±0,4	3,5±1,4

finden, so etwa beim Übergang von hartem calcifizierten Knochen zu weichem Knorpel.

Gradienten können mineralischer oder chemischer Natur sein, oder werden durch verschieden große Poren erzeugt [145]. Mineralische Gradienten finden sich in fast allen Zähnen und Mandibeln verschiedenster Lebewesen, begonnen bei Seeigel und Käferschnecke über Krebse bis hin zum Menschen [171, 17]. Chemische Gradienten einschließlich der Einlagerung von Metallen und abgestuften Hydratisierung von Proteinen sind beispielsweise in den Hauffäden von Muscheln, im Schnabel von Tintenfischen und im Huf von Pferden enthalten [118, 67, 147]. Porositätsgradienten dienen vor allem der Stabilisierung der Form und dem Schutz vor Brüchen bei mechanischer Belastung. Diese Art von Gradienten finden sich sowohl im Tierreich, z.B. im Skelett des Glasschwamms und in Knochen, als auch im Pflanzenreich, wo sie u.a. für die Öffnung von Samenhüllen zuständig sein können [3, 84, 38].

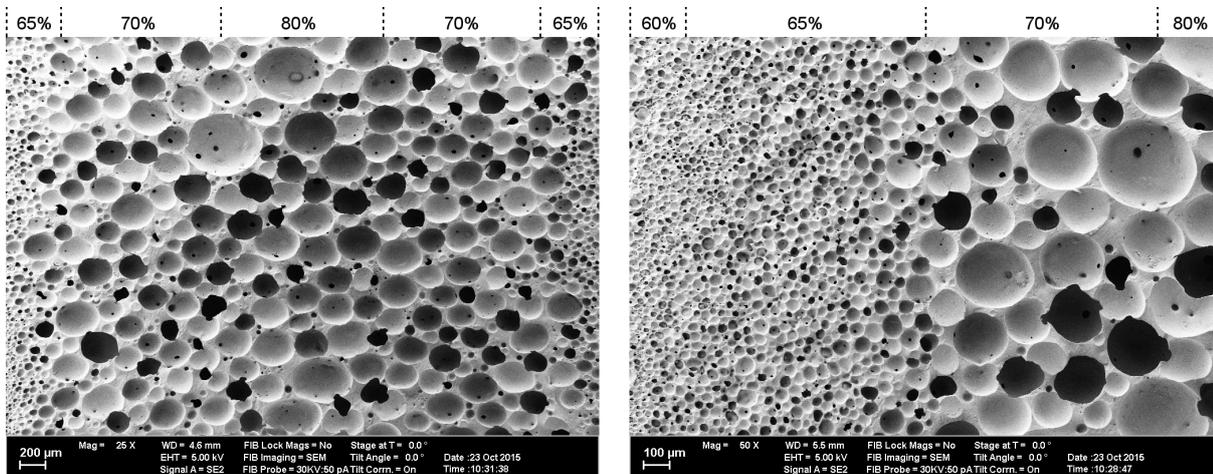


Abbildung 4.2: Lineare Gradienten in monolithisch hergestellten PDMS-Alginat-Kompositen, wobei größere Poren mit geringerer Härte des Materials korrelieren: a) Komposit mit zunehmendem und wieder abnehmendem Alginatanteil, b) Komposit mit zunehmendem Alginatanteil. Herstellung der Gradienten siehe Anhang A.2.

Um den benötigten mechanischen und funktionellen Anforderungen an die Umgebung zu entsprechen sind in vielen natürlichen Materialien mehrere Gradientenarten miteinander kombiniert. Über das Verstehen dieser komplexen biologischen Strukturen können neue, von der Biologie inspirierte synthetische Systeme aufgebaut wer-

den. Zusätzlich lassen sich durch die Nachbildung natürlicher Systeme innovative synthetische Strukturen mit umweltfreundlichen oder biologisch aktiven Materialien entwickeln [38, 145]. Das PDMS-Alginat-Komposit bietet einen Ansatz für die Herstellung relativ weicher Gradientenmaterialien. Durch die mögliche in-situ-Vernetzung von Kompositen verschiedenen Alginatanteils lassen sich monolithisch aufgebaute Strukturen mit Gradienten erzeugen. Größe und Menge der vom Alginat erzeugten Poren im PDMS bestimmen die Härte und Elastizität des Materials. Durch den monolithischen Aufbau lassen sich zusätzliche Arbeitsgänge, die z.B. beim Verkleben verschiedener Schichten anfallen würden, vermeiden.

Neben linearen Gradienten sind auch radiale Gradienten z.B. in zylindrischer Form als Katheter mit einem Tubus aus Silikon und einer graduierten Außenseite aus PDMS-Alginat-Komposit denkbar. Eine weitere Anwendung bieten Weichteilimplantate. Durch intrinsische Härte- und Elastizitätsgradienten ließen sich solche Implantate sehr natürlich den Originalen nachahmen und optimal in das umliegende Gewebe integrieren.

4.6.2 Anwendung als Wundverbandsmaterial

Neben der Anwendung als Implantatmaterial könnte das Silikon-Alginat-Komposit als Verbandsmaterial für chronische Wunden eingesetzt werden.

Chronische, nicht heilende Wunden stellen für viele Betroffene eine Belastung dar. Dauernde Schmerzen schränken ihre Bewegung und ihren Alltag ein und sie müssen ständig zum Arzt, um den Verband wechseln zu lassen. Zudem nässen die Wunden häufig, können optisch belastend aussehen, unangenehm riechen und stellen Nährböden für Keime dar [58]. Von chronischen Wunden betroffen sind etwa 1% der Bevölkerung [156], meist ältere Menschen und Patienten in Krankenhäusern und Pflegeheimen, aber auch Rollstuhlfahrer.

Zusätzlich zur Behandlung eventueller Grunderkrankungen ist die richtige Versorgung der Wunde notwendig. Dabei wird darauf geachtet, dass sich die neu bildenden Zellen stets in einer feuchten und warmen Umgebung befinden, wobei trotzdem überschüssiges Wundsekret (Exsudat) entfernt werden muss. Der Wechsel eines Verbandes sollte für die Patienten so selten und schmerzarm wie möglich sein und keine Verletzungen der neuen Zellschichten, z.B. durch Verkleben des Verbandsmaterials mit der Wunde, hervorrufen. Als Verbände kommen je nach Art der Wunde, ihrer Heilungsphase und der abgehenden Sekretmenge verschiedene Materialien zum Einsatz. Die gebräuchlichsten Verbände sind Hydrokolloide, Hydrogele, Hydropolymere (Polyurethanschäume), Alginate und transparente Folien aus Polyurethan oder Silikon [63, 167].

Die Materialien Alginat und Silikon werden also bereits in der Wundbehandlung eingesetzt, jedoch unabhängig voneinander und in verschiedenen Fragestellungen: Alginatverbände bestehen oft aus einem Vlies mit getrockneten Calcium- und/oder Natriumalginatfasern, -flocken oder -pulvern. Solche Verbände werden für stärker nässende, tiefe und infizierte Wunden eingesetzt. Trocknet die Wunde jedoch aus, kann beim Entfernen des Alginatverbandes das neu gewachsene Granulationsgewebe ein-

reißen und es können sich Nekrosen und Fibrinbeläge bilden [167]. Transparente Folien aus Silikon dienen häufig als äußere Abdeckung eines Wundverbandes und werden bei nicht nässenden und nicht infizierten Wunden eingesetzt. Silikonfolien können zudem bewirken, dass Narbengewebe reduziert wird. Da das Silikon nicht mit der Wunde verklebt, können Verbandswechsel sehr schonend durchgeführt werden [167].

Das Silikon-Alginat-Komposit mit seiner porösen Matrix aus Silikon und den miteinander verbundenen Kammern aus z.B. Calciumalginat verbindet die Eigenschaften beider Materialien miteinander. Überschüssiges Wundsekret kann in großen Mengen von der Alginatphase aufgenommen werden, wobei Zelltrümmer und Infektionskeime fest in des Gel eingebunden werden. Natriumionen, die natürlicherweise im Wundsekret enthalten sind, werden ebenfalls mit aufgesogen und wandeln das Calciumalginat teilweise in lösliches, viskoses Natriumalginat um. Die freiwerdenden Calciumionen besitzen zusätzlich eine blutstillende Wirkung [63]. Die poröse Silikonmatrix würde dafür sorgen, dass die Feuchtigkeit im Wundmilieu gehalten wird (Abb. 4.3). Gleichzeitig kann Wasserdampf abgeführt werden. Ein großer Vorteil wäre zudem, dass das Silikon für ein reizarmes Entfernen des Verbandes ohne Verklebungen sorgen würde. Neu gebildete Zellschichten blieben dadurch auch bei trocknender Wunde intakt.

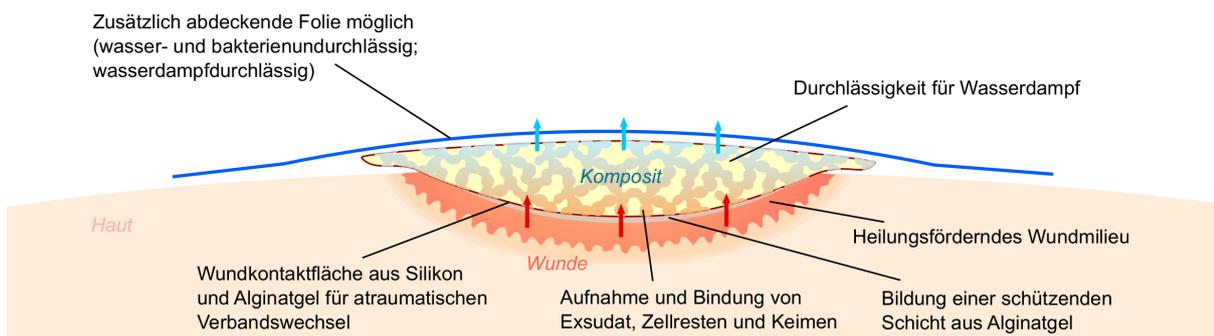


Abbildung 4.3: Schema der möglichen Wirkungsweise eines Wundverbandes aus Silikon-Alginat-Komposit.

Ein wichtiges Kriterium für die Permeabilität von Wundverbänden ist die Wasserdampftransmissionsrate (MVTR). Sie ist ein Maß für die Durchlässigkeit eines Materials für verdunstetes Wasser. Gesunde Haut gibt $240\text{--}1.920\text{ g/m}^2/24\text{ h}$ ab, während der Wasserdampfverlust einer offenen Wunde bei etwa $4.800\text{ g/m}^2/24\text{ h}$ liegt [146]. Eine 2 mm dicke Membran aus einem 75%igen Silikon-Alginat-Komposit konnte bei 40% rel. Luftfeuchtigkeit bis zu $1.627\text{ g Wasserdampf/m}^2/24\text{ h}$ abführen (Tabelle 4.2, Methode siehe Anhang A.3). Das Alginat im Komposit wirkte sich dabei durch seine Hydrophilizität erhöhend auf die Wasserdampfdurchlässigkeit aus: Eine gleich dicke Membran aus porösem PDMS, die durch Ausspülen des Alginats aus 75%igem Komposit hergestellt wurde, wies eine geringere MVTR von $1.528\text{ g/m}^2/24\text{ h}$ auf. Die Wasserdampfdurchlässigkeit des Komposits liegt damit höher als bei sechs von Sussman und Bates-Jensen getesteten kommerziellen Pflastern [146]. Auch gegen-

über drei von vier von Stephen et al. getesteten Hydrokolloid-Verbänden¹⁰ besitzt das Komposit eine höhere MVTR. Dieselbe Arbeitsgruppe ermittelte auch die MVTR von sechs verschiedenen Polyurethanschaum-Verbänden¹¹, wobei drei der Proben eine ähnliche Wasserdampfdurchlässigkeit wie das Silikon-Alginat-Komposit aufwiesen (die Messwerte korrelierten dabei nicht mit der Dicke der Proben) [149]. Hydrokolloid- und Polyurethanschaum-Verbände werden bei nicht infizierten, mäßig exsudierenden Wunden eingesetzt [167].

Tabelle 4.2: Wasserdampftransmissionsraten (MVTR) unterschiedlicher Materialien bei 37°C und angegebener relativer Luftfeuchtigkeit (rF).

Material	rF / %	MVTR / g/m ² /24 h	Lit.
gesunde Haut	n.a.	240–1.920	[146]
offene Wunde	n.a.	ca. 4.800	[146]
Verdunstung von Wasser	40	6.218,76±49,67	
75% Komposit, 2 mm dick	40	1.645,45±35,60	
75% Komposit, 2 mm dick, Alginat ausgespült	40	1.527,58±37,42	
Wundpflaster	≤20	422–839	[146]
Hydrokolloid-Verbände	≤20	230–2.480	[149]
Polyurethanschaum-Verbände	≤20	980–9.270	[149]

Ein weiteres Maß für Wundverbände ist ihr Absorptionsvermögen. Es gibt an, wie viel Flüssigkeit von einem Verband aufgenommen werden kann, wenn er auf eine exsudierende Wunde gelegt wird. Ein 75%iges Komposit mit einer Dicke von 2 mm kann über 24 Stunden 1.257,37±338,63 g Wasser pro m² aufnehmen. Es kann damit etwa 80% der Flüssigkeit absorbieren, die ein kommerzieller Alginatverband fähig ist, aufzunehmen (≈1.510 g/m²/24 h) [149]. Die Konzentration der Alginatausgangslösung dieses kommerziellen Alginatverbandes war zwar nicht angegeben, kann jedoch generell bei Alginatverbänden bis zu 6% betragen [14], wie es auch beim untersuchten Komposit der Fall war.

Beim Vergleich der Daten ist zu beachten, dass die von den Arbeitsgruppen um Sussman und Thomas ermittelten Werte bei einer rel. Luftfeuchtigkeit von ≤20% erfolgten und dadurch höher sind, als sie bei 40% rel. Luftfeuchtigkeit wären [101]. Jedoch kann angenommen werden, dass sich das Silikon-Alginat-Komposit für mäßig exsudierende Wunden eignen würde.

Eine zusätzliche Eigenschaft der Silikon-Alginat-Komposite ist, dass sie individuell auf die Form der Wunde zugeschnitten werden können, wie das Demonstrationsbei-

¹⁰Verbände aus Hydrokolloiden bestehen aus Gelatine, Pektin oder Zellulosederivaten und sind mit einer semipermeablen Folie abgedeckt. Das Wundsekret quillt die Hydrokolloide auf, die daraufhin als Gel die Wunde feucht halten [167].

¹¹Polyurethanschäume können mehr Sekret aufnehmen (Mechanismus: Kapillarkraft) als Hydrokolloide, bilden dabei jedoch kein Gel [167].

spiel in Abb. 4.4 zeigt: Mit einer handelsüblichen Hautschere ließ sich aus einer 4 mm dicken Auflage aus 75%igem Komposit ein Stück in Form der Wundkontur leicht ausschneiden. Solch eingepasste Wundauflagen wären geeignet, sich unter Druckverbände anbringen zu lassen.

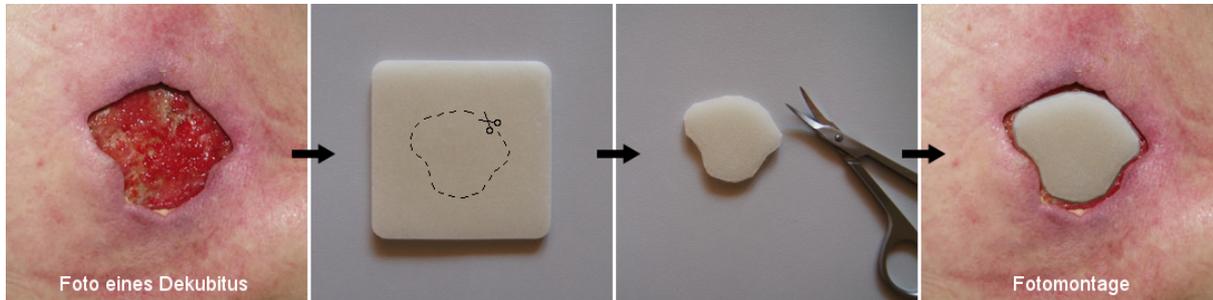


Abbildung 4.4: Beispiel für den passgenauen Zuschnitt eines Silikon-Alginat-Komposits auf die Form einer Dekubitus-Wunde (Herstellung siehe Anhang A.4; Foto des Dekubitus aus [167]).

Dünne Auflagen aus Komposit sind weich und sehr flexibel (Abb. 4.5a). Sie könnten daher als Tamponade oder Kompressen für tiefe Wunden mit Taschenbildung eingesetzt werden. Für weniger tiefe Wunden könnte das Komposit auch in Pflasterform eingesetzt werden. Zur Demonstration wurde hierfür ein Komposit als Pflasterkissen, welches mit einer haftenden transparenten Folie bedeckt war, hergestellt (Abb. 4.5b).



Abbildung 4.5: Anwendungsbeispiele des Silikon-Alginat-Komposits: a) als Tamponade und b) als Pflasterverband mit abdeckender Folie (Herstellung siehe Anhang A.4).

Forschung wird hinsichtlich der Funktionalität von Wundverbänden betrieben. Verbandswechsel bedeuten häufig Unannehmlichkeiten für den Patienten, da diese u.U. schmerzhaft sein können und mit häufigen Besuchen beim Arzt verbunden sind. Wundruhe ist nötig, damit der Heilungsprozess so ungestört wie möglich ablaufen kann. Um Verbandswechsel zu vermeiden, gibt es Untersuchungen zu selbstauflösenden, wirkstoffabgebenden Verbänden aus z.B. Polylactid-Co-Glycolid [93, 140]. Weiterhin könnten Verbandswechsel reduziert bzw. vermieden werden, wenn über Farbindikatoren von außen sichtbar der Verlauf und aktuelle Stand der Wundheilung erfassbar wäre [103]. Erste Ansätze liegen in der Entwicklung von Cellulose-Pflastern, die Änderungen des pH-Wertes einer Wunde und damit mögliche Infektionen anzeigen [152].

Das Silikon-Alginat-Komposit bietet als Verband sowohl die Möglichkeiten einer Medikamentenintegration als auch einer Indikatorintegration. Für eine Medikation könnten dabei lipophile Wirkstoffe (wie z.B. steroidale Entzündungshemmer) über die Silikonmatrix abgegeben werden, während wasserlösliche Wirksubstanzen (z.B. angiogene Wachstumsfaktoren) in der Alginatphase enthalten sein könnten. Das Anbinden von Farbindikatoren an das Alginat zur Überwachung des pH-Wertes wäre ebenfalls denkbar. Silikon dagegen ist für wässrige Substanzen und Ionen nicht permeabel, jedoch für Gase. In einer Wunde werden im Verlauf ihrer Heilung verschiedene Mengen an Gasen produziert: Der Sauerstoff-Partialdruck ist zu Beginn des Heilungsprozesses sehr niedrig und erhöht sich mit fortschreitender Heilung. Gleichzeitig erhöht sich der Kohlenstoffdioxid-Partialdruck während der pH-Wert sinkt [58]. Bei Infektionen durch Bakterien (Biofilme) können erhöhte CO₂-Werte gemessen werden [76]. Interessant ist daher die Überlegung, Indikatoren für Gasabsonderungen in das Silikon einzubringen. Solche Systeme basieren auf der homogenen Verteilung von spezifischen Indikatoren innerhalb des Silikons. Wenn Gase durch das Silikon wandern, führen sie zu einer (De-)Protonierung der Indikatorstoffe, die daraufhin ihre Farbe umschlagen. Sauerstoff lässt sich beispielsweise über in Silikon eingebundene metall-organische Verbindungen auf Ruthenium- oder Cobalt-Basis sensitiv optochemisch detektieren [72]. Eine Erkennung von CO₂ im Silikon wäre über an Aminocellulose gebundene Hydroxypyren-Trisulfonsäure möglich [178]. Untersuchungen zur Wundheilung haben gezeigt, dass sich Zugaben geringer Mengen von partikelgebundenem Stickstoffmonoxid und Kohlenstoffmonoxid positiv auf den Heilungsprozess auswirken können, da sie die Zellproliferation und Angiogenese fördern [91, 2]. Die Permeabilität des Silikons für Gase im Zusammenspiel mit solch Wirkstoff-ausgasenden Partikeln und entsprechenden Indikatoren ließe sich auch dahingehend nutzen, dass der Verband anzeigt, wann die Wirkstoffe vollständig an die Wunde abgegeben wurden. Inwieweit ein solch funktionalisierter Verband wirtschaftlich wäre, bleibt zu überprüfen.

4.6.3 Anwendung als Mikroträger für Zellen in Bioreaktoren

Die äußere Gestalt des Kompositmaterials kann je nach Verwendungszweck sehr variabel sein. Es lässt sich in verschiedenste Formen gießen und kann auch nach seiner Vernetzung mit Skalpell oder Schere zugeschnitten werden. Komposite, die als kleine Kugeln hergestellt werden, bieten eine weitere Anwendungsmöglichkeit. Ausgespült könnten sie als makroporöse Mikroträger, sogenannte "microcarrier" [161], für Zellen in Bioreaktoren eingesetzt werden.

Mikroträger besitzen je nach Einsatzgebiet verschiedene Größen. In Suspensionsreaktoren werden sie mit einem Durchmesser von typischerweise 150–500 µm verwendet. In Fließbett- und Festbettreaktoren sind die Mikroträger meist 0,6–1 mm bzw. 3–5 mm groß [33]. Als Mikroträgermaterial werden bisher u.a. Dextran, Kollagen, Zellulose, Polymere wie Polystyrol und Polyacrylamid, Glas oder Keramik eingesetzt. Ungeladene Oberflächen müssen dabei meist mit Proteinen beschichtet werden, um die Adhäsion der Zellen zu ermöglichen. Des Weiteren kommen in Abhängigkeit von der

Anwendung makroporöse Mikroträger und Träger ohne Poren zum Einsatz. Die Porosität makroporöser Mikroträger ist als das prozentuale Verhältnis vom Volumen der Poren zum Gesamtvolumen des Trägers definiert und liegt normalerweise zwischen 60 und 99%. Dabei besitzen die Poren Größen zwischen 30 und 400 μm [95]. Silikonbasierte, porenlose Mikroträger, die mit APTES modifiziert wurden, sind bereits erfolgreich für die Kultur von Babyhamster-Nierenzellen entwickelt worden [26]. Jedoch gibt es bisher noch keine Veröffentlichungen zu makroporösen Mikroträgern aus Silikon. Diese könnten sich v.a. für eine kontinuierliche Langzeit-Kultur in Rührreaktoren, sowie Fließ- und Festbettreaktoren eignen (Abb. 4.6).

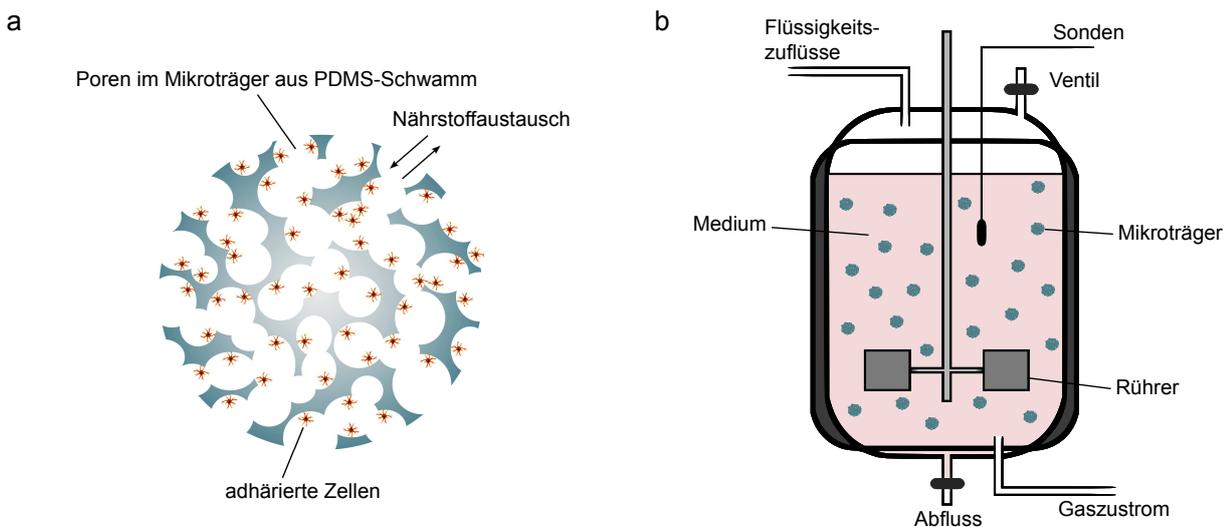


Abbildung 4.6: Schema der Besiedelung eines PDMS-Schwamm-Mikroträgers mit Zellen (a) und dessen möglicher Einsatz in einem Bioreaktor (b).

In Vorversuchen war es möglich, Kompositkugeln mit Durchmessern von 1 bis 2 mm und einer Porosität von 75% herzustellen, deren Alginatephase ausgespült werden konnte. Durch Ausspülen der Alginatephase wurden PDMS-Schwammkugeln erhalten (Abb. 4.7), die als poröse Mikroträger genutzt werden könnten. An und in diese Träger könnten sowohl adhären wie auch nicht adhären Zellen immobilisiert werden. Durch die Porosität würden die Zellen in einem 3-dimensionalen Gefüge mit gewebeähnlichem Mikromilieu wachsen, was die Zellpopulation stabilisiert [33]. Zudem könnten Adhäsion, Wachstum und Metabolismus einiger Zelltypen durch die Elastizität des PDMS-Schwamms gefördert werden, wie bereits in 4.3 diskutiert wurde. Gleichzeitig bietet der Träger in seinem Inneren – wie alle makroporösen Mikroträger – den Zellen Schutz vor Scherbelastungen im Reaktor [95].

Gegenüber Trägern aus z.B. Keramiken haben die PDMS-Schwämme den Vorteil, dass sie transparent sind. Somit wäre eine optische Bestimmung der Zellzahl und Untersuchung der Zelladhäsion beispielsweise über Lebend/Tot-Färbungen möglich. Durch die Elastizität des PDMS lässt sich das Material zudem gut ausspülen. Nach einem Reinigungsprozess wären die autoklavierbaren Mikroträger aus PDMS-Schwamm daher theoretisch wiederverwendbar. Da die Dichte und Sinkgeschwindigkeit der Trä-

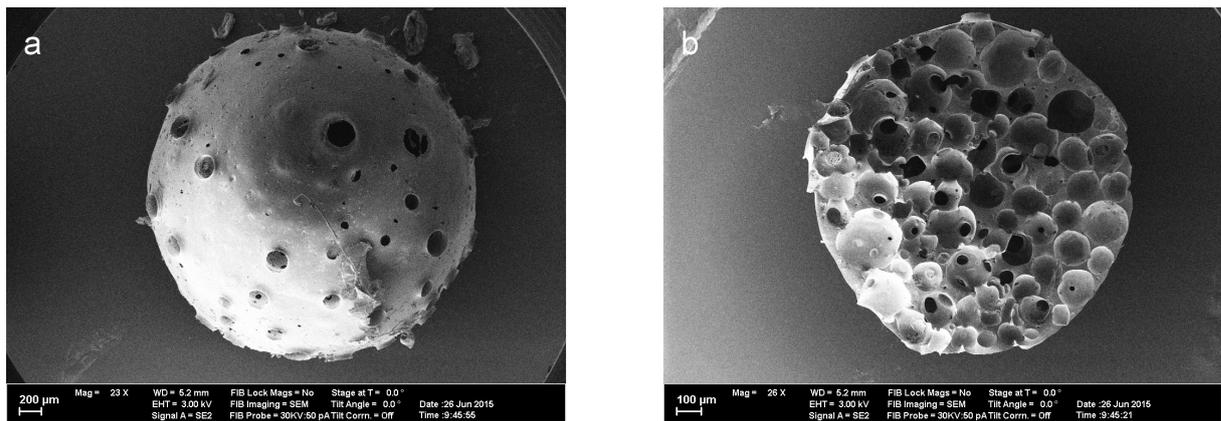


Abbildung 4.7: Kugeln aus PDMS-Schwämmen hergestellt aus Kompositmaterial mit einem Alginatanteil von 75%. An der Oberfläche der Mikroträger sind die durch das Alginat verursachten Porenöffnungen gut zu erkennen (a), während im Querschnitt die Verbindung der Poren untereinander zu sehen ist (b).

ger für deren Durchmischung im Reaktor und damit für die ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen eine große Rolle spielen [95], könnten diese über den Zusatz von Füllstoffen in das PDMS-Polymer spezifisch eingestellt werden¹².

Einen limitierenden Faktor stellt der Stofftransport innerhalb der Mikroträger dar. Nur mit ausreichender Nährstoffversorgung und Abführung von zellschädigenden Stoffwechselprodukten kann eine Zellkultur stabil sein [33]. Bei einer Porosität von 75% handelt es sich im Inneren der PDMS-Schwamm-Träger vorwiegend um diffusive Prozesse. Wie schon bei der Immobilisierung von L929-Zellen im Komposit in Abschnitt 4.3 beschrieben, ist der Stofftransport hauptsächlich von der Größe der Poren, der Dicke des porösen Materials, der Konzentration der Stoffe im Medium und dem Stoffumsatz abhängig. Entsprechend wird der Stoffaustausch an den Zellen in den Mikroträgern durch größere Poren, einen kleineren Trägerradius und ein höheres Angebot der zu verbrauchenden Substanzen im Medium gesteigert [33]. Wie in Abb. 4.7a zu sehen, gelang es in den Vorversuchen zwar, Porenöffnungen auf der Kugeloberfläche zu generieren, jedoch waren es für einen guten Stoffaustausch noch zu wenige. Eine Herausforderung für die Herstellung von Mikroträgern aus PDMS-Schwämmen bestünde demnach darin, Kugeln hoher Porosität mit einem Durchmesser unter 500 μm und offener Oberfläche herzustellen. Gleichzeitig muss die Herstellung in größerem Maßstab durchführbar sein. Denkbar wäre hier ein 3-phasiges Verfahren, bei dem das 2-phasige, noch unvernetzte Kompositgemisch in einer dritten Phase emulgiert und anschließend vernetzt wird. Silikongrenzschichten, wie sie an der Grenze zu hydrophoben Stoffen auftreten, sind dabei zu vermeiden, um eine möglichst hohe Zahl an Porenöffnungen an der Trägeroberfläche zu erhalten (siehe 4.1). Weitergehende Untersuchungen müssten zudem bezüglich einer verbesserten Zelladhäsion am PDMS-

¹²Das PDMS MED-6015 besitzt eine Dichte von 1,03 g/cm^3 [108]. Die Dichte makroporöser Mikroträger sollte zwischen 1,03 und 2,5 g/cm^3 liegen mit Sinkgeschwindigkeiten über 30 cm/min^1 [95, 33, 90].

Schwamm, wie sie in 4.3 diskutiert wurde, und einer eventuellen Zellgewinnung aus den Trägern durchgeführt werden.

Neben der Anwendung in Bioreaktoren werden Mikroträger auch als Zellübertragungssysteme in der regenerativen Medizin eingesetzt. Verschiedene wirkstoffsekretierende und metabolisch aktive Zellen sowie Stammzellen sind in zahlreichen Studien bereits erfolgreich implantiert worden. Beispiele hierfür sind Mikroträger-gebundene mesenchymale Stammzellen zur Haut-, Knorpel- und Knochenregeneration und Keratinozyten, epidermale Zellen und Fibroblasten zur Wundheilung (eine Übersicht bisheriger Forschungen liefern Li et al. [90]). Hepatozyten und Langerhans'sche Inseln wurden in mehreren *in-vivo*-Studien für die Unterstützung der Leber- und Bauchspeicheldrüsenfunktion in Mikroträger aus Alginat eingekapselt [79, 133]. Eine Kombination des Alginats mit dem Silikon in Form des Komposits könnte eine zusätzliche mechanische Stabilisierung der Zellübertragungssysteme gewährleisten. Gleichzeitig könnten in den verschiedenen Poren des Materials mehrere Zellsphäroide räumlich voneinander getrennt immobilisiert wachsen. Auch hierfür müsste das Komposit eine ausreichend poröse Oberflächenstruktur aufweisen, die einen hohen Stoffaustausch gewährleistet.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Obwohl Silikon ein in der Medizintechnik vielfach eingesetztes Implantatmaterial ist und als biokompatibel gilt, erfährt es durch einige seiner Eigenschaften Nachteile in der Anwendung. Seine starke Hydrophobizität kann Fremdkörperreaktionen hervorrufen und aufgrund seiner Undurchlässigkeit für wässrige Moleküle lässt es sich nur eingeschränkt mit Wirkstoffen funktionalisieren. Mit dem Ziel, diese Nachteile auszugleichen, wurde in dieser Arbeit das Silikon Polydimethylsiloxan (PDMS) mit dem natürlichen Hydrogel Alginat kombiniert. Ohne eine chemische Vernetzung der beiden Polymere untereinander wurde ein Kompositmaterial entwickelt, bei dem das Alginat ein zusammenhängendes Porensystem innerhalb des PDMS generiert. Durch die Bildung eines solchen interpenetrierenden Netzwerks (IPN) entstand ein Material, das weich und elastisch ist und sich in seiner Gestalt sehr variabel bearbeiten lässt. Das integrierte Alginat kann einen Anteil von 70–80% vom gesamten Komposit ausmachen und führt zu einer starken Verbesserung der Benetzbarkeit. In Abhängigkeit von der Polarität der Umgebung lässt sich der Wasserkontaktwinkel auf unter 40° senken. Zytotoxizitätstests zeigten keinerlei schädliche Einwirkung des Komposits auf Zellen.

Die Bildung der durchgehenden Alginatphase ermöglicht die Aufnahme und Abgabe von wasserlöslichen Substanzen. Die Durchlässigkeit für die Moleküle wird dabei stark vom Alginatanteil im Komposit beeinflusst, da dieser die Größe der Poren bestimmt, die das Hydrogelnetzwerk im PDMS bildet. Mit steigendem Alginatanteil werden die Poren größer und die Permeabilität der Komposite erhöht sich. Zusätzlich kann die Diffusion der Stoffe über die Stärke der Alginatvernetzung kontrolliert werden. Die Funktionalisierung des Kompositmaterials mit wasserlöslichen Wirkstoffen wurde in einem *in-vitro*-Versuch demonstriert. Hierfür erfolgte die Aufnahme des Nervenwachstumsfaktors NGF in das Kompositmaterial, dessen Freisetzung die Differenzierung von PC12-Zellen einleitete. Der Differenzierungsgrad der Zellen hing dabei von der NGF-Abgabemenge ab, die über die Größe des Hydrogelnetzwerks und die Dauer der Alginatvernetzung mit zweiwertigen Ionen eingestellt wurde.

Neben der Funktionalisierung des PDMS-Alginat-Komposits durch diffusionsbasierte Wirkstoffintegration wurde untersucht, inwieweit sich das Material mit lebenden Zellen besiedeln lässt. Das Hydrogelnetzwerk kann in Abhängigkeit vom Alginatanteil Poren von etwa 150 bis zu 300 μm im PDMS generieren. Diese sind groß genug, um Zellen in das Innere des Komposits aufzunehmen und bis in eine Materialtiefe von 1–2 mm ausreichend mit Nährstoffen zu versorgen. Wird die Alginatphase durch Ausspülen aus dem Komposit entfernt, verbleibt ein poröser PDMS-Schwamm. Dessen Oberfläche wurde sowohl kovalent als auch über Physisorption mit verschiedenen Molekülen modifiziert, um eine gute Zelladhäsion zu ermöglichen. Für mesenchymale Stammzellen (hUC-MSCs) erwies sich eine Beschichtung mit dem Glykoprotein Vitronectin am erfolgreichsten, so dass die Zellen sowohl auf als auch innerhalb der PDMS-Schwämme

adhärierten. Nach 5 Tagen Inkubation wuchsen auf und in den Schwämmen etwa doppelt so viele Zellen wie auf glatten PDMS-Oberflächen. Eine Modifizierung der PDMS-Schwämme mit Kollagen ermöglichte zudem die Anheftung von PC12-Zellen, die sich innerhalb des Schwammes differenzierten und Neuriten ausbildeten. Die gesteigerte Attraktivität des porösen PDMS-Schwamms zur Zellanheftung ließe Implantate mit einer solchen Materialoberfläche besser in das Nachbargewebe integrieren. Fremdkörperreaktionen mit fibröser Abkapselung der Implantate könnten dadurch reduziert werden.

Würden wirkstoffsekretierende Zellen eingebettet, wäre das PDMS-Alginat-Komposit als Beschichtungsmaterial für Implantate mit zellbasiertem Wirkstoffabgabesystem geeignet. Biologisch aktive Substanzen könnten dann über einen längeren Zeitraum an das umliegende Gewebe abgegeben werden. Solche Zellen bedürfen jedoch einer einbettenden Matrix, die eine unkontrollierte Verbreitung dieser Zellen unterbindet und eine Immunabwehr der Wirtszellen gegen die wirkstoffabgebenden Zellen verhindert. Alginat stellt eine geeignete biokompatible Matrix zur Zellimmobilisierung dar. Um zu überprüfen, ob Zellen in der Alginatphase des Komposits überleben könnten, wurden L929-Zellen in das Innere des Materials eingebettet. Die immobilisierten Zellen vermehrten sich zügig und bildeten nach einigen Tagen Sphäroide innerhalb der Alginatphase. Nach 25 Tagen lebten noch immer etwa 40% aller bis dahin im Komposit gewachsenen Zellen. Durch das IPN ist die Alginatphase zudem fest im Material verankert, während die Silikonmatrix einen Schutz vor mechanischen Beanspruchungen bietet. Eine Anwendung des PDMS-Alginat-Komposits als Material für zellbasierte Therapien wäre daher möglich.

Um als Implantatmaterial eingesetzt werden zu können, muss das PDMS-Alginat-Komposit körperverschlingbar sein. Als Vorstufe zu Tierversuchen wurde hierfür ein HET-CAM durchgeführt, bei dem das Material für 7 Tage auf der Chorion-Allantois-Membran (CAM) von 10 Tage alten Hühnerembryonen auflag. Während der Dauer des Versuchs kam es an einigen Stellen unterhalb der Proben – wie auch bei reinen PDMS-Proben – zu leichten Verdickungen des CAM-Gewebes. Andere zelluläre Veränderungen, wie beispielsweise die Bildung von Riesenzellen, waren nicht zu erkennen. Das Komposit erwies sich damit als verträglich auf der CAM und lässt eine gute Verträglichkeit im Körper vermuten.

Die weitere Eignung des PDMS-Alginat-Komposits als Werkstoff für Implantate wurde über den Aufbau eines Prototyp-Implantats überprüft. Als Vorbild diente eine Silikon-elektrode zur Erfassung muskulärer Signale. Diese Elektrode wurde mit Kompositmaterial statt reinem Silikon hergestellt. Der Nachweis ihrer Funktion erfolgte über die Ableitung von EKG-Signalen, die über ein Muskelphantom eingespeist wurden. Anschließend fand ein Vergleich mit den Signalaufnahmen der reinen Silikon-elektrode statt. Obwohl das Kompositmaterial eine elektrische Leitfähigkeit um 0,0016 S/m besitzt und damit im Halbleiterbereich liegt, waren keine Verluste der Signalqualität festzustellen.

Das in dieser Arbeit entwickelte Material auf Basis von PDMS und Alginat wurde also in seinen Grundeigenschaften untersucht und seine Anwendbarkeit als Implan-

tatmaterial überprüft. Durch die Möglichkeit, das Komposit sowohl zu funktionalisieren als auch mit Zellen zu besiedeln, könnten patientenspezifische Anforderungen an das Implantat erfüllt werden. Die Arbeit liefert damit einen Beitrag zur individualisierten Medizintechnik. Neben der Nutzung des PDMS-Alginat-Komposits als Implantatmaterial sind jedoch auch andere Anwendungen möglich. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass das Komposit als Biomaterial für verschiedene biomedizinische Bereiche geeignet wäre. Über die Variation des Alginatanteils können monolithisch aufgebaute Komposite mit Härte- und Elastizitätsgradienten hergestellt werden. Solche Gradienten sind in der Natur häufig anzutreffen und ermöglichen den fließenden Übergang an der Grenzfläche zu verschiedenen Materialeigenschaften. Des Weiteren besitzt das PDMS-Alginat-Komposit das Potential, als Wundverbandsmaterial für chronische Wunden eingesetzt zu werden. Die Kombination aus der Aufnahmefähigkeit des Alginats für Wundflüssigkeit und dem Feuchthaltevermögen des PDMS könnte ein optimales Wundklima für eine verbesserte Heilung erzeugen. Daneben ist auch eine Anwendung des Kompositmaterials als Mikroträger für Zellen denkbar. Diese könnten beispielsweise in Bioreaktoren für die Vermehrung von eukaryotischen Zellen in Großanlagen bzw. zur maßstabsgerechten Vergrößerung ihrer Produktionsleistung eingesetzt werden.

Um die genannten Anwendungen auf den Markt bringen zu können, müsste weitere Forschung betrieben werden. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf die optimalen Polaritätsverhältnisse zu angrenzenden Medien während der Kompositherstellung gelegt werden, um die Oberfläche offenerporiger zu gestalten. Darüber hinaus würde eine Entwicklung von skalierbaren Herstellungsverfahren die Produktion der Komposite als Implantat- und Biomaterial im großen Maßstab erlauben.

Diese Arbeit liefert die Grundlage für zahlreiche künftige Untersuchungen, die sich aus den vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten des Komposits ergeben.

A Anhang

A.1 Korrelation Raman-mikroskopischer Bilder

Für eine kontrastreiche Darstellung der Raman-mikroskopischen Bilder von PDMS-Alginat-Kompositen wurde eine Korrelation der Aufnahmen durchgeführt. In Abb. A.1 sind die generierten Bilder von PDMS, Wasser und Alginat einer Komposit-Probe dargestellt. Die Skala auf der rechten Seite der Abbildung gibt die normierte Intensität der detektierten Werte wieder, wobei ein Wert von 1 der maximal detektierten Intensität entspricht.

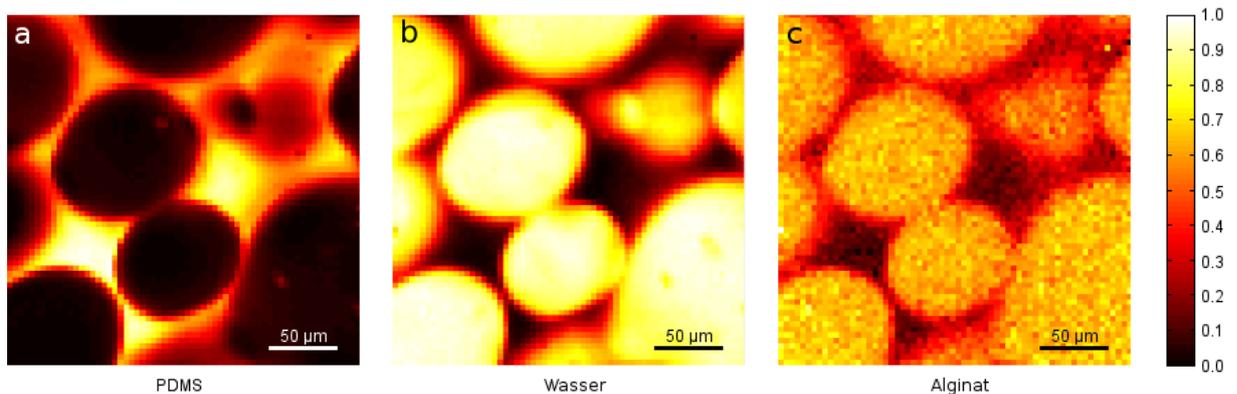


Abbildung A.1: Konfokale Raman-Mikroskopie eines 75%igen Komposits, das mit 10%iger Alginatlösung hergestellt wurde: Darstellung des PDMS (a), des Wassers (b) und des Alginats (c). Die Skala gibt die normierten Intensitäten an, wobei helle Farben einem hohen und dunkle Farben einem geringen Anteil der jeweiligen Verbindung in der Aufnahme bedeuten.

Deutlich ist zu sehen, dass an den Stellen, an denen PDMS detektiert wurde, kein Wasser vorhanden war und umgekehrt. Des Weiteren schienen die Vorkommen von Wasser und Alginat örtlich übereinzustimmen. Die Intensität des Alginats war jedoch aufgrund seiner geringen Gesamtkonzentration im Komposit wesentlich niedriger als die des Wassers.

Um zu prüfen, ob in den Aufnahmen die Bereiche des Alginats mit denen des Wassers linear zusammenhängen, wurden die Bilder nach Gleichung A.1 miteinander korreliert:

$$r(A, B) = \frac{\sum_m \sum_n (A_{mn} - \bar{A})(B_{mn} - \bar{B})}{\sqrt{\left(\sum_m \sum_n (A_{mn} - \bar{A})^2\right) \left(\sum_m \sum_n (B_{mn} - \bar{B})^2\right)}} \quad (\text{A.1})$$

Hierbei ist $r(A, B)$ der Korrelationskoeffizient zwischen A und B , wobei A und B Matrizen der selben Größe sind. \bar{A} und \bar{B} sind die Mittelwerte von A bzw. B .

Das Ergebnis einer solchen Korrelation ließ sich in einem Koordinatensystem als Punktwolke bildlich darstellen. Je vollständiger das Alginat und das Wasser miteinander korrelierten, desto mehr lagen die Punkte auf einer Geraden.

In Abb. A.2 ist das Ergebnis der Korrelation zwischen Abb. A.1b und Abb. A.1c zu sehen. Auf der X-Achse ist die Integration des Wasser-Frequenzbereichs dargestellt, auf der Y-Achse die Integration des Alginat-Frequenzbereichs. Die Daten wurden normiert, so dass der kleinste Wert 0 und der größte Wert 1 betrug.

Der Korrelationskoeffizient lag bei 0,94, womit ein linearer Zusammenhang zwischen dem Wasser und dem Alginat nachgewiesen werden konnte. Es bedeutet, dass an den Orten, an denen Wasser detektiert wurde, immer auch zu gleichen Verhältnissen Alginat vorhanden war.

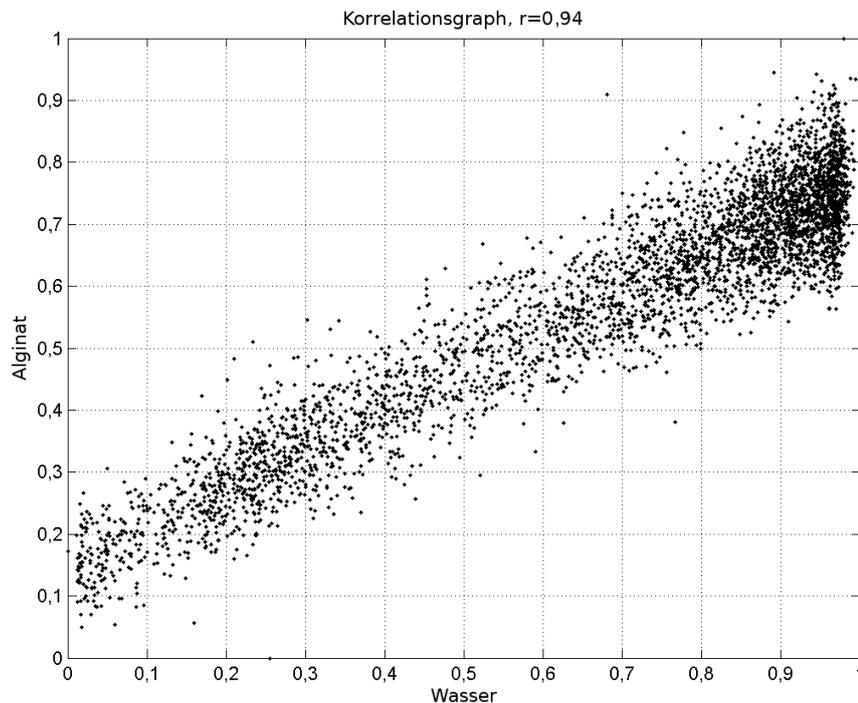


Abbildung A.2: Korrelation von Alginat und Wasser aus den Raman-mikroskopischen Aufnahmen in Abb. A.1.

A.2 Herstellung von Kompositen mit Härtegradient

Zur Demonstration der Herstellbarkeit von Gradienten innerhalb eines Kompositmaterials erfolgte eine zeitlich parallele Herstellung und Entgasung von PDMS-Alginat-Mischungen mit 60%, 65%, 70% und 80% Alginatanteil. Diese Mischungen wurden

eine nach der anderen in die ABS-Gussform des Diffusionstests (siehe 2.2.10) gegossen. Die 1 mm dicken Ringe der Form wurden hierfür aufeinandergelegt, wobei nach jeder Ringzugabe das entstandene Hohlvolumen genau bis zur Oberkante des Ringes mit Kompositmischung aufgefüllt wurde. Durch abwechselndes Einfüllen der verschiedenen Mischungen konnten auf diese Weise nacheinander 1 mm dicke Schichten mit unterschiedlichem Alginatgehalt hergestellt und anschließend miteinander vernetzt werden.

Ergänzend zur bildlichen Darstellung von Gradienten innerhalb eines Materials erfolgte ein Vergleich der Shore A-Härten von den Kompositen verschiedener Zusammensetzung. Hierfür wurden zusätzlich Proben mit 20% und mit 40% Alginatanteil nach 2.2.8 hergestellt und vermessen.

A.3 Bestimmung der MVTR und Absorptionsfähigkeit

Zur Messung der Wasserdampftransmissionsraten (MVTR) wurden 2 mm dicke Kompositscheiben mit einem Alginatanteil von 75% nach 2.2.8 hergestellt. Die Scheiben hatten einen Durchmesser von 36 mm. Für die Messung kamen sowohl Komposite, deren Alginatphase für 30 s mit BaCl_2 -Lösung vernetzt wurde, als auch Komposite mit ausgespültem Alginat zum Einsatz.

In den Schraubdeckel eines Polypropylen-Bechers, der ebenfalls einen Durchmesser von 36 mm besaß, wurde mittig ein Loch von 30 mm Durchmesser gefräst. Je eine Kompositprobe wurde in den Deckel gelegt und fixiert (Abb. A.3).

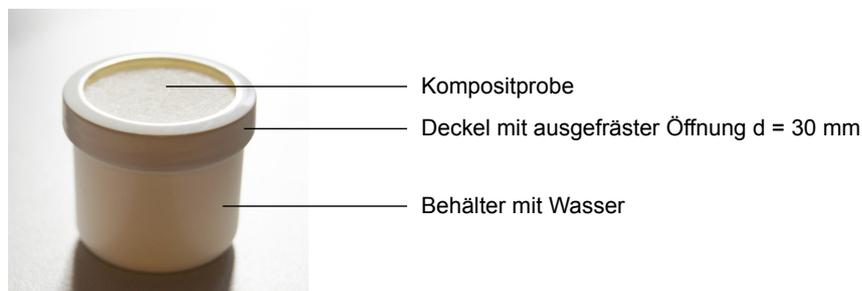


Abbildung A.3: Behälter mit Kompositprobe für die Messung der Wasserdampftransmissionsrate und der Wasserdampfabsorptionsfähigkeit.

In den Behälter wurden 10 ml destilliertes Wasser gefüllt, das auf 37°C erwärmt war. Es folgte das Aufbringen des Schraubdeckels inklusive Probe auf den Behälter, wobei die Kompositscheibe im äußeren Bereich gegen den oberen Rand des Behälters gedrückt wurde. Wasserdampf konnte somit nur durch die Probe durch das Loch im Deckel entweichen. Wasser und Probe berührten sich nicht. Der gesamte Behälter wurde gewogen und anschließend bei 37°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40% inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte eine erneute Bestimmung des Behältergewichts. Aus dem Masseverlust ergab sich die Wasserdampftransmissionsrate in $\text{g/m}^2/24 \text{ h}$. Zum

Vergleich fand eine Bestimmung der verdunsteten Wassermenge bei analogem Versuchsaufbau, jedoch ohne Probe im Becherdeckel, statt.

Für die Ermittlung der Absorptionsfähigkeit der Komposite für Wasser fanden ebenfalls 2 mm dicke, 75%ige Kompositscheiben (nach 2.2.8 hergestellt) Anwendung. Nach der Aushärtung des PDMS wurde das Alginat für 30 s mit BaCl_2 -Lösung kurz vernetzt. Danach folgte eine Trocknung der Komposite bei 37°C für 48 h. Die getrockneten Scheiben wurden gewogen und anschließend in 40 ml destilliertes Wasser gelegt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37°C erfolgte eine Entnahme der Komposite aus dem Wasser. Anhaftende Wassertropfen wurden vorsichtig abgetupft und die Proben erneut gewogen. Die Absorptionsfähigkeit in $\text{g/m}^2/24 \text{ h}$ ergab sich aus der Gewichts Differenz der Proben vor und nach der Inkubation im Wasser.

A.4 Herstellung von Wundauflagenbeispielen

Für die mögliche Anwendung des Silikon-Alginat-Komposits als Wundversorgungsmaterial wurden verschiedene ABS-Gussformen mit dem 3D-Drucker hergestellt. In diese wurden Kompositmischungen mit einem Alginatanteil von 75% gefüllt.

Die Gussform für die Wundauflage zum individuellen Zuschnitt auf die Wundkontur (Abb. A.4 links) ergab eine $6 \times 6 \text{ cm}^2$ große Kompositauflage. Sie besaß abgerundete Ecken und wurde auf eine Dicke von 4 mm gegossen.

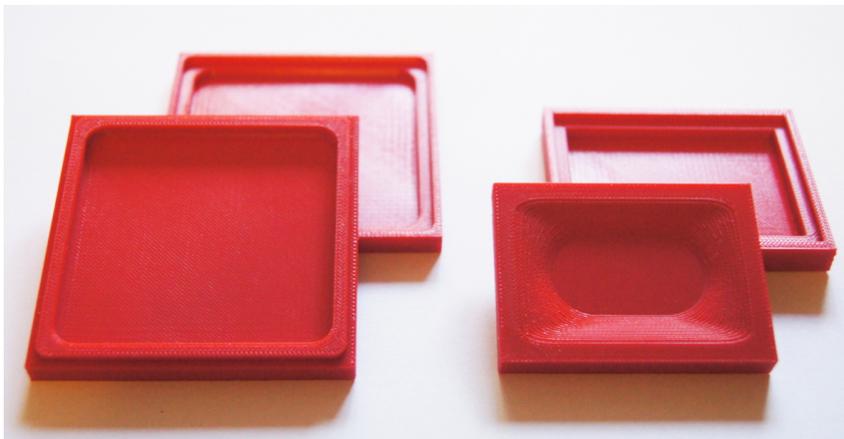


Abbildung A.4: Gussformen für die Beispiele des Silikon-Alginat-Komposits als Wundauflage und Tamponade (links) und als Pflasterkissen (rechts). Im Vordergrund sind die Formen, dahinter die dazu passenden Deckel.

Zur Demonstration der Anpassung der Kompositauflage an die Form einer Wunde wurde ein Foto eines Dekubitus [167] herangezogen. Es erfolgte ein Zuschnitt des Komposits nach der Gestalt der Wunde mit einer Hautschere. Die Aufbringung der angepassten Komposit-Wundauflage auf den Dekubitus wurde mit Hilfe von Fotomontage veranschaulicht.

Für die Veranschaulichung der Nutzung des Komposits als Tamponade wurde die gleiche Gussform wie für die Wundauflage genutzt, jedoch nur 1,5 mm hoch befüllt. So ergab sich ein sehr flexibles Material.

Als Beispiel für einen Pflasterverband wurde Komposit in eine 3,5 x 5 cm² große Form mit sich konisch verjüngender Dicke gegossen. Die maximale Dicke betrug 3 mm. Die Ecken und Kanten der Form waren abgerundet (Abb. A.4 rechts). Das vernetzte Komposit wurde auf eine transparente, klebende Folie aus Polypropylen (Veloflex) gesetzt und zu Demonstrationszwecken auf das gesunde Bein der Autorin geklebt.

A.5 Herstellung von Mikroträgern

Die testweise Herstellung kugelförmiger Komposite als Mikroträger mit Durchmessern von 1–2 mm erfolgte in einem einfachen Aufbau über ein 2-Phasen-System. An Materialien kamen dünne Silikonschläuche mit einem Innendurchmesser von 3 mm (VWR), Luer-Spritzen, Luer-Adapter, Y-Schlauchtüllen sowie Schlauchklemmen zum Einsatz.

In den Silikonschlauch wurde zunächst eine Lösung mit 5% Natriumdodecylsulfat (SDS) vorgelegt, um die Innenseite des Schlauchs kurzfristig zu hydrophilisieren. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur erfolgte ein Austausch des SDS im Schlauch gegen 6%ige Alginatlösung, die zur besseren Kontrastierung mit Methylenblau versetzt worden ist. Über eine Y-Schlauchtülle und zwei Luer-Adapter wurden an den gefüllten Silikonschlauch zwei Spritzen angebracht. In der ersten Spritze befand sich das noch unvernetzte Kompositmaterial mit 75% Alginatanteil, während die zweite Spritze die 6%ige blaue Alginatlösung enthielt (Abb. A.5).



Abbildung A.5: Einfache Methode zur Herstellung von Komposit-Mikroträgern: Das noch unvernetzte Kompositmaterial (cremefarben) wird über eine Y-Schlauchtülle in einen Silikonschlauch gespritzt und mit Alginatlösung (zur besseren Sichtbarkeit blau eingefärbt) aus der zweiten Spritze abgetrennt.

Über die Y-Schlauchtülle wurden aus der ersten Spritze etwa 3–5 mm³ Kompositmischung in den Schlauch gedrückt. Der Kompositvorschub wurde durch Einspritzen der Alginatlösung aus der zweiten Spritze abgetrennt. Nach Zufuhr von 100–150 µl Alginatlösung in den Schlauch (zur Vermeidung des Zusammenklebens der Kompositkugeln)

konnte der Vorgang des Kompositeinspritzens wiederholt werden. Abschließend erfolgte ein Verschließen des Silikonschlauchs an beiden Enden mit Schlauchklemmen, so dass die Y-Schlauchtülle mit den Spritzen entfernt und die im Schlauch enthaltenen Komposite bei 80° C vernetzt werden konnten. Während der Vernetzung formten sich die Komposite zu Kugeln, deren Alginatphase anschließend ausgespült werden konnte.

Literaturverzeichnis

- [1] ABELA-FORMANEK, C. ; AMON, M. ; KAHRAMAN, G. ; SCHAUERSBERGER, J. ; DUNAVO-ELGYI, R. : Biocompatibility of hydrophilic acrylic, hydrophobic acrylic, and silicone intra-ocular lenses in eyes with uveitis having cataract surgery: Long-term follow-up. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* Bd. 37, Nr. 1, S. 104–112, 2011
- [2] AHANGER, A. A. ; PRAWAZ, S. ; KUMAR, D. et al. : Wound healing activity of carbon monoxide liberated from CO-releasing molecule (CO-RM). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* Bd. 384, Nr. 1, S. 93–102, 2011
- [3] AIZENBERG, J. ; WEAVER, J. C. ; THANAWALA, M. S. et al. : Skeleton of *Euplectella* sp.: Structural hierarchy from the nanoscale to the macroscale. *Science* Bd. 309, Nr. 5732, S. 275–278, 2005
- [4] ALEMÁN, J. V. ; CHADWICK, A. V. ; HE, J. et al. : Definitions of terms relating to the structure and processing of sols, gels, networks, and inorganic-organic hybrid materials (IUPAC Recommendations 2007). *Pure and Applied Chemistry* Bd. 79, Nr. 10, S. 1801–1829, 2007
- [5] ALIZADEH, M. ; ABBASI, F. ; FARAHI, M. ; JALILI, K. : Silicone-based hydrogels prepared by interpenetrating polymer network synthesis: Swelling properties and confinements effects on the formation kinetics. *Journal of Applied Polymer Science* Bd. 124, Nr. 2, S. 985–992, 2012
- [6] ALLEN, J. W. ; BHATIA, S. N.: Improving the next generation of bioartificial liver devices. *Seminars in Cell & Developmental Biology* Bd. 13, Nr. 6, S. 447–454, 2002
- [7] ALM, M. : Impregnation and surface modification of polymers in liquid and supercritical carbon dioxide. Dissertation, Roskilde University, Roskilde, 2007
- [8] ANDERSEN, T. ; STRAND, B. L. ; FORMO, K. ; ALSBERG, E. ; CHRISTENSEN, B. E.: Alginates as biomaterials in tissue engineering. In: RAUTER, A. P. (Hrsg.) ; LINDHORST, T. (Hrsg.): *Carbohydrate Chemistry: Volume 37*, RSC Publishing, Cambridge, 2012
- [9] ANDERSON, J. M. ; RODRIGUEZ, A. ; CHANG, D. T.: Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology* Bd. 20, Nr. 2, S. 86–100, 2008
- [10] ANSELME, K. ; PLOUX, L. ; PONCHE, A. : Cell/material interfaces: Influence of Surface chemistry and surface topography on cell adhesion. *Journal of Adhesion Science and Technology* Bd. 24, Nr. 5, S. 831–852, 2012
- [11] ASPLUND, O. : Capsular contracture in silicone gel and saline-filled breast implants after reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery* Bd. 73, Nr. 2, S. 270–275, 1984
- [12] AUGST, A. ; KONG, H. J. ; MOONEY, D. J.: Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular Bioscience* Bd. 6, Nr. 8, S. 623–633, 2006

- [13] BALA, I. ; HARIHARAN, S. ; KUMAR, M. N. V. R.: PLGA nanoparticles in drug delivery: The state of the art. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* Bd. 21, Nr. 5, S. 387–422, 2004
- [14] BARIKOSKY, M. ; MAINGAULT, P. (Erfinder): Verbandprodukt mit einer Kalziumalginatmatrix und Verfahren zur Herstellung. Patent DE69715568T2, 2003
- [15] BARILLAS, M. K.: Investigation of CO₂-philic oligomers for carbon dioxide/hydrogen membrane separations. Dissertation, University of Pittsburgh, Pittsburgh, 2011
- [16] BELLAIRS, R. ; OSMOND, M. : *Atlas of chick development*. 3. Aufl., Academic Press/Elsevier, Oxford, 2014
- [17] BENTOV, S. ; ZASLANSKY, P. ; AL-SAWALMIH, A. et al. : Enamel-like apatite crown covering amorphous mineral in a crayfish mandible. *Nature Communications* Bd. 3, Nr. 839, S. 1–7, 2012
- [18] BODAS, D. ; KHAN-MALEK, C. : Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment – an SEM investigation. *Sensors and Actuators B: Chemical* Bd. 123, Nr. 1, S. 368–373, 2007
- [19] BRIQUET, F. ; COLAS, A. ; THOMAS, X. : Silikone in der Medizin. Dow Corning France, 1996
- [20] CASSIE, A. B. D. ; BAXTER, S. : Wettability of porous surfaces. *Transactions of the Faraday Society* Bd. 40, S. 546–551, 1944
- [21] CHAPLIN, M. : Water structure and science – Alginate: α -L-Guluronate and β -D-Mannuronate Polymers. Webseite (fachliche Informationen): [<http://www1.lsbu.ac.uk/water/hyalgh.html>], letzte Änderung: 2015, aufgerufen Jan. 2016
- [22] CLARSON, S. J. ; SEMLYEN, J. A.: *Siloxane polymers*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1993
- [23] COLAS, A. ; RAFIDISON, P. : Silicones in new pharmaceutical developments, from formulations to manufacturing processes. *PharmaChem* , S. 46–49, 2005
- [24] COX-REIJVEN, P. L. ; SOETERS, P. B.: Validation of bio-impedance spectroscopy: Effects of degree of obesity and ways of calculating volumes from measured resistance values. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* Bd. 24, Nr. 3, S. 271–280, 2000
- [25] DEL POZO, J. L. ; TRAN, N. V. ; PETTY, P. M. et al. : Pilot study of association of bacteria on breast implants with capsular contracture. *Journal of Clinical Microbiology* Bd. 47, Nr. 5, S. 1333–1337, 2009
- [26] DENKBAŞ, E. B. ; HOFFMAN, A. S. ; PIŞKIN, E. : Silicone-based microcarriers: Preparation and BHK cell culture. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal* Bd. 58, Nr. 1, S. 65–70, 1995
- [27] DJABARI, Z. ; BAUZA, E. ; DAL FARRA, C. ; DOMLOGE, N. : The HET-CAM test combined with histological studies for better evaluation of active ingredient innocuity. *International Journal of Tissue Reactions* Bd. 24, Nr. 4, S. 117–121, 2002

- [28] DRURY, J. L. ; DENNIS, R. G. ; MOONEY, D. J.: The tensile properties of alginate hydrogels. *Biomaterials* Bd. 25, Nr. 16, S. 3187–3199, 2004
- [29] DUSSEAULT, J. ; TAM, S. K. ; MÉNARD, M. et al. : Evaluation of alginate purification methods: effect on polyphenol, endotoxin, and protein contamination. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* Bd. 76, Nr. 2, S. 243–251, 2006
- [30] EDER, C. ; FALKNER, E. ; APPL, H. et al. : Macroscopic evaluation of HET-CAM biomaterial testing: How reliable is macroscopical scoring without histology? Vortrag, Altex 22nd Annual User Meeting for Medisoft and Lytec, Houston, 2005
- [31] EDER, C. ; FALKNER, E. ; MICKEL, M. et al. : A modified HET-CAM approach for biocompatibility testing of medical devices. *Animal Welfare* Bd. 14, Nr. 4, S. 297–302, 2005
- [32] EHRHART, F. ; METTLER, E. ; BÖSE, T. et al. : Biocompatible coating of encapsulated cells using ionotropic gelation. *PLoS ONE* Bd. 8, Nr. 9, Artikelnr. e73498, 2013
- [33] EIBL, R. ; EIBL, D. ; PÖRTNER, R. ; CATAPANO, G. ; CZERMAK, P. : *Cell and tissue reaction engineering*, Springer-Verlag, Berlin/ Heidelberg, 2009
- [34] EL-OSMANI, R. : Entwicklung eines Haut-/Gewebe-Phantoms zur Evaluierung der Grenzflächeneigenschaften von Elektroden. Bachelorarbeit, Hochschule Koblenz, Koblenz, 2014
- [35] ELBERT, D. L. ; HUBBELL, J. A.: Surface treatments of polymers for biocompatibility. *Annual Review of Materials Science* Bd. 26, S. 365–394, 1996
- [36] ELIAS, H.-G. : *Makromoleküle: Chemische Struktur und Synthesen*. 6. Aufl., Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2009
- [37] ENGLER, A. J. ; SEN, S. ; SWEENEY, H. L. ; DISCHER, D. E.: Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* Bd. 126, Nr. 4, S. 677–689, 2006
- [38] ERB, R. M. ; SANDER, J. S. ; GRISCH, R. ; STUDART, A. R.: Self-shaping composites with programmable bioinspired microstructures. *Nature Communications* Bd. 4, Nr. 1712, 2013
- [39] FICHET, O. ; VIDAL, F. ; DARRAS, V. ; BOILEAU, S. ; TEYSSIÉ, D. : Polysiloxane based interpenetrating polymer networks: Synthesis and properties. In: BOILEAU, S. (Hrsg.) ; BOURY, B. (Hrsg.) ; GANACHAUD, F. (Hrsg.): *Silicon based polymers*, Springer Science & Business Media, New York, 2008
- [40] GABRIEL, C. ; GABRIEL, S. ; CORTHOUT, E. : The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey. Bd. 41, Nr. 11, S. 2231–2249, 1996
- [41] GERMAN REPRAP GMBH: Shore-Härte. Webseite (fachliche Informationen): [[http:// wiki.germanreprap.com/materialien/shore_haerte](http://wiki.germanreprap.com/materialien/shore_haerte)], letzte Änderung: 2014, aufgerufen Jan. 2016
- [42] GILHOTRA, R. M. ; NAGPAL, K. ; MISHRA, D. N.: Azithromycin novel drug delivery system for ocular application. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* Bd. 1, Nr. 1, S. 22–28, 2011

- [43] GRAY, J. W. ; DOLBEARE, F. ; PALLAVICINI, M. G.: Quantitative cell-cycle analysis. In: MELAMED, M. R. (Hrsg.) ; LINDMO, T. (Hrsg.) ; MENDELSON, M. L. (Hrsg.): *Flow Cytometry and Sorting*. 2. Aufl., Wiley-Liss, Wilmington, 1990
- [44] GREENE, L. A. ; TISCHLER, A. S.: Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* Bd. 73, Nr. 7, S. 2424–2428, 1976
- [45] GUBBELS, F. : Silicones in the electronics industries. In: *Inorganic polymers*, Nova Science Publishers, New York, 2007
- [46] GUTIÉRREZ MILLÁN, C. ; COLINO GANDARILLAS, C. I. ; SAYALERO MARINERO, M. L. ; LANAJO, J. M.: Cell-based drug-delivery platforms. *Therapeutic Delivery* Bd. 3, Nr. 1, S. 25–41, 2012
- [47] HAKELIUS, L. ; OHLSÉN, L. : Tendency to capsular contracture around smooth and textured gel-filled silicone mammary implants: A five-year follow-up. *Plastic and Reconstructive Surgery* Bd. 100, Nr. 6, S. 1566–1569, 1997
- [48] HANSEN, C. M.: *Hansen solubility parameters: A user's handbook*. 2. Aufl., CRC Press, Boca Raton, 2007
- [49] HAUG, A. ; BJERRUM, J. ; BUCHARDT, O. et al. : The affinity of some divalent metals for different types of alginates. *Acta Chemica Scandinavica* Bd. 15, S. 1794–1795, 1961
- [50] HAYMAN, E. G. ; PIERSCHBACHER, M. D. ; SUZUKI, S. ; RUOSLAHTI, E. : Vitronectin – a major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum. *Experimental Cell Research* Bd. 160, Nr. 2, S. 245–258, 1985
- [51] HEILIGENSTEIN, S. ; CUCCHIARINI, M. ; LASCHKE, M. W. et al. : Evaluation of nonbiomedical and biomedical grade alginates for the transplantation of genetically modified articular chondrocytes to cartilage defects in a large animal model in vivo. *The Journal of Gene Medicine* Bd. 13, Nr. 4, S. 230–242, 2011
- [52] HEZI-YAMIT, A. ; SULLIVAN, C. ; WONG, J. et al. : Impact of polymer hydrophilicity on biocompatibility: Implication for DES polymer design. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* Bd. 90, Nr. 1, S. 133–141, 2009
- [53] HILLERSTRÖM, A. ; KRONBERG, B. : A two-step method for the synthesis of a hydrophilic PDMS interpenetrating polymer network. *Journal of Applied Polymer Science* Bd. 110, Nr. 5, S. 3059–3067, 2008
- [54] HOFFMANN, K. P. ; KOCH, K.-P. ; DOERGE, T. ; MICERA, S. : New technologies in manufacturing of different implantable microelectrodes as an interface to the peripheral nervous system. Konferenzbeitrag, The first IEEE/RAS-EMBS international conference on biomedical robotics and biomechatronics (BioRob), Pisa, S. 414–419, 2006
- [55] HOPP, I. ; MICHELMORE, A. ; SMITH, L. E. et al. : The influence of substrate stiffness gradients on primary human dermal fibroblasts. *Biomaterials* Bd. 34, Nr. 21, S. 5070–5077, 2013

- [56] HORVATH, A. L.: *Handbook of aqueous electrolyte solutions: Physical properties, estimation, and correlation methods*, Ellis Horwood, Chichester, 1985
- [57] HU, Z. ; WANG, C. ; NELSON, K. D. ; EBERHART, R. C.: Controlled release from a composite silicone/hydrogel membrane. *ASAIO Journal* Bd. 46, Nr. 4, S. 431–434, 2000
- [58] HUNT, T. K. ; HOPF, H. ; HUSSAIN, Z. : Physiology of wound healing. *Advances in Skin & Wound Care* Bd. 13, Suppl. 2, S. 6–11, 2000
- [59] HÜTTEN, M. ; EHRHART, F. ; ZIMMERMANN, H. et al. : UHV-alginate as matrix for neurotrophic factor producing cells – a novel biomaterial for cochlear implant optimization to preserve inner ear neurons from degeneration. *Otology & Neurotology* Bd. 34, Nr. 6, S. 1127–1133, 2013
- [60] ICCVAM: Appendix B3 – ICCVAM-recommended protocol for future studies using the hen's egg test-chorioallantoic membrane (HET-CAM) test method. In: *ICCVAM test method evaluation report: Current validation status of in vitro test methods proposed for identifying eye injury hazard potential of chemicals and products*, NIH Publication No. 10-7553, 2010
- [61] JACOBS-TULLENEERS-THEVISSSEN, D. ; CHINTINNE, M. ; LING, Z. et al. : Sustained function of alginate-encapsulated human islet cell implants in the peritoneal cavity of mice leading to a pilot study in a type 1 diabetic patient. *Diabetologia* Bd. 56, Nr. 7, S. 1605–1614, 2013
- [62] JOHNSON, A. S. ; O'SULLIVAN, E. ; D'Aoust, L. N. et al. : Quantitative assessment of islets of Langerhans encapsulated in alginate. *Tissue Engineering. Part C, Methods* Bd. 17, Nr. 4, S. 435–449, 2011
- [63] JUCHLI, L. : *Pflege. Praxis und Theorie der Gesundheits- und Krankenpflege*. 7. Aufl., Thieme Georg Verlag, Stuttgart/ New York, 1997
- [64] JUCHNIEWICZ, M. ; STADNIK, D. ; BIESIADA, K. et al. : Porous crosslinked PDMS-microchannels coatings. *Sensors and Actuators B: Chemical* Bd. 126, Nr. 1, S. 68–72, 2007
- [65] JUNG, D. H. ; KIM, B. R. ; CHOI, J. Y. ; RHO, Y. S. ; PARK, H. J. ; HAN, W. W.: Gross and pathologic analysis of long-term silicone implants inserted into the human body for augmentation rhinoplasty: 221 revision cases. *Plastic and Reconstructive Surgery* Bd. 120, Nr. 7, S. 1997–2003, 2007
- [66] KARP, F. B. ; BERNOTSKI, N. A. ; VALDES, T. I. ; BOHRINGER, K. F. ; RATNER, B. D.: Foreign body response investigated with an implanted biosensor by in situ electrical impedance spectroscopy. *IEEE Sensors Journal* Bd. 8, Nr. 1, S. 104–112, 2008
- [67] KASAPI, M. A. ; GOSLINE, J. M.: Micromechanics of the equine hoof wall: Optimizing crack control and material stiffness through modulation of the properties of keratin. *The Journal of Experimental Biology* Bd. 202, Pt 4, S. 377–391, 1999
- [68] KAWAKAMI, K. ; TSURUDA, S. ; MIYAGI, K. : Immobilization of microbial cells in a mixed matrix of silicone polymer and calcium alginate gel: Epoxidation of 1-octene by *Nocardia corallina* B-276 in organic media. *Biotechnology Progress* Bd. 6, Nr. 5, S. 357–361, 1990

- [69] KHAN, N. ; AQIL, M. ; AMEEDUZZAFAR, Z. ; IMAM, S. S. ; ALI, A. : Development and evaluation of a novel in situ gel of sparfloracin for sustained ocular drug delivery: In vitro and ex vivo characterization. *Pharmaceutical Development and Technology* Bd. 20, Nr. 6, S. 662–669, 2015
- [70] KHORASANI, M. T. ; MIRZADEH, H. ; KERMANI, Z. : Wettability of porous polydimethylsiloxane surface: Morphology study. *Applied Surface Science* Bd. 242, Nr. 3-4, S. 339–345, 2005
- [71] KIM, S.-Y. ; KANG, J.-H. ; SEO, W.-S. et al. : Effect of topographical control by a micro-molding process on the activity of human mesenchymal stem cells on alumina ceramics. *Biomaterials Research* Bd. 19, Artikelnr. 23, 2015
- [72] KLIMANT, I. ; WOLFBEIS, O. S.: Oxygen-sensitive luminescent materials based on silicone-soluble ruthenium diimine complexes. *Analytical Chemistry* Bd. 67, Nr. 18, S. 3160–3166, 1995
- [73] KONG, H. J. ; KAIGLER, D. ; KIM, K. ; MOONEY, D. J.: Controlling rigidity and degradation of alginate hydrogels via molecular weight distribution. *Biomacromolecules* Bd. 5, Nr. 5, S. 1720–1727, 2004
- [74] KREINER-MØLLER, A. ; STRACKE, F. ; ZIMMERMANN, H. : Confocal raman microscopy as a non-invasive tool to investigate the phase composition of frozen complex cryopreservation media. *Cryo Letters* Bd. 34, Nr. 3, S. 248–254, 2013
- [75] KREINER-MØLLER, A. ; STRACKE, F. ; ZIMMERMANN, H. : Hydrohalite spatial distribution in frozen cell cultures measured using confocal Raman microscopy. *Cryobiology* Bd. 69, Nr. 1, S. 41–47, 2014
- [76] KROUKAMP, O. ; WOLFAARDT, G. M.: CO₂ production as an indicator of biofilm metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* Bd. 75, Nr. 13, S. 4391–4397, 2009
- [77] KUBON, M. ; MOSCHALLSKI, M. ; LINK, G. et al. : A microsensor system to probe physiological environments and tissue response. Konferenzbeitrag, 2010 IEEE Sensors, Kona, S. 2607–2611, 2010
- [78] KUDDANNAYA, S. ; CHUAH, Y. J. ; LEE, M. H. A. et al. : Surface chemical modification of poly(dimethylsiloxane) for the enhanced adhesion and proliferation of mesenchymal stem cells. *ACS Applied Materials & Interfaces* Bd. 5, Nr. 19, S. 9777–9784, 2013
- [79] KÜHTREIBER, W. M. (Hrsg.) ; LANZA, R. P. (Hrsg.) ; CHICK, W. L. (Hrsg.): *Cell encapsulation technology and therapeutics*, Springer Science & Business Media, New York, 1999
- [80] KUNZLER, T. P. ; DROBEK, T. ; SCHULER, M. ; SPENCER, N. D.: Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients. *Biomaterials* Bd. 28, Nr. 13, S. 2175–2182, 2007
- [81] KUWAHARA, Y. ; SHIMA, Y. ; SHIRAYAMA, D. et al. : Quantification of hardness, elasticity and viscosity of the skin of patients with systemic sclerosis using a novel sensing device (Vesmeter): A proposal for a new outcome measurement procedure. *Rheumatology* Bd. 47, Nr. 7, S. 1018–1024, 2008

- [82] LAMBRECHT, J. ; WOLF, H. P. ; GERLACH, E. : Chemische Eigenschaften von Silikonelastomeren. In: *Silikonelastomere – Werkstoffe für Kabelgarnituren, Isolatoren, Überspannungsableiter*, ETG-FB 93, VDE Verlag, Berlin, 2003
- [83] LANDÁZURI, N. ; LEVIT, R. D. ; JOSEPH, G. et al. : Alginate microencapsulation of human mesenchymal stem cells as a strategy to enhance paracrine-mediated vascular recovery after hindlimb ischaemia. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* Bd. 10, Nr. 3, S. 222–232, 2012
- [84] LAUNEY, M. E. ; BUEHLER, M. J. ; RITCHIE, R. O.: On the mechanistic origins of toughness in bone. *Annual Review of Materials Research* Bd. 40, Nr. 1, S. 25–53, 2010
- [85] LEDNICKÝ, F. ; JANATOVÁ, V. ; LOPOUR, P. ; VONDRÁČEK, P. : Silicone rubber-hydrogel composites as polymeric biomaterials III. An investigation of phase distribution by scanning electron microscopy. *Biomaterials* Bd. 12, Nr. 9, S. 848–852, 1991
- [86] LEONG, K. W.: Synthetic biodegradable polymer drug delivery systems. In: TARCHA, P. J. (Hrsg.): *Polymers for controlled drug delivery*, CRC Press, Boca Raton, 1991
- [87] LEVI-MONTALCINI, R. ; CALISSANO, P. : The nerve-growth factor. *Scientific American* Bd. 240, Nr. 6, S. 68–77, 1979
- [88] LEWIS, S. ; HAHN, M. ; KLEIN, C. et al. : Implantable silicone electrode for measurement of muscle activity: Results of first in vivo evaluation. *Biomedizinische Technik/ Biomedical Engineering* , Nr. 58, Suppl. 1, 2013
- [89] LEWIS, S. ; RUSSOLD, M. ; DIETL, H. et al. : Fully implantable multi-channel measurement system for acquisition of muscle activity. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement* Bd. 62, Nr. 7, S. 1972–1981, 2013
- [90] LI, B. ; WANG, X. ; WANG, Y. et al. : Past, present, and future of microcarrier-based tissue engineering. *Journal of Orthopaedic Translation* Bd. 3, Nr. 2, S. 51–57, 2015
- [91] LI, Y. ; LEE, P. I.: Controlled nitric oxide delivery platform based on S-nitrosothiol conjugated interpolymer complexes for diabetic wound healing. *Molecular Pharmaceutics* Bd. 7, Nr. 1, S. 254–266, 2010
- [92] LIU, L. ; SHEARDOWN, H. : Glucose permeable poly(dimethylsiloxane) poly(N-isopropyl acrylamide) interpenetrating networks as ophthalmic biomaterials. *Biomaterials* Bd. 26, Nr. 3, S. 233–244, 2005
- [93] LIU, S.-J. ; KAU, Y.-C. ; CHOU, C.-Y. et al. : Electrospun PLGA/collagen nanofibrous membrane as early-stage wound dressing. *Journal of Membrane Science* Bd. 355, Nr. 1–2, S. 53–59, 2010
- [94] LOPOUR, P. ; JANATOVÁ, V. : Silicone rubber-hydrogel composites as polymeric biomaterials VI. Transport properties in the water-swollen state. *Biomaterials* Bd. 16, Nr. 8, S. 633–640, 1995
- [95] LUNDGREN, B. ; BLÜML, G. : Microcarriers in cell culture production. In: SUBRAMANIAN, G. (Hrsg.): *Bioseparation and bioprocessing – A handbook, Vol. 1: Biochromatography, membrane separations, modeling, validation*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, S. 165–222, 1998

- [96] MALPIQUE, R. ; OSÓRIO, L. M. ; FERREIRA, D. S. et al. : Alginate encapsulation as a novel strategy for the cryopreservation of neurospheres. *Tissue Engineering. Part C, Methods* Bd. 16, Nr. 5, S. 965–977, 2010
- [97] MARK, J. E. (Hrsg.): *Polymer data handbook*, Oxford University Press, Oxford, 1999
- [98] MARK, J. E. (Hrsg.): *Physical properties of polymers handbook*, Springer Science & Business Media, New York, 2007
- [99] MASHAK, A. ; RAHIMI, A. : Silicone polymers in controlled drug delivery systems: A review. *Iranian Polymer Journal* Bd. 18, Nr. 4, S. 279–295, 2009
- [100] MCGLONE, J. ; SWANSON, J. ; FORD, S. et al. : *Guide for the care and use of agricultural animals in research and teaching*. 3. Aufl., Federation of Animal Science Societies, Champaign, 2010
- [101] MELLOR, J. ; THISTLETHWAITE, J. ; JOHNSTONE, A. : The effect of the environment on modern wound dressings. Vortrag, European Wound Management Association (EWMA), Wien, 2012
- [102] MOHAPATRA, S. N. ; HILL, D. W.: The changes in blood resistivity with haematocrit and temperature. *European Journal of Intensive Care Medicine* Bd. 1, Nr. 4, S. 153–162, 1975
- [103] MOHR, G. J. ; STICH, M. ; SZEIMIES, M. ; TRUPP, S. ; WOLFBEIS, O. S. (Erfinder): Verbandsmaterial zur Überwachung einer Wundheilung. Patent, DE102010001855 A1, 2011
- [104] MOSSER, D. : The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology* Bd. 73, Nr. 2, S. 209–212, 2003
- [105] MUTSAERS, S. E. ; BISHOP, J. E. ; MCGROUTHER, G. ; LAURENT, G. J.: Mechanisms of tissue repair: From wound healing to fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* Bd. 29, Nr. 1, S. 5–17, 1997
- [106] NIKOLOVA, P. ; WARD, O. P.: Effect of the support matrix on biotransformation of benzaldehyde to benzyl alcohol by yeast cells in aqueous and aqueous-organic two phase systems. *Journal of Industrial Microbiology* Bd. 13, Nr. 3, S. 172–176, 1994
- [107] NOWAK-SLIWINSKA, P. ; SEGURA, T. ; IRUELA-ARISPE, M. L.: The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis* Bd. 17, Nr. 4, S. 779–804, 2014
- [108] NUSIL TECHNOLOGY: MED-6015: Optically clear low consistency silicone elastomer. Datenblatt, 2014
- [109] ONUKI, Y. ; BHARDWAJ, U. ; PAPADIMITRAKOPOULOS, F. ; BURGESS, D. J.: A review of the biocompatibility of implantable devices: Current challenges to overcome foreign body response. *Journal of diabetes science and technology* Bd. 2, Nr. 6, S. 1003–1015, 2008
- [110] OU, J. ; REN, C. L. ; PAWLISZYN, J. : A simple method for preparation of macroporous polydimethylsiloxane membrane for microfluidic chip-based isoelectric focusing applications. *Analytica Chimica Acta* Bd. 662, Nr. 2, S. 200–205, 2010

- [111] OWEN, M. J. ; SMITH, P. J.: Plasma treatment of polydimethylsiloxane. *Journal of Adhesion Science and Technology* Bd. 8, Nr. 10, S. 1063–1075, 1994
- [112] PAVLYUCHENKO, V. N. ; SOROCHINSKAYA, O. V. ; IVANCHEV, S. S. et al. : New silicone hydrogels based on interpenetrating polymer networks comprising polysiloxane and poly(vinyl alcohol) networks. *Polymers for Advanced Technologies* Bd. 20, Nr. 4, S. 367–377, 2009
- [113] PEPPAS, N. A. (Hrsg.): *Hydrogels in medicine and pharmacy, Vol. II: Polymers*, CRC Press, Boca Raton, 1987
- [114] PERRY, M. M.: A complete culture system for the chick embryo. *Nature* Bd. 331, Nr. 6151, S. 70–72, 1988
- [115] PETERSEN, A. ; JOLY, P. ; BERGMANN, C. ; KORUS, G. ; DUDA, G. N.: The impact of substrate stiffness and mechanical loading on fibroblast-induced scaffold remodeling. *Tissue Engineering. Part A* Bd. 18, Nr. 17–18, S. 1804–1817, 2012
- [116] PILLAY, V. ; TSAI, T.-S. ; CHOONARA, Y. E. et al. : A review of integrating electroactive polymers as responsive systems for specialized drug delivery applications. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* Bd. 102, Nr. 6, S. 2039–2054, 2014
- [117] PRASAD, B. R. ; BROOK, M. A. ; SMITH, T. et al. : Controlling cellular activity by manipulating silicone surface roughness. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* Bd. 78, Nr. 2, S. 237–242, 2010
- [118] QIN, X. ; WAITE, J. H.: Exotic collagen gradients in the byssus of the mussel *Mytilus edulis*. *Journal of Experimental Biology* Bd. 198, Nr. 3, S. 633–644, 1995
- [119] QIU, Y. ; PARK, K. : Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* Bd. 53, Nr. 3, S. 321–339, 2001
- [120] REICH, U. ; FADEEVA, E. ; WARNECKE, A. et al. : Directing neuronal cell growth on implant material surfaces by microstructuring. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* Bd. 100, Nr. 4, S. 940–947, 2012
- [121] REZAC, M. E. ; JOHN, T. ; PFROMM, P. H.: Effect of copolymer composition on the solubility and diffusivity of water and methanol in a series of polyether amides. *Journal of Applied Polymer Science* Bd. 65, Nr. 10, S. 1983–1993, 1997
- [122] ROBB, W. L.: Thin silicone membranes – their permeation properties and some applications. *Annals of the New York Academy of Sciences* Bd. 146, Nr. 1, S. 119–137, 1968
- [123] ROCHE APPLIED SCIENCE: Cell Proliferation ELISA BrdU. Manual, 2011
- [124] ROCHE APPLIED SCIENCE: Cell Proliferation Reagent WST-1. Manual, 2011
- [125] ROTH, B. J.: The electrical conductivity of Tissues. In: BRONZINO, J. D. (Hrsg.): *The Biomedical Engineering Handbook*. 2. Aufl., CRC Press, Boca Raton, 1999
- [126] ROTH, J. : Funktionalisierung von Silikonoberflächen. Dissertation, Technische Universität Dresden, Dresden, 2008

- [127] ROTMANS, J. I. ; HEYLIGERS, J. M. M. ; STROES, E. S. G. ; PASTERKAMP, G. : Endothelial progenitor cell-seeded grafts: Rash and risky. *The Canadian Journal of Cardiology* Bd. 22, Nr. 13, S. 1113–1116, 2006
- [128] ROWLETT, K. ; SIMKISS, K. : Explanted embryo culture: In vitro and in ovo techniques for domestic fowl. *British Poultry Science* Bd. 28, Nr. 1, S. 91–101, 1987
- [129] RUBIN, P. A. ; POPHAM, J. K. ; BILYK, J. R. ; SHORE, J. W.: Comparison of fibrovascular ingrowth into hydroxyapatite and porous polyethylene orbital implants. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery* Bd. 10, Nr. 2, S. 96–103, 1994
- [130] SAHA, K. ; KEUNG, A. J. ; IRWIN, E. F. et al. : Substrate modulus directs neural stem cell behavior. *Biophysical Journal* Bd. 95, Nr. 9, S. 4426–4438, 2008
- [131] SAWAHATA, K. J. ; HARA, M. ; YASUNAGA, H. ; OSADA, Y. J.: Electrically controlled drug delivery system using polyelectrolyte. *Journal of Controlled Release* Bd. 14, Nr. 3, S. 253–262, 1990
- [132] SCHILD, H. G.: Poly(N-isopropylacrylamide): Experiment, theory and application. *Progress in Polymer Science* Bd. 17, Nr. 2, S. 163–249, 1992
- [133] SCHNEIDER, S. ; FEILEN, P. J. ; BRUNNENMEIER, F. et al. : Long-term graft function of adult rat and human islets encapsulated in novel alginate-based microcapsules after transplantation in immunocompetent diabetic mice. *Diabetes* Bd. 54, Nr. 3, S. 687–693, 2005
- [134] SHEIKH, Z. ; BROOKS, P. J. ; BARZILAY, O. ; FINE, N. ; GLOGAUER, M. : Macrophages foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials. *Materials* Bd. 8, Nr. 9, S. 5671–5701, 2015
- [135] SHI, J. ; ALVES, N. M. ; MANO, J. F.: Drug Release of pH/temperature-responsive calcium alginate/poly(N-isopropylacrylamide) semi-IPN beads. *Macromolecular Bioscience* Bd. 6, Nr. 5, S. 358–363, 2006
- [136] SHIMIZU, T. ; GODA, T. ; MINOURA, N. ; TAKAI, M. ; ISHIHARA, K. : Super-hydrophilic silicone hydrogels with interpenetrating poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) networks. *Biomaterials* Bd. 31, Nr. 12, S. 3274–3280, 2010
- [137] SLAUGHTER, B. V. ; KHURSHID, S. S. ; FISHER, O. Z. ; KHADEMHOSEINI, A. ; PEPAS, N. A.: Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced Materials* Bd. 21, Nr. 32–33, S. 3307–3329, 2009
- [138] SMITH, R. J. ; ATKINSON, R. E. ; JUPITER, J. B.: Silicone synovitis of the wrist. *The Journal of Hand Surgery* Bd. 10, Nr. 1, S. 47–60, 1985
- [139] SO, C.-S. : *Praktische EKG-Deutung*. 4. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2013
- [140] SOFOKLEOUS, P. ; STRIDE, E. ; EDIRISINGHE, M. : Preparation, characterization, and release of amoxicillin from electrospun fibrous wound dressing patches. *Pharmaceutical Research* Bd. 30, Nr. 7, S. 1926–1938, 2013

- [141] SPANEL-BOROWSKI, K. : The chick chorioallantoic membrane as test system for biocompatible materials. *Research in Experimental Medicine* Bd. 189, Nr. 1, S. 69–75, 1989
- [142] SPECTOR, M. : The concept of biocompatibility. In: *Comprehensive Biomaterials, Vol. 1*, Elsevier, Amsterdam, 2011
- [143] STERN, S. A.: The “barrer” permeability unit. *Journal of Polymer Science Part A-2: Polymer Physics* Bd. 6, Nr. 11, S. 1933–1934, 1968
- [144] STRATASYS: MSDS ABSplus/ P430 ABS Model/ M30 ABS Model. Datenblatt, 2013
- [145] STUDART, A. R. ; LIBANORI, R. ; ERB, R. M.: Functional gradients in biological composites. In: RUIZ-MOLINA, D. (Hrsg.) ; NOVIO, F. (Hrsg.) ; ROSCINI, C. (Hrsg.): *Bio- and bioinspired nanomaterials*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2014
- [146] SUSSMAN, C. (Hrsg.) ; BATES-JENSEN, B. M. (Hrsg.): *Wound care: A collaborative practice manual*. 3. Aufl., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore/ Philadelphia, 2007
- [147] TAN, Y. ; HOON, S. ; GUERETTE, P. A. et al. : Infiltration of chitin by protein coacervates defines the squid beak mechanical gradient. *Nature Chemical Biology* Bd. 11, Nr. 7, S. 488–495, 2015
- [148] THOMAS, P. C. ; HALTER, M. ; TONA, A. et al. : A noninvasive thin film sensor for monitoring oxygen tension during in vitro cell culture. *Analytical Chemistry* Bd. 81, Nr. 22, S. 9239–9246, 2009
- [149] THOMAS, S. ; HUGHES, G. ; FRAM, P. ; HALLETT, A. : An in-vitro comparison of the physical characteristics of hydrocolloids, hydrogels, foams, and alginate/cmc fibrous dressings. Bericht, Surgical Materials Testing Laboratory – Princess of Wales Hospital, Bridgend, 2004
- [150] TOEPKE, M. W. ; BEEBE, D. J.: PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications. *Lab on a Chip* Bd. 6, Nr. 12, S. 1484–1486, 2006
- [151] TRANSPARENCY MARKET RESEARCH: Implantable drug delivery devices market – global industry analysis, size, share, trends and forecast 2012-2018. Marktanalyse, 2013
- [152] TRUPP, S. ; ALBERTI, M. ; CAROFIGLIO, T. et al. : Development of pH-sensitive indicator dyes for the preparation of micro-patterned optical sensor layers. *Sensors and Actuators B: Chemical* Bd. 150, Nr. 1, S. 206–210, 2010
- [153] TSE, J. R. ; ENGLER, A. J.: Stiffness gradients mimicking in vivo tissue variation regulate mesenchymal stem cell fate. *PLoS ONE* Bd. 6, Nr. 1, Artikelnr. e15978, 2011
- [154] TURNER, D. C. ; FLIER, L. A. ; CARBONETTO, S. : Identification of a cell-surface protein involved in PC12 cell-substratum adhesion and neurite outgrowth on laminin and collagen. *The Journal of Neuroscience* Bd. 9, Nr. 9, S. 3287–3296, 1989
- [155] TURNER, J. S. ; CHENG, Y.-L. : Preparation of PDMS-PMAA interpenetrating polymer network membranes using the monomer immersion method. *Macromolecules* Bd. 33, Nr. 10, S. 3714–3718, 2000

- [156] UNIVERSITÄTSKLINIKUM HEIDELBERG: Neue Wundambulanz in der Universitäts-Hautklinik. Webseite (Pressemitteilung): [<http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Wund-und-Ulcusambulanz.135965.0.html>], Einstellung: 2014, aufgerufen Feb. 2015,
- [157] VALDES, T. I. ; KLUHE, U. ; KREUTZER, D. ; MOUSSY, F. : Ex ova chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for testing biosensors. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* Bd. 67, Nr. 1, S. 215–223, 2003
- [158] VALDES, T. I. ; KREUTZER, D. ; MOUSSY, F. : The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research* Bd. 62, Nr. 2, S. 273–282, 2002
- [159] VALENCIA-LAZCANO, A. A. ; ALONSO-RASGADO, T. ; BAYAT, A. : Characterisation of breast implant surfaces and correlation with fibroblast adhesion. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* Bd. 21, S. 133–148, 2013
- [160] VAN KOOTEN, T. G. ; VON RECUM, A. F.: Cell adhesion to textured silicone surfaces: The influence of time of adhesion and texture on focal contact and fibronectin fibril formation. *Tissue Engineering* Bd. 5, Nr. 3, S. 223–240, 1999
- [161] VAN WEZEL, A. L.: Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture. *Nature* Bd. 216, Nr. 5110, S. 64–65, 1967
- [162] VANNAH, W. M. ; CHILDRESS, D. S.: Indentor tests and finite element modeling of bulk muscular tissue in vivo. *Journal of Rehabilitation Research and Development* Bd. 33, Nr. 3, S. 239–252, 1996
- [163] VDE-DGBMT ; ACATECH: Bioimplantate – biologische, biologisierte und biofunktionalisierte Implantate. Positionspapier, 2011
- [164] VERMA, L. ; SAKIR, M. ; SINGH, N. ; GILHOTRA, R. M. ; MEHAN, S. : Development of phase change solutions for ophthalmic drug delivery based on ion activated and pH induced polymers. *International Journal Of Pharma Professional's Research* Bd. 1, Nr. 2, S. 127–134, 2010
- [165] VIJAYA BHASKAR, T. B. ; MA, A. N. L. N. Lendlein ; ROCH, T. : The interaction of human macrophage subsets with silicone as a biomaterial. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* Bd. 61, Nr. 2, S. 119–133, 2015
- [166] VITAGLIANO, V. ; LYONS, P. A.: Diffusion coefficients for aqueous solutions of sodium chloride and barium chloride. *Journal of the American Chemical Society* Bd. 78, Nr. 8, S. 1549–1552, 1956
- [167] VON HALLERN, B. : *Kompendium Wundbehandlung - Wirkungsweise und Indikationen von Wundbehandlungsprodukten*. 20. Aufl., Verlag für Medizinische Publikationen – Bernd von Hallern, Stade, 2014
- [168] VYMAZALOVÁ, Z. ; HRON, P. : Polymer composites silicone rubber-hydrogel. *Kautschuk und Gummi Kunststoffe* Bd. 54, Nr. 5, S. 230–234, 2001
- [169] WANG, C. ; ZHOU, B. ; TU, Y. et al. : Critical dipole length for the wetting transition due to collective water-dipoles interactions. *Scientific Reports* Bd. 2, Nr. 358, S. 1–6, 2012

- [170] WANG, P. ; DING, T. : Creep of electrical resistance under uniaxial pressures for carbon black-silicone rubber composite. *Journal of Materials Science* Bd. 45, Nr. 13, S. 3595–3601, 2010
- [171] WANG, R. Z. ; ADDADI, L. ; WEINER, S. : Design strategies of sea urchin teeth: Structure, composition and micromechanical relations to function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* Bd. 352, Nr. 1352, S. 469–480, 1997
- [172] WEI, H. ; CHUEH, B. ; WU, H. et al. : Particle sorting using a porous membrane in a microfluidic device. *Lab on a Chip* Bd. 11, Nr. 2, S. 238–245, 2011
- [173] WELLS, R. G.: The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology* Bd. 47, Nr. 4, S. 1394–1400, 2008
- [174] WENZEL, R. N.: Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Industrial & Engineering Chemistry* Bd. 28, Nr. 8, S. 988–994, 1936
- [175] WILLIAMS, D. F.: On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* Bd. 29, Nr. 20, S. 2941–2953, 2008
- [176] WILSON, C. J. ; CLEGG, R. E. ; LEAVESLEY, D. I. ; PEARCY, M. J.: Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: A review. *Tissue Engineering* Bd. 11, Nr. 1–2, S. 1–18, 2005
- [177] WINTERMANTEL, E. ; HA, S.-W. : *Medizintechnik: Life Science Engineering*. 5. Aufl., Springer, Berlin, 2009
- [178] WOLFBEIS, O. S. ; KOVÁCS, B. ; GOSWAMI, K. ; KLAINER, S. M.: Fiber-optic fluorescence carbon dioxide sensor for environmental monitoring. *Microchimica Acta* Bd. 129, Nr. 3–4, S. 181–188, 1998
- [179] WONG, I. ; HO, C.-M. : Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices. *Microfluidics and nanofluidics* Bd. 7, Nr. 3, S. 291–306, 2009
- [180] XIE, T. ; TJIN, S. C. ; YANG, Q. P. ; NG, S. L.: Effect of blood's velocity on blood resistivity. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement* Bd. 47, Nr. 5, S. 1197–1200, 1998
- [181] YEUNG, T. ; GEORGES, P. C. ; FLANAGAN, L. A. et al. : Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motility and the Cytoskeleton* Bd. 60, Nr. 1, S. 24–34, 2005
- [182] YODA, R. : Elastomers for biomedical applications. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition* Bd. 9, Nr. 6, S. 561–626, 1998
- [183] YUEN, P. K. ; SU, H. ; GORAL, V. N. ; FINK, K. A.: Three-dimensional interconnected microporous poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices. *Lab on a Chip* Bd. 11, Nr. 8, S. 1541–1544, 2011

- [184] ZARGAR, R. ; NOURMOHAMMADI, J. ; AMOABEDINY, G. : Preparation, characterization, and silanization of 3D microporous PDMS structure with properly sized pores for endothelial cell culture. *Biotechnology and Applied Biochemistry* Bd. 63, Nr. 2, S. 190–199, 2015
- [185] ZEKORN, T. ; SIEBERS, U. ; HORCHER, A. et al. : Alginate coating of islets of Langerhans: In vitro studies on a new method for microencapsulation for immuno-isolated transplantation. *Acta Diabetologica* Bd. 29, Nr. 1, S. 41–45, 1992
- [186] ZHAO, J. ; LUO, G. ; WU, J. ; XIA, H. : Preparation of microporous silicone rubber membrane with tunable pore size via solvent evaporation-induced phase separation. *ACS Applied Materials & Interfaces* Bd. 5, Nr. 6, S. 2040–2046, 2013
- [187] ZHAO, X. ; LI, L. ; LI, B. ; ZHANG, J. ; WANG, A. : Durable superhydrophobic/superoleophilic PDMS sponges and their applications in selective oil absorption and in plugging oil leakages. *Journal of Materials Chemistry A* Bd. 2, Nr. 43, S. 18281–18287, 2014
- [188] ZHOU, J. ; ELLIS, A. V. ; VOELCKER, N. H.: Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices. *Electrophoresis* Bd. 31, Nr. 1, S. 2–16, 2010
- [189] ZHU, F. ; KUHLMANN, M. K. ; KAYSEN, G. A. et al. : Segment-specific resistivity improves body fluid volume estimates from bioimpedance spectroscopy in hemodialysis patients. *Journal of Applied Physiology* Bd. 100, Nr. 2, S. 717–724, 2006
- [190] ZIMMERMANN, H. ; EHRHART, F. ; ZIMMERMANN, D. et al. : Hydrogel-based encapsulation of biological, functional tissue: Fundamentals, technologies and applications. *Applied Physics A* Bd. 89, Nr. 4, S. 909–922, 2007
- [191] ZIMMERMANN, H. ; WÄHLISCH, F. ; BAIER, C. et al. : Physical and biological properties of barium cross-linked alginate membranes. *Biomaterials* Bd. 28, Nr. 7, S. 1327–1345, 2007
- [192] ZIMMERMANN, U. ; THÜRMER, F. ; JORK, A. et al. : A novel class of amitogenic alginate microcapsules for long-term immunoisolated transplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences* Bd. 944, S. 199–215, 2001
- [193] ZINGER, O. ; ANSELME, K. ; DENZER, A. et al. : Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials* Bd. 25, Nr. 14, S. 2695–2711, 2004

Veröffentlichungen

BIERKANDT, K.; LIPPEK, J.; GEPP, M. M.; RUFF, R.; POPPENDIECK, W.; ZIMMERMANN, H.; HOFFMANN, K.-P.: Silicone-alginate-composite for cell based therapies: A novel silicone based implant material for immobilization of drug releasing cells. Abstract und Posterbeitrag anlässlich der BMT 2014 – 48. Jahrestagung der DGBMT, Hannover, 2014

BIERKANDT, K.; GEPP, M. M.; POPPENDIECK, W.; RUFF, R.; HOFFMANN, K.-P.; ZIMMERMANN, H.: A novel bioactive implant material based on a porous silicone-hydrogel-composite. Abstract und Posterbeitrag anlässlich der BMT 2013 – 47. Jahrestagung der DGBMT, Graz, 2013

HOFFMANN, K.-P.; **BIERKANDT, K.:** Materialien für die Medizintechnik. Eingeladener Vortrag anlässlich der MedTech Pharma 2012, Nürnberg, 2012

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich sehr bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Fuhr, Leiter des Fraunhofer-Instituts für Biomedizinische Technik (IBMT), bedanken. Er ermöglichte mir die Durchführung meiner Promotion und bot mir eine hervorragende fachliche Betreuung.

Bei Frau Prof. Dr. Engel vom Lehrstuhl für Biophysik an der Universität des Saarlandes bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Hoffmann, Leiter der Abteilung für Medizintechnik und Neuroprothetik am Fraunhofer-IBMT, danke ich für seine Unterstützung und den großen Spielraum zur freien Entfaltung meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Poppendieck, bis 2016 Leiter der Arbeitsgruppe Neuroprothetik am Fraunhofer-IBMT. Durch seine vielen wertvollen Anregungen und das geduldige Korrekturlesen trug er wesentlich zum Gelingen der Arbeit bei.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Kollegen und Kolleginnen des IBMT für die hervorragende Zusammenarbeit und freundliche Atmosphäre. Insbesondere danke ich den Mitarbeitern der Abteilung für Medizintechnik und Neuroprothetik, dass sie mich so vielfältig unterstützt haben. Dies betrifft sowohl ihre fachliche Kompetenz und anregenden Diskussionen, wie auch die kurzweiligen Momente, die den Spaß an der Arbeit nie verloren gehen ließen. Ganz herzlicher Dank gilt meinem lieben Bürokollegen und Mit-Doktoranden Alexander Brensing. Er ist ein unglaublich geduldiger Mensch und ein wunderbarer Gesprächspartner, der mich und meine Arbeit in Büro und Labor kritisch, aber stets konstruktiv begleitet hat. Des Weiteren danke ich Harald Frank und Tomasz Moszkowski für die Einführung in die Welt der Elektroden, meinem Praktikanten Jaryi Lippek für die Zuarbeit im Rahmen der Versuche zur Zelleinbettung und Sonja Pontius für ihr stets offenes Ohr. Mein Dank gilt weiterhin Michael Gepp, der mir die Zeitrafferaufnahmen an den BioStations ermöglichte, mich stets mit hochmolekularem Alginate versorgte und mit dem ich viele aufschlussreiche Gespräche führen durfte. Zudem danke ich Asgar Kreiner-Møller. Ohne ihn hätte ich keine Raman-mikroskopischen Aufnahmen. Auch bei Elmar Mohrhardt, der die HET-CAM-Eier in Kultur nahm und sie für mich umsetzte, bedanke ich mich. Frau Dr. Yvonne Kohl danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Zytotoxizitätstests.

Des Weiteren möchte ich mich bei Matthias Hagner vom Nanolabor der Universität Konstanz für die Anfertigung der REM-Bilder von Gradienten- und Mikroträgerkompositen, sowie für die freundliche Aufnahme in die Labore bedanken. Letzteres gilt auch für Jan Schmidt vom Lehrstuhl für Ultrakurzzeitphysik und Photonik, sowie für Herrn Dr. Michael Laumann und Lauretta Nejedli vom Elektronenmikroskopie-Center der Universität Konstanz.

Darüber hinaus gilt mein Dank meinen Eltern, die mich während der Zeit meines Studiums und der Promotion immer unterstützt haben.

Meinem Mann Jens danke ich von Herzen für seine Liebe, Geduld und Unterstützung in allen Lebenslagen. Zusammen mit unseren drei Kindern Linus, Justus und Lisa gibt er mir immer wieder Rückhalt, Zuversicht und Freude.