



---

**Funktionalisierung von Titan(dioxid)oberflächen mit kovalent  
gebundenem und in Depots eingebrachtem Wirkstoff  
für den Blutkontakt**

---

**Dissertation**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**David Tebbe**

aus

München

Würzburg 2007

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Wir lassen nie vom Suchen ab,  
und doch, am Ende allen unseren Suchens,  
sind wir am Ausgangspunkt zurück  
und werden diesen Ort zum ersten Mal erfassen.

(T.S. Eliot)

Gesundheit ist mehr als nur die Abwesenheit von Krankheit.  
Voller Freude, Liebe und Begeisterung zu sein – das ist vollständige Gesundheit.

(... für meine Zwillingsschwester)

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>Kenntnisstand.....</b>  | <b>5</b>  |
| 2.1      | Biokompatibilität.....   | 5         |
| 2.2      | Titan als Biomaterial.....   | 8         |
| 2.3      | Die Hämostase (Blutgerinnung).....                                     | 10        |
| 2.3.1    | Vaskuläre Hämostase .....  | 10        |
| 2.3.2    | Zelluläre Hämostase .....  | 10        |
| 2.3.3    | Plasmatische Hämostase .....   | 11        |
| 2.4      | Heparin.....   | 14        |
| 2.4.1    | Struktur und Wirkung .....   | 14        |
| 2.4.2    | Quantifizierung.....   | 15        |
| 2.4.3    | Bestimmung der Wirksamkeit .....                                       | 16        |
| 2.5      | Immobilisierung von Antikoagulantien auf Oberflächen.....              | 17        |
| 2.5.1    | Überblick.....   | 17        |
| 2.5.2    | Quantitative Bestimmung der immobilisierten Aminogruppen .....         | 20        |
| 2.5.3    | Kopplung mit Carbodiimiden.....  | 21        |
| 2.6      | Wirkstoffreisetzende nanoporöse Depots.....                            | 22        |
| 2.6.1    | Überblick.....   | 22        |
| 2.6.2    | Bestimmung der Porosität .....   | 23        |
| 2.6.3    | Diffusionskinetik nach Higuchi .....                                   | 24        |
| 2.7      | Sol-Gel-Prozeß .....   | 25        |
| 2.7.1    | Überblick.....   | 25        |
| 2.7.2    | Methacryloxypropyltrimethoxysilan.....                                 | 27        |
| 2.7.3    | Radikalische Polymerisation.....                                       | 29        |
| 2.7.4    | Rotationsbeschichtung (Spin-Coating) .....                             | 30        |
| 2.8      | QCM-D Methode.....   | 31        |
| <b>3</b> | <b>Vorbehandlung von Titan zur kovalenten Wirkstoffanbindung .....</b> | <b>35</b> |
| 3.1      | Erzeugung definierter Titandioxid-Schichten auf Titan .....            | 35        |
| 3.1.1    | Anodische Oxidation .....  | 36        |
| 3.1.2    | Thermische Oxidation .....   | 37        |
| 3.1.3    | PVD (Physical Vapour Deposition) .....                                 | 38        |
| 3.1.4    | Sol-Gel-Prozeß .....   | 39        |
| 3.2      | Modifikation der TiO <sub>2</sub> -Schichten .....                     | 40        |
| 3.3      | Topographie bzw. Rauigkeit der TiO <sub>2</sub> -Schichten .....       | 42        |
| 3.4      | Quantifizierung der immobilisierten Haftvermittler .....               | 44        |
| 3.5      | Ausblick.....  | 47        |
| <b>4</b> | <b>Kovalente Immobilisierung von Heparin .....</b>                     | <b>48</b> |
| 4.1      | TiO <sub>2</sub> -Pulver als Substrat.....                             | 48        |
| 4.2      | Quantifizierung der immobilisierten Haftvermittler .....               | 50        |
| 4.3      | Quantifizierung des Heparins .....                                     | 52        |
| 4.4      | Hydrolyse des immobilisierten Heparins .....                           | 53        |
| 4.5      | Reaktionskontrolle durch das Zetapotential .....                       | 54        |
| 4.6      | RAMAN-Spektroskopie.....   | 55        |
| 4.7      | Wirksamkeitsbestimmung von Heparin .....                               | 56        |
| 4.8      | Heparinisierung planer Oberflächen .....                               | 58        |
| 4.9      | QCM-D Messungen.....   | 59        |
| 4.10     | Ausblick.....  | 63        |

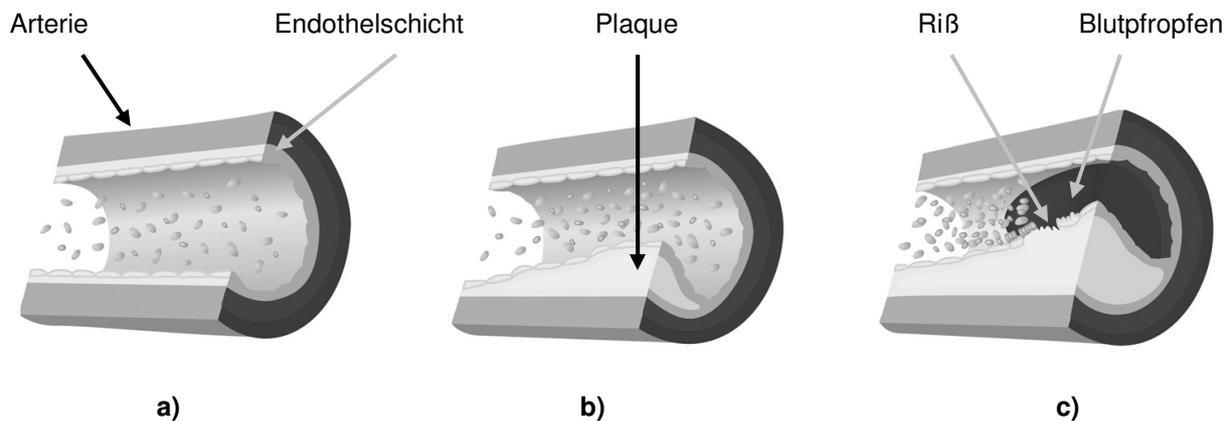
|          |   |            |
|----------|---|------------|
| <b>5</b> | <b>Nanoporöse Wirkstoffdepots .....</b>   | <b>64</b>  |
| 5.1      | Herstellung von P-MA-PS Volumen-Wirkstoffdepots.....                                      | 64         |
| 5.2      | Photopolymerisation .....   | 66         |
| 5.3      | Bestimmung des Polymerisationsgrades .....  | 67         |
| 5.4      | Porosität der Matrix.....   | 68         |
| 5.5      | Heparin-Freisetzung .....   | 70         |
| 5.6      | Degradation der anorganischen Matrix .....  | 75         |
| 5.7      | Wirksamkeit des ausdiffundierten Heparins.....  | 77         |
| 5.8      | Herstellung definierter MA-PS-Beschichtungen auf Al-/TiO <sub>2</sub> -Folie.....         | 77         |
| 5.9      | Ausblick.....   | 80         |
| <b>6</b> | <b>Zusammenfassung/Summary .....</b>  | <b>81</b>  |
| <b>7</b> | <b>Experimentalteil.....</b>  | <b>86</b>  |
| 7.1      | Reagenzien .....  | 86         |
| 7.2      | Vorbehandlung von Titan zur Wirkstoffanbindung.....                                       | 87         |
| 7.2.1    | <i>Polieren der cp-Titanplättchen .....</i>   | <i>87</i>  |
| 7.2.2    | <i>Anodische Oxidation .....</i>  | <i>87</i>  |
| 7.2.3    | <i>Thermische Oxidation .....</i>   | <i>88</i>  |
| 7.2.4    | <i>PVD (Physical Vapour Deposition/Physikalische Gasphasenabscheidung) .....</i>          | <i>88</i>  |
| 7.2.5    | <i>TiO<sub>2</sub>-Schichten über den Sol-Gel-Prozeß .....</i>                            | <i>89</i>  |
| 7.2.6    | <i>Funktionalisierung der TiO<sub>2</sub>-Oberflächen mit Haftvermittlern .....</i>       | <i>89</i>  |
| 7.3      | <b>Kovalente Immobilisierung von Heparin.....</b>   | <b>89</b>  |
| 7.3.1    | <i>Eigenschaften des TiO<sub>2</sub>-Pulvers (Anatas) .....</i>                           | <i>89</i>  |
| 7.3.2    | <i>Funktionalisierung von TiO<sub>2</sub>-Pulver mit APMS, Di- und Triamino-APMS.....</i> | <i>90</i>  |
| 7.3.3    | <i>Immobilisierung von Heparin mit EDC &amp; NHS.....</i>                                 | <i>90</i>  |
| 7.3.4    | <i>Hydrolysestabilität des gebundenen Heparins.....</i>                                   | <i>90</i>  |
| 7.3.5    | <i>Übertragbarkeit der Heparinisierung von Pulvern auf plane Oberflächen.....</i>         | <i>91</i>  |
| 7.3.6    | <i>QCM-D Messungen .....</i>  | <i>91</i>  |
| 7.4      | <b>Nanoporöse Wirkstoffdepots.....</b>  | <b>92</b>  |
| 7.4.1    | <i>Herstellung von nanoporösen Hybrid-Wirkstoffdepots (P-MA-PS).....</i>                  | <i>92</i>  |
| 7.4.2    | <i>Ermittlung des Polymerisationsgrades .....</i>   | <i>93</i>  |
| 7.4.3    | <i>Porosität der Matrix.....</i>  | <i>94</i>  |
| 7.4.4    | <i>Kumulative Heparin-Freisetzung .....</i>   | <i>94</i>  |
| 7.4.5    | <i>Degradation der Matrix .....</i>   | <i>94</i>  |
| 7.4.6    | <i>Herstellung dünner Schichten auf Al-/TiO<sub>2</sub>-Folie.....</i>                    | <i>95</i>  |
| 7.5      | <b>Ninhydrinreaktion.....</b>   | <b>96</b>  |
| 7.6      | <b>Toluidinblautest.....</b>  | <b>98</b>  |
| 7.7      | <b>Bestimmung der Wirksamkeit von Heparin.....</b>  | <b>99</b>  |
| <b>8</b> | <b>Charakterisierung.....</b>   | <b>103</b> |
| 8.1      | <b>Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....</b>  | <b>103</b> |
| 8.2      | <b>Rasterkraftmikroskopie (AFM).....</b>  | <b>103</b> |
| 8.3      | <b>Particle Sizer .....</b>   | <b>103</b> |
| 8.4      | <b>Zetapotentialmessungen .....</b>   | <b>104</b> |
| 8.5      | <b>FT-IR-Spektroskopie .....</b>  | <b>106</b> |
| 8.6      | <b>Mikro-RAMAN-Spektroskopie.....</b>   | <b>107</b> |
| 8.7      | <b>XRD .....</b>  | <b>107</b> |
| 8.8      | <b>UV-VIS-Spektroskopie .....</b>   | <b>107</b> |
| <b>9</b> | <b>Literatur.....</b>   | <b>108</b> |

**Abkürzungsverzeichnis**

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| AA                                 | Adipinsäure   |
| AFM                                | Rasterkraftmikroskopie  |
| APMS                               | 3-Aminopropyltrimethoxysilan  |
| CMC                                | <i>N</i> -Cyclohexyl- <i>N'</i> -(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-methyl- <i>p</i> -toluolsulfat |
| cp                                 | engl.: commercially pure (entspricht hohem Reinheitsgrad)                                       |
| Diamino-APMS                       | <i>N</i> -(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan   |
| DITC                               | 1,4-Phenylendiisothiocyanat   |
| DMSO                               | Dimethylsulfoxid  |
| EDC                                | <i>N</i> -3-Dimethylaminopropyl- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid Hydrochlorid                       |
| Et                                 | Ethylrest (-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )   |
| HCII                               | Heparin Kofaktor II   |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> | bidestilliertes Wasser  |
| Hep                                | Heparin   |
| IE                                 | Internationale Einheit (Aktivität)  |
| MA-PS                              | Methacryloxypropyltrimethoxypolysilsesquioxan   |
| MAS                                | Methacryloxypropyltrimethoxysilan   |
| MES                                | 2-Morpholinoethansulfonsäure Monohydrat   |
| Me                                 | Methylrest (-CH <sub>3</sub> )  |
| NHS                                | <i>N</i> -Hydroxysuccinimid   |
| PBS                                | Phosphat-gepufferte Saline  |
| PEO                                | Polyethylenoxid   |
| P-MA-PS                            | Polymethacryloxypropyltrimethoxypolysilsesquioxan   |
| PVD                                | Physical Vapor Deposition   |
| QCM-D                              | Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring   |
| REM                                | Rasterelektronenmikroskopie   |
| RT                                 | Raumtemperatur  |
| sccm                               | standard cm <sup>3</sup> (Gasflußrate)  |
| Triamino-APMS                      | <i>N</i> <sup>1</sup> -[3-(Trimethoxysilyl)-propyl]diethylentriamin                             |
| U                                  | Unit (Aktivität)  |
| Vol.-%                             | Volumenprozent  |
| wt%                                | Gewichtsprozent   |

# 1 Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stehen an erster Stelle der Todesursachen in Europa und in den Vereinigten Staaten, weit vor Krebserkrankungen und anderen Leiden.<sup>[1]</sup> Krankhafte arteriosklerotische Veränderungen der Gefäße, umgangssprachlich auch Arterienverkalkung genannt, spielen vor allem an der Hauptschlagader, den Herzkranzgefäßen, im Gehirn und in den Beinen eine Rolle; hierunter wird eine Systemerkrankung der Schlagadern (Arterien) verstanden, die zur Ablagerung von Blutfetten, Thromben, Bindegewebe und Kalk in den Gefäßwänden führt. Besonders kritisch wirken sich die Gefäßveränderungen am Herzen aus, denn hier kann es zum Gefäßverschluß (Infarkt) kommen (Abb. 1.1).

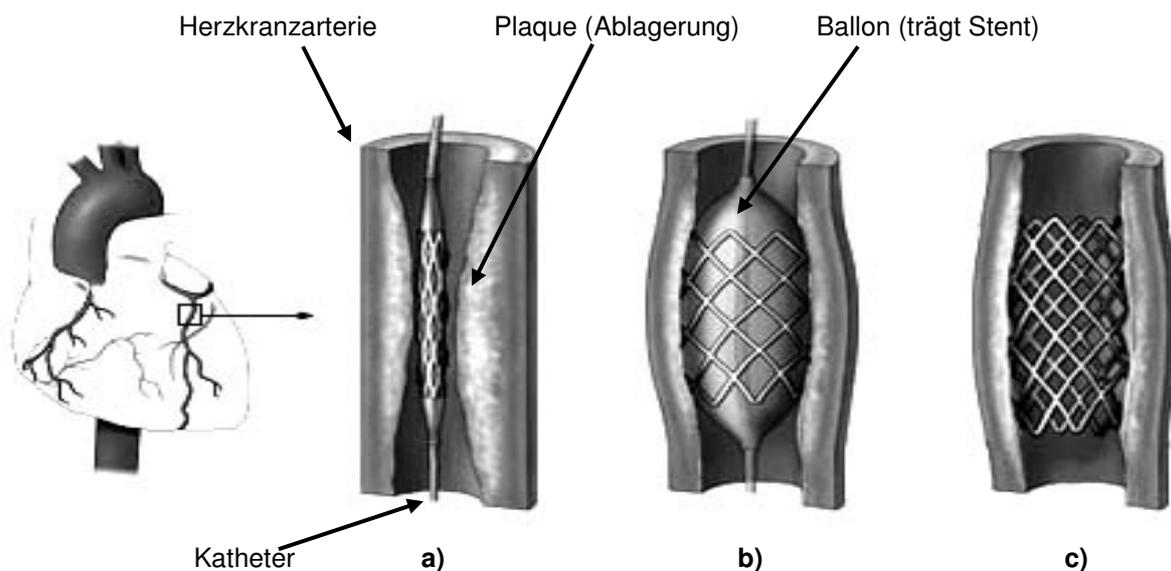


**Abb. 1.1:** Schematischer Ablauf des Gefäßinfarktes a) Ausschnitt einer gesunden Arterie b) in die Endothelschicht lagern sich Cholesterin bzw. Makrophagen und folglich Muskelzellen, Bindegewebe und Kalk ein, es entsteht ein Plaque c) dieser bricht auf, es bildet sich ein Blutpfropfen, der den Infarkt herbeiführt

Mit zunehmendem Alter lagern sich begünstigt durch genetische Prädisposition, Streß, falsche Ernährung, Alkoholkonsum, Rauchen und ausgesparte körperliche Ertüchtigung, Fette (v.a. LDL-Cholesterin) in die Gefäßinnenwand (Endothelwand) ein. Langsam entwickelt das Endothel eine Funktionsstörung, indem seine Fähigkeit nachläßt, den Gefäßdurchmesser an den Blutdruck anzupassen. Als Folge der „Endothelverfettung“ wandern Immunzellen (Makrophagen) in das Endothel ein und nehmen dort in grossen Mengen Cholesterin auf. Dadurch verändern sie sich und werden zu aufgeblähten Schaumzellen. Ihre Zahl nimmt ständig zu, was dazu beiträgt, dass eine chronische Entzündung bestehen bleibt. Um die Gefäßwand an der entzündlichen Verengung zu glätten, bilden Muskelzellen eine schützende Schicht. Diese wird von den Schaumzellen wieder aufgeweicht, indem diese verschiedene Botenstoffe (Entzündungsmediatoren) freisetzen. Im fortgeschrittenen Stadium kommt es schließlich zum Verfall der Endothelzellen und zu starker Vermehrung des Bindegewebes

(Sklerose). Die Muskelzellen der Gefäßwand sterben ab und es wird zunehmend Kalk eingelagert. Hierdurch wird das Gefäß starr und kann sich den Pulsschlägen nicht mehr anpassen, als Folge davon steigt der Blutdruck. Irgendwann wird die Gefäßwandveränderung (Plaque) instabil und bricht auf. An dieser Stelle bildet sich ein Blutpfropf, der das Gefäß verschließt, es kommt zum Infarkt. Es kann auch zu dauerhaften Wandausbuchtungen des Blutgefäßes (Aneurysmen) kommen, die aufreißen und innere Blutungen verursachen können.

Konventionelle Therapieformen wie Bypassoperationen oder chirurgische Eingriffe zur Entfernung des Aneurysmas belasten den Organismus des Patienten stark.<sup>[2]</sup> In den letzten 30 Jahren wurden erhebliche Fortschritte in der Behandlung dieser Erkrankungen erzielt, ermöglicht durch große Verbesserung in der Diagnostik sowie der minimalinvasiven Implantation von Gefäßstützen (engl.: Stent), die direkt in das akut verstopfte Gefäß implantiert werden (s. Abb. 1.2).



**Abb. 1.2:** Schematischer Ablauf des Koronaren Stenting a) In die durch Plaque verengte Herzkranzarterie wird mithilfe eines Katheters ein Stent eingeführt, der auf einem aufspreizbaren Ballon sitzt b) Der Ballon und somit der Stent werden dilatiert c) Nach dem Stenting wird der Katheter mit dem Ballon wieder entfernt und der Stent verbleibt als dauerhafte Gefäßstütze in der Arterie

Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie die Blutgefäße erhält, eine myokardiale Ischämie (Minderdurchblutung des Herzmuskels) verringert und so die Lebensqualität und Lebenserwartung von Patienten mit Herzerkrankungen verbessert. Stents werden mittels Ballondilatation (Ballondehnung) implantiert. Hierbei werden sie über einen Katheter an die betreffende Engstelle im Gefäß geführt und dort durch Aufblasen eines Ballons an die Gefäßwand gedrückt. Während dieses Prozesses wirken Drücke von bis zu 13 bar auf den

Stent und es kann zu mechanisch induzierten Verletzungen der Endothelschicht kommen, welche die Innenseite des Gefäßes auskleidet. Dies würde zum Kontakt von Blut mit der das Gefäß umgebenden Kollagenschicht und somit zum Auslösen der Gerinnungskaskade führen. Ein weiteres Risiko besteht darin, dass das Stentmaterial als Fremdkörper im Gefäß erkannt wird. Dies würde zur Thrombusbildung und dem verstärktem Wachstum glatter Muskelzellen und damit letztendlich zu einer Restenose (Wiederverengung des Gefäßes) führen.<sup>[3]</sup> Mit einer Inzidenzrate von 20-50% stellen Restenosen die Hauptkomplikation bei Stentimplantationen dar.<sup>[4]</sup> Um diese Effekte zu vermeiden werden während der Heilungsphase aggressive Antikoagulantien systemisch verabreicht, die allerdings den ganzen Körper belasten und das Auftreten von Komplikationen bei Blutungen erhöhen können. Um die Belastung des Patienten auf das kleinstmögliche Maß zu reduzieren, ist die Entwicklung von Stents mit einer nicht-thrombogenen Oberfläche von großem Interesse.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Einstellung antithrombogener Eigenschaften der Titan-Implantatoberfläche durch Modifizierung ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften. Hierzu sollte einerseits eine kovalente Bindung von gerinnungshemmenden Glycosaminoglycan wie beispielsweise Heparin an die Oberfläche erfolgen. Die Anbindung des antikoagulanten Wirkstoffs sollte über Haftvermittler (Spacer) stattfinden, die in ihrer Länge variieren, wodurch die biologische Wirksamkeit des Glycosaminoglycans beeinflusst werden kann.<sup>[5]</sup> Ebenso wurde der Einfluß von Herstellungsbedingungen der primären TiO<sub>2</sub>-Schicht, etwa durch anodische oder thermische Oxidation sowie durch PVD- und Sol-Gel-Beschichtung, auf die Wirksamkeit der Haftvermittleranbindung untersucht. Desweiteren sollte Heparin in nanoporöse Wirkstoffdepots eingebettet werden, mit denen sich das Titan-Substrat beschichten läßt. Über die Einstellung der Porosität und des Vernetzungsgrads dieser anorganischen/organischen Hybrid-Matrices sollte das Diffusionsverhalten des Wirkstoffs aus dem Depot zu regulieren sein. Dies würde die Möglichkeit eröffnen, den antikoagulantem Wirkstoff je nach Anforderungen des Einsatzortes über einen definierten Zeitraum hinweg kontrolliert aus der Implantatoberfläche freizusetzen. Als Bulkmaterial (Substrat) wurden sowohl cp-Titanplättchen als auch TiO<sub>2</sub>-Pulver (als Modell für die oxidierte Titanoberfläche) verwendet. Die Charakterisierung der modifizierten Werkstoffe erfolgte über das Zetapotential der Oberfläche im Elektrolytkontakt, UV-VIS-, Mikro-RAMAN- bzw. FT-IR-Spektrometrie und XR-Diffraktometrie. Die Adsorption von Proteinen wurde mit der QCM-D-Technik untersucht. Als Modellprotein wurde Fibrinogen gewählt. Das Plasmaprotein löst durch Konformationsänderungen bei der Adsorption auf künstlichen

Werkstoffoberflächen die Thrombozytenadhäsion und damit die Blutgerinnung (Hämostase) aus. Die Menge und die Wirksamkeit des eingesetzten Heparins wurden photospektrometrisch über den Toluidinblautest bzw. das Substrat ChromozymTH<sup>®</sup> bestimmt.

## 2 Kenntnisstand

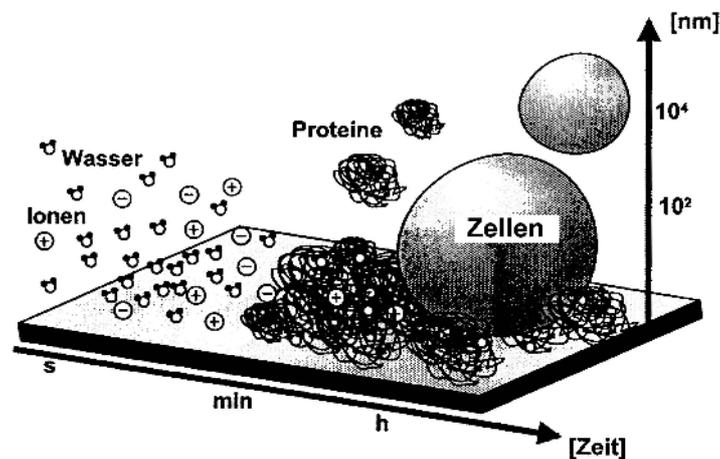
### 2.1 Biokompatibilität

Biomaterialien, die mit Hart- oder Weichgewebe oder Blut in Kontakt stehen, fordern Bioverträglichkeit, mechanische Festigkeit, Korrosions-, Degradations-, Auslaug-, Abrieb-, und Verschleißfestigkeit, Verarbeit- und Sterilisierbarkeit. Bis auf die Sterilisation, die durch Vorschriften geregelt ist,<sup>[6]</sup> sind alle anderen interpretierbar, etwa durch die Funktion, den Implantationsort und durch die Zeitdauer des Einsatzes.

In den Körper eingebrachte Implantate sollen in diesem Funktionen übernehmen, die sonst nicht mehr wahrgenommen werden können. Diese Übernahme von Funktionen des biologischen Systems wird als *Biofunktionalität* bezeichnet. Jedes Implantat ruft an der Grenzfläche mit dem umgebenden Gewebe eine Reaktion hervor. Die Auswirkungen auf den Körper werden mit dem Begriff *Biokompatibilität* beschrieben. Darunter versteht man den Grad der Gewebeverträglichkeit eines in ein lebendes biologisches System eingebrachten oder mit seiner Oberfläche in Kontakt tretenden nicht biologischen bzw. technischen Werkstoffs oder Medizinproduktes.<sup>[7]</sup> Dabei werden die Strukturkompatibilität, die sich auf die mechanischen Eigenschaften bezieht, und die Oberflächenkompatibilität, die die chemischen, physikalischen, biologischen und morphologischen Oberflächeneigenschaften des Implantats beeinflussen, betrachtet. Ein Material wird als *inkompatibel* bezeichnet, wenn eine Freisetzung von Substanzen in toxischen Konzentrationen oder von Antigenen vorliegt. Diese können Immunreaktionen hervorrufen, welche Allergien, Entzündungen und mögliche Abstoßung bedingen. Die Bezeichnung *biokompatibel* bedeutet, dass bei Freisetzung von Substanzen keine toxische Konzentration erreicht wird. Weiterhin dürfen nur Reaktionen wie die Einkapselung in nicht adhärentes Bindegewebe oder auch schwache Fremdkörperreaktionen und die Bildung von Riesenzellen auftreten. Wenn keine toxischen Substanzen freigesetzt werden wird das Material als *bioinert* bezeichnet. Falls eine positive Wechselwirkung mit Gewebedifferenzierung induziert wird, spricht man von *bioaktiven* Substanzen.<sup>[8]</sup> Für eine weitere Gruppe, die nicht im Körper verbleiben sollen, wird von *degradabel* gesprochen, wenn das Gewebe nach einer gewissen Zeit das Implantat ersetzt, wobei in diesem Fall die Zellanheftung gewünscht ist.<sup>[9]</sup> Von *Biofunktionalisierung* wird häufig gesprochen, wenn die Oberfläche chemisch bzw. biochemisch modifiziert wird. Dies

wird meist durchgeführt, um eine bessere Verträglichkeit bzw. ein besseres Einwachsen zu gewährleisten. Dabei können bioaktive Proteine auf bioinerten Oberflächen angekoppelt werden, um die Verträglichkeit zu verbessern.<sup>[10]</sup>

Wird ein Implantat in ein biologisches System eingebracht, adsorbieren die Bestandteile der angrenzenden flüssigen Phase (z.B. im Blutkontakt) auf die Implantatoberfläche, es bildet sich ein sogenannter Biofilm aus. Eine wichtige Frage ist dabei, welche Prozesse sich direkt nach der Implantation eines Materials im Körper abspielen, da diese die weitere Entwicklung der Grenzfläche Implantat/Körper vorprogrammieren. Die Biofilmbildung läuft in mehreren Schritten ab. In Abb. 2.1 ist die zeitliche Entwicklung zusammen mit dem Dickenwachstum der Schicht dargestellt.

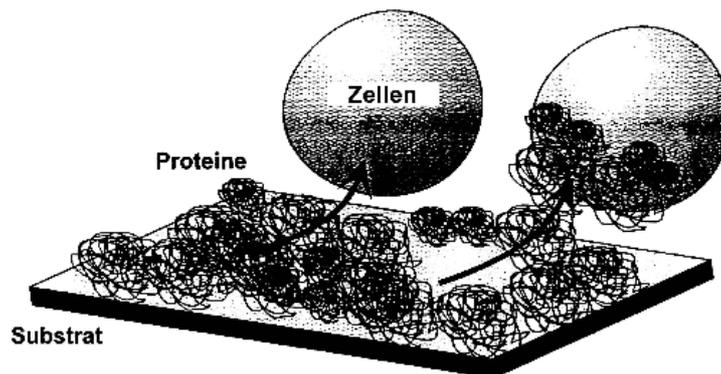


**Abb. 2.1:** Wechselwirkungen zwischen Oberfläche und überstehender Lösung bei der Biofilmbildung<sup>[11]</sup>

Bei der Biofilmbildung können verschiedene Phasen unterschieden werden. An erster Stelle haben Biomaterialien im Körper zunächst und v.a. Kontakt mit extrazellulären Elektrolyten. Die durch Implantate im Hart- oder Weichgewebe aktivierten Faktoren des Komplements sind chemotaktisch wirksam und locken zur Abwehr des eingedrungenen Fremdkörpers neutrophile Granulozyten an den Implantationsort. Die Mechanismen der Kaskadenaktivierung nach Kontakt der Faktoren mit den Biomaterialoberflächen sind im Einzelnen nicht aufgeklärt. Denkbar sind der Ladungstransport zwischen Proteinen und dem Biomaterial<sup>[12]</sup> sowie Veränderungen von Proteinen im elektrischen Feld der Oberfläche.<sup>[13]</sup> Im darauf folgenden Schritt tritt die Adsorption von Makromolekülen wie Proteinen auf die Oberfläche auf. Der pH-Wert beeinflusst die Oberflächenladung und damit die Adsorption der Proteine.<sup>[14]</sup> In einem dynamischen Gleichgewicht bei reversibler Adsorption besteht ein ständiger Austausch zwischen adsorbierten Proteinen und Proteinen in Lösung. Dieser Austausch und die Einstellung des Gleichgewichts kann im Zeitrahmen von Minuten bis hin

zu Stunden oder Tagen stattfinden. Weiterhin können irreversibel fixierte Proteine auf der Oberfläche vorliegen. Die Oberflächenmorphologie und die chemische Zusammensetzung beeinflussen die Menge des Adsorbates, die Struktur und die Eigenschaften des adsorbierten Proteinfilms. Durch die Konformationsänderung der Proteine kann der Verlauf der Proteinadsorption und der Zellanhaftung beeinflusst werden und so die weitere Entwicklung des Biofilms.

Als zweiter Schritt werden durch die Regulierung von extrazellulären Matrixproteinen wie *Fibrinogen*, Fibrin und anderen Glykoproteinen Zellen an die Proteinschicht adsorbiert.<sup>[15]</sup> Die Adhäsion ist abhängig von der jeweiligen Zelle, der Oberfläche und dem umgebenden Milieu.<sup>[16]</sup> Auch hier handelt es sich um einen nicht statischen Zustand, der von Adsorption und Desorption geprägt ist, wobei bei der Desorption auch Teile der Proteinschicht mitgerissen werden können (Abb. 2.2).



**Abb. 2.2:** Vorgänge bei der Desorption von Teilen des Biofilms (Zellen und mit Protein behaftete Zellen)<sup>[11]</sup>

Dilatierbare Gefäßstützen, die im permanenten Blutkontakt stehen, müssen neben allgemeinen Anforderungen wie ausreichenden mechanischen und elektrochemischen Eigenschaften (statische und dynamische Festigkeit, axiale Flexibilität, Kaltumformbarkeit und Korrosionsbeständigkeit) ebenfalls eine anwendungsbezogene Biokompatibilität besitzen. Primär müssen die Gefäßstützen hämokompatibel sein, dürfen also die Blutgerinnung nicht auslösen. Dies wird von Materialien erreicht deren Oberfläche weder durch eine Konformationsänderung an adsorbierten Plasmaproteinen die Aggregation von Thrombozyten fördert, noch durch Aktivierung des Hagemann Faktors (Faktor XII) die Gerinnungskaskade auslöst.<sup>[17]</sup> Sekundär sollte eine neointimale Proliferation vermieden werden. Hierbei handelt es sich um Wucherungen, die aufgrund eines verstärkten Wachstums glatter Muskelzellen an

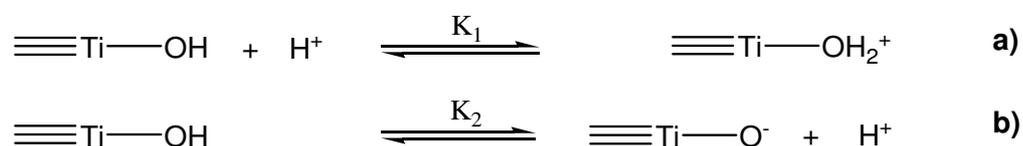
der Gefäßinnenwand entstehen und zu einer Restenose (Wiederverengung) des Gefäßes führen.

## 2.2 Titan als Biomaterial

Der Werkstoff Titan hat sich in den letzten Jahrzehnten aufgrund seiner ausgezeichneten Materialeigenschaften bei medizinischen Anwendungen als Implantatmaterial bewährt und findet immer häufiger Einsatz. Nach jeweiliger spezifischer Anforderung wird es im medizinischen Sektor als Reinmaterial oder als Legierung eingesetzt, wobei von letzteren die Ti-6wt%Al-4wt%V-Legierung die bekannteste darstellt.<sup>[18]</sup> Durch folgende Eigenschaften gegenüber anderen Implantatwerkstoffen hebt sich Titan hervor:<sup>[19]</sup>

- Geringes spezifisches Gewicht ( $4.5 \text{ g/cm}^3$ )
- Sehr niedrige Wärmeleitfähigkeit ( $22 \text{ W/mK}$ )
- Günstiges Verhältnis des Elastizitätsmoduls ( $100 \text{ Gpa}$ ) zum spezifischen Gewicht
- Relativ hohe Festigkeit, die bei Titanlegierungen noch gesteigert werden kann
- Ausgezeichnete Korrosionsbeständigkeit gegenüber aggressiven Medien und die damit direkt zusammenhängende Biokompatibilität

Aufgrund der ca. 10 nm dicken passivierenden Oxidschicht, die Titan beim Kontakt mit Sauerstoff spontan ausbildet, besitzt dieser Werkstoff seine ausgezeichnete Gewebeverträglichkeit. Wird diese Passivschicht verletzt, so bildet sie sich unverzüglich nach.<sup>[20]</sup>



**Reaktionsgleichung 2.1:** Amphoterer Verhalten von hydroxyliertem  $\text{TiO}_2$  in wässrigem Medium. Die Gleichgewichts-Reaktionspfeile sagen aus, dass sich Hin- und Rückreaktion in einem dynamischen Gleichgewicht befinden: a) Formale Reaktion als Base durch Protonenaufnahme b) Formale Reaktion als Säure durch Protonenabgabe

Im wässrigen Milieu liegt die Oberfläche dieser Oxidschicht hydroxyliert vor und reagiert amphoter, d.h. sowohl als Säure als auch als Base. Für die Protonierung und Deprotonierung

der Oberflächen-Hydroxylgruppen lassen sich entsprechende Assoziations- bzw. Dissoziations-Reaktionen (Reaktionsgleichung 2.1) formulieren. Die Gleichgewichtskonstanten  $K_1$  und  $K_2$  können entsprechend dem Massenwirkungsgesetz beschrieben werden (Formel 2.1):

$$K_1 = \frac{[Ti-OH_2^+]}{[Ti-OH][H^+]} \quad \text{und} \quad K_2 = \frac{[Ti-O^-][H^+]}{[Ti-OH]} \quad \text{Formel 2.1}$$

Die Säure-Base-Reaktionen (Reaktionsgleichung 2.1) erzeugen eine Oberflächenladung, die vom pH-Wert abhängig ist. Der Punkt, an dem die Oberfläche ungeladen ist (Ti-OH) bzw. die Anzahl positiver ( $Ti-OH_2^+$ ) und negativer Ladungen ( $Ti-O^-$ ) gleich groß ist, wird isoelektrischer Punkt oder  $pH_{pzc}$  ( $pzc = \text{point of zero charge}$ ) genannt. Bei Titandioxid liegt dieser Punkt zwischen  $pH = 4.5-6.5$ . Oberhalb des  $pH_{pzc}$  ist die Oberfläche negativ, unterhalb positiv geladen. Aus diesem Grund ist die Oberfläche von Titan unter physiologischem pH-Wert von 7.4 negativ geladen. Bei Implantaten im Blutkontakt erweist sich dies aber als problematisch, da durch den Kontakt von Blut mit negativ geladenen Oberflächen das intrinsische System aktiviert und somit die Gerinnungskaskade ausgelöst werden kann.<sup>[21]</sup> Durch Beschichtung der Oberfläche lässt sich dies aber verhindern. Somit wird die Entwicklung unterschiedlicher Ti-Oberflächen für biomedizinische Zwecke, wie Knochenersatzimplantate, vaskuläre Stents und Katheter möglich.<sup>[21]</sup>

Darüber hinaus besitzt Titan eine hohe Affinität zu Sauerstoff, was neben der Ausbildung der passivierenden Oxidschicht auch dazu führt, dass korrodiertes Titan im Körper nie in ionischer Form vorliegt, sondern stets als stabiles Hydroxid  $Ti(OH)_4$ . Im Gegensatz zu den Metallen Ni, Co, Cr oder Ba wird auf diese Weise die Komplexbildung von Titan mit körpereigenen Proteinen verhindert und somit ein mögliches Auslösen einer toxischen Reaktion.<sup>[22,23]</sup> Im vaskulären Bereich findet Titan beispielsweise als Ummantelung von Herzschrittmachern, als Werkstoff für implantierbare Arzneimittelpumpen und als Stentmaterial Einsatz.<sup>[24]</sup>

### 2.3 Die Hämostase (Blutgerinnung)

Die Hämostase ist ein Synonym für den Begriff Blutstillung. Diese beinhaltet unter anderem die Blutgerinnung (Koagulation). Die Mechanismen der Blutstillung verhindern bei Verletzungen der Gefäßwände den übermäßigen Austritt von Blut aus dem Blutkreislauf und sind Voraussetzung für die Wundheilung. Während der Gerinnung laufen viele komplexe molekulare Mechanismen ab, die größtenteils durch den Kontakt von Blut mit Gewebe außerhalb der Gefäße ausgelöst werden. Sie lassen sich in einen vaskulären, einen zellulären und einen plasmatischen Abschnitt gliedern.<sup>[25]</sup>

#### 2.3.1 Vaskuläre Hämostase

Tritt eine Gefäßwandverletzung auf, wird durch mehrere Schritte versucht, den Blutfluß zu stoppen. Ausgelöst durch die Ausschüttung bestimmter Botenstoffe kommt es zur Kontraktion der glatten Muskelzellen, was eine Verengung der Gefäßwände (Vasokonstriktion) nach sich zieht. Durch den kleineren Durchmesser der Blutgefäße wird der Blutfluß und somit die Blutung verringert. Innerhalb weniger Sekunden werden Thrombozyten (Blutplättchen) über den Kontakt mit Gewebe außerhalb der Gefäße angelockt und aktiviert, wobei sie ihre Form verändern. Dabei werden Botenstoffe freigesetzt, die weitere Prozesse der Gerinnung anstoßen. Bei diesem Prozeß spielen die Thrombozyten die Hauptrolle, also bezeichnet man ihn als zelluläre Hämostase.

#### 2.3.2 Zelluläre Hämostase

Die im Blutplasma befindlichen Thrombozyten sind mit einem Durchmesser von 2-4 µm wesentlich kleiner als die übrigen Blutzellen und besitzen zwei Funktionen.<sup>[28]</sup> Einerseits bringen sie Blutungen durch die Bildung eines Thrombus (Blutgerinnsel) zum Stillstand. Darüber hinaus katalysieren sie auch die plasmatische Hämostase, welche zur Entstehung von Fibrin führt, das die Blutgerinnsel stabilisiert. Die Bildung eines Thrombus kann durch den Kontakt des Bluts mit einer künstlichen Werkstoffoberfläche ausgelöst werden. Auslösender Faktor sind hierbei Konformationsänderungen von auf der Oberfläche adsorbierten Plasmaproteinen, wie beispielsweise Fibrinogen. Desweiteren wird das Thrombozytensystem durch Bindung von Glykoproteinen an die Membran der Thrombozyten aktiviert. Dieser Vorgang wird durch den von-Willebrand-Faktor (vWF) vermittelt und führt zu einer ersten

Adhäsion der Thrombozyten und zur Ausbildung einer dünnen Bedeckung der Wunde. Der vWF ist ein lösliches Blutprotein, das erst nach einer Endothelverletzung mit subendotheliale Kollagen, einem Strukturprotein des Extrazellular-Raumes, reagieren und so Blutplättchen binden kann. Auf die Adhäsion der Thrombozyten folgt die Freisetzung einer Reihe von Inhaltsstoffen, wie Phospholipiden und Plättchenfaktoren. Anschließend kommt es unter Einfluss von Thrombin zur Bildung von Thrombozyten-Agglomeraten und damit zum Thrombus.

Zu den medikamentösen Thrombozytenaggregationshemmern zählen unter anderem Acetylsalicylsäure und Clopidogrel, die durch das Blockieren von Rezeptoren an der Thrombozytenoberfläche die Bildung von Agglomeraten verhindern. Im Universitätsklinikum Würzburg werden beispielsweise nach Stentimplantationen neun Monate lang Acetylsalicylsäure und Clopidogrel verabreicht, um postoperative Thrombosen zu vermeiden.<sup>[26]</sup> Formal kann die zelluläre (primäre) von der plasmatischen (sekundäre) Hämostase unterschieden werden, in vivo bestehen zwischen diesen Systemen jedoch enge funktionelle und zeitliche Wechselwirkungen. So ist zum Beispiel das im plasmatischen System gebildete Thrombin ein starker Thrombozyten-Aggregator, wohingegen das von den Thrombozyten freigesetzte Phospholipid die plasmatische Gerinnung aktiviert.<sup>[28]</sup>

### 2.3.3 *Plasmatische Hämostase*

Damit die plasmatische Blutgerinnung lokal und kontrolliert erfolgen kann, wird sie durch die sequentielle Aktivierung einer Serie von Gerinnungsfaktoren ausgelöst. Die Nomenklatur der Faktoren erfolgt in römischen Ziffern (s. Tabelle 2.1). Mit Ausnahme der Faktoren I, XIII und der Kofaktoren III, V und VIII handelt es sich hierbei um Serin-Proteasen (Eiweiß-spaltende Enzyme). Sie führen sequenziell zur Bildung von Thrombin und anschließend zur thrombinkatalysierten Umwandlung von Fibrinogen in unlösliches Fibrin. All diese Gerinnungsfaktoren, liegen in ihrer inaktiven Form als Pro-Enzyme im Blutplasma vor und wandeln sich schrittweise in ihre aktive Form um, wobei jedes aktivierte Enzym mit einem anderen spezifischen Pro-Enzym reagiert und dieses aktiviert.<sup>[27,28]</sup>

Bisweilen werden zwei Systeme der plasmatischen Gerinnung differenziert, die intrinsische (innere) und die extrinsische (äußere) Hämostase (Abb. 2.3), wobei letztere bedeutender ist und schneller abläuft. Beim extrinsischen System wird der Faktor VII durch Gewebsthromboplastin aktiviert, das kein Bestandteil des Blutplasmas, sondern des

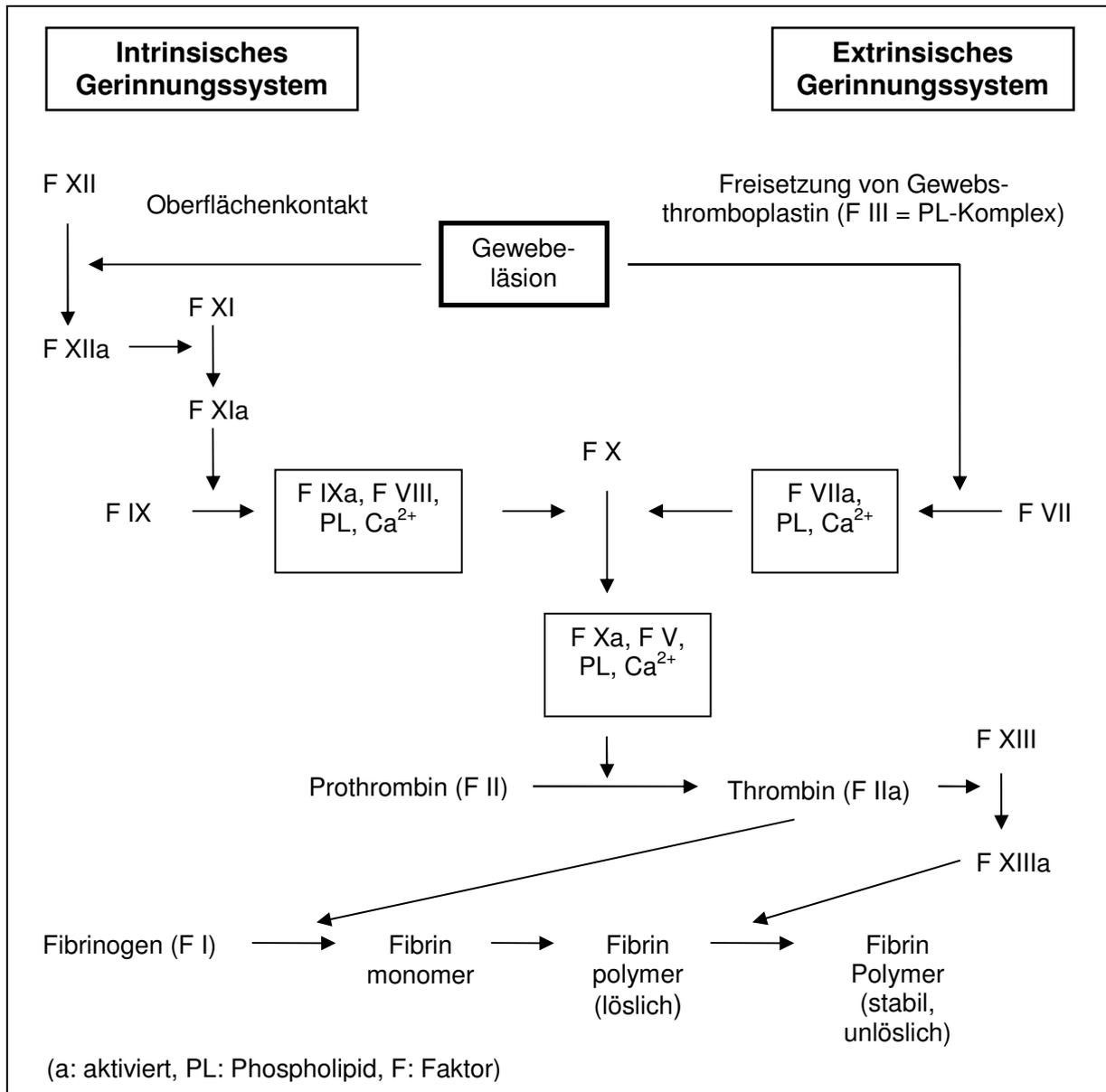
Körpergewebes ist. Die Gerinnung wird ausgelöst, wenn aufgrund von Verletzungen das Gewebe an der Außenseite der Gefäße mit fließendem Blut in Kontakt kommt. Der aktivierte Faktor VII bewirkt in Gegenwart von Phospholipid, das sich auf der Oberfläche von aktivierten Blutplättchen befindet, und Calcium die Aktivierung von Faktor X in Xa. Dieser überführt zusammen mit dem Kofaktor Faktor V, Phospholipid und Calcium Prothrombin (Faktor II) in Thrombin, welches wiederum die Umwandlung von Fibrinogen (Faktor I) in Fibrinmonomere katalysiert. Diese werden durch Autopolymerisation in Fibrinfäden und schließlich durch den ebenfalls von Thrombin aktivierten Faktor XIII in stabile wasserunlösliche Fibrinpolymere, auch Roter Abscheidungstrombus genannt, überführt.

| Faktor | Name  | Funktion  |
|--------|---|---|
| I      | Fibrinogen                                  | Bildet das Fibrinnetz   |
| II     | Prothrombin                                 | Die aktive Form Thrombin aktiviert die Faktoren I, V, VII und XIII  |
| III    | Thromboplastin, Tissue Factor (TF)          | Im subendothelialen Gewebe, Kofaktor von VIIa   |
| IV     | Calcium                                     | Viele Faktoren benötigen $\text{Ca}^{2+}$ um an die negativ geladenen Phospholipide der Plasmamembranen zu binden |
| V      | Proaccelerin                                | Kofaktor von X, mit dem es einen Komplex bildet   |
| VII    | Proconvertin                                | Aktiviert IX und X, wird durch Kontakt mit TF aktiviert   |
| VIII   | Antihämophiles Globulin A                   | Kofaktor von IX, mit dem es einen Komplex bildet  |
| IX     | Antihämophiles Globulin B, Christmas-Faktor | Aktiviert X, bildet einen Komplex mit VIII  |
| X      | Stuart-Prower-Faktor                        | Aktiviert Prothrombin, bildet einen Komplex mit VII   |
| XI     | Plasma-Thromboplastin-Antecedent            | Aktiviert XII und IX  |
| XII    | Hageman-Faktor                              | Aktiviert die Fibrinolyse   |
| XIII   | Fibrinstabilisierender Faktor               | Stabilisiert Fibrin durch die Bildung von Quervernetzungen  |

**Tabelle 2.1:** Die Gerinnungsfaktoren: Jedem Faktor ist eine römische Zahl zugewiesen. Ein kleines a hinter dem Faktor bedeutet, dass er in der aktiven Form vorliegt. Aus historischen Gründen existiert VI nicht mehr, er entspricht  $\text{Va}^{[28]}$

Durch den Kontakt mit einer negativ geladenen Fremdoberfläche (z.B. defekte Gefäßstrukturen oder künstliche Gefäßimplantate) kann der Faktor XII aktiviert und somit das intrinsische Gerinnungssystem ausgelöst werden. Der Faktor XIIa aktiviert dann weitere Faktoren (XI und IX). Diese bewirken zusammen mit Kofaktor VIII, Calcium und dem Phospholipid die Aktivierung von Faktor X. Ab dieser Stelle der Kaskade verlaufen das intrinsische und das extrinsische System analog.<sup>[28,29]</sup>

Die plasmatische Gerinnung kann medikamentös entweder durch Heparin oder durch Cumarin-Derivate (z.B. Marcumar) unterdrückt werden. Cumarin-Derivate hemmen die Vitamin K abhängigen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X und dadurch die Bildung von Thrombin.<sup>[30]</sup>



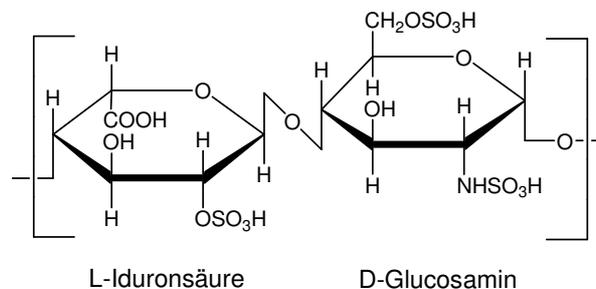
**Abb. 2.3:** Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade<sup>[31]</sup>

Heparin hingegen bindet an Antithrombin, wodurch dieses eine deutlich höhere Komplexbildungsaffinität gegenüber Thrombin besitzt. Komplextiertes Thrombin verliert somit seine biologische Aktivität. Die Wirkung von Heparin wird ausführlicher in Kapitel 2.4 beschrieben.

## 2.4 Heparin

### 2.4.1 Struktur und Wirkung

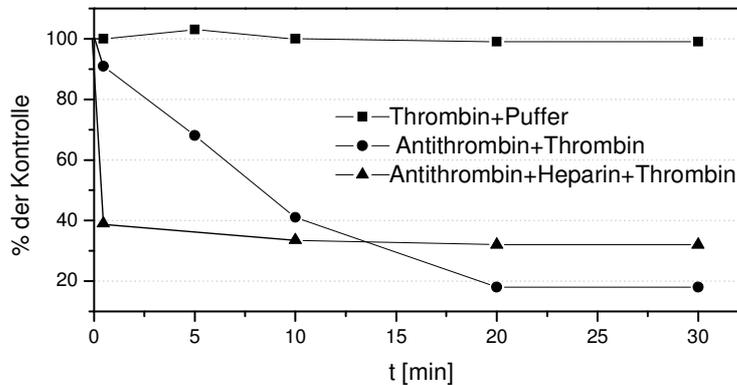
Natürlicherweise kommt das Glycosaminoglycan Heparin in verschiedenen Organen (Herz, Leber und Darm) und im Endothel der Gefäße vor.<sup>[32]</sup> Chemisch gesehen handelt es sich um ein Polysaccharid, bestehend aus einer variablen Anzahl von Aminozuckern mit einer molaren Masse zwischen 4000-40000 g/mol (Häufigkeitsgipfel etwa 15000). Es besteht aus unregelmäßig verteilten Pentasaccharideinheiten aus 1,4-verknüpfter L-Iduronsäure-2-sulfat und D-Glucosamin-N,6-disulfat (Abb. 2.4). Die Disaccharidblöcke sind durch D-Glucuronsäure und N-acetyl-D-glucosamin-6-sulfat unterbrochen bzw. erweitert.<sup>[33]</sup>



**Abb. 2.4:** Hauptdisaccharideinheit des Heparins

Heparin wird meist aus der Darmschleimhaut oder der Lunge von Schweinen bzw. Rindern extrahiert und in der Medizin als rasch wirkendes Antikoagulans zur Vorbeugung von Thrombosen und Embolien verwendet. Die Wirkung von Heparin ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen. Heparin bindet zum einen spezifisch an das Protein Antithrombin an, welches das Enzym Thrombin durch Komplexbildung inaktiviert. Thrombin ist das Endprodukt der 1. Phase der plasmatischen Gerinnungskaskade und seine Hauptfunktion ist die Katalyse der Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin (vgl. Kapitel 2.3.3). Ohne Heparin bildet sich der Thrombin-Antithrombinkomplex mit einer relativ geringen Geschwindigkeit, in Gegenwart von Heparin hingegen kommt es unverzüglich zur Komplexbildung. Dieser sogenannte „Heparin-Kofaktor-Effekt“ bewirkt, dass die Komplexbildung 1000fach schneller abläuft (s. Abb. 2.5). Nach Bildung des Thrombin-Antithrombinkomplexes wird das Heparin wieder freigesetzt und ist somit aufgrund seiner katalytischen Funktion in der Lage, in weitere Komplexbildungsreaktionen einzugreifen.<sup>[34]</sup> Die Hemmung anderer an der Gerinnungskaskade beteiligter Serin-Proteasen, wie Faktor IXa, Xa, XIa und XIIa durch Antithrombin

wird ebenfalls durch die Anwesenheit von Heparin beschleunigt. Dadurch ist Heparin im Gegensatz zu anderen gerinnungshemmenden Medikamenten in der Lage, in Kombination mit Antithrombin alle enzymatischen Stufen der Gerinnungskaskade unmittelbar zu blockieren.



**Abb. 2.5:** Die Bildung des Thrombin-Antithrombin-Komplexes in An- bzw. in Abwesenheit von Heparin

Darüber hinaus konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass Heparin neben seiner antikoagulanten Wirkung auch die Proliferation glatter Muskelzellen hemmt und damit neben der Hemmung der Hämostase auch diesem Mechanismus zur Entstehung von Restenosen vorbeugt.<sup>[35]</sup>

Unerwünschte Nebenwirkungen bei der systemischen Behandlung mit Heparin können Thrombozytopenie, Blutungen und bei Langzeittherapie auch Osteoporose sein. Bei ersterem handelt es sich um eine starke Verminderung der Blutplättchen, die in schweren Fällen zu spontanen Blutungen der Haut und Schleimhäute führt.<sup>[35]</sup> Um diese Nebenwirkungen auszuschließen erscheint es sinnvoll, Implantatoberflächen für den Blutkontakt direkt mit Heparin zu modifizieren. Die katalytische Wirkung von Heparin würde hierbei sicherstellen, dass mit dem Glycosaminoglycan funktionalisierte Oberflächen langanhaltend antithrombogen wirken.

#### 2.4.2 Quantifizierung

Über den Toluidinblautest kann die Menge an immobilisiertem Heparin photometrisch bestimmt werden.<sup>[36,37]</sup> Das Meßprinzip zur Quantifizierung von Heparin beruht darauf, dass Heparin in wässriger Lösung mit dem Farbstoff *o*-Toluidinblau (Abb. 2.6) einen Komplex bildet, der im organischen Medium (*n*-Hexan) löslich ist und somit durch Ausschütteln der wässrigen Phase entzogen werden kann. Gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz kann dann

über das Extinktionsmaximum des *o*-Toluidinblaus bei einer Wellenlänge von 631 nm die Restkonzentration des ungebundenen Farbstoffs in der wässrigen Lösung bestimmt und mit der Menge an Heparin korrelieren werden.

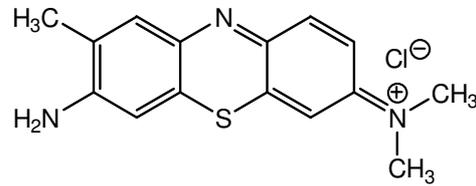


Abb. 2.6: *o*-Toluidinblau

Bei einer Verminderung der *o*-Toluidinblaukonzentration von 10-50% durch die Komplexbildung ist die Abnahme der Extinktion mit zunehmender Heparinkonzentration linear. Ebenso kann verfahren werden, um die an Pulveroberflächen kovalent immobilisierte Menge an Heparin zu bestimmen. Hierbei wird der sich auf der Pulveroberfläche ausbildende Heparin-Farbstoff-Komplex über einen Spritzenfilter aus der wässrigen Phase entfernt.

#### 2.4.3 Bestimmung der Wirksamkeit

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die antikoagulative Wirksamkeit von Heparin zu quantifizieren. Neben unpraktischen und ungenauen titrimetrischen Verfahren stellt eine die aPTT-Methode dar, die die Zeit mißt, bis die Blutgerinnung einsetzt (s. Kapitel 2.5). Dieser stehen jedoch noch genauere chromogene Verfahren gegenüber, bei denen chromogene Substrate Einsatz finden, die photometrisch ausgewertet werden können. Am genauesten hierbei, vor allem bei kleinen Mengen an Heparin, ist das chromogene Substrat Chromozym TH<sup>®</sup> [38].

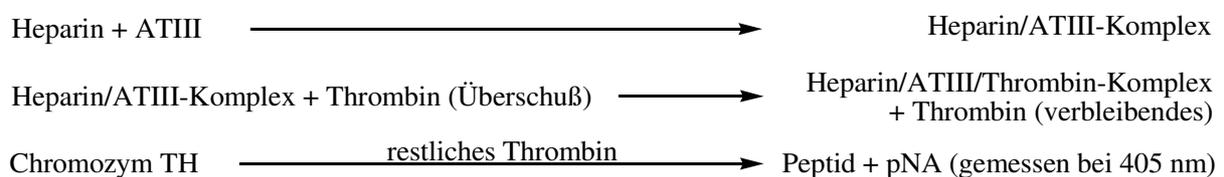


Abb. 2.7: Prinzip der Wirksamkeitsbestimmung von Heparin über Chromozym TH<sup>®</sup>

Das Prinzip dieser chromogenen Methode beruht darauf, dass Heparin und Antithrombin (AT-III) in wässriger Lösung einen Heparin/AT-III-Komplex bilden (Abb. 2.7). In Gegenwart von überschüssig eingesetztem Thrombin bildet sich ein Heparin/AT-III/Thrombin-Komplex

aus. Das überschüssige in Lösung verbleibende Thrombin katalysiert die Hydrolyse des chromogenen Substrates Chromozym TH<sup>®</sup>, welches einen Farbstoff abspaltet, der photometrisch bei 405 nm gemessen werden kann.<sup>[39]</sup> Je wirksamer Heparin ist, desto mehr Thrombin wird dem wässrigen Medium durch Komplexbildung entzogen. Dies hat weniger Farbstoffbildung und somit photometrisch eine geringere Extinktion bei 405 nm zur Folge.

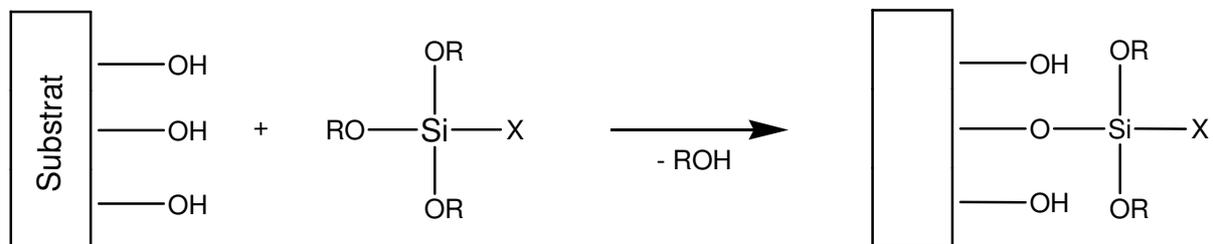
## 2.5 Immobilisierung von Antikoagulantien auf Oberflächen

### 2.5.1 Überblick

Implantate, die im permanenten Blutkontakt stehen, müssen neben den allgemeinen Anforderungen wie ausreichender mechanischer Beschaffenheit vor allem eine ortsgebundene Biokompatibilität besitzen. Bei Stentwerkstoffen bedeutet dies hämokompatibles Verhalten, welches sowohl durch die Oberflächenstruktur als auch durch die Oberflächenzusammensetzung eingestellt werden kann. Letzteres kann durch gezielte Funktionalisierung der Oberflächen mit Antikoagulantien erreicht werden, ein bekanntes Beispiel hierfür stellt die Heparinisierung dar.

Seitdem es Gott et al. 1963 erstmals unter Verwendung des Benzalkoniumchlorids Zephiranchlorid gelang, Heparin an Graphitoberflächen zu binden,<sup>[40]</sup> konnte Heparin an zahlreichen Polymeren, z. B. an Polyurethanen, Cellulose, Polyvinylchlorid oder Silicon immobilisiert und dadurch eine verbesserte Hämokompatibilität dieser Materialien bewirkt werden.<sup>[41,42,43,44,45]</sup> Heparin kann an das Biomaterial sowohl *ionisch* als auch *kovalent* angebunden werden. Im Falle der ionischen Immobilisierung erfolgt die Anbindung über  $\text{SO}_4^{2-}$ -,  $\text{COO}^-$ - und  $\text{NHSO}_3^-$ -Gruppen am Heparin und einer kationischen Gegenladung am Biomaterial, welches hierfür mit quartären Ammoniumsalzen funktionalisiert wurde. Das hierbei auftretende klinische Problem ist, dass die ionische Kation-Heparin-Bindung nicht stark genug ist, um einen Austausch des Heparins mit anionischen Blutbestandteilen zu verhindern. Aus diesem Grund löst sich ionisch gebundenes Heparin zumeist von der Oberfläche, so dass auch bei geringer Lösungsrate die antithrombogene Wirkung der Oberfläche relativ schnell gesenkt wird.<sup>[41,45]</sup>

Um diesem Effekt entgegenzuwirken ist bei Implantaten, die dauerhaft im Blutkontakt stehen, die kovalente Immobilisierung des Wirkstoffs vorzuziehen. Über Hydroxyl-, Carbonyl-, oder Aminogruppen des Heparins kann der Wirkstoff kovalent an Oberflächen angebunden werden. Diese müssen zuvor jedoch entsprechend aktiviert werden, sodass sich eine chemische Bindung zwischen den funktionellen Gruppen des Wirkstoffs und denen der Oberfläche ausbilden kann. Für die Aktivierung von Implantatoberflächen stehen eine Reihe von Reagenzien bzw. funktionellen Gruppen zur Verfügung, wie z.B. Glutaraldehyd,<sup>[46]</sup> endständige Azidgruppen,<sup>[43]</sup> Diisothiocyanat<sup>[47]</sup> als auch die Carboxylierung und Aminierung.<sup>[48]</sup> Bei letzterer Methode werden anorganische Oberflächen mit bifunktionellen Haftvermittler-Molekülen (Spacern) modifiziert, die eine gleichermaßen gute Bindung zum Wirkstoff eingehen können (Abb. 2.8).



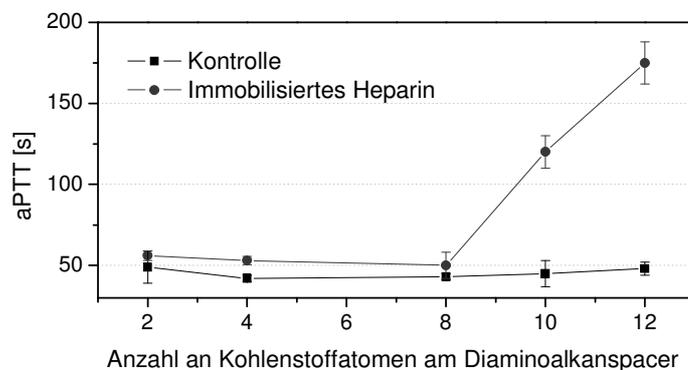
**Abb. 2.8:** Reaktion eines bifunktionellen Alkoxysilyl-Spacers (R: Methyl- oder Ethylrest) mit einer mit Hydroxylgruppen funktionalisierten anorganischen Oberfläche (Substrat), unter Abspaltung des entsprechenden Alkohols. X könnte beispielsweise eine über einen Alkylrest verlängerte terminale Amino- oder Carboxylgruppe sein, die mit dem organischen Wirkstoff eine chemische Bindung ausbildet

Organofunktionelle Silane besitzen in der Gruppe der Haftvermittler eine herausragende Rolle, da sie eine starke Bindung zwischen einer organischen Verbindung (z.B. Heparin) und den Hydroxylgruppen eines anorganischen Substrats (z.B. Glas, Silikone oder Metalloxide) herstellen können. Üblicherweise besitzen die Silane die Struktur  $(RO)_3Si-X$ , wobei RO- eine leicht hydrolysierbare Alkoxygruppe ist. Die Anbindung des Silans an das anorganische Material erfolgt durch die Reaktion der Siloxangruppe mit den Hydroxylgruppen der Substratoberfläche unter Abspaltung des entsprechenden Alkohols. Bei X handelt es sich um einen hydrolysestabilen organischen Rest mit einer terminalen funktionellen Gruppe, die eine kovalente Bindung zum Wirkstoff ermöglicht. Üblich sind hier u.a. Amino-, Carboxylat- oder Isocyanatgruppen.<sup>[47,48]</sup>

Die Wirksamkeit von Heparin, das beispielsweise an Aminogruppen von Spacern immobilisiert wurde, wird jedoch im Wesentlichen von drei Faktoren beeinflusst:

- Sterische Hinderung/Mobilität
- Chemische Modifikation
- Auslaugen

Untersuchungen von Ebert und Kim ergaben, dass die gerinnungshemmende Wirkung des modifizierten Materials abhängig von der Länge des Haftvermittlers war.<sup>[64]</sup> In ihren Arbeiten wurde Heparin über verschieden lange Diaminoalkan-Spacer an Substrate gebunden. Diese wurden anschließend in Blutplasma eingebracht und mithilfe des aPTT-Tests (activated Partial Thromboplastin Time-Test) die Zeit bis zum Einsetzen der Blutgerinnung bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Spacer-Länge auch die antikoagulante Wirkung der modifizierten Polymere stieg (s. Abb. 2.9). Der Effekt war ab einer Haftvermittlerlänge von mehr als 10 Kohlenstoffatomen am ausgeprägtesten.



**Abb. 2.9:** Über den aPTT-Test ermittelte Zeit bis zum Einsetzen der Blutgerinnung in Abhängigkeit von der Anzahl an Kohlenstoffatomen am Diaminoalkanspacer. Die „Vierecke“ zeigen zur Kontrolle mit Diaminoalkanen funktionalisierte Polymere, an die kein Heparin gebunden wurde<sup>[64]</sup>

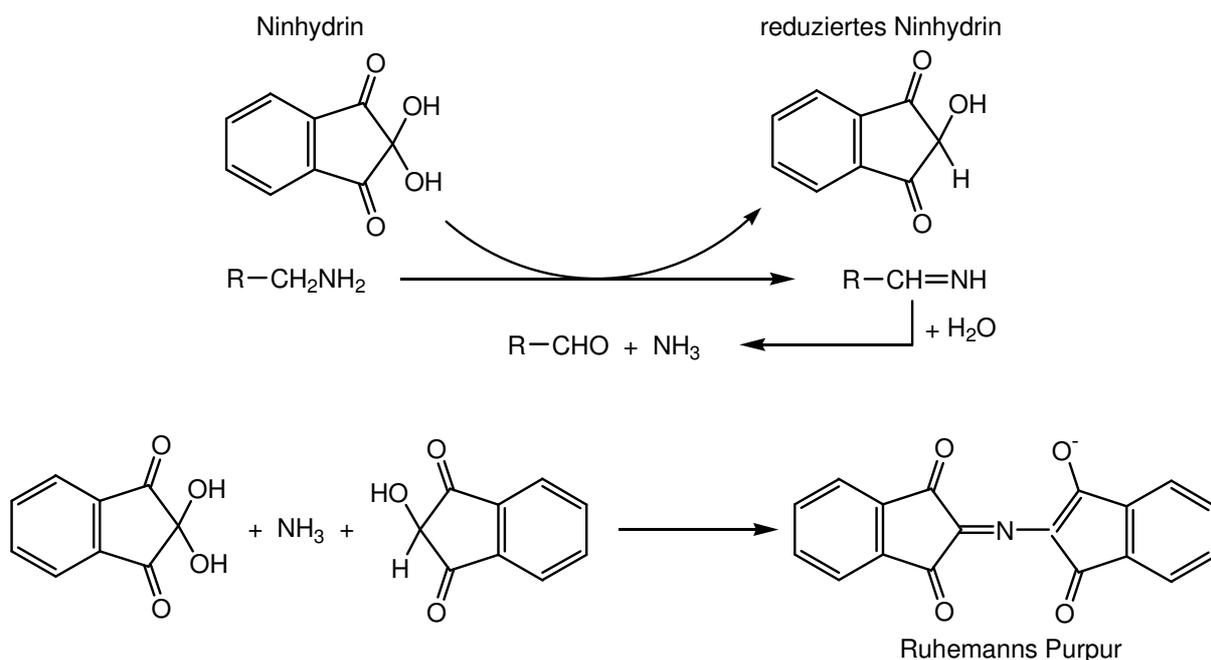
Die höhere biologische Aktivität von Heparin und somit das langsamere Einsetzen der Blutgerinnung ist auf die durch längere Haftvermittler-Moleküle gesteigerte Mobilität des Wirkstoffs zurückzuführen. Heparin ist somit „beweglicher“ und besser in der Lage, mit Antithrombin zu interagieren.

Darüber hinaus ist bei der Immobilisierung von Heparin wichtig, dass die für die antikoagulante Wirkung verantwortliche Pentasaccharideinheit bzw. deren Carboxylgruppen

chemisch nicht modifiziert oder zerstört wird. Es konnte gezeigt werden, dass Heparin bei einer Blockierung von über 50% der Carboxylgruppen praktisch unwirksam wird.<sup>[63]</sup> Dieses Ergebnis wird von Untersuchungen von Agarwal und Danishefsky gestützt, die belegen konnten, dass durch Veresterung der Carboxylgruppen und der Iduronsäureeinheiten mit Diazomethan die Fähigkeit des Wirkstoffs an Antithrombin zu binden verloren ging.<sup>[49]</sup>

### 2.5.2 Quantitative Bestimmung der immobilisierten Aminogruppen

Ninhydrin ist ein Reagenz zum Nachweis von Ammoniak, Aminosäuren und primären Aminogruppen. Die Quantifizierung primärer Aminogruppen kann mithilfe der Ninhydrinreaktion nach Moore und Stein erfolgen.<sup>[50]</sup> Das Prinzip dieser Reaktion beruht darauf, dass Ninhydrin in Gegenwart von Ammoniak mit seiner reduzierten Form zum Farbstoff Ruhemanns-Purpur dimerisiert, der nach seinem Entdecker benannt wurde. Ammoniak entsteht bei der oxidativen Desaminierung des primären Amins zum Aldehyd (Abb. 2.10).

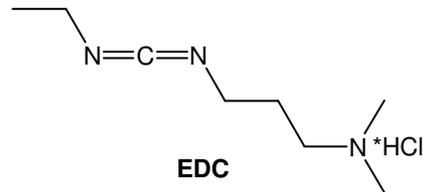


**Abb. 2.10:** Der Reaktionsmechanismus der Ninhydrinreaktion im Falle der Quantifizierung primärer Aminogruppen<sup>[51]</sup>

Die Quantifizierung des Farbstoffs erfolgt durch das Extinktionsmaximum bei einer Wellenlänge von 570 nm. Über das Lambert-Beer'sche Gesetz kann über die Konzentration des gebildeten Farbstoffs auf die Konzentration an primären Aminogruppen zurückgeschlossen werden.

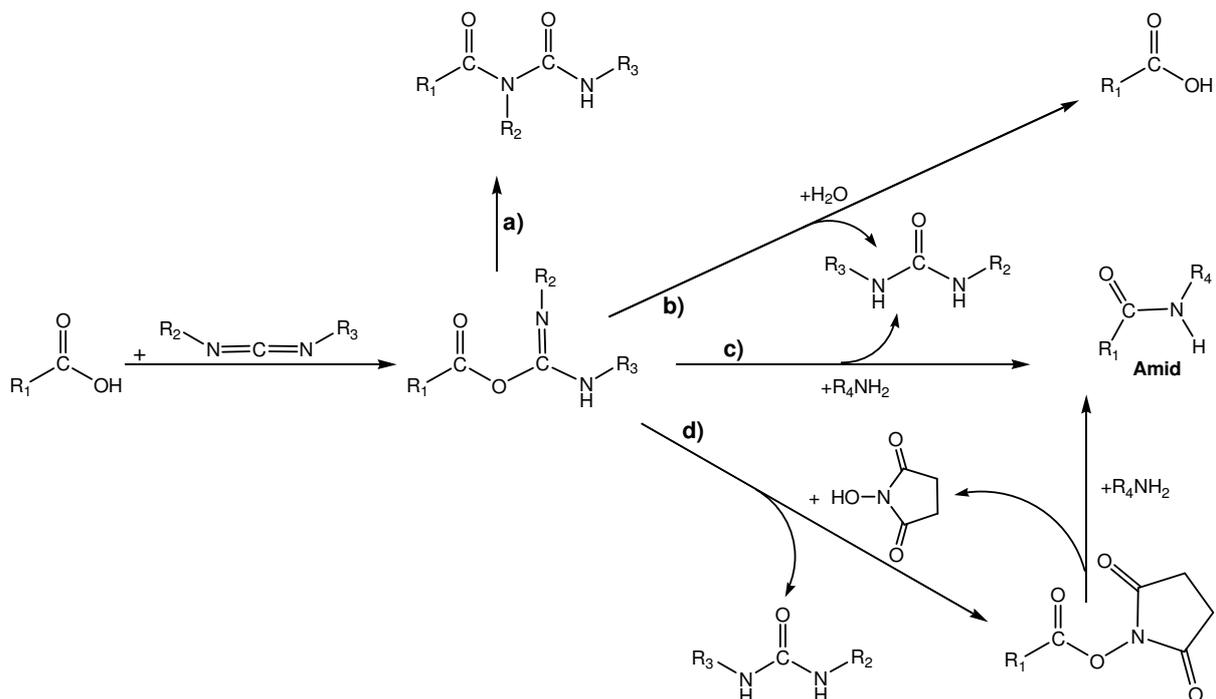
### 2.5.3 Kopplung mit Carbodiimiden

Eine schnelle, ungiftige und schonende Möglichkeit, Carboxylgruppen in Peptidbindungen zu überführen, stellt die Kupplung mit Carbodiimiden dar. Hierzu wird die Carboxylgruppe mit einem wasserlöslichen Carbodiimid für den nukleophilen Angriff einer Aminogruppe aktiviert.<sup>[52]</sup>



**Abb. 2.11:** Die Strukturformel des als Kupplungsreagenz verwendeten Carbodiimids EDC

Damink et al. konnten zeigen, dass die Ausbeute durch den Zusatz von *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) noch gesteigert werden konnte. Als Carbodiimid wurde *N*-3-Dimethylaminopropyl-*N'*-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC) verwendet (Abb. 2.11).<sup>[53]</sup>



**Abb. 2.12:** Nukleophile Addition einer Carboxylfunktion an ein Carbodiimid unter Ausbildung eines hochreaktiven O-Acylisoharnstoffderivats, der auf verschiedene Weise weiterreagieren kann: a) Umlagerung zum stabilen *N*-Acylharnstoff b) Hydrolyse zur Carbonsäure c) Reaktion mit einem primären Amin zum gewünschten Amid unter Abspaltung eines Harnstoffderivats d) Substitution von EDC durch NHS, welches bei anschließender Reaktion mit einem primären Amin ebenfalls zum Amid führt

Im ersten Reaktionsschritt wird die Carboxylgruppe durch nukleophile Addition an das Carbodiimid unter Bildung eines O-Acylisoharnstoffs aktiviert. Dieser kann daraufhin mit

einem primären Amin unter Abspaltung eines Harnstoffderivats zum Amid umgesetzt werden (Abb. 2.12c). Durch die Zugabe von NHS kann die Ausbeute an Amid erhöht werden, da es unerwünschte Nebenreaktionen unterdrückt. Untersuchungen ergaben, dass durch die Anwesenheit von NHS die N-Acylverschiebung der mit EDC aktivierten Carboxylgruppe verhindert wird, die zur Umlagerung in einen N-Acylharnstoff führen würde (Abb. 2.12a). Darüber hinaus ist die mit EDC aktivierte Carboxylgruppe (Abb. 2.12b) hydrolyseempfindlicher als die durch NHS substituierte (Abb. 2.12d).<sup>[53]</sup>

## 2.6 Wirkstoffreisetzende nanoporöse Depots

### 2.6.1 Überblick

Das Design und die Entwicklung implantierbarer nanoporöser Wirkstoffdepots wurde in den letzten Jahrzehnten immer bedeutender, da sie dem Patienten Schonung, Sicherheit, Effizienz und Bequemlichkeit garantieren. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist mit Antibiotikum beladener PMMA-Knochenzement, der für die Prevention und die Behandlung postoperativen Infektionen wie Osteomyelitis eingesetzt wird.<sup>[54,55]</sup>

Ein weiteres Anwendungsgebiet liegt in der Beschichtung metallischer Implantate mit biologisch aktiven Molekülen, um die Blutkompatibilität zu verbessern. Ein Beispiel hierfür sind Stent-Oberflächen, die mit Wirkstoffen wie Heparin<sup>[56]</sup> und Bivalirudin<sup>[57]</sup> modifiziert wurden, um nach der Implantation häufig auftretende Komplikationen wie die Koagulation des Blutes und eine neointimale Proliferation durch Zellen zu verhindern.<sup>[58]</sup> Hierzu kann der Wirkstoff zum einen kovalent über Silan-Spacer an die Oberfläche gebunden werden<sup>[43,59,60]</sup> oder in eine Polymermatrix eingebracht werden, um kontrolliert über eine definierte Dauer in das angrenzende Biosystem zu diffundieren.<sup>[61,62]</sup> Die kovalente Immobilisierung des Wirkstoffs kann sich als nachteilig erweisen, wenn dadurch biologisch wirksame Gruppen sterisch behindert werden<sup>[63,64]</sup> und somit die Wirksamkeit nicht mehr gewährleistet ist.

Im Gegensatz dazu hat sich die Effizienz von wirkstoffreisetzenden Systemen wie PMMA-Polymeren<sup>[65]</sup> als auch von im Körper degradierbaren PLA-/PGA-Polymeren<sup>[66]</sup> bewährt. Desweiteren wurden bereits rein anorganische Volumenwerkstoffe, bestehend aus nanoporösem SiO<sub>2</sub>, als Systeme für die Freisetzung des Wirkstoffs Heparin etabliert.<sup>[67,68]</sup>

Grundsätzlich ist problematisch, dass organische Polymere eine schlechte Adhäsion zu metallischen Oberflächen besitzen.<sup>[69]</sup> Dies kann bei Kontakt mit Körperflüssigkeit zu einer hydrolytischen Spaltung der adhäsiven Metall-/Polymer-Grenzfläche führen. Dieser Effekt und gleichzeitige Degradation des Polymers kann die Ablösung größerer Fragmente zur Folge haben, die im Blutkontakt zu einem Verschluss des Gefäßes führen können.<sup>[70]</sup>

Um die Adhäsion der Polymere auf metallischen Oberflächen zu verbessern, können bifunktionale Polymermoleküle verwendet werden, die zusätzlich kovalent an die Metalloberfläche anbinden, wie z.B. an die hydroxylierte Oxidschicht von Titan. Diese Methode, entwickelt für eine bessere Adhäsion von PMMA-Zementen auf metallischen Prothesen,<sup>[71]</sup> ist bereits aus der Zahnmedizin bekannt und befindet sich dort schon seit einiger Zeit im klinischen Einsatz.<sup>[72,73]</sup> Mit Organosilanen (z.B. MAS; s. Kapitel 2.7.2), die üblicherweise als Adhäsivstoffe verwendet werden, können mithilfe der kürzlich entwickelten Sol-Gel-Technologie<sup>[74]</sup> Volumenwerkstoffe hergestellt werden. Die daraus resultierenden organisch/anorganischen Hybrid-Polymere weisen einerseits eine gute *Adhäsion* auf Metalloberflächen auf<sup>[75]</sup> und besitzen darüber hinaus bessere mechanische Eigenschaften als die reinen Polymere. Durch Variation der Prozeßparameter während der Herstellung (Sol-Gel- und Polymerisationsbedingungen) können die Struktur (Dichte, Nanoporosität) und damit die stofflichen Eigenschaften über ein großes Spektrum hinweg exakt eingestellt werden.<sup>[76]</sup>

### 2.6.2 Bestimmung der Porosität

In der Werkstoffkunde bezeichnet die Porosität das Verhältnis des Volumens aller Hohlräume eines porösen Festkörpers zu dessen äußerem Volumen. Es handelt sich also um ein Maß dafür, wieviel Raum der eigentliche Feststoff aufgrund seiner Körnung oder Klüftung innerhalb eines bestimmten Volumens ausfüllt bzw. welche Hohlräume er in diesem hinterläßt. Die Poren sind dabei in der Regel mit Luft und/oder einem porengängigen Medium wie beispielsweise Wasser gefüllt. Die Porosität wird üblicherweise in Prozent oder als Fraktion (Bruchteile von 1 = %/100) angegeben und mit dem Formelbuchstaben  $\Phi$  bezeichnet. Die Gesamtporosität einer Probe setzt sich zusammen aus der Summe der Hohlräume, die untereinander und mit der Umgebung in Verbindung (Nutzporosität) und den nicht miteinander verbundenen Hohlräumen (geschlossene Porosität). Die Porosität kann für leicht pulverisierbare Feststoffe über die Stickstoffsorption bestimmt werden, welche hierfür ein Standardverfahren darstellt.<sup>[68]</sup> Bei nanoporösen Festkörpern, die aufgrund ihrer mechanischen Eigenschaften nicht pulverisierbar sind, kann die Porosität mithilfe einer

porengängigen Flüssigkeit (z.B.: Ethanol) bekannter Dichte bestimmt werden, die die Matrix durch Kapillarkräfte aufnehmen kann. Die Menge der absorbierten Flüssigkeit kann über die Gewichts Differenz ermittelt werden und somit über die Dichte mit dem Volumen korreliert werden.<sup>[67]</sup>

### 2.6.3 Diffusionskinetik nach Higuchi

Zur Beschreibung der Freigabekinetik von Wirkstoffen aus Sol-Gel-Matrixsystemen kann die sogenannte „Higuchi-Gleichung“ (Formel 2.2) herangezogen werden,<sup>[77,78]</sup> die ursprünglich nur für planare Oberflächen Anwendung fand. Die treibende Kraft bei der Wirkstofffreigabe ist der Konzentrationsgradient zwischen Lösungsmittelmedium und Diffusionsfront. Aus der Higuchi-Gleichung läßt sich ableiten, dass die freigesetzte Wirkstoffmenge pro Flächeneinheit eine Funktion der Zeit ist. Die insgesamt freigesetzte Wirkstoffmenge ist dabei umso größer, je größer die Gesamtoberfläche ist, die dem Freisetzungsmittel ausgesetzt ist.

$$Q = \sqrt{\frac{D\varepsilon}{\tau} \cdot (2A - \varepsilon C_s) \cdot C_s \cdot t} = k_H \cdot \sqrt{t} \quad \text{Formel 2.2}$$

$Q$  = freigesetzte Wirkstoffmenge pro Flächeneinheit ( $\text{mol/m}^2$ ),  $D$  = Diffusionskoeffizient des Arzneistoffes im Freisetzungsmittel ( $\text{m}^2/\text{s}$ ),  $\varepsilon$  = Porosität,  $\tau$  = Krümmung der Poren,  $A$  = Gehalt an Arzneistoff ( $\text{mol/m}^3$ ),  $C_s$  = Sättigungslöslichkeit ( $\text{mol/m}^3$ ),  $t$  = Zeit (s),  $k_H$  = rezepturabhängige Proportionalitätskonstante

Aus Formel 2.2 wird deutlich, dass die Freisetzungsgeschwindigkeit bei einem bestimmten Wirkstoffgehalt von den physikalischen Eigenschaften des Wirkstoffs und der Porosität der Matrix abhängig ist. Diese Parameter können zu einer rezepturabhängigen Konstante  $k_H$  zusammengefasst werden. Homogene Porengröße und gleichmäßige Porenverteilung vorausgesetzt, ist die Freisetzungsrate nur noch eine Funktion der Zeit und der Oberfläche. Bei der Auftragung der kumulativ freigesetzten Wirkstoffmenge über die Wurzel der Zeit ergibt sich nach Formel 2.2 eine Gerade. Für die Anwendbarkeit der Higuchi-Gleichung gelten folgende Anforderungen bzw. Vereinfachungen. Die dem Freisetzungsmittel zugängliche Oberfläche darf sich während der Freigabeuntersuchung nicht durch Quellen oder Erosion/Degradation der Matrix verändern. Für eine konstante Lösungsgeschwindigkeit des Arzneistoffs müssen während der Untersuchung Sink-Bedingungen herrschen. Die Porositätsänderung durch herausgelösten Wirkstoff bleibt bei diesem Modell unberücksichtigt. Da die in der Diffusionsschicht befindliche Arzneistoffmenge vernachlässigt wird, gilt das vorliegende Modell nur bis zu einer freigesetzten Wirkstoffmenge von

60%.<sup>[78,79]</sup> Die Menge an ungelöstem Arzneistoff in der Matrix muß deutlich größer sein, als dessen Sättigungslöslichkeit, damit ein gleichmässiges Konzentrationsgefälle vorliegt.<sup>[77,78]</sup>

## 2.7 Sol-Gel-Prozeß

### 2.7.1 Überblick

Das Sol-Gel-Verfahren ermöglicht die Herstellung homogener Keramiken und Beschichtungen durch Hydrolyse und Kondensation von Metall-/Silanalkoholaten. Die Vorteile des Verfahrens liegen in der guten Homogenität, der hohen Reinheit und der kontrollierbaren Porosität der darstellbaren Materialien.

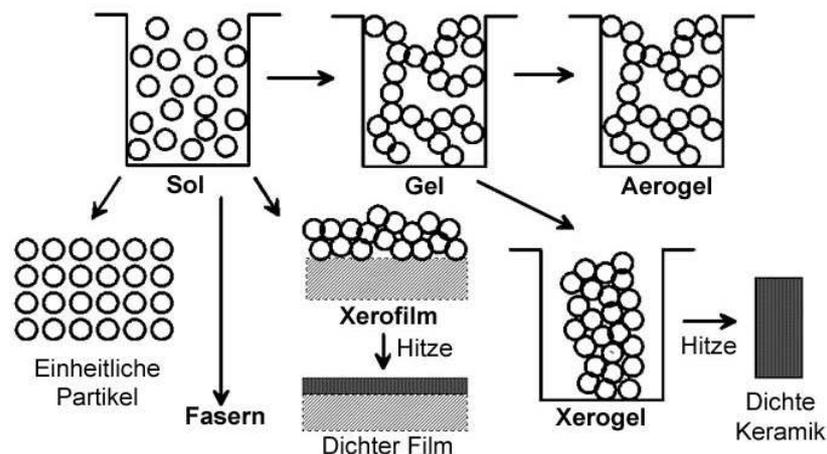
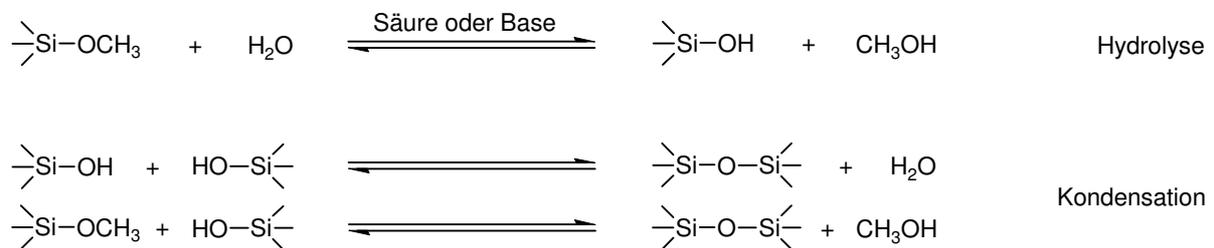


Abb. 2.13: Überblick über mögliche Produkte des Sol-Gel-Prozeß

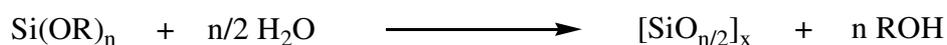
Daneben sind für den Prozeß nur niedrige Reaktionstemperaturen und ein geringer apparativer Aufwand erforderlich. Die Sol-Gel-Technik ermöglicht die Synthese neuer Werkstoffe mit definierten physikalischen und chemischen Eigenschaften und ihre Weiterverarbeitung zu Keramiken, Fasern, Pulvern, Gläsern als auch sehr dünnen Beschichtungen (Abb. 2.13). Anwendungsgebiete des Verfahrens sind beispielsweise die Herstellung von transparent-leitfähigen Beschichtungen von Photo- und Solarzellen,<sup>[80]</sup> kratzfeste und antireflektierende Beschichtungen auf Kunststoffen,<sup>[69]</sup> sowie Beschichtungen und Volumenwerkstoffen in der Implantologie zur definierten Wirkstofffreisetzung<sup>[67,68]</sup> (Drug Release System).

Ein Xerogel ist ein poröser Feststoff mit einer netzwerkartigen Struktur, der aus der Trocknung eines Gels hervorgegangen ist. Ein Beispiel hierfür ist Silicagel. In Abgrenzung zu den Aerogelen weisen Xerogele während der Trocknung erhebliche Strukturänderungen auf, die mit Schrumpfungsprozessen und einer Abnahme der Porosität verbunden sind. Diese liegt bei Xerogelen bei um die 50%, also weit geringer als bei Aerogelen mit etwa 90%.<sup>[81]</sup> Hydrolyse und Kondensation sind die grundlegenden Schritte des Sol-Gel-Prozesses. Als Ausgangsmaterialien für die Synthese des Sole und Gele dienen Metall- bzw. Silanalkoxide (Precursor). Die Chemie des Sol-Gel-Prozesses läßt sich durch folgende Reaktionsgleichungen, die zum einen die Hydrolyse und zum anderen die Kondensation der Alkoxy- (hier: Methoxy-) bzw. Hydroxygruppen formell beschreiben (Reaktionsgleichung 2.2).<sup>[81]</sup>



**Reaktionsgleichung 2.2:** Säure- bzw. basenkatalysierte *Hydrolyse* der Methoxygruppen des Precursors. Die so generierten OH-Gruppen können intermolekular sowohl mit weiteren OH-Gruppen unter Abspaltung von Wasser (Dehydratation) als auch mit Methoxygruppen unter Abspaltung des entsprechenden Alkohols (Dealkoholation) *kondensieren*

Bei der Hydrolyse erfolgt der partielle oder vollständige Austausch der Alkoxygruppen durch Hydroxygruppen, der bei koordinativ gesättigten Alkoxysilanen einem dreistufigen  $S_N2$ -Mechanismus unterliegt: Nukleophile Addition von Wasser an das elektrophile Silanatom, Protonentransfer vom Nukleophil zur Abgangsgruppe (Alkoxygruppe) im Übergangszustand und anschließend Abspaltung der protonierten Abgangsgruppe (Alkohol). Die Kondensation kann mechanistisch auf verschiedene Arten erfolgen. Trifft die nukleophile OH-Gruppe des Silans auf ein partiell hydrolysiertes Metallalkoxid, kann entweder eine Alkoxygruppe (Dealkoholation) oder eine Hydroxygruppe (Dehydratation) substituiert werden. In beiden Fällen wird eine Oxobrücke zwischen den Silanatomen ausgebildet.



**Reaktionsgleichung 2.3:** Gesamtbilanz des Sol-Gel-Prozesses (Hydrolyse & Kondensation; R = CH<sub>3</sub>)

Die Gesamtreaktion bei vollständiger Hydrolyse und Kondensation kann durch Reaktionsgleichung 2.3 beschrieben werden. Im Verlauf des Sol-Gel-Prozesses formen sich

aus den einzelnen Alkoxysilan-Molekülen durch die genannten Prozesse (Dehydratation & Dealkoholation) kolloide Teilchen mit einem Durchmesser von 3-4 nm, aus denen sich durch weitere Verknüpfung ein anorganisches Netzwerk bildet. Nach R.K. Iler verläuft die Kondensation des Sols zum Gel in drei Schritten:<sup>[82]</sup>

- Kondensation von Monomeren zu grösseren Partikeln
- Wachstum der Partikel
- Verknüpfung der Partikel zu Ketten und, im weiteren Verlauf, zu einem dreidimensionalen Netzwerk, das sich im Innern der Lösung ausbreitet und sich letztendlich zu einem Gel verfestigt

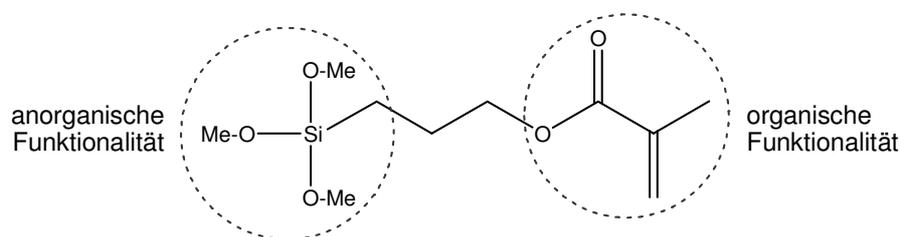
Die Reaktionen finden gleichzeitig statt, so dass es nicht möglich ist, den Prozeß durch einzelne, unabhängige Hydrolyse- und Kondensationsreaktionen zu beschreiben. Zur Beschreibung der Reaktionskinetik der Hydrolyse von Tetraalkoxysilanen müssen beispielsweise allein für die Hinreaktion 165 Geschwindigkeitskonstanten berücksichtigt werden.<sup>[81]</sup> Daneben haben äußere Parameter wie Temperatur, Druck, Art des Lösungsmittels und Precursors sowie pH-Wert, Wassergehalt und Verdünnungsgrad einen Einfluß auf das Hydrolyse- und Kondensationsverhalten.

Die Thermodynamik von Hydrolyse und Kondensation läßt sich quantitativ durch das Modell der Partialladungen beschreiben.<sup>[81]</sup> Beeinflussende Faktoren sind die Stärke des Nukleophils, die Elektrophilie des Silan-Atoms und die Basizität der Abgangsgruppe. Grundlage des Modells ist die Ladungsübertragung zwischen Atomen bei der Ausbildung kovalenter Bindungen, die zur Angleichung der unterschiedlichen Elektronegativitäten führt. Das Modell ermöglicht es, das Ausmaß des Ladungsaustausches zwischen einem Zentralatom und den verschiedenen Alkoxy-Liganden zu berechnen und damit Aussagen über den Ablauf chemischer Reaktionen im Sol-Gel-Prozeß zu machen.

### 2.7.2 *Methacryloxypropyltrimethoxysilan*

Einer direkten kovalenten Bindung zwischen Metall und Kunststoff stehen die grundsätzlich unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften beider Materialien gegenüber. Während Kunststoffe als organische, kovalent gebundene Materialien im allgemeinen hydrophobe Oberflächeneigenschaften besitzen, sind Metalle als anorganische

Werkstoffe durch eine hydrophile Oberfläche und Metallbindung gekennzeichnet. Im Gegensatz zu rein adhäsiv haftenden Kunststoffen, sollte eine direkte kovalente Anbindung des Polymers an ein Metall aufgrund der hohen Bindungsenergie zu einer deutlich höheren Festigkeit und Beständigkeit des Verbundes gegenüber Einflüssen, wie dem Eindiffundieren von Wasser oder Temperaturwechselspannungen führen. Eine solche kovalente Anbindung läßt sich durch die Verwendung sogenannter Haftvermittler als Interface zwischen dem Metall und dem Volumenwerkstoff realisieren. Haftvermittler sind i.a. mindestens bifunktionelle Moleküle. Der für Anwendungen in der Zahnheilkunde gebräuchlichste Haftvermittler Methacryloxypropyltrimethoxysilan ist in Abb. 2.14 skizziert.



**Abb. 2.14:** Trimethoxysilylpropylmethacrylat

Bei der Ausgangsverbindung in Abb. 2.14 handelt es sich um ein bifunktionelles Molekül mit einer anorganischen Trimethoxysilyl- und einer organischen Methacrylat-Funktionalität. Nach Hydrolyse der Alkoxygruppen des Silans kann dieses an die Metalloberfläche (z.B. von Titan) kondensieren. Desweiteren kondensieren die durch die Hydrolyse hervorgegangenen Hydroxygruppen auch intermolekular, was die Ausbildung eines anorganischen Netzwerks, eines Volumenwerkstoffs über den Sol-Gel-Prozeß zur Folge hat.

Die organische Methacrylatgruppe hingegen kann in einem zweiten Schritt thermisch oder photochemisch polymerisiert werden (s. Kapitel 2.7.3), was eine zusätzliche Vernetzung zur Folge hat, über die Materialeigenschaften wie z.B. Härte, Porosität und Hydrolysestabilität variiert werden können. Resultat ist eine durchgehende chemische Bindung zwischen dem Volumenwerkstoff und der Metalloberfläche.<sup>[83]</sup> In der Literatur wird die Generierung von Volumenwerkstoffen aus Methacryloxypropyltrimethoxysilan über den Sol-Gel-Prozeß beschrieben,<sup>[74]</sup> als auch die Herstellung von Hybridwerkstoffen durch zusätzliche Polymerisation.<sup>[75]</sup> Jedoch wurden die so erhaltenen nanoporösen Materialien weder zur Beschichtung von Metalloberflächen, noch als wirkstofffreisetzende Depots etabliert.

### 2.7.3 Radikalische Polymerisation

Bei der radikalischen Polymerisation reagieren Radikale, die sehr reaktiv sind, da sie ungepaarte Elektronen besitzen. Eine Polymerisationsreaktion lässt sich in folgende drei Schritte einteilen: Initiation, Wachstumsreaktion und Kettenabbruch.<sup>[84]</sup>

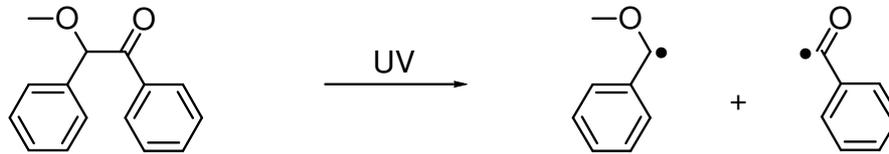


Abb. 2.15: Initiation z.B. durch Benzoinmethylether und UV-Licht

Zur Initiation der Reaktion dient ein sogenannter Starter (Abb. 2.15), der Radikale ( $R\cdot$ ) ausbildet. Die Startreaktion kann thermisch, chemisch oder durch UV-Licht mithilfe des jeweils geeigneten Startermoleküls ausgelöst werden.

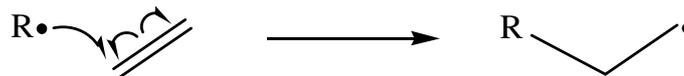


Abb. 2.16: Primärreaktion eines Radikals mit einer C=C-Doppelbindung

Die Reaktion eines Radikals mit einer C=C-Doppelbindung fällt ebenfalls noch unter die Initialisierung der radikalischen Polymerisation (Abb. 2.16).



Abb.2.17: Kettenwachstum

Durch sukzessive Reaktion der vorhandenen Radikale mit weiteren C=C-Doppelbindungen kommt es zum Kettenwachstum (Abb.2.17).

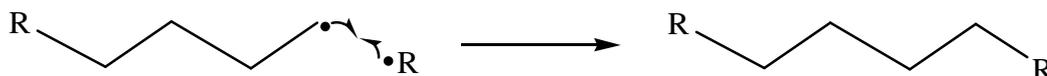


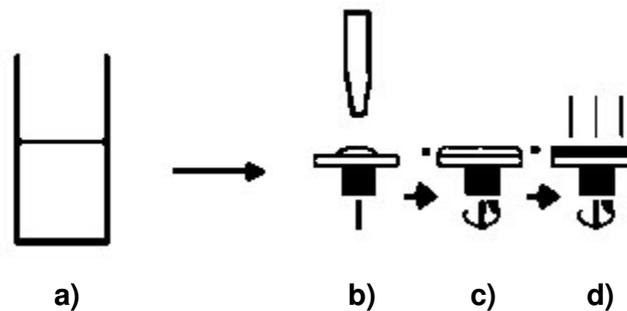
Abb.2.18: Abbruchreaktion

Regiert die sich durch die Wachstumsreaktion ausgebildete Kette mit einem weiteren Radikal, wobei es sich um ein Starterradikal oder ein durch Kettenwachstum entstandenes Radikal

handeln kann, kommt es zum Kettenabbruch durch Rekombination (Abb.2.18). Zusammenfassend kann man sagen, daß die Polymerisation zur Generierung organischer Festkörper herangezogen werden kann, die einen hohen Vernetzungsgrad aufweisen. Je nach Einsatzmenge des UV-Initiators und den vorherrschenden Reaktionsbedingungen kann das Kettenwachstum gesteuert werden, bei der Kinetik dieser Reaktion handelt es sich jedoch um einen sehr komplexen Prozeß.

#### 2.7.4 Rotationsbeschichtung (Spin-Coating)

Das Spin-coating ist ein Verfahren zum Auftragen dünner und gleichmäßiger Schichten bzw. Filme auf einem Substrat, deren Dicke im Bereich von 1 µm und darunter liegt. Zum Aufschleudern eignen sich alle in Lösung vorliegenden Materialien.



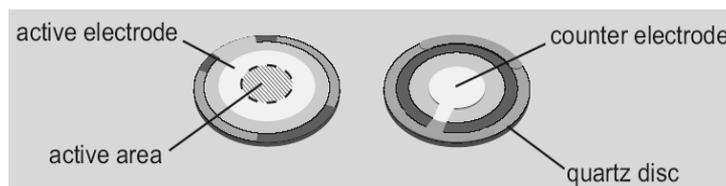
**Abb. 2.19:** Schematischer Ablauf des Spin-coatings: a) Sol-Gel-Lösung b) wird mit einer Pipettenspitze auf des Substrat aufgebracht c) und durch Rotation des Substrats wird gleichmässige Verteilung erreicht, überschüssige Lösung wird abgeschleudert d) abschließend erfolgt die Trocknung der Schicht

Angewendet wird das Verfahren industriell u.a. bei der Funktionalisierung von Wafern (Substratscheibe), wie beispielsweise beim Beschichten von CDs in der Mikroelektronik.<sup>[85]</sup> Realisierbar ist auch die Generierung dünner Filme auf metallischen Substraten über den Sol-Gel-Prozeß.<sup>[80]</sup> Das Substrat wird auf einem Drehteller an der Unterseite fixiert (Abb. 2.19). Mit einer Dosiereinrichtung über dem Zentrum des Wafers (Substratscheibe) wird die gewünschte Menge der Lösung aufgebracht. Beschleunigung, Enddrehzahl und Zeit werden am Spin-Coater eingestellt, und die Lösung wird gleichmäßig über die Waferoberfläche verteilt. Eventuell überschüssiges Material wird vom Wafer abgeschleudert. Typischerweise werden Polymer- bzw. Sol-Gel-Lösungen verwendet, wobei Molekulargewicht, Viskosität, Drehgeschwindigkeit, Beschleunigung, Prozeßdauer als auch die Temperatur einen direkten Einfluß auf die Filmdicke haben.<sup>[86]</sup> Um eine feste Schicht zu erhalten, ist es notwendig, das Lösungsmittel zu entfernen. Ein Teil des Lösungsmittels verflüchtigt sich schon beim

Aufschleudern. Desweiteren kann restliches Lösungsmittel je nach dessen Flüchtigkeit durch Trocknung bei RT oder durch Hitzeeinwirkung entfernt werden.

## 2.8 QCM-D Methode

Mit Hilfe der QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring) Methode kann die Adsorption von Proteinen in Lösung auf Oberflächen in Echtzeit untersucht werden. Diese Prozesse sind für biomedizinische Technologien von großer Bedeutung. Es gibt eine Reihe von Methoden, um Proteinadsorption zu untersuchen. Sie beruhen auf Prinzipien wie optischer Absorption, Brechungsindexänderung, radioaktiver Markierung, elektro-mechanischer Mikrogravimetrie oder Fluoreszenzmarkierung.



**Abb. 2.20:** Aufbau der 5 MHz AT-cut Quarzkristalle im Lieferzustand. Die „active area“ kann z.B. mit Haftvermittler/Wirkstoff modifiziert werden

QCM-D basiert auf der Grundlage eines piezoelektrischen Oszillators. Im Gegensatz zu optischen Methoden wie der Ellipsometrie, bei der nur reflektierende Oberflächen vermessen werden können oder der OWLS (optical waveguide lightmode spectroscopy), für die hochtransparente Oberflächen benötigt werden, ist es nicht nur günstiger, sondern es können bei QCM-D fast alle Oberflächenmaterialien verwendet werden, solange sie sich als dünner Film (< 200 nm) auf dem Quarzkristall abscheiden lassen.<sup>[87]</sup>

An Unter- und Oberseite der verwendeten 5 MHz AT-cut Quarzkristalle (quartz disc) sind Goldelektroden (counter & active electrode) aufgedampft (Abb. 2.20). Durch Anlegen einer abgestimmten Wechselspannung wird an dem Quarzkristall ein piezoelektrischer Effekt induziert, der eine Oszillation mit einer für den Kristall charakteristischen Resonanzfrequenz im MHz-Bereich anregt. Die Frequenz dieser Oszillation ist von der Dicke des Kristalls abhängig. Adsorbieren auf der Oberfläche des Kristalls Proteine, kann anhand des Absinkens der Frequenz der Resonanzschwingung, die Masse des Adsorbats gemäß der Sauerbrey-Gleichung (Formel 2.3) bestimmt werden.<sup>[88]</sup> Es werden die Frequenzänderungen der

Grundschwingung (5 MHz), des 3. (15 MHz), des 5. (25 MHz) und des 7. (35 MHz) Obertons bestimmt. Die Messempfindlichkeit steigt mit der Höhe des Obertons. Da die Frequenzänderungen mit einer sehr hohen Präzision gemessen werden können, ist es möglich selbst geringe Massenänderungen zu bestimmen.

$$\Delta m = -C \cdot \frac{\Delta f}{n} \quad \text{Formel 2.3}$$

mit  $\Delta m$  = Massenänderung,  $C$  = Massenempfindliche Konstante,  $\Delta f$  = Frequenzänderung und  $n$  = Anzahl des Obertons

So besitzen unbeschichtete Kristalle eine Massensensitivität von  $1 \text{ ng/cm}^2$  bei Messungen an Luft und  $5 \text{ ng/cm}^2$  bei Messungen in Wasser. Die Sauerbrey-Gleichung gilt allerdings nur für den adsorbierten Film, wenn dieser folgende Eigenschaften besitzt:<sup>[89]</sup>

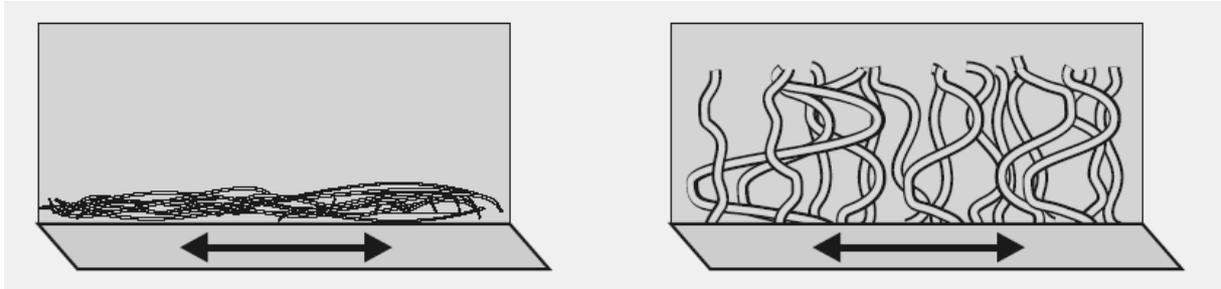
- Eine geringe Masse im Vergleich zur Masse des Kristalls
- Starre Adsorption, ohne auf der oszillierenden Oberfläche des Adsorbens zu gleiten oder zu deformieren
- Gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt sein

Die elastisch adsorbierten Proteinfilm erzeugen aber wegen ihrer viskoelastischen Eigenschaften eine zusätzliche Dämpfung der Resonanzschwingung. Um dies zu berücksichtigen wird in der QCM-D-Technik neben der Frequenzänderung auch der Dissipationsfaktor bestimmt. Der Dissipationsfaktor  $D$  ist zum Gütefaktor  $Q$  invers (Formel 2.4).

$$D = \frac{1}{Q} = \frac{\text{Energieverlust pro Oszillation}}{\text{Gesamtenergie des Systems}} \quad \text{Formel 2.4}$$

$D$  ist die Summe aller Mechanismen, die zum Energieverlust im oszillierenden System führen. Die Adsorption von Proteinen führt zu einem Ansteigen der Dissipation. Für einen 5 MHz Quarzkristall beträgt die Dissipationsfaktor-Empfindlichkeit  $2 \times 10^{-8}$  an Luft und  $3 \times 10^{-7}$  in Wasser. Die Empfindlichkeit bei Messungen in Wasser ist geringer, da die Dämpfung der Schwingung durch den Oberflächenkontakt mit der Flüssigkeit groß ist, im Vergleich zur Dämpfung die durch die Adsorption von Proteinen hervorgerufen wird.

In Abb. 2.21 ist ein Modell der Proteinadsorption auf der Kristall-Oberfläche dargestellt, Proteine können als dichte Schicht (hohe Viskosität) bis hin zu Schichten niedriger Viskosität adsorbieren, bei letzterer ist die entsprechende Dissipation am höchsten.



**Abb. 2.21** (links): Protein Adsorbat (Striche) mit hoher Viskosität und (rechts): Adsorbierte Proteine (Linien) mit niedriger Viskosität auf schwingender Quarz-Oberfläche (Doppelpfeil)

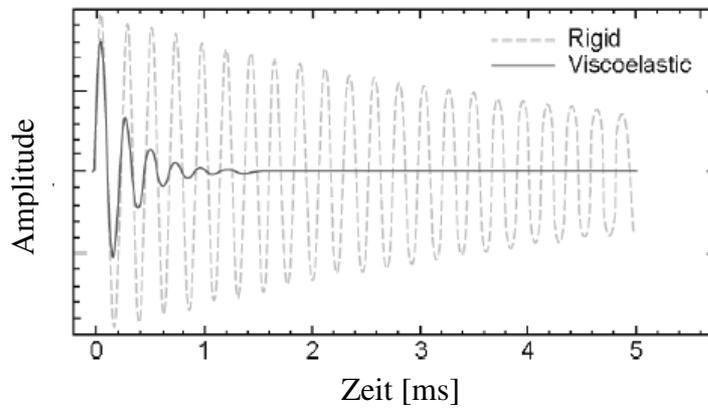
Um simultane Informationen über die Änderungen des Frequenz und des Dissipationsfaktors in Echtzeit zu erhalten, wird die Spannung mit der die Oszillationen angeregt werden periodisch an- und ausgeschaltet. Nach dem Abschalten der Spannung wird eine exponentiell gedämpfte sinusförmige Abklingkurve erhalten (Formel 2.5), wobei  $D$  mit der Dämpfungszeitkonstante  $\tau$  in folgendem Zusammenhang steht (Formel 2.6):

$$A(t) = A_0 e^{-t/\tau} \sin(2\pi f t + \varphi) \quad \& \quad D = \frac{1}{\pi f \tau} \quad \text{Formel 2.5 \& Formel 2.6}$$

$A_0$  = Spannungsamplitude zur Zeit  $t = 0$ ,  $\tau$  = Dämpfungszeitkonstante,  $f$  = Frequenz,  $t$  = Zeit,  $\varphi$  = Phasenwinkel

Durch numerische Anpassung der Abklingkurve gemäß Formel 2.5 wird simultan sowohl die Resonanzfrequenz als auch der Dissipationsfaktor erhalten.<sup>[90]</sup> Aus der Dissipation lassen sich Rückschlüsse auf die viskoelastischen Eigenschaften des Adsorbats ziehen (Abb. 2.22). So besitzen viskoelastische adsorbierte Filme einen weit höheren Dissipationsfaktor als starre Filme. Um die viskoelastischen Eigenschaften unterschiedlicher Systeme miteinander zu vergleichen, ist es sinnvoll das  $\Delta D/\Delta f$  Verhältnis zu betrachten. Dieses Verhältnis ist proportional zur Viskoelastizität. Änderungen in der Viskoelastizität lassen entweder auf Konformationsänderungen oder auf Änderungen der Protein-Protein-Wechselwirkungen schließen.

Diese Effekte stehen miteinander im Zusammenhang. Konformationsänderungen der Proteine werden in vivo mit dem Auslösen der Blutgerinnungskaskade in Verbindung gebracht.<sup>[91]</sup>



**Abb. 2.22:** Vergleich der Dämpfung der Abklingkurve eines viskoelastischen (viscoelastic, durchgezogene Linie) und eines starren (rigid, gestrichelte Linie) Adsorbats, woraus sich der Dissipationsfaktor bestimmen lässt.<sup>[92]</sup>

### 3 Vorbehandlung von Titan zur kovalenten Wirkstoffanbindung

Dauerimplantate, die im permanenten Blutkontakt stehen, müssen neben den allgemeinen Anforderungen wie ausreichender mechanischer Beschaffenheit vor allem eine anwendungs- bzw. ortsgebundene Biokompatibilität besitzen. Bei Stentwerkstoffen bedeutet letzteres hämokompatibles Verhalten, welches sowohl durch die Oberflächenstruktur als auch durch die Oberflächenzusammensetzung eingestellt werden kann. Als Stentwerkstoffe kommen z.Zt. hauptsächlich der Stahl X2CrNiMo 17 13 2 (AISI 316L), Legierungen aus Nickel/Titan bzw. vereinzelt auch Tantal zum Einsatz.<sup>[93]</sup> Beim Einsatz dieser Materialien kann es jedoch neben Ni-induzierten Kontaktallergien zu weit häufiger vorkommenden postoperativen Restenosen (Wiederverengung) kommen, die auf Auslösen der Blutgerinnung bzw. auf Überwucherung mit glatten Muskelzellen zurückzuführen sind. Um diese Effekte zu vermeiden, können entsprechende Wirkstoffe an die Materialoberfläche immobilisiert werden. Die Anbindung von z.B. Heparin kann über Haftvermittlermoleküle realisiert werden, welche eine kovalente Bindung des Wirkstoffs an die Substratoberfläche ermöglichen.

Ziel dieses Kapitels ist die Untersuchung der Anbindung von Haftvermittlermolekülen an Titan-Substratoberflächen, um die Grundlage für eine erfolgreiche Wirkstoffanbindung zu schaffen. Hierbei sollten die Ti-Substrate zuerst über verschiedene Verfahren mit definierten TiO<sub>2</sub>-Schichten modifiziert und anschließend über Rotationsbeschichtung (Spin-Coating) mit den jeweiligen Haftvermittlermolekülen (Spacer) funktionalisiert werden. Die jeweilige TiO<sub>2</sub>-Schicht bzw. deren Topographie sollte mit der Menge an gebundenen Haftvermittler-Molekülen korreliert werden. Die Moleküllänge der verschiedenen Spacer variierte, was Auswirkungen auf die Wirksamkeit des gebundenen Heparins haben sollte (s. Kapitel 4.7).

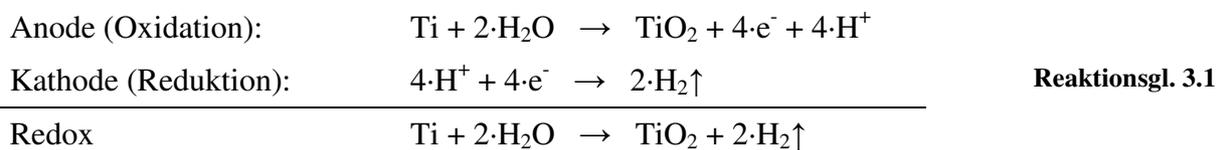
#### 3.1 Erzeugung definierter Titandioxid-Schichten auf Titan

In diesem Kapitel wird die Vorbehandlung von Titan zur Wirkstoffanbindung untersucht, indem über die nachfolgend aufgeführten Verfahren (Anodische/Thermische Oxidation, PVD & Sol-Gel Prozeß) definierte TiO<sub>2</sub>-Beschichtungen auf polierte cp-Titansubstrate aufgebracht wurden. Die Substrate wurden anschließend mit verschiedenen Haftvermittler-Molekülen funktionalisiert und deren Anzahl pro Flächeneinheit über die Ninhydrin-Reaktion bestimmt,

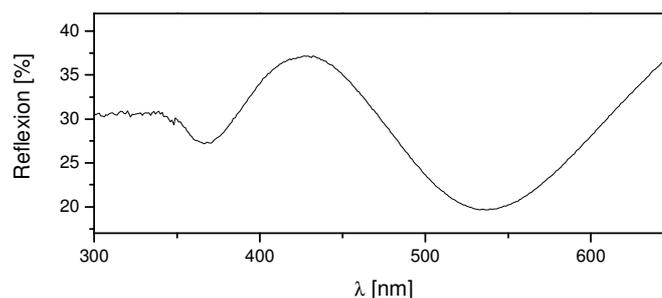
um einen Zusammenhang zwischen den hergestellten TiO<sub>2</sub>-Schichten (bzw. deren Topographie) und der Menge an immobilisiertem Haftvermittler ableiten zu können. Die Anbindung von Heparin an die verschiedenen Haftvermittler-Moleküle ist Gegenstand von Kapitel 4.

### 3.1.1 Anodische Oxidation

Die Anodisierung bietet den Vorteil, dass Oberflächen von Substraten nahezu jeder Form gleichmäßig oxidiert werden können. Hierzu wurden die Ti-Plättchen leitend an der Anode fixiert und zwischen diesen und der Platinnetz-Gegenelektrode ein elektrisches Potential angelegt. Die dabei ablaufende Redoxreaktion ist in Reaktionsgleichung 3.1 dargestellt:



Die elektrochemische Oxidation von Titan lieferte TiO<sub>2</sub>-Schichten, die aufgrund der Interferenz mit Tageslicht je nach deren Dicke unterschiedlich farblich erschienen. Dieser Effekt konnte reflexionspektroskopisch (Abb. 3.1) dazu verwendet werden, um die Schichtdicke des TiO<sub>2</sub> zu berechnen.<sup>[94]</sup>



**Abb. 3.1:** UV-VIS-Spektrum einer TiO<sub>2</sub>-Schicht (auf Titan) zur Ermittlung der Schichtdicke, gemessen in Reflexion

Setzt man die Wellenzahlen der jeweiligen Extrema in die allgemeine Formel für die Lage der Interferenzmaxima bzw. -minima einer dünnen Schicht ein (Formel 3.1), so ergibt sich eine berechnete Schichtdicke von  $d = 362 \text{ nm}$ .

$$|v_{extr.1} - v_{extr.2}| = \frac{\Delta j}{4d\sqrt{n_2^2 - \sin^2 \varphi}} \quad \text{mit } v = \frac{1}{\lambda} \quad \text{Formel 3.1}$$

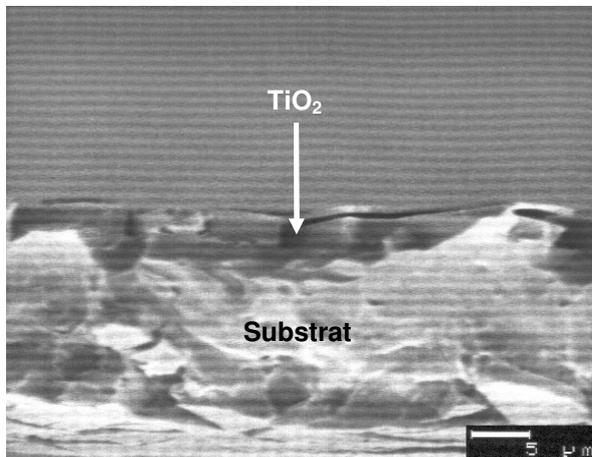
Dünnschichtoptische Formel zur Bestimmung der Schichtdicke; mit  $v$  = Wellenzahl der jeweiligen Minima,  $\Delta j = 2$  als Abstand zwischen den Extrema,  $d$  = Schichtdicke,  $n_2^2 = 2.52$  als Brechungsindex von  $\text{TiO}_2$  (Anatas) und  $\varphi = 0^\circ$  als Lichteinfallswinkel relativ zum senkrechten Einfall.

### 3.1.2 Thermische Oxidation

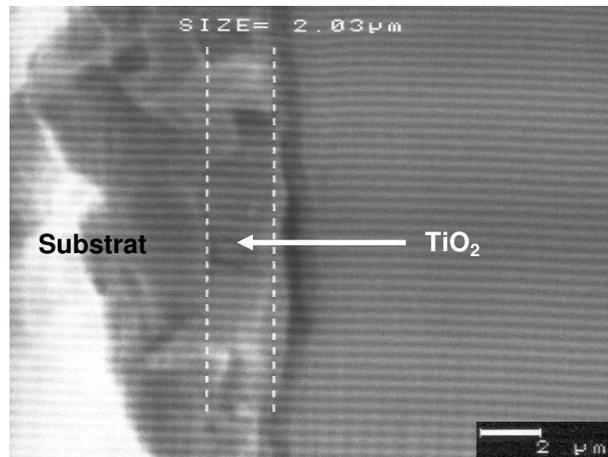
Die thermische Oxidation von Titan erzeugt lateral sehr homogene  $\text{TiO}_2$ -Schichten und besitzt ebenso wie die Anodisierung den Vorteil, dass Substratoberflächen nahezu jeder Form gleichmäßig oxidiert werden können. Die Oxidation der Ti-Plättchen erfolgte unter Normalbedingungen durch Luftsauerstoff bei  $600^\circ\text{C}$  (Reaktionsgl. 3.2).<sup>[96]</sup>



Um die  $\text{TiO}_2$ -Schichtdicke bestimmen zu können, wurde Titan-Folie oxidiert und deren Abrißkante über REM vermessen (Abb. 3.2 & Abb. 3.3).



**Abb. 3.2:** Blick auf die Abrißkante (REM) einer thermisch oxidierten Ti-Folie bei einer Skalierung von  $5\ \mu\text{m}$ , der untere (hellere) Teil des Bildes stellt das Substrat, der dunklere (obere) Horizont das  $\text{TiO}_2$  dar

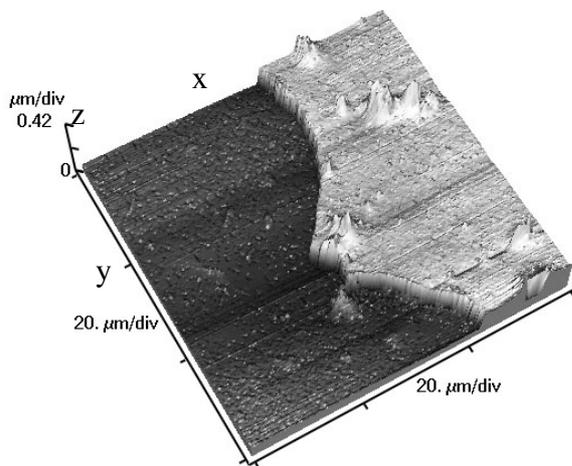


**Abb. 3.3:** Bestimmung der  $\text{TiO}_2$ -Schichtdicke (REM) an der Abrißkante bei einer Skalierung von  $2\ \mu\text{m}$ . Das Substrat befindet sich linksseitig, die gestrichelten Linien grenzen den  $\text{TiO}_2$ -Durchmesser ab

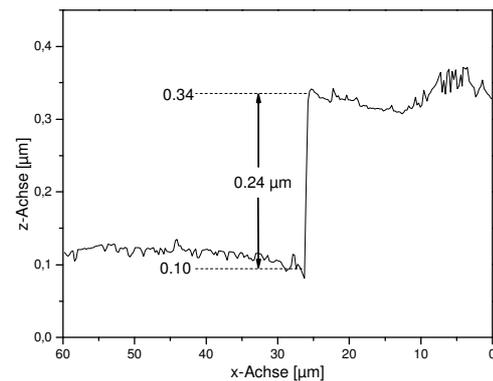
Die Schichtdicke konnte durch geeignete Wahl der Parameter (Temperatur und Dauer der Oxidation) variiert werden und betrug nach 1.5 h bei  $600^\circ\text{C}$  ungefähr  $2\ \mu\text{m}$ .

### 3.1.3 PVD (Physical Vapour Deposition)

Die Eigenschaften der über physikalische Gasphasenabscheidung auf polierten Titanplättchen hergestellten Titanoxidschichten konnte durch Wahl der Beschichtungsparameter (Gaszusammensetzung, Gasfluß bzw. Gasdruck und Beschichtungsdauer) gezielt eingestellt werden. Das Prinzip der hier angewandten Kathodenzerstäubung beruht darauf, dass Substrat und Ti-Target (Material, mit dem beschichtet werden soll) in eine Vakuumkammer eingebracht werden, die anschliessend mit Argongas (Plasmagas) und Sauerstoff (Reaktionsgas) bei jeweils definiertem Partialdruck geflutet wird. Ein HF-Magnetron ionisiert das Argongas aufgrund der unterschiedlichen Beweglichkeit von Elektronen und Atomkern zu Argonplasma. Die positiv geladenen Edelgasatome werden in einem elektrischen Feld („Self-Biasing“) auf das Ti-Target (Kathode) beschleunigt und schlagen beim Aufprall Ti-Kluster heraus, die mit dem ebenfalls in der Gasphase befindlichen Sauerstoff zu  $\text{TiO}_2$  reagieren und sich als dünne Schicht auf dem Substrat abscheiden.<sup>[95]</sup>



**Abb. 3.4:** Darstellung der „Kante“ (AFM) zwischen beschichtetem und unbeschichtetem Substrat



**Abb. 3.5:** Abbildung der Kante als „Schnitt“ durch die xz-Ebene von **Abb. 3.4**

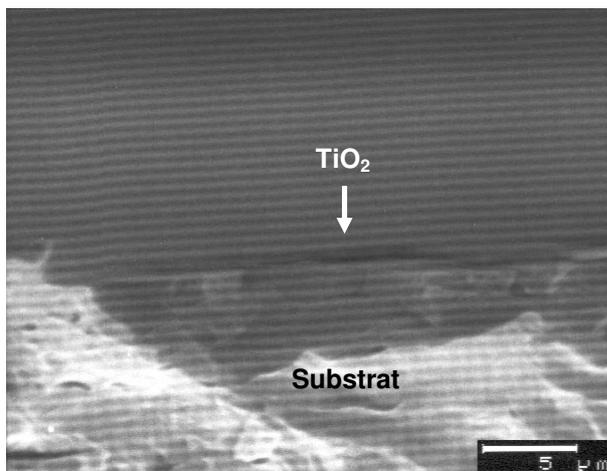
Die Bestimmung der Schichtdicke erfolgte dadurch, dass die Substrate vor der Beschichtung mit einem Textmarkerstrich versehen wurden, auf dem sich das abgeschiedene  $\text{TiO}_2$  anschließend mit Aceton leicht wieder entfernen ließ. Durch Vermessung der „Kante“ (AFM; s. Abb. 3.4) zwischen beschichtetem und unbeschichtetem Substrat konnte die Dicke der Oxidschicht ermittelt werden.

### 3.1.4 Sol-Gel-Prozeß

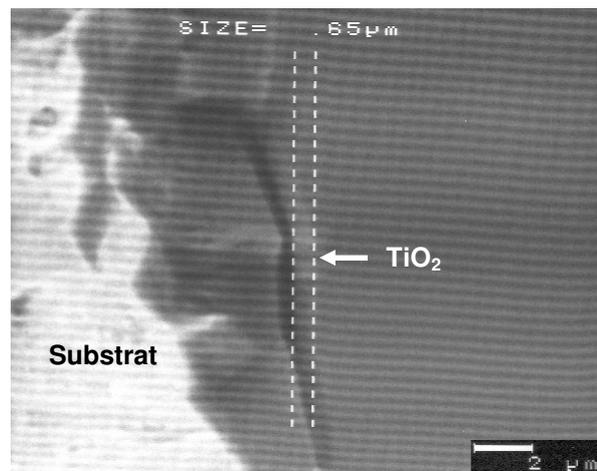
Der Sol-Gel-Prozeß bietet den Vorteil, daß sehr homogene  $\text{TiO}_2$ -Schichten mit gezielten Materialeigenschaften (Porosität & Härte) durch Wahl der Prozeßparameter (Wassergehalt, Konzentration des Precursors, Trocknungsbedingungen) generiert werden können. Die Hydrolyse des Precursors (Tetrabutoxytitanat, Reaktionsgl. 3.3) erfolgte durch Luftfeuchtigkeit, zeitgleich setzte die Polykondensation des  $\text{Ti}(\text{OH})_4$  unter Ausbildung von Ti-O-Ti-Bindungen (Reaktionsgl. 3.4) ein.<sup>[96]</sup>



Die auf diese Weise generierte  $\text{TiO}_2$ -Schichtdicke konnte ermittelt werden, indem Titan-Folie über den Spin-Coating-Prozeß (s. Kapitel 2.7.4) beschichtet und deren Abrißkante (REM) vermessen wurde (s. Abb. 3.6 & Abb. 3.7).



**Abb. 3.6:** Abrißkante (REM) einer über den Sol-Gel-Prozeß beschichteten Ti-Folie bei einer Skalierung von  $5 \mu\text{m}$ , der untere (hellere) Teil des Bildes stellt das Substrat, der dunklere (obere) Horizont das  $\text{TiO}_2$  dar

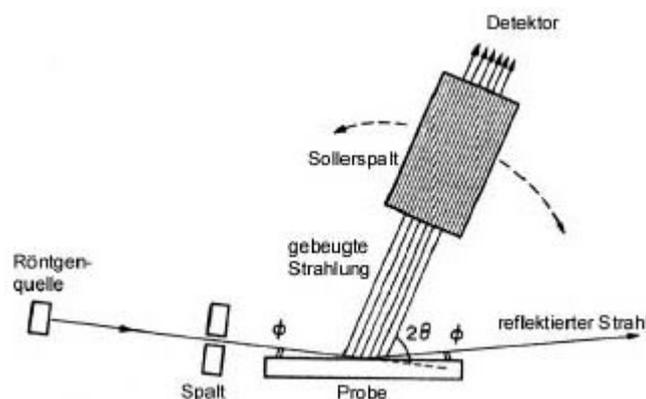


**Abb. 3.7:** Bestimmung der  $\text{TiO}_2$ -Schichtdicke (REM) an der Abrißkante bei einer Skalierung von  $2 \mu\text{m}$ . Das Substrat befindet sich linksseitig, die gestrichelten Linien grenzen den  $\text{TiO}_2$ -Durchmesser ab

Die so erhaltene  $\text{TiO}_2$ -Schichtdicke von  $0,65 \mu\text{m}$  konnte durch mehrmaliges Beschichten erreicht werden. Die Kalzinierung erfolgte nach jeder Beschichtungssequenz bei  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ . Bei einmaliger Aufbringung dickerer Schichten  $> 100 \text{ nm}$  kommt es bei der Trocknung durch Erhitzen zu Rissbildungen, bedingt durch Spannungen im Material.

### 3.2 Modifikation der TiO<sub>2</sub>-Schichten

Die Modifikation der über die verschiedenen Verfahren hergestellten TiO<sub>2</sub>-Schichten wurde über Röntgenbeugung bestimmt, welche die Intensität und den Beugungswinkel der an den Netzebenen des TiO<sub>2</sub> gebeugten monochromatischen Röntgenstrahlung misst (Abb. 3.11). Da die Beugungswahrscheinlichkeit hauptsächlich von der Dichte der Elektronen und somit von der Ordnungszahl abhängt, können für dünne Schichten (< μm) oder Schichten mit leichten Elementen Probleme wegen zu geringer Intensität der gebeugten Strahlung entstehen, bzw. diese von Signalen des Substrates überlagert werden. Aus diesem Grund wurden die dünnen TiO<sub>2</sub>-Schichten in dieser Arbeit unter streifendem Einfall der Röntgenstrahlung (Grazing Incidence XRD, GIXRD) untersucht, da sich hierdurch das Intensitätsverhältnis Schicht-zu-Substrat verbesserte. Bedingt durch den kleinen Einfallswinkel (konstant 1°) und dem damit verbundenen langen Weg des Röntgenstrahls durch die Schicht, lieferte GIXRD Informationen aus dem oberflächennahen Bereich der Probe mit hoher Intensität der Reflexe, die über einen beweglichen Detektor eingefangen wurden (Abb. 3.8).<sup>[97]</sup>



**Abb. 3.8:** Aufbau des Röntgendiffraktometers; bei GIXRD Messungen beträgt der Winkel  $\Phi$  des einfallenden Röntgenstrahls auf die Probe konstant 1°, nur der Detektor wird bewegt

Allgemein unterscheiden sich die TiO<sub>2</sub>-Modifikationen Anatas und Rutil darin, dass ersteres tetragonal-holoedrische (= höchstsymmetrische Gruppe; 4/m 2/m 2/m) und letzteres tetragonale (4/m 2/m 2/m) Kristalle mit prismatischem (nadelig) Habitus ausbildet.<sup>[98]</sup> Hierbei ist bei beiden Modifikationen je ein Ti-Atom (zentral im Oktaeder liegend) in erster Koordinationsphäre von jeweils sechs O-Atomen umgeben, die jeweils in den Ecken eines Oktaeders liegen.

Beim Anatas sind diese Oktaeder über Eckpunkte, beim Rutil hingegen über Kanten miteinander verbunden (Abb. 3.9 & Abb. 3.10).

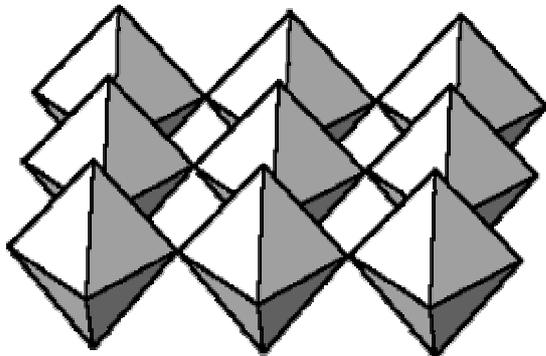


Abb. 3.9: Anatas

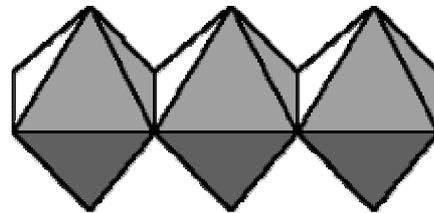
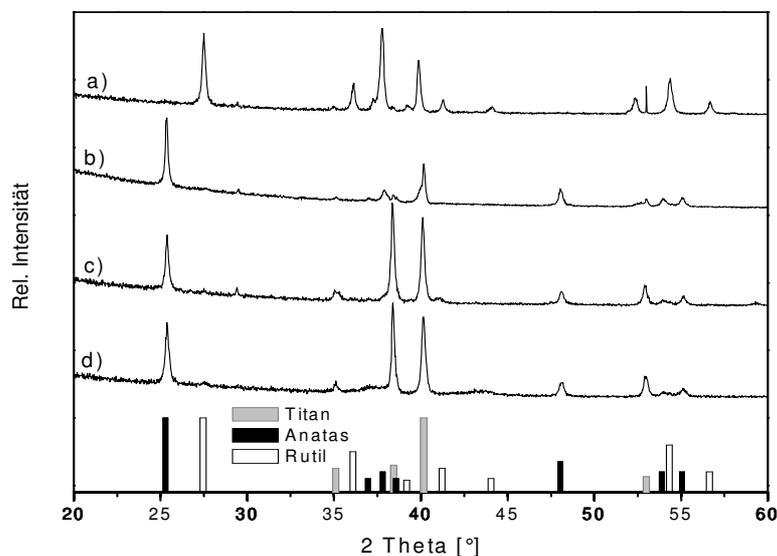


Abb. 3.10: Rutil

Aus den Diffraktogrammen (Abb. 3.11) geht hervor, dass mit Ausnahme der über thermische Oxidation hergestellten  $\text{TiO}_2$ -Schichten (Rutil) alle übrigen  $\text{TiO}_2$ -Schichten aus der Modifikation Anatas bestanden.



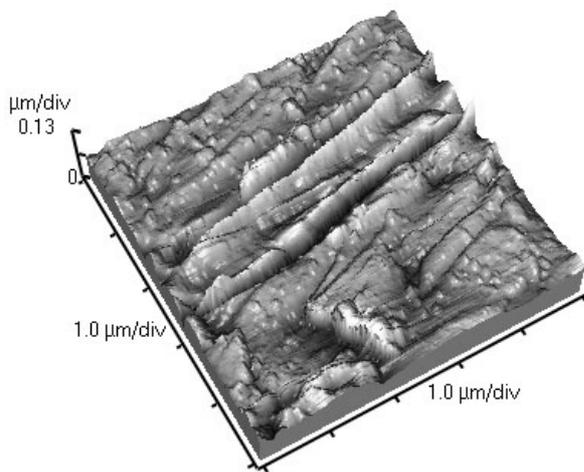
**Abb. 3.11:** Röntgendiffraktogramme (Cu-Anode:  $\text{CuK}\alpha_1$ - und  $\text{CuK}\alpha_2$ -Strahlung; Messungen ohne sekundärseitigen Monochromator) der über die verschiedenen Verfahren (a) Thermische Oxidation b) Sol-Gel-Prozess c) Anodische Oxidation d) PVD-Magnetron-Sputtering) hergestellten  $\text{TiO}_2$ -Beschichtungen auf Ti-Substraten. Miller indices (h, k & l)/ $2\Phi$ -Wert\* für Anatas: 101/25.3, 103/36.9, 004/37.8, 112/38.6, 200/48.1, 105/53.9, 211/55.1; Rutil: 110/27.4, 101/36.1, 200/39.2, 111/41.2, 210/44.1, 211/54.3, 220/56.6; Titan: 100/35.1, 002/38.4, 101/40.2, 102/53.0; \*( $2\Phi$ -Werte für Miller-Indices gelten nur für  $\text{CuK}\alpha_1$ -Strahlung, Peaks der Diffraktogramme a)-d) weichen geringfügig davon ab)

Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich die kinetisch schneller bildende Modifikation Anatas (kinetisches Produkt) bei Erhitzung über  $550\text{ °C}$  allmählich in die thermodynamisch

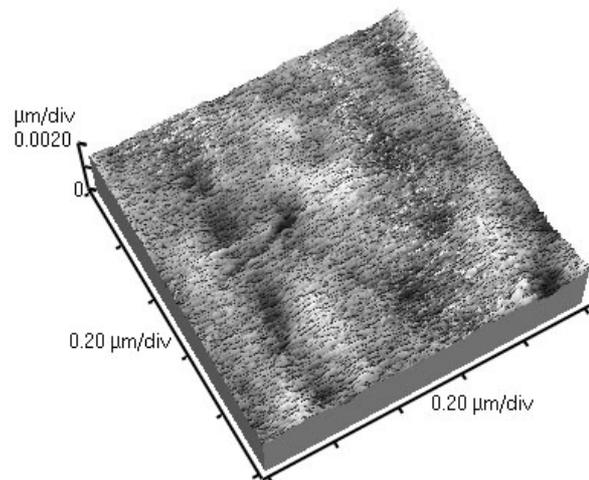
stabilere Modifikation Rutil umwandelte. Die einzelnen Peaks der verschiedenen Modifikationen Anatas/Rutil bzw. des Titans (Abb. 3.11) konnten über die Miller Indices den entsprechenden Gitterebenen der Kristallite zugeordnet werden.

### 3.3 Topographie bzw. Rauigkeit der TiO<sub>2</sub>-Schichten

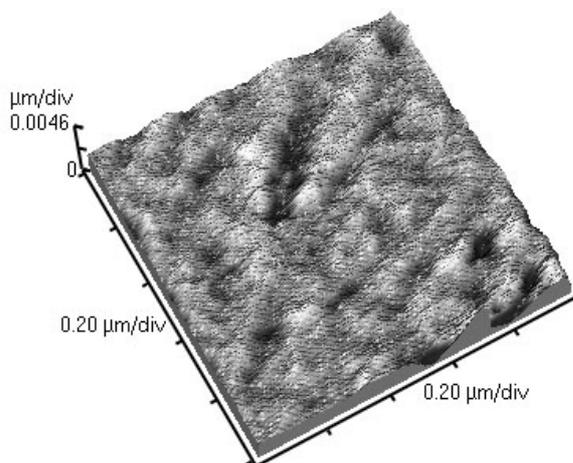
Die Topographien der auf den polierten Ti-Substraten über die verschiedenen Verfahren dargestellten TiO<sub>2</sub>-Beschichtungen wurden mit dem AFM im Kontaktmodus bestimmt und sind qualitativ in den Abb. 3.12–Abb. 3.17 dargestellt.



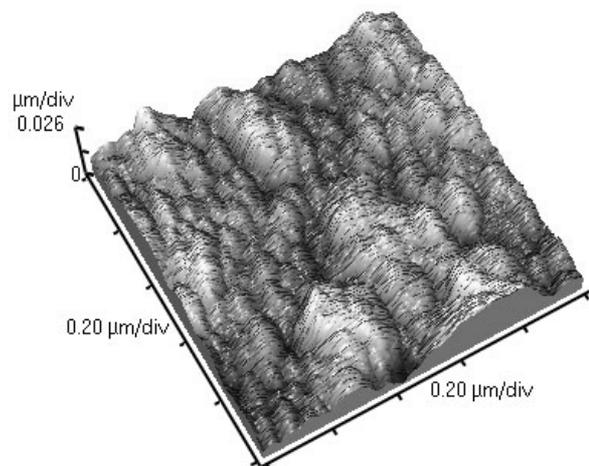
**Abb. 3.12:** Unpoliertes Ti-Substrat (Lieferzustand)



**Abb. 3.13:** Poliertes Ti-Substrat



**Abb. 3.14:** Anodisch oxidiertes Ti-Substrat



**Abb. 3.15:** Thermisch oxidiertes Ti-Substrat

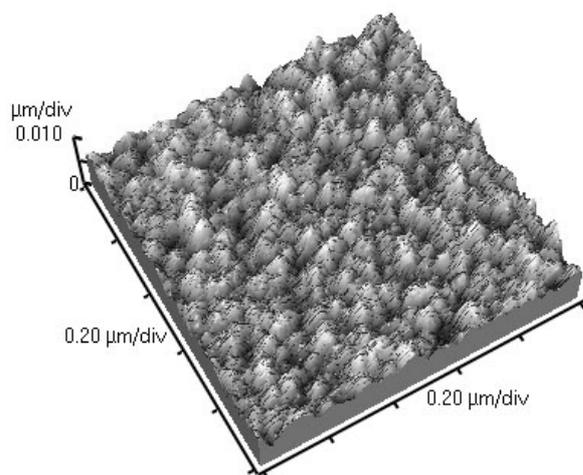


Abb. 3.16: Über PVD beschichtetes Ti-Substrat

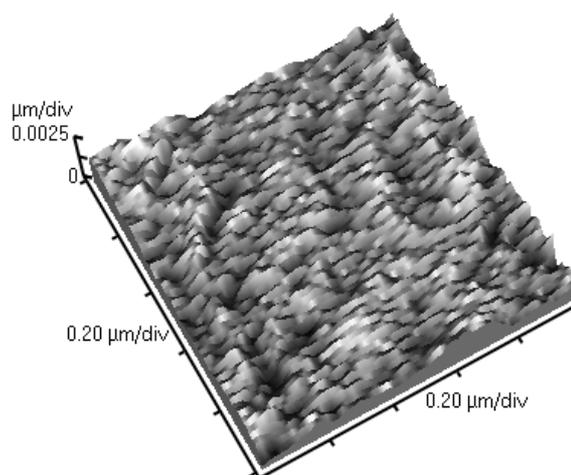


Abb. 3.17: Sol-Gel-beschichtetes Ti-Substrat

Abb. 3.12–Abb. 3.17: Rasterkraftmikroskopische (AFM) Aufnahmen (1 µm Kantenlänge) der verschiedenen Titan-Substrate im Kontakt-Modus. Die Titansubstrate liegen im Lieferzustand vor (Abb. 3.12) und werden anschließend poliert, um eine einheitliche Oberfläche zu schaffen (Abb. 3.13), bevor sie über Anodische und Thermische Oxidation (Abb. 3.14 & Abb. 3.15), PVD (Abb. 3.16) und über den Sol-Gel-Prozeß (Abb. 3.17) mit den entsprechenden TiO<sub>2</sub>-Schichten modifiziert wurden

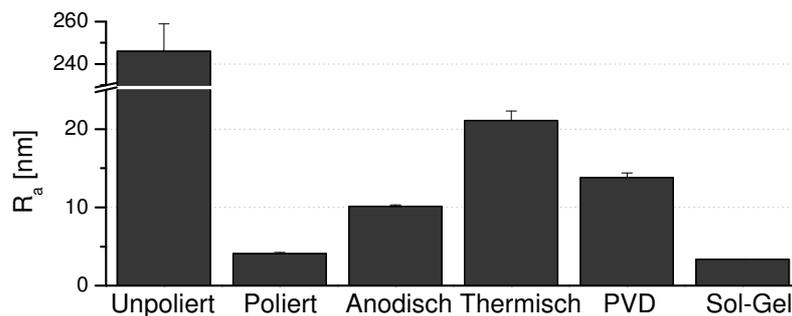
Da die Skalierung der z-Achse („Schichtwachstum“) automatisch von der Software des AFM-Geräts vorgenommen wurde, war ein direkter Vergleich der unterschiedlichen Topographien nicht möglich. Aufgrund der Tatsache, dass die Bestimmung der spezifischen Oberfläche mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) nicht möglich war, wurden die mittleren Rauigkeiten ( $R_a$ ) der unterschiedlich präparierten TiO<sub>2</sub>-Schichten miteinander verglichen. Die  $R_a$ -Werte für die Proben aus den Abb. 3.12–Abb. 3.17 sind in Tabelle 3.1 zusammen mit den ggf. jeweiligen Schichtdicken des TiO<sub>2</sub> dargelegt und in Abb. 3.18 gegenüberstellend abgebildet.

|                                    | Unpoliert | Poliert   | Anodisch | Thermisch | PVD      | Sol-Gel   |
|------------------------------------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|
| <b><math>R_a</math>-Werte [nm]</b> | 246±13    | 4.12±0.12 | 10.1±0.2 | 21.1±1.2  | 13.8±0.6 | 3.34±0.01 |
| <b>Schichtdicke [nm]</b>           | -         | -         | 362*     | 2195±165  | 248±25   | 650±75    |

**Tabelle 3.1:** Über AFM ermittelte Rauigkeiten ( $R_a$ ) der über die verschiedenen Verfahren auf polierten Titan-Substraten hergestellten TiO<sub>2</sub>-Schichten. Jeder Wert ist der Mittelwert aus drei Messungen und die Fehler sind Standardabweichungen. Die Bestimmung der jeweiligen TiO<sub>2</sub>-Schichtdicken erfolgte wie in Kapitel 3.1 bereits beschrieben (\*errechnet)

Die mittlere Rauigkeit  $R_a$  gibt den mittleren Abstand eines Messpunktes auf der Oberfläche zur Mittellinie an. Die Mittellinie schneidet innerhalb der Bezugsstrecke das wirkliche Profil so, dass die Summe der betragsmässigen Profilabweichungen, bezogen auf die Mittellinie, minimal wird. Die mittlere Rauigkeit entspricht also dem arithmetischen Mittel der Abweichungen von der Mittellinie.<sup>[99]</sup>

Es ist gut zu erkennen, dass eine Politur der Substrate (Lieferzustand) für die Einstellung einer definierten und somit für die Weiterverarbeitung geeigneten Topographie unumgänglich war. Hierbei ist noch erwähnenswert, dass die Substrate vor der Weiterverarbeitung zum Entfernen von Verunreinigungen bzw. der nativen Oxidschicht nicht wie üblicherweise in der Literatur beschrieben geätzt (Ätzlösungen enthalten  $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{HF}$ ) wurden. Hierbei hätten kürzere Beizezeiten (weniger als 30 s) die native  $\text{TiO}_2$ -Passivierungsschicht nicht vollständig entfernt, wohingegen längere Ätzzeiten zu Porenbildung geführt hätten, die einen massiven Einfluss auf die Topographie der Substrate gehabt hätte.<sup>[100]</sup>



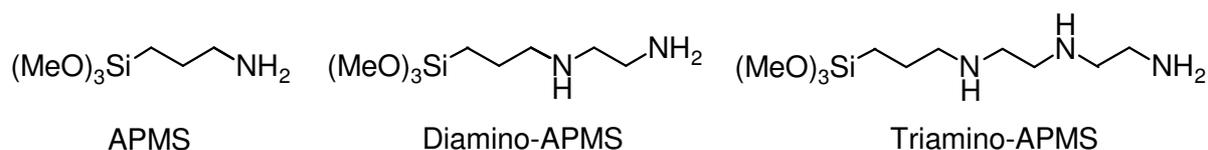
**Abb. 3.18:** Rauigkeiten ( $R_a$ ) der verschiedenen unbeschichteten Titansubstrate (unpoliert und poliert) bzw. der über die verschiedenen Verfahren beschichteten polierten Titansubstrate (Anodisch, Thermisch und PVD)

Es ist deutlich zu sehen (Abb. 3.18), dass die über den Sol-Gel Prozeß beschichteten Substrate die geringste mittlere Rauigkeit ( $3.34 \pm 0.01$  nm) und die über Thermische Oxidation modifizierte Substrate den größten  $R_a$ -Wert von  $21.1 \pm 1.2$  nm besaßen. Die mit definierten  $\text{TiO}_2$ -Schichten modifizierten Substrate wurden wie im nachfolgenden Kapitel beschrieben mit Haftvermittlermolekülen (zur Wirkstoffanbindung) funktionalisiert. Das Reaktionsschema hierfür ist analog der Anbindung von MA-PS auf  $\text{TiO}_2$  (s. Abb. 5.16).

### 3.4 Quantifizierung der immobilisierten Haftvermittler

Die Anbindung von Heparin an die über die verschiedenen Verfahren hergestellten  $\text{TiO}_2$ -Oberflächen kann über die primären Aminogruppen der Haftvermittler APMS, Di- und Triamino-APMS (s. Abb. 3.19) erfolgen, nachdem letztere über die Trimethoxysilyl-Funktionalitäten an die Hydroxygruppen der jeweiligen  $\text{TiO}_2$ -Schicht kondensierten (s. Abb. 4.3 in Kapitel 4.2). Dieses Kapitel untersucht den Zusammenhang zwischen den verschieden

hergestellten TiO<sub>2</sub>-Schichten und der jeweiligen Menge an immobilisiertem Haftvermittler, in Kapitel 4.3 wird desweiteren die Menge des gebundenen Wirkstoffs bestimmt.



**Abb. 3.19:** Strukturformeln der Haftvermittler APMS, Di- und Triamino-APMS

Die Menge der auf den verschiedenen TiO<sub>2</sub>-Schichten immobilisierten Haftvermittler-Moleküle konnte über deren primäre Aminogruppen mithilfe der Ninhydrinreaktion photometrisch bestimmt werden. Nach Erstellen einer Kalibrierungsgeraden wurden für die mit den verschiedenen Haftvermittlern funktionalisierten cp-Titansubstrate (aus Abb. 3.14–Abb. 3.17) folgende Werte erhalten (Tabelle 3.2):

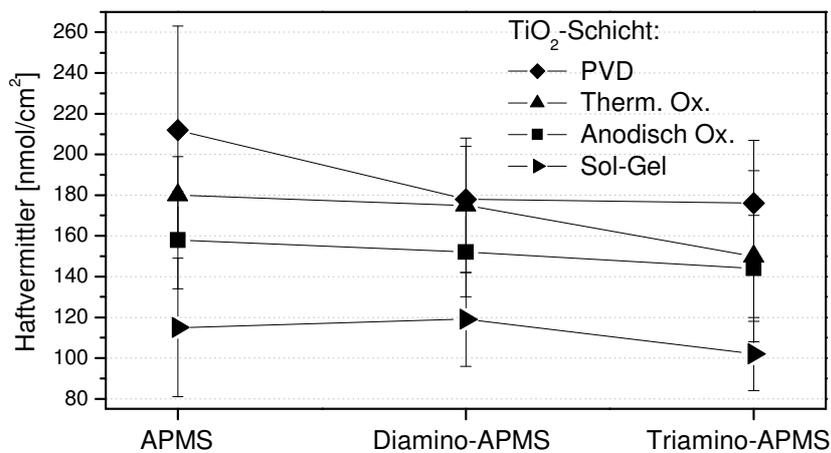
| <i>cp-Titansubstrate:</i> | <b>APMS</b>                    | <b>Diamino-APMS</b> | <b>Triamino-APMS</b> |
|---------------------------|--------------------------------|---------------------|----------------------|
| <b>Anodisch oxidiert</b>  | 158±24 [nmol/cm <sup>2</sup> ] | 152±22              | 144±26               |
| <b>Thermisch oxidiert</b> | 180±19                         | 175±33              | 150±42               |
| <b>PVD</b>                | 212±51                         | 178±26              | 176±31               |
| <b>Sol-Gel</b>            | 115±34                         | 119±23              | 102±18               |

**Tabelle 3.2:** Quantifizierung der Haftvermittler APMS, Di- und Triamino-APMS als Anzahl pro Fläche (nmol pro cm<sup>2</sup>). Jeder Wert ist der Mittelwert aus drei Messungen, die Fehler sind Standardabweichungen

Aus Abb. 3.20 geht hervor, dass die Menge an immobilisiertem Haftvermittler tendenziell hin zu längeren Molekülen (APMS < Diamino-APMS < Triamino-APMS) abnahm, bedingt durch deren größer werdenden sterischen Anspruch auf der Substratoberfläche. Desweiteren führte die Erhöhung der Anzahl an sekundären Aminogruppen im Haftvermittlermolekül zu intermolekularer elektrostatischer Abstoßung. Beide Effekte bewirkten eine Reduktion der Oberflächenfunktionalisierung mit Haftvermittlermolekülen.

Es ist ausserdem signifikant, dass nicht die mit TiO<sub>2</sub> beschichteten Ti-Substrate mit der größten Oberflächen-Rauigkeit (Thermische Oxidation; Ra = 21.1±1.2) die höchste Haftvermittlerdichte aufwiesen, sondern die über den PVD-Prozeß beschichteten Substrate. Dies könnte daraus resultieren, dass nicht die mittlere Oberflächenrauigkeit, sondern ein anderer Parameter für diesen Effekt verantwortlich ist. Denkbar hierfür wäre die spezifische Oberfläche, was auch erklären würde, weshalb die über den Sol-Gel Prozeß beschichteten

Substrate mit der „glattesten“ Oberfläche ( $R_a$ -Wert von  $3.34 \pm 0.01$  nm) die geringste Menge an Haftvermittlermolekülen gebunden hatten. Es ist allerdings zu beachten, daß bei der Berechnung der Oberfläche der Substrate, die den Werten in Tabelle 3.2 zugrunde liegt, von einer ideal glatten Oberfläche ausgegangen wurde und deren eigentliche Oberfläche nicht berücksichtigt wurde. Somit ist die tatsächliche Oberfläche der Substrate um ein Vielfaches größer, was die Quantifizierung in  $\text{nmol pro cm}^2$  (absolute Werte) dementsprechend deutlich verringern dürfte.



**Abb. 3.20:** Quantifizierung der Haftvermittlermoleküle ( $\text{NH}_2$ -Gruppen in  $\text{nmol/cm}^2$ ), die auf den mit  $\text{TiO}_2$  (über: PVD, Thermische/Anodische Oxidation und Sol-Gel-Prozeß) beschichteten Ti-Substraten immobilisiert wurden. Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert aus drei Messungen und Fehlerbalken sind Standardabweichungen

Vergleicht man die  $\text{NH}_2$ -Bedeckungen der Substratoberflächen mit Werten aus der Literatur, in der Monolayer von APMS, Di- und Triamino-APMS zwischen  $0.3\text{-}0.5$   $\text{nmol/cm}^2$  veranschlagt werden,<sup>[101,102,104]</sup> so handelt es sich bei den hier vorgenommenen Aminierungen des  $\text{TiO}_2$  um hochzahlige Multilayer. Dies ist neben der nicht berücksichtigten spezifischen Oberfläche der Substrate auf die Beschichtungstechnik (Spin-Coating) zurückzuführen. Während des Auftrags der Haftvermittler-Lösung auf das rotierende Substrat kam es neben dem Verdampfen des Lösungsmittels gleichzeitig zum Kontakt mit Luftfeuchtigkeit. Hierdurch wurden die Methoxygruppen der Trimethoxysilyl-Funktionalitäten unmittelbar hydrolysiert. Es folgte eine dreidimensionalen Vernetzung (Kondensation) der Haftvermittlermoleküle untereinander, woraus dickere Schichten resultierten.<sup>[96]</sup>

### 3.5 Ausblick

Im Rahmen dieses Kapitels ist es gelungen, Titan-Substrate erfolgreich mit Haftvermittlermolekülen zu funktionalisieren. Die Titansubstrate wurden zuvor über verschiedene Verfahren mit definierten  $\text{TiO}_2$ -Schichten modifiziert und mithilfe von XRD und AFM hinsichtlich ihrer Zusammensetzung bzw. Topographie charakterisiert. Die Funktionalisierung mit den unterschiedlichen Haftvermittlern erfolgte über den Spin-Coating Prozeß, über den die Dicke der Haftvermittlerschicht je nach Menge und Verdünnung der Haftvermittlerlösung gezielt eingestellt werden konnte. Von allen Haftvermittlerlösungen wurden gleiche Volumina gleicher Konzentration verwendet. Um im Meßbereich der Ninhydrinreaktion zu liegen, wurden die Konzentration und die Menge der Haftvermittlerlösungen so gewählt, dass die Haftvermittlerschichten mehrere hundert Monolayer betragen. Hierbei konnten zwei Effekte beobachtet werden. Zum einen nahmen die Schichtdicken tendenziell hin zu längeren Haftvermittlermolekülen ab, bedingt durch deren größer werdenden sterischen Anspruch auf der Oberfläche. Desweiteren konnten „rauere“  $\text{TiO}_2$ -Schichten prinzipiell mit mehr Haftvermittlermolekülen modifiziert werden, was auf deren größere Oberfläche zurückzuführen war.

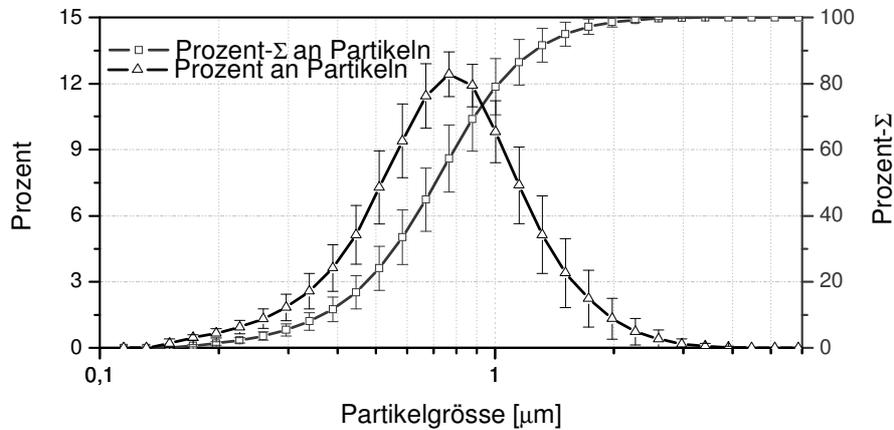
## 4 Kovalente Immobilisierung von Heparin

Im Gegensatz zur Modifizierung von Ti-Substraten mit  $\text{TiO}_2$ - bzw. Haftvermittlerschichten, deren Dicke verfahrensbedingt über einen weiten Bereich hinweg gezielt eingestellt werden kann, bewegt sich die Heparinisierung im Monolayerbereich. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass der Wirkstoff nur an  $\text{NH}_2$ -Gruppen binden kann, die sich auf der Oberfläche befinden und sterisch zugänglich sind. Dem Wirkstoff selbst ist es nicht möglich, wie etwa durch intermolekulare Vernetzung, Multilayerschichten aufzubauen. Um die Wirkstoffanbindung qualitativ nachvollziehen zu können, wurden  $\text{TiO}_2$ -Pulver mit einer hohen spezifischen Oberfläche als Modell für die oxidierte Titansubstratoberfläche funktionalisiert. Diese sollten RAMAN-spektroskopisch bzw. über die Bestimmung des Zetapotentials charakterisiert werden. Die Quantifizierung des Wirkstoffs bzw. der verbleibenden biologischen Aktivität sollten über den Toluidinblau-Test bzw. das Substrat ChromozymTH<sup>®</sup> vorgenommen werden. Es sollte abschließend untersucht werden, ob die Länge der Haftvermittler-Moleküle einen Einfluß auf die biologische Wirksamkeit des gebundenen Heparins hat.

### 4.1 $\text{TiO}_2$ -Pulver als Substrat

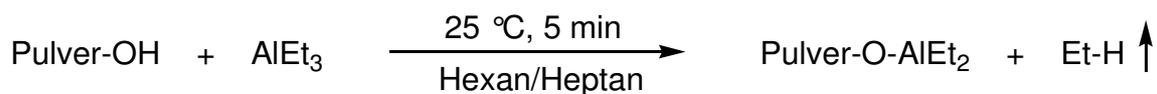
Um die Reaktivität des  $\text{TiO}_2$ -Pulvers (Anatas) abschätzen zu können, war es nötig, die Pulvereigenschaften (Partikelgröße/-oberfläche, Anzahl der OH-Gruppen auf der Oberfläche und Modifikation) genau zu bestimmen. Desweiteren ermöglichte die Verwendung von Pulvern als Substrat die Reaktionskontrolle durch das Zetapotential, da dieses nur anhand von Suspensionen bestimmt werden konnte.

Der Partikeldurchmesser wurde über Laserbeugungsspektrometrie ermittelt (Kapitel 8.3) und betrug  $D_{50} = 0.71 \pm 0.08 \mu\text{m}$  (Abb. 4.1), was einer spezifischen Oberfläche von  $25.4 \pm 2.8 \text{ cm}^2\text{mg}^{-1}$  Pulver entsprach.



**Abb. 4.1:** Die Partikelgröße ist gegen Prozent bzw. die Prozentsumme der Partikelfractionen aufgetragen. Jeder Meßpunkt entspricht dem Mittelwert aus drei Messungen, die Fehlerbalken sind Standardabweichungen

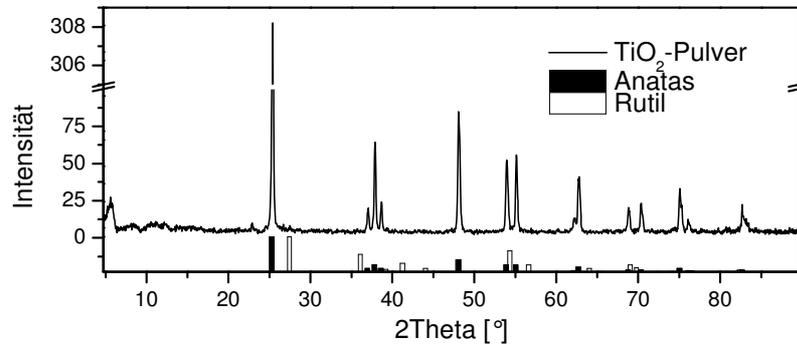
Die Anzahl an OH-Gruppen auf der im wässrigen Milieu hydroxyliert vorliegenden  $\text{TiO}_2$ -Oberfläche der Pulver konnte titrimetrisch durch die Reaktion mit Triethylaluminium bestimmt werden, welches mit OH-Gruppen sehr heftig unter Freisetzung von Ethangas reagierte (Reaktionsgleichung 4.1). Geht man davon aus, dass 1 Mol eines idealen Gases 22.4 l Volumen einnimmt, kann man über das bei der Reaktion freigesetzte Ethangasvolumen die Anzahl der OH-Gruppen auf der Pulveroberfläche bestimmen.



**Reaktionsgleichung 4.1:** Reaktion von OH-Gruppen der Pulveroberfläche mit Triethylaluminium unter Ethangasfreisetzung

Die auf diese Weise experimentell ermittelte Anzahl von  $7.70 \pm 2.71 \text{ OH-Gruppen pro nm}^2$  war höher als der in der Literatur genannte Bereich von  $3.01\text{-}5.42 \text{ OH/nm}^2$ ,<sup>[103]</sup> zurückzuführen auf Feuchtigkeit bzw. auf der Glasoberfläche sitzende OH-Gruppen, die ebenfalls mit  $\text{AlEt}_3$  reagierten.

Die Modifikation des  $\text{TiO}_2$ -Pulvers wurde über Röntgenbeugung bestimmt und konnte eindeutig Anatas zugeordnet werden (Abb. 4.2).

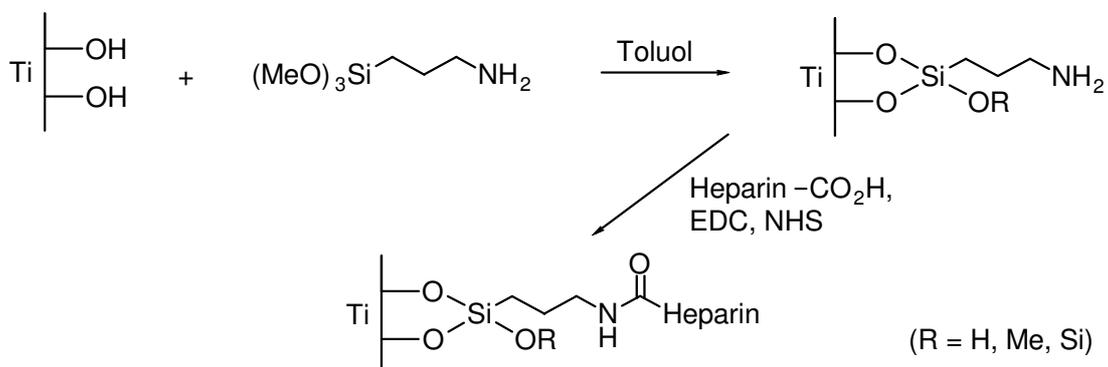


**Abb. 4.2:** Diffraktogramm des  $\text{TiO}_2$ -Pulvers, unterlegt mit den normierten Peaks für Rutil und Anatas

Im Folgenden wurden das  $\text{TiO}_2$ -Pulver als Modell für die  $\text{Ti}(\text{O}_2)$ -Implantat-Oberfläche mit Haftvermittler-Molekülen funktionalisiert, um anschließend den Wirkstoff binden zu können.

#### 4.2 Quantifizierung der immobilisierten Haftvermittler

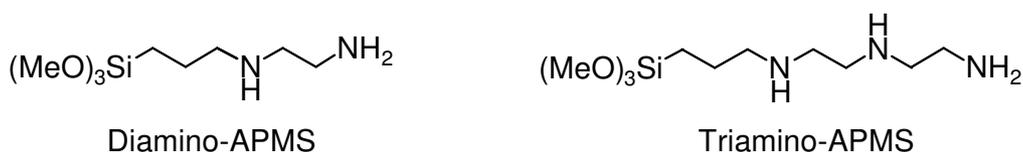
Die Anbindung von Heparin an die Titanoberfläche erfolgte über die Haftvermittler APMS, Di- und Triamino-APMS, welche in Toluol gelöst an die Hydroxygruppen der Titanoberfläche immobilisiert wurden.



**Abb. 4.3:** Kovalente Immobilisierung von Heparin an  $\text{TiO}_2$ -Pulver über den Haftvermittler APMS unter Ausbildung einer Amidbindung

In einer Folgereaktion bildeten die mit dem wasserlöslichen Carbodiimid EDC aktivierten Carboxylgruppen des Heparins mit den terminalen (primären) Aminogruppen der

Haftvermittler Amidbindungen aus. Die Funktionalisierung des  $\text{TiO}_2$ -Pulvers am Beispiel von APMS ist in Abb. 4.3 dargestellt. Die kovalente Anbindung des Wirkstoffs an die Haftvermittler Di- und Triamino-APMS (Abb. 4.4) erfolgte ebenfalls über deren primäre ( $\text{R-NH}_2$ ) Aminogruppen, da diese im Gegensatz zu den sekundären ( $\text{R-NH-R'}$ ) Amidbindungen ausbilden konnten.



**Abb. 4.4:** Die Haftvermittler Di- und Triamino-APMS

Die Menge der kovalent an der Oberfläche immobilisierten terminalen Aminogruppen wurde sowohl an den cp-Titanplättchen als auch am  $\text{TiO}_2$ -Pulver über die Ninhydrinreaktion photometrisch bestimmt. Nach Erstellen einer Kalibrierungsgeraden (Kapitel 7.5) wurden für die mit den verschiedenen Haftvermittlern funktionalisierten  $\text{TiO}_2$ -Pulver folgende Werte erhalten (Tabelle 4.1):

| <i>Pulver:</i>                         | <b>APMS</b> | <b>Diamino-APMS</b> | <b>Triamino-APMS</b> |
|--|-------------|---------------------|----------------------|
| <b>[nmol/mg]</b>                       | 84.9 ±2.1   | 78.7 ±2.0           | 71.3 ±1.3            |
| <b>[NH<sub>2</sub>/nm<sup>2</sup>]</b> | 20.0 ±0.5   | 18.7 ±0.5           | 17.0 ±0.3            |

**Tabelle 4.1:** Quantifizierung der  $\text{NH}_2$ -Gruppen als Stoffmenge pro Pulvergewicht und dementsprechend als Anzahl pro Fläche

Die Anzahl der kovalent auf der Pulver-Oberfläche immobilisierten primären Aminogruppen war bei APMS am größten und nahm von Di- hin zu Triamino-APMS ab, da mit zunehmender Molekülgröße des Haftvermittlers auch der sterische Anspruch auf der Oberfläche zunahm. Desweiteren führte die Erhöhung der Anzahl an sekundären Aminogruppen im Haftvermittlermolekül zu intermolekularer elektrostatischer Abstoßung. Beide Effekte bewirkten eine Reduktion der Oberflächenfunktionalisierung mit Haftvermittlermolekülen. Vergleicht man die  $\text{NH}_2$ -Bedeckung der Pulveroberfläche mit Werten aus der Literatur, in der ein Monolayer mit 2-3  $\text{NH}_2/\text{nm}^2$  veranschlagt wird, so handelte es sich bei den hier vorgenommenen Aminierungen des  $\text{TiO}_2$  um Multilayer.<sup>[104]</sup>

### 4.3 Quantifizierung des Heparins

Die quantitative Bestimmung des immobilisierten Heparins über den Toluidinblautest lieferte nur für die TiO<sub>2</sub>-Pulver verwertbare Ergebnisse. Auf den mit Haftvermittlern modifizierten cp-Titanplättchen ließ sich kein Heparin nachweisen. Ein Rückschluss, dass kein Heparin kovalent an die Plättchenoberfläche gebunden werden konnte, war allerdings nicht möglich, sondern es wird vermutet, dass das immobilisierte Heparin unter der Nachweisgrenze des Toluidinblautests von mindestens 10 µg lag.<sup>[127]</sup>

|                       | APMS     | Diamino-APMS | Triamino-APMS |
|-----------------------|----------|--------------|---------------|
| [ng/cm <sup>2</sup> ] | 53.3±3.6 | 41.2±6.9     | 32.1±5.7      |

**Tabelle 4.2:** Quantifizierung des an die Haftvermittler gebundenen Heparins

An den Haftvermittler APMS konnte mit 53.3±3.6 ng/cm<sup>2</sup>, verglichen mit Di- und Triamino-APMS (s. Tabelle 4.2), am meisten Heparin gebunden werden. Dieses Ergebnis steht im Zusammenhang mit der Dichte der auf der Oberfläche gebundenen Haftvermittlermoleküle in der Reihenfolge APMS > Diamino-APMS > Triamino-APMS (Kapitel 4.2), deren primäre Aminogruppen mit den Carboxylgruppen des Heparins Amidbindungen ausbildeten. Obwohl die Menge an gebundenem Heparin bei Triamino-APMS am geringsten war, zeigte der an diesen Haftvermittler immobilisierte Wirkstoff die höchste verbleibende biologische Aktivität (s. Kapitel 4.7). Dies stützt die Hypothese, dass längere Haftvermittlermoleküle Heparin effizienter immobilisieren, bedingt durch die höhere Flexibilität des Wirkstoffs. Wird die Menge des gebundenen Heparins mit anderen bekannten heparinisierten Oberflächen verglichen, so ergeben sich für diese weit höhere Werte (Tabelle 4.3).

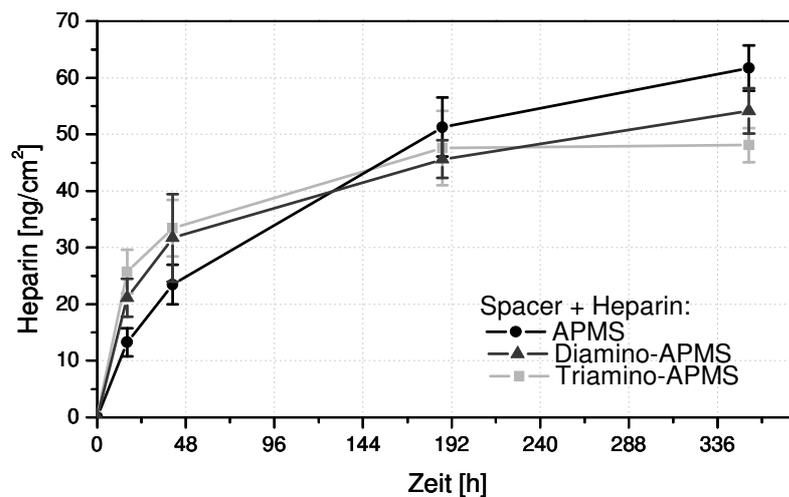
| Substrat                                      | Polyurethan-CO <sub>2</sub> H <sup>[37]</sup> | Polyurethan-NH <sub>2</sub> <sup>[37]</sup> | Polyurethan-PEO <sup>[105]</sup> | Polyethylen <sup>[106]</sup> |
|---|---|---|----------------------------------|------------------------------|
| Immobilisiertes Heparin [µg/cm <sup>2</sup> ] | 1.40±0.08                                     | 2.00±0.13                                   | 0.24±0.04 bis 0.47±0.08*         | 4.4±0.1 bis 4.7±0.1          |

**Tabelle 4.3:** Menge des auf unterschiedlichen Polymersubstraten immobilisierten Heparins \*(abhängig von der PEO-Spacerlänge)

Dies ist darauf zurückzuführen, dass die in eine Polymerschicht eingebrachten Spacer über die Gesamte Dicke des Polymers hinweg Heparin anbinden können, was mit einer Heparinisierung im hohen Multilayerbereich gleichzusetzen ist.

#### 4.4 Hydrolyse des immobilisierten Heparins

Um die Stabilität des an die verschiedenen Haftvermittler gebundenen Heparins zu bestimmen, wurde unter in vivo nachgeahmten Bedingungen (37 °C, PBS, 70 Schüttlungen pro Minute) das Hydrolyseverhalten des Wirkstoffs von den entsprechend funktionalisierten Pulvern ins wässrige Medium untersucht (s. Abb. 4.5).



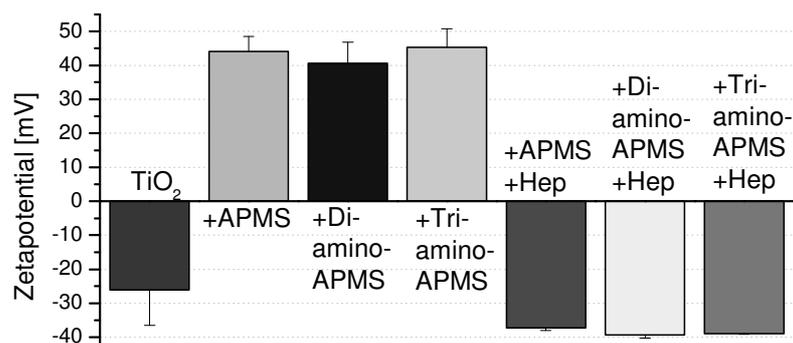
**Abb. 4.5:** Hydrolyse des Heparins von den Haftvermittlern APMS, Di- und Triamino-APMS (bzw. von den entsprechend funktionalisierten Pulvern aus Kapitel 4.3) ins wässrige Milieu (PBS). Vermessen wurde sowohl das an den „Pulvern“ verbleibende, als auch die in PBS gelöste Menge an Heparin. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei Messungen, die Fehlerbalken sind Standardabweichungen

Da die drei Haftvermittler (APMS, Di- und Triamino-APMS) gegenüber dem Wirkstoff jeweils kovalente Amidbindungen ausbildeten, musste die geringste Hydrolysegeschwindigkeit des Heparins vom Haftvermittler APMS während der ersten 100 h auf eine andere Ursache zurückzuführen sein. Diese könnte sein, dass beim Haftvermittler APMS die höchste Oberflächenfunktionalisierung mit primären Aminogruppen auf dem Substrat erreicht werden konnte (s. Kapitel 4.2) und letztere aus sterischen Gründen nur teilweise mit Heparin Amidbindungen ausbilden konnten. Darüber hinaus lagen „freie“ primäre Aminogruppen unter physiologischen Bedingungen protoniert als  $R-NH_3^+$  vor, wodurch sich eine elektrostatische Wechselwirkung mit der negativ geladenen Oberfläche des Heparins ausbilden konnte. Ionische Bindungen sind zwar schwächer als kovalente Bindungen,<sup>[121]</sup> sie könnten jedoch einen additiven Beitrag zur Amidbindung leisten und somit die Hydrolyse erschweren. Die Menge an Heparin, die von den verschiedenen Haftvermittlern nach über 336 h (Sättigung) hydrolysierte, lag in der Reihenfolge APMS > Diamino-APMS > Triamino-

APMS vor und ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass an den Haftvermittler APMS am meisten und an Triamino-APMS am wenigsten Heparin gebunden werden konnte (s. Kapitel 4.3).

#### 4.5 Reaktionskontrolle durch das Zetapotential

Um die einzelnen Stufen der Oberflächenmodifizierungen der  $\text{TiO}_2$ -Pulvern nachvollziehen zu können, wurde nach jedem Reaktionsschritt das Zetapotential gemessen. Hierzu wurden die Pulver in bidestilliertem Wasser suspendiert. Die in Abb. 4.6 dargestellten Ergebnisse der Zetapotentialmessungen ließen auf eine erfolgreiche Funktionalisierung des  $\text{TiO}_2$ -Pulvers mit Heparin über die Haftvermittler APMS, Di- und Triamino-APMS schließen.

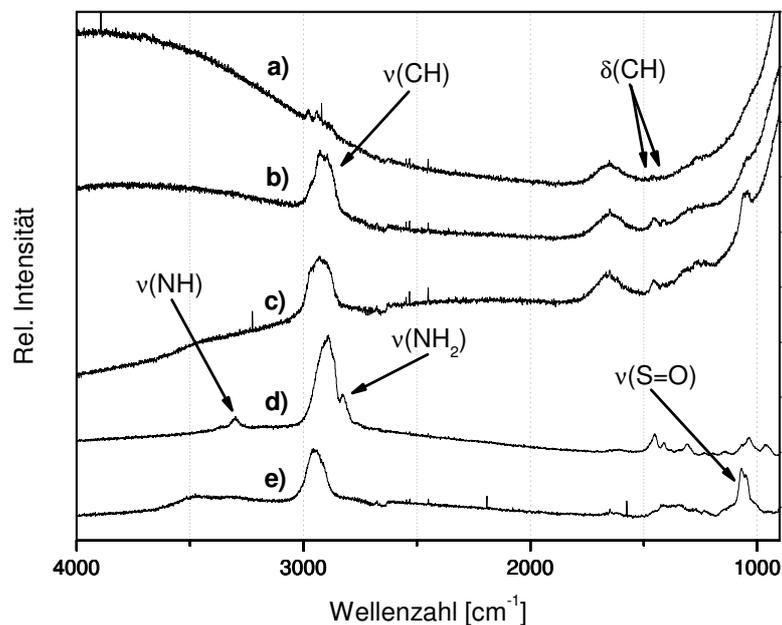


**Abb. 4.6:** Zetapotentiale nach der Funktionalisierung von  $\text{TiO}_2$ -Pulver mit den Spacern APMS, Di- und Triamino-APMS bzw. nach der Heparinisierung (+Hep) der jeweiligen Spacer. Jeder Meßbalken entspricht dem Mittelwert aus drei Messungen, die Fehlerbalken sind Standardabweichungen

Das unbehandelte  $\text{TiO}_2$  besaß aufgrund der in Wasser bei pH 7 größtenteils deprotoniert vorliegenden Hydroxylgruppen an seiner Oberfläche ein negatives Zetapotential von  $-26.1 \pm 10.5$  mV. Durch die Funktionalisierung mit den verschiedenen Spacern stieg das Zetapotential auf positive Werte von  $+44.1 \pm 4.4$  mV (APMS),  $+40.6 \pm 6.2$  mV (Diamino-APMS) und  $+45.3 \pm 5.5$  mV (Triamino-APMS), da im Wasser die primären Aminogruppen der Haftvermittler protoniert als  $\text{NH}_3^+$  vorlagen. Durch die Anbindung des Wirkstoffs an die Aminogruppen der Haftvermittler sank das Zetapotential auf  $-37.2 \pm 0.9$  mV (APMS),  $-39.3 \pm 1.0$  mV (Diamino-APMS) und  $-39.0 \pm 0.2$  mV (Triamino-APMS). Die starke Zunahme der negativen Ladung der Partikel konnte durch die große Anzahl an deprotonierten Sulfat- und Carboxylgruppen des immobilisierten Heparins erklärt werden.

## 4.6 RAMAN-Spektroskopie

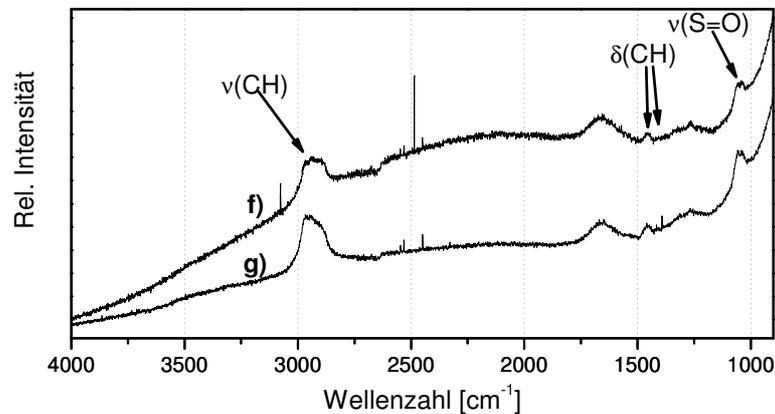
Da durch Zetapotentialmessungen keine definierte Aussage über die Struktur des Produkts möglich war, wurden RAMAN-spektroskopische Untersuchungen ergänzend hinzugezogen. Die Funktionalisierung des  $\text{TiO}_2$ -Pulvers (Anatas) mit dem Haftvermittler APMS ( $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ ) war im RAMAN-Spektrum anhand des Auftretens der C-H-Valenz- bzw. Deformationsschwingungsbanden zwischen  $3000\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ ,  $1450\text{ cm}^{-1}$  und  $1420\text{ cm}^{-1}$  nachvollziehbar (Abb. 4.7).



**Abb. 4.7:** RAMAN-Spektren von a) Anatas und b) nach der Umsetzung mit APMS bzw. c) Heparin im Vergleich zu d) reinem APMS und e) reinem Heparin

Im folgenden konnte die Heparinisierung des mit APMS modifizierten Pulvers anhand des Auftretens der symmetrischen S=O-Valenzschwingungsbande im Spektrum bei  $1040\text{ cm}^{-1}$  belegt werden, da ausschließlich der Wirkstoff diese molekulinternen S=O-Bindungen besitzt.

Analog ließ sich die Heparinisierung des  $\text{TiO}_2$ -Pulvers über die Haftvermittler Di- und Triamino-APMS RAMAN-spektroskopisch verfolgen, da sie mit APMS bzw. mit dem Wirkstoff die charakteristischen Banden gemein haben (Abb. 4.8).



**Abb. 4.8:** RAMAN-Spektren von  $\text{TiO}_2$  nach der Reaktion mit f) Diamino-APMS und Heparin bzw. g) nach der Reaktion mit Triamino-APMS und Heparin

Den Beleg dafür, dass die Haftvermittler Di- und Triamino-APMS erfolgreich an das  $\text{TiO}_2$  immobilisiert werden konnten, lieferte das Auftreten der C-H-Schwingungsbanden (analog der Funktionalisierung mit APMS). Desweiteren konnte die Immobilisierung des Wirkstoffs an Di- und Triamino-APMS ebenfalls durch das Auftreten der symmetrischen  $\text{SO}_3^-$ -Schwingung nachgewiesen werden (Abb. 4.8).

#### 4.7 Wirksamkeitsbestimmung von Heparin

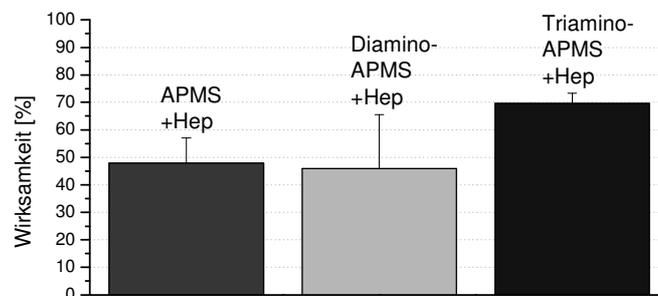
Um die Blutverträglichkeit einer heparinisierten Oberfläche zu beurteilen, in erster Linie nicht die Quantität des gebundenen Heparins von Bedeutung, sondern die Fähigkeit des Wirkstoffs mit Antithrombin zu interagieren. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Freisetzung von Heparin in einem begrenzten Umfeld die Blutgerinnung vermieden werden kann, wobei eine Menge von  $40 \text{ ng pro cm}^2\text{min}$  bereits genügt, um die Fibrinbildung und somit die Blutgerinnung an der Grenzfläche Biomaterial/Blut zu unterbinden.<sup>[107]</sup> Die in dieser Arbeit dauerhaft über die verschiedenen Haftvermittler (APMS, Di- und Triamino-APMS) mit Wirkstoff modifizierten Substrate haben somit physiologisch wirksame Mengen an Heparin gebunden und dürften für den Blutkontakt antithrombogen eingestellte Oberflächen besitzen.

Die verbleibende biologische Aktivität des an das TiO<sub>2</sub>-Pulver über die verschiedenen Haftvermittler immobilisierten Wirkstoffs wurde über das Substrat Chromozym TH bestimmt. Das Prinzip dieser farbbildenden Reaktion ist in Kapitel 2.4.3 dargelegt. In Tabelle 4.4 sind die Absorptionswerte bei  $\lambda = 405$  nm dargelegt. Aufgrund der extrem hohen Kosten der Messmethode wurden von jedem funktionalisierten Pulver nur zwei Proben vermessen.

|  | APMS            | Diamino-APMS     | Triamino-APMS   |
|--|-----------------|------------------|-----------------|
| <b>Pulvermenge [mg]</b>                    | 3.8/4.1         | 4.8/5.2          | 4.7/5.2         |
| <b>Heparinmenge [µg]</b>                   | 5.14/5.55       | 5.02/5.44        | 3.83/4.24       |
| <b>Aktivität<sub>max</sub> [Units/ml*]</b> | 0.89/0.96       | 0.87/0.94        | 0.66/0.73       |
| <b>Absorption<sub>ist</sub></b>            | 1.39/1.10       | 1.10/1.51        | 1.23/1.08       |
| <b>Aktivität<sub>ist</sub> [Units/ml]</b>  | 0.37/0.52       | 0.52/0.30        | 0.44/0.53       |
| <b>Wirksamkeit [%]</b>                     | 41.3/54.3       | 59.8/32.2        | 67.1/72.3       |
| <b>Mittelwert</b>                          | <b>47.8±9.2</b> | <b>46.0±19.5</b> | <b>69.7±3.7</b> |

**Tabelle 4.4:** Quantifizierung der Wirksamkeit des an TiO<sub>2</sub> über die entsprechenden Spacer immobilisierten Heparins durch Messung der Absorption bei  $\lambda = 405$  nm (s. Kapitel 7.7). Von jedem funktionalisierten Pulver wurden zwei verschiedene Proben (/) vermessen \*Das Pulver wurde in 1 ml NaCl-Lösung (0.15 M) suspendiert

Vergleicht man die Werte des über die verschiedenen Haftvermittler immobilisierten Heparins, so fällt auf, dass der an Triamino-APMS gebundene Wirkstoff die höchste Wirksamkeit beibehält (Abb. 4.9).



**Abb. 4.9:** Auftragung der Wirksamkeiten des an die verschiedenen Spacer immobilisierten Heparins. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert aus 2 Messungen, die Fehlerbalken sind Standardabweichungen

Dies ist darauf zurückzuführen, dass längere Haftvermittlermoleküle (APMS < Diamino-APMS < Triamino-APMS) den Wirkstoff „beweglicher“ binden, was eine bessere Wechselwirkung des Heparins mit Antithrombin ermöglicht und somit mit einer höheren Wirksamkeit einhergeht.<sup>[64]</sup>

#### 4.8 Heparinisierung planer Oberflächen

Im Gegensatz zur Heparinisierung von  $\text{TiO}_2$ -Pulver, das eine hohe spezifische Oberfläche von  $25,4 \pm 2,8 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$  besitzt, war der Nachweis der erfolgreichen Anbindung des Wirkstoffs an plane Substratoberflächen RAMAN-spektroskopisch nicht möglich (s. Kapitel 4.6), da die Intensität der S=O-Valenzschwingung des Heparins hierfür nicht ausreichte. Desweiteren konnte das Zetapotential nicht als qualitativer Nachweis für die Funktionalisierung herangezogen werden, da die Bestimmung nur anhand von suspendierbaren Pulvern möglich war (s. Kapitel 4.5). Um dennoch den Nachweis führen zu können, dass die Heparinisierung von Pulvern auf plane Oberflächen übertragbar ist, wurden transparente Polystyrol-Substrate erst mit den verschiedenen Haftvermittlern (adhäsiv) und anschließend mit dem Wirkstoff funktionalisiert. Dies erfolgte in Analogie zu der Modifizierung der  $\text{TiO}_2$ -Pulver. Im Anschluß daran wurde der optisch (UV-VIS) nicht detektierbare Wirkstoff mit einer 1.0%-Lösung Toluidinblau eingefärbt, da der Farbstoff einerseits eine hohe Komplexbildungsaffinität zu Heparin besitzt und zudem bei  $\lambda = 631 \text{ nm}$  eine starke Adsorptionsbande aufweist (Abb. 4.10).<sup>[36,37]</sup>

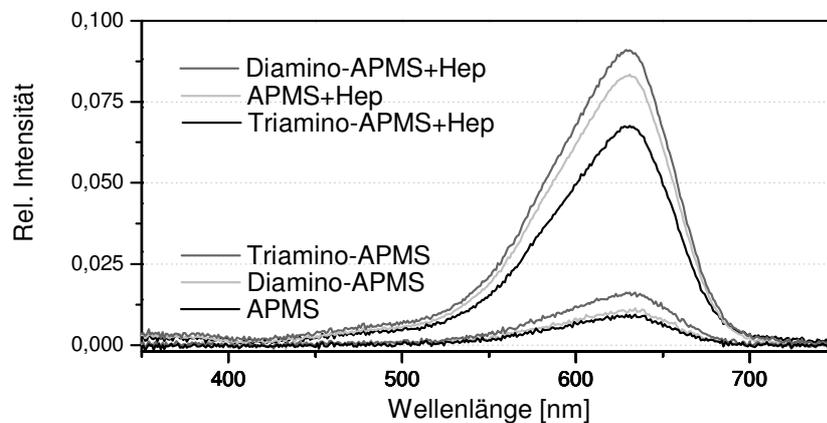


Abb. 4.10: UV-VIS Spektren der verschiedenen mit Toluidinblau eingefärbten Oberflächen

Es ist gut zu erkennen, dass die ausschließlich mit Haftvermittler funktionalisierten Substrate nur eine relativ geringe Menge an Farbstoff aufnehmen konnten. Dies liegt daran, dass die Oberflächen dieser Substrate durch protonierte Aminogruppen ebenso wie der Farbstoff selbst positiv geladen war und es dadurch zu elektrostatischer Abstoßung kam. Farbstoffeinschlüsse in der Substratoberfläche waren lediglich auf Kapillarkräfte zurückzuführen.<sup>[113]</sup> Es ist ausserdem ersichtlich, dass mit reinem APMS modifizierte Substrate die geringste Menge an

Farbstoff aufnehmen konnten, bedingt durch die grösste Dichte an protonierten Aminogruppen auf der Oberfläche, verglichen mit Di- und Triamino-APMS.

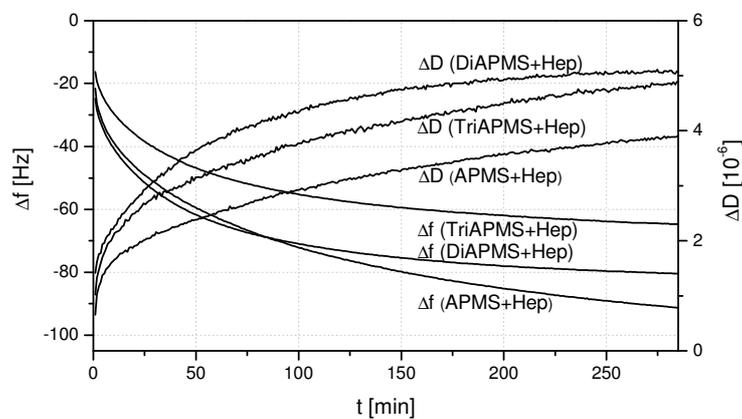
Die über die verschiedenen Haftvermittler heparinisierten Substrate hingegen, die nach aussen eine resultierende negative Oberflächenladung besitzen (s. Kapitel 4.5), konnten den positiv geladenen Farbstoff Toluidinblau gut komplexieren, woraus sich auch die relativ höheren Absorptionswerte bei  $\lambda = 631$  nm erklären lassen. Diese qualitative Methode für den Nachweis der Heparinisierung auf planen Substratoberflächen könnte in folgenden Untersuchungen durch XPS- (X-ray Photoelectron Spectroscopy/Röntgeninduzierte Photoelektronenspektroskopie) Messungen gestützt werden. XPS bietet den Vorteil, dass selbst Wirkstofflagen im Submonolayerbereich detektiert werden können und über die Bestimmung der Signalintensität einzelner Atome ein Rückschluss auf die gebundene Menge an Heparin möglich wäre.

#### 4.9 QCM-D Messungen

Die erste Reaktion nach Einbringung eines Implantats in den Körper ist die Ausbildung eines Biofilms, der aus adsorbierten Matrix-Proteinen besteht. Die quantitative Zusammensetzung und Konformationsänderungen dieses Proteinfilms während der Adsorption ist wahrscheinlich der Schlüsselfaktor für die darauffolgende Zellanhaftung und somit der biologischen „Antwort“ des Organismus auf das Implantat-Material.<sup>[108]</sup> Im Falle von Materialien im Blutkontakt ist bekannt, dass die Proteinadsorption und die damit verknüpften strukturellen Änderungen der verschiedenen extrazellulären Plasma-Proteine (z.B. Fibrinogen) die Hämostase (Blutgerinnung) auslösen können.

Die Adsorption von Fibrinogen auf den verschiedenen heparinisierten Oberflächen wurde in dieser Arbeit mithilfe der QCM-D Methode untersucht. Diese bietet einerseits den Vorteil, dass die Adsorption in Echtzeit über den Massenzuwachs des Kristalls verfolgt werden kann und andererseits ist es möglich, Konformationsänderungen der adsorbierten Proteine aufgrund von Änderungen der viskoelastischen Eigenschaften zu analysieren. Hierzu wurden die Gold-Oberflächen der Quartz-Kristalle mit einer ca. 100 nm dicken  $\text{TiO}_2$ -Schicht bedampft (PVD) und im Anschluss daran (ähnlich wie die  $\text{TiO}_2$ -Pulver) mit den entsprechenden Haftvermittlern und Heparin modifiziert. Die Konzentration des verwendeten extrazellulären

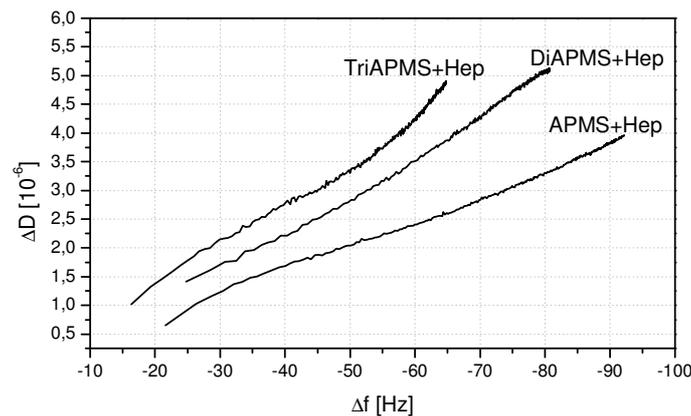
Plasma-Proteins Fibrinogen (in PBS, pH = 7.4) betrug 50  $\mu\text{g/ml}$ . Obwohl diese verglichen mit der des menschlichen Blutes (3 mg/ml) viel niedriger war, erlaubt diese niedrigere Konzentration eine intensivere Interaktion einzelner Fibrinogen-Moleküle mit der Oberfläche, bevor diese von weiteren frisch adsorbierten Molekülen blockiert wird. Der daraus resultierende Effekt ist zum einen, dass die Schichten dichter gepackt sind und relativ wenig Wasser enthalten, wodurch die Auswirkung des in die Schichten eingeschlossenen Wassers während der Messung reduziert wird. Zum anderen begünstigen niedrigere Protein-Konzentrationen (< 50  $\mu\text{g/ml}$ ) Oberflächen-Effekte auf die Protein Adsorption, wodurch die QCM-D Messungen eine bessere Aussage hinsichtlich der in dieser Arbeit verschiedenen heparinisierten Oberflächen erlauben.<sup>[126]</sup>



**Abb. 4.11:**  $\Delta f$ - und  $\Delta D$ -Kurven der Fibrinogen-Adsorption auf den über die verschiedenen Haftvermittler (APMS, Di- und Triamino-APMS) heparinisierten Kristalloberflächen

Abb. 4.11 zeigt Änderungen in der Frequenz  $\Delta f$  und der Dissipation  $\Delta D$  der verschiedenen Oberflächen während der QCM-D Messungen. Die Zugabe von in PBS gelöstem Fibrinogen ergab eine Abnahme von  $\Delta f$  und einen Anstieg von  $\Delta D$ . Da  $\Delta f$  für den Massenanstieg des Kristalls aufgrund der adsorbierten Proteinschicht und  $\Delta D$  für die viskoelastischen Eigenschaften des Adsorbats steht, demonstrieren die Ergebnisse, dass die Menge an adsorbiertem Fibrinogen in der Reihenfolge APMS > Diamino-APMS > Triamino-APMS auf den verschiedenen heparinisierten Oberflächen variierte. Die Menge an adsorbiertem Fibrinogen wurde nach der Sauerbrey-Gleichung (Formel 2.3) berechnet und betrug 539  $\text{ng/cm}^2$  (APMS), 476  $\text{ng/cm}^2$  (Diamino-APMS) und 382  $\text{ng/cm}^2$  (Triamino-APMS) nach 5 h Messzeit. Die adsorbierten Protein-Schichten zeigten wie aus den Dissipationskurven hervorgehend verschiedene viskoelastischen Eigenschaften, die Viskoelastizität der Schichten stieg in der Reihenfolge APMS < Triamino-APMS < Diamino-APMS (Abb. 4.11).

Abb. 4.12 zeigt die Korrelation zwischen  $\Delta D$  und  $\Delta f$  für die verschiedenen Oberflächen. Diese Darstellung ist bei der Analyse und dem Vergleich der viskoelastischen Eigenschaften von Proteinfilmen auf verschiedenen Oberflächen hilfreich, da  $\Delta D$  und  $\Delta f$  hier nicht der gleichen Zeitabhängigkeit unterliegen und die Zeit durch diese Auftragung als Parameter eliminiert werden konnte.



**Abb. 4.12:** Auftragung der  $\Delta D$ - gegen die  $\Delta f$ -Werte der Fibrinogenadsorption (auf den über die Haftvermittler APMS, Di- und Triamino-APMS heparinisierten Oberflächen) für den direkten Vergleich

In zahlreichen Experimenten konnte gezeigt werden, dass niedrige  $\Delta D/\Delta f$ -Werte eine Indikation für starr adsorbierte Proteinschichten sind.<sup>[109]</sup> Die Ergebnisse demonstrieren, dass die  $\Delta D/\Delta f$ -Werte für die über APMS mit Heparin modifizierten Substrate nahezu eine Gerade bilden, die zu höheren  $\Delta f$ -Werten hin leicht ansteigt. Im Gegensatz hierzu waren die  $\Delta D/\Delta f$ -Werte für die mit Di- und Triamino-APMS modifizierten Oberflächen generell höher. Dieses Verhalten indiziert geringere strukturelle Änderungen innerhalb der adsorbierten Proteinschicht.<sup>[110]</sup> Niedrigere  $\Delta D/\Delta f$ -Werte indizieren eine dichtere Packung des adsorbierten Protein-Films auf der Substratoberfläche, welche entweder durch Änderung der Konformation (Denaturierung) und/oder durch hohe Affinität der Bindungsstellen des Proteins zum Substrat hervorgerufen werden.

Fibrinogen ist ein stabähnlich langgezogenes Makromolekül ( $M = 252$  kDa; Länge  $> 450$  Å) mit drei verschiedenen globulären Subdomänen (E, D und  $\alpha C$ ). Unter physiologischen Bedingungen ist die Gesamtladung des Fibrinogens negativ. Die D und E Domänen sind negativ geladen, wohingegen die  $\alpha C$  Domänen positiv geladen sind. Die  $\alpha C$  Domänen agieren als eine Art „Pionier“ im Anbindungsprozess auf der Oberfläche, jedoch binden sie an diese nicht fest an.<sup>[111]</sup> Es ist wahrscheinlich, dass die unterschiedlichen  $\Delta D/\Delta f$ -Werte unter

anderem dadurch verursacht werden, dass die verschiedenen Subdomänen des Fibrinogen mit dem Heparin bzw. den entsprechenden Haftvermittler-Molekülen interagieren, die sich auf den Substrat-Oberflächen befinden.

Tatsächlich konnte über Zeta-Potential Messungen herausgefunden werden, dass die mit APMS, Di- und Triamino-APMS modifizierte Oberflächen und die entsprechend heparinisierten Substrate positive bzw. negative Oberflächenladungen besaßen, die alle in einer ähnlichen Größenordnung lagen (s. Abb. 4.6). Vielmehr ist anzunehmen, dass die sekundären Aminogruppen der Haftvermittler Di- und Triamino-APMS während der Adsorption mit den positiv geladenen  $\alpha$ C Domänen des Fibrinogens interagieren und somit den Ausschlag für die unterschiedlichen  $\Delta D/\Delta f$  -Werte geben könnten (Abb. 4.12). Dies würde einerseits einen Einfluss auf die Adsorptionskinetik des Proteins haben und könnte erklären, warum die  $\Delta f$ -Kurven der über Di- und Triamino-APMS heparinisierten Oberflächen schneller als die über APMS ansteigen (Abb. 4.11). Andererseits könnte diese elektrostatische Wechselwirkung auch die Konformationsänderung des Fibrinogens beeinflussen und letztendlich für die höchsten  $\Delta D/\Delta f$ -Werte von Triamino-APMS verantwortlich sein.

Ferner ist noch zu betrachten, dass sterische Effekte für die unterschiedlichen  $\Delta D/\Delta f$ -Werte (Abb. 4.12) verantwortlich sein könnten. Protein-Filme die auf den mit APMS und Wirkstoff modifizierten Oberflächen adsorbierten lagen dichter gepackt vor (kleiner  $\Delta D/\Delta f$ -Wert). Hierbei ist zu beachten, dass Oberflächen, die mit dem Haftvermittler APMS modifiziert wurden, die grösste Dichte an freien primären Aminogruppen aufwiesen, welche wiederum die grösste Menge an Heparin binden konnten (Tabelle 4.2). Diese dichteste Funktionalisierung mit Wirkstoff, verglichen mit den längeren Haftvermittlermolekülen Di- und Triamino-APMS, ermöglicht eine stärkere Interaktion des Heparins mit Fibrinogen und führt somit zu einer dichteren Packung der Proteine, die sich in niedrigen  $\Delta D/\Delta f$ -Werten niederschlägt. Da dichter und somit starrer adsorbierte Proteinfilme üblicherweise mit einer Änderung der Konformation einhergehen, ist anzunehmen, dass dieser Effekt bei der Heparinisierung über den Haftvermittler Triamino-APMS am wenigsten ausgeprägt ist und die über diesen Haftvermittler heparinisierten Oberflächen bezüglich der Proteinadsorption (bzw. dem damit verbundenen Auslösen der Blutgerinnung) die günstigsten biokompatiblen Eigenschaften aufweisen.

#### 4.10 Ausblick

Die erfolgreiche Anbindung von Heparin an die  $\text{TiO}_2$ -Pulver konnte RAMAN-spektroskopisch über das Auftreten der symmetrischen  $\text{SO}_3$ -Schwingung bzw. über Zetapotentialmessungen durch Änderung der Oberflächenladung im wässrigen Elektrolyten nachvollzogen werden. Die Anbindung des Wirkstoffs erfolgte über Haftvermittler verschiedener Moleküllänge, wobei die Menge des an die Pulveroberfläche gebundenen Haftvermittlers signifikant hin zu kleineren Molekülen (APMS < Diamino-APMS < Triamino-APMS) zunahm. Aufgrund der dichtesten Funktionalisierung der Oberfläche mit  $\text{NH}_2$ -Gruppen im Falle von APMS, konnte an diesen Spacer auch am meisten Wirkstoff gebunden werden. Jedoch ergab die Messung der verbleibenden biologischen Aktivität über das Substrat ChromozymTH<sup>®</sup>, dass mit steigender Moleküllänge des Haftvermittlers auch die Wirksamkeit des gebundenen Heparin zunahm. Mit Hilfe der QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring) Technik wurde das Adsorptionsverhalten des extrazellulären Plasmaproteins Fibrinogen auf den über die verschiedenen Haftvermittler (APMS, Di- und Triamino-APMS) heparinisierten Oberflächen untersucht. Im Falle der Heparinisierung über Triamino-APMS wurde zwar am wenigsten Protein adsorbiert, es lag jedoch im Vergleich zu den über APMS und Diamino-APMS modifizierten Oberflächen weniger starr gebunden vor. Dies legt den Schluß nahe, dass das adsorbierte Fibrinogen eine geringere Konformationsänderung erfährt, was mit einer besseren Hämokompatibilität einhergehen sollte.

## 5 Nanoporöse Wirkstoffdepots

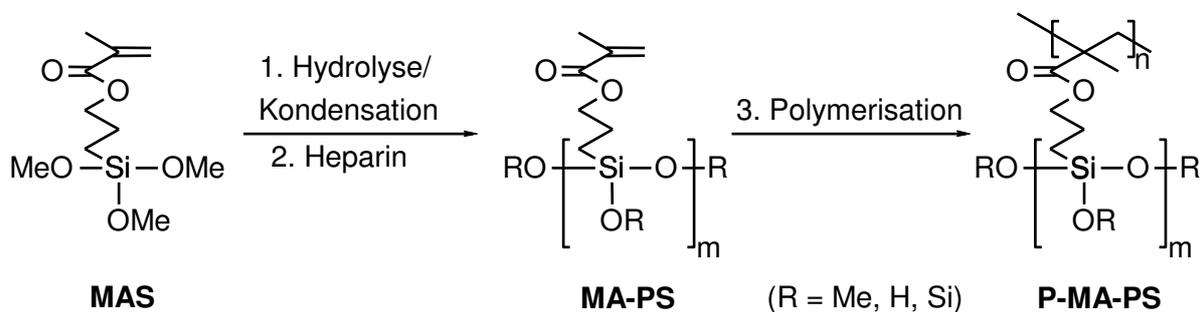
Der Sol-Gel Prozeß eröffnet die Möglichkeit, die chemischen (Vernetzung) und physikalischen Eigenschaften (Dichte, Porosität) eines Materials durch Variation von Reaktanden, pH-Wert, Hydrolyse- und Trocknungsbedingungen über ein breites Spektrum hinweg genau einzustellen. So konnte gezeigt werden, daß der Effekt von verschiedenen Katalysatoren, Wasser- bzw. Lösungsmittelmengen einen Effekt auf die chemischen und physikalischen Eigenschaften von P-MA-PS Hybridwerkstoffen hat,<sup>[74,75]</sup> jedoch wurden diese Materialien bislang noch nicht für den Einsatz als Wirkstoffdepots etabliert. In diesem Kapitel sollten P-MA-PS Werkstoffe als Wirkstoffdepots für die gezielte Freisetzung von Heparin entwickelt werden. P-MA-PS wurde herangezogen, da es über den Sol-Gel-Prozeß neben der Ausbildung von Volumenwerkstoffen kovalent an Titanoxid-Oberflächen anbinden kann. Desweiteren sollte es möglich sein, über zusätzliche organische Vernetzung der Matrices die Freisetzungskinetik von Heparin in ein wässriges Medium steuern zu können.

### 5.1 Herstellung von P-MA-PS Volumen-Wirkstoffdepots

Die Sol-Gel-Technologie eröffnet neue Möglichkeiten, biologisch wirksame Substanzen unter schonenden Bedingungen in Vollkörper- bzw. Beschichtungsmaterialien einzubringen, um auf diese Weise Wirkstoffdepots zu generieren, deren Freisetzungskinetik im wässrigen Milieu gezielt eingestellt werden kann. Diese Technologie ist preiswert, vielseitig und einfach, zudem sind die so erhaltenen Xerogele ungiftige und biokompatible Materialien. Am bekanntesten sind wirkstofffreisetzende Sol-Gel Matrices aus SiO<sub>2</sub> bzw. organisch modifiziertem SiO<sub>2</sub>.<sup>[112,113]</sup>

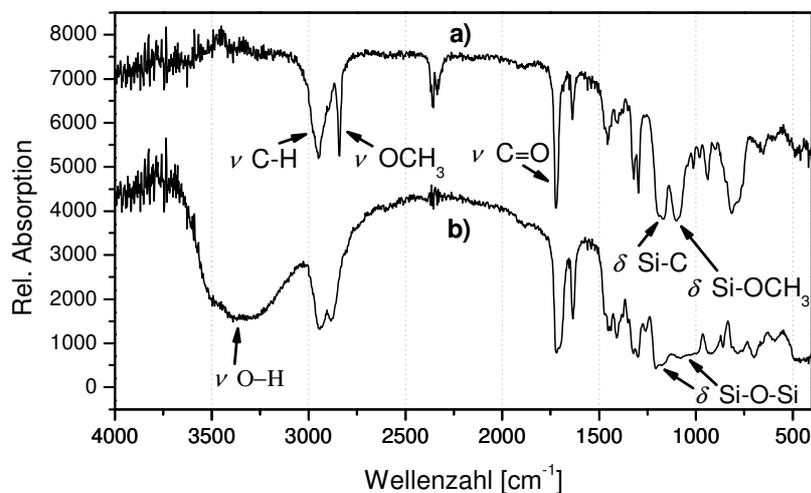
Die Hydrolyse bzw. Polykondensation von MAS kann sowohl säure- als auch basenkatalysiert erfolgen.<sup>[74]</sup> Basen wie z.B. NaOH, die einen harten nukleophilen Charakter besitzen haben den Nachteil, daß sie den Methacryl-Ester hydrolysieren und somit den MAS-Precursor zerstören können. Aus diesem Grund wurden die Polysilsesquioxane (MA-PS) in dieser Arbeit ausschließlich Säuren-katalysiert dargestellt. Die Generierung der anorganischen (über den Sol-Gel Prozeß) bzw. der organisch modifizierten (über photochemische

Polymerisation) Wirkstoffdepots und die Einbringung von Heparin ist in Abb. 5.1 schematisch dargestellt.



**Abb. 5.1:** Darstellung von organisch/anorganischen P-MA-PS Wirkstoffdepots. Die Einbringung des Heparins erfolgte in den Sol-Gel-Ansatz, vor der photochemischen Polymerisation

Die erfolgreiche Bildung von MA-PS kann qualitativ mithilfe der FT-IR-Spektroskopie verfolgt werden (Abb. 5.2).

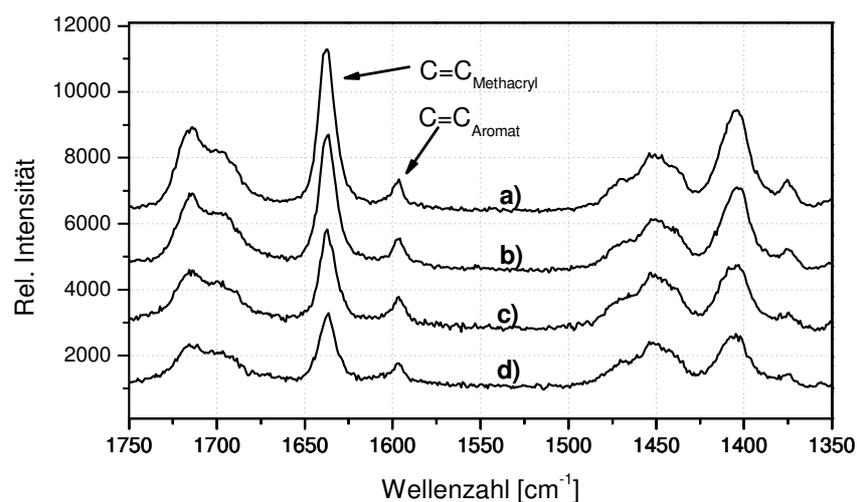


**Abb. 5.2:** FT-IR-Spektrum vom käuflichen Precursor MAS (a) und von MAS nach der Umsetzung zu MA-PS über den Sol-Gel-Prozeß (b)

Das Spektrum von MA-PS zeigt gegenüber dem von MAS eine Abnahme der Signalintensität von  $\nu(-\text{OCH}_3) = 2850 \text{ cm}^{-1}$  und  $\nu(\text{Si-OCH}_3) = 1080 \text{ cm}^{-1}$ , einhergehend mit einer Zunahme der Signalintensität von  $\nu(\text{Si-OH}) = 3700\text{-}3200 \text{ cm}^{-1}$  und  $\nu(\text{Si-O-Si}) = 1130 \text{ cm}^{-1}$ . Dies belegt eindeutig, dass es neben der Hydrolyse der Methoxygruppen auch zur Kondensation eines Siloxan-Netzwerks gekommen ist.

## 5.2 Photopolymerisation

Die Polymerisation von MA-PS zu P-MA-PS (Abb. 5.1) erfolgte photochemisch mithilfe von UV-Licht, wodurch kontrollierbare und für den Wirkstoff schonende Reaktionsbedingungen gewährleistet werden konnten. Da die radikalische Polymerisation mithilfe von UV-Licht relativ langsam abläuft, wurden dem Sol-Gel-Ansatz 5-Mol% Benzoinmethylether beigemischt. Dieser radikalische Initiator zerfällt bei Exposition mit UV-Licht in Radikale, welche die Polymerisation und somit die Ausbildung von P-MA-PS-Netzwerken stark beschleunigt (Abb. 5.4).<sup>[75]</sup> Der Polymerisationsprozeß konnte RAMAN-spektroskopisch über die Abnahme der Signalintensität der methacrylischen C=C-Doppelbindung bei  $1635\text{ cm}^{-1}$  verfolgt werden. In Abb. 5.3 ist die Abnahme der  $\text{C}=\text{C}_{\text{Methacryl}}$ -Doppelbindung nach verschiedenen UV-Belichtungszeiten qualitativ dargestellt.

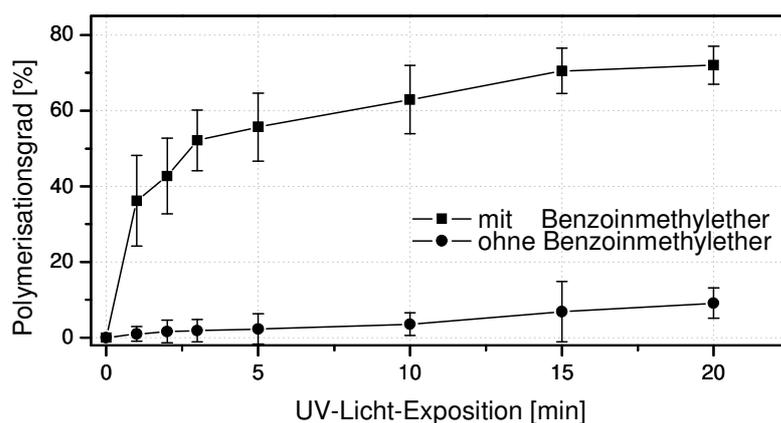


**Abb. 5.3:** RAMAN-Spektren von MA-PS (a) und P-MA-PS nach verschiedenen langen UV-Belichtungszeiten (b = 1, c = 5, d = 10 min)

Das  $\text{C}=\text{C}_{\text{Aromat}}$ -Signal des UV-Initiators blieb während der Polymerisation unverändert und konnte als molekülexterne Referenz für die Bestimmung des Polymerisationsgrades verwendet werden (s. Kapitel 7.4.2). Im Falle der photochemischen Aushärtung ohne Benzoinmethylether wurde die molekülinterne Bande bei  $1450\text{ cm}^{-1}$  als interner Standard herangezogen.

### 5.3 Bestimmung des Polymerisationsgrades

Um quantitative Aussagen hinsichtlich des Polymerisationsgrades der Matrix machen zu können, ist es notwendig, die Konzentration der freien Kohlenstoff-Doppelbindungen in den Edukten bzw. Produkten zu bestimmen. Dies kann  $^{13}\text{C}$ -NMR-<sup>[114]</sup>, FT-IR-<sup>[115,116]</sup> als auch FT-RAMAN-spektroskopisch erfolgen, wobei letztere Methode herangezogen und in Anlehnung an die FT-IR-spektroskopische entwickelt wurde, da hier die Intensität des C=C-Doppelbindungssignals am größten ist. Der Vorteil liegt darin begründet, dass die relevante C=C-Valenzschwingung im Gegensatz zur IR-Spektroskopie aufgrund der hohen Polarisierbarkeitsänderung während der Schwingung eine hohe Intensität aufweist. Die Intensität der Schwingung kann im RAMAN-Effekt näherungsweise als proportional zur Konzentration der entsprechenden Bindung betrachtet werden. Da eine Kalibrierung der Methode nicht anhand definierter polymerer Verbindungen erfolgen kann, wurde die Bande einer weiteren molekülexternen bzw. -internen Schwingung als interner Standard herangezogen, die durch die durchgeführte Polymerisationsreaktion keine Änderung in ihrer Intensität erfuhr. Hierzu eignete sich die aromatische C=C-Valenzschwingung des UV-Initiators Benzoinmethylether bei  $1605\text{ cm}^{-1}$ . Im Falle der deutlich langsameren photochemischen Aushärtung ohne den UV-Initiator Benzoinmethylether wurde die molekülinterne Bande bei  $1450\text{ cm}^{-1}$  als interner Standard herangezogen.



**Abb. 5.4:** Der Polymerisationsgrad von P-MA-PS-Proben in Abhängigkeit der Dauer der UV-Licht-Exposition mit und ohne UV-Initiator. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus drei Messungen, die Fehlerbalken sind Standardabweichungen

Der Einfluß unterschiedlich langer UV-Belichtungszeiten (mit und ohne den UV-Initiator Benzoinmethylether) auf den Polymerisationsgrad ist in Abb. 5.4 dargestellt. Es wird deutlich,

daß durch die Zugabe von Benzoinmethylether in den ersten 5 min der UV-Lichtexposition ein sprunghafter Anstieg des Polymerisationsgrades zu beobachten ist, im Gegensatz zur Polymerisation ohne den UV-Initiator. Hieraus geht hervor, daß eine Initiierung mit Benzoinmethylether nötig ist, um in angemessener UV-Belichtungszeit hohe Polymerisationsgrade von über 60% zu erhalten.

#### 5.4 Porosität der Matrix

In der Literatur beschriebene mesoporöse SiO<sub>2</sub>-Xerogele besitzen üblicherweise Porengrößen zwischen 2-50 nm bei entsprechend großer spezifischer Oberfläche.<sup>[76,117]</sup> Im Falle von wirkstofffreisetzenden Matrices, die keiner chemischen Wechselwirkung mit dem Wirkstoff unterliegen, stellt jedoch der für die Freisetzungskinetik kritische Parameter die Porosität dar (s. Higuchi-Gleichung/Formel 2.2). Die Porosität der Matrices wurde über die Gewichts-differenz  $\Delta m$  durch absorbierten Alkohol bekannter Dichte (Ethanol,  $\rho = 0.79 \text{ g/cm}^3$  bei 20 °C) nach der Formel 5.1 ermittelt:

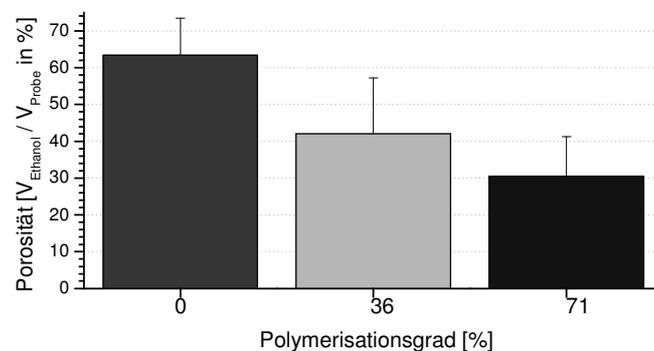
$$\text{Porosität} = \frac{V_{\text{Ethanol}}}{V_{\text{Probe}}} \times 100 [\%] \quad \text{mit} \quad V_{\text{Ethanol}} = \frac{\Delta m}{\rho_{\text{Ethanol}}} \quad \text{Formel 5.1}$$

Das daraus bestimmbare Volumen des absorbierten Alkohols ( $V_{\text{Ethanol}}$ ) wurde durch das Gesamtvolumen der entsprechenden Probe dividiert ( $V_{\text{Probe}}$ ) und auf diese Weise die Porosität der verschiedenen polymerisierten Matrices ermittelt (Tabelle 5.1).

| Polymerisationsgrad                         | 0                |      |      | 36               |      |      | 71               |      |      |
|---|------------------|------|------|------------------|------|------|------------------|------|------|
| <b>m<sub>Probe</sub> [mg]</b>               | 214              | 214  | 114  | 237              | 238  | 235  | 262              | 242  | 252  |
| <b>V<sub>Probe</sub> [mm<sup>3</sup>]</b>   | 169              | 169  | 90.4 | 183              | 184  | 182  | 186              | 172  | 179  |
| <b>m<sub>Probe+Ethanol</sub> [mg]</b>       | 310              | 284  | 161  | 303              | 275  | 314  | 292              | 282  | 311  |
| <b>m<sub>Ethanol</sub> [mg]</b>             | 96               | 70   | 47.0 | 66               | 37   | 79   | 30               | 40   | 59   |
| <b>V<sub>Ethanol</sub> [mm<sup>3</sup>]</b> | 122              | 88.4 | 59.5 | 83.5             | 46.8 | 100  | 38.0             | 50.6 | 74.7 |
| <b>Porosität [%]</b>                        | 72.1             | 52.3 | 65.8 | 45.6             | 25.4 | 55.1 | 20.5             | 29.4 | 41.8 |
| <b>Porosität<sub>Mittelwert</sub> [%]</b>   | <b>63.4±10.1</b> |      |      | <b>42.0±15.2</b> |      |      | <b>30.6±10.7</b> |      |      |

Tabelle 5.1: Experimentell ermittelte Werte der Porosität für die verschieden polymerisierten Proben.

Da die Probenoberflächen durch den Gießprozeß (s. Kapitel 7.4.3) nicht vollständig plan vorlagen, wurde die Höhe von jeweils drei verschiedenen polymerisierten (0, 36 und 71%) Proben an zehn verschiedenen Stellen vermessen und für die Berechnung der Probenvolumina je deren Mittelwerte verwendet. Die auf diese Weise erhaltenen Volumina wurden daraufhin durch deren jeweilige Masse dividiert, woraus die massenspezifischen Volumina (Mittelwerte) von 0.79, 0.77 & 0.71 mm<sup>3</sup>/mg für die verschiedenen Polymerisationsgrade von 0, 36 & 71% resultierten. Die massenspezifischen Volumina wurden anschließend für weitere Berechnung der Volumina der Probenkörper über deren Gewicht herangezogen, um eine hohe relative Genauigkeit der Probenvolumina zu erhalten. Die Ergebnisse (Abb. 5.5) verdeutlichen, daß die unpolymersierten Proben gegenüber den polymerisierten die höchste Porosität von 63±10% aufweisen. Vergleicht man diese Werte mit denen von reinen SiO<sub>2</sub> Xerogelen aus der Literatur, die eine Porosität von ungefähr 50% besitzen,<sup>[118]</sup> so erweisen sich die in dieser Arbeit für unpolymersierte Proben erhaltenen Werte um ca. ein Viertel höher. Dies ist auf den sperrigen organischen Methacryloxypropyl-Rest des Precursors MAS zurückzuführen, welcher eine weniger dichte Packung und somit eine höhere Porosität der Matrix zur Folge hat.



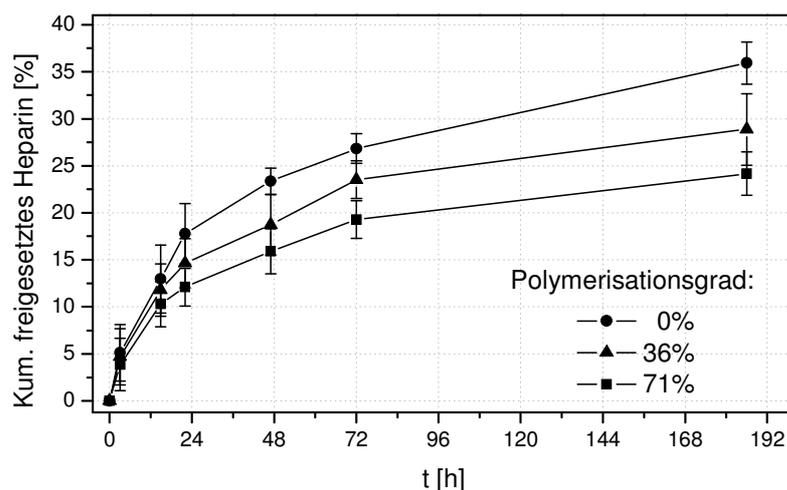
**Abb. 5.5:** Experimentell ermittelte Werte der Porosität für die verschiedenen polymerisierten P-MS-PS

Desweiteren ist zu beobachten, daß eine Erhöhung des Polymerisationsgrades der P-MA-PS Probenkörper mit einer relativ starken Abnahme der Porosität (42±15 & 31±11%) einhergeht, bedingt durch die mit der zusätzlichen organischen Vernetzung einhergehenden strukturellen Veränderungen der Matrix. Dieses Phänomen ist einerseits damit zu erklären, daß die Matrices durch die organische Vernetzung durch den Methacrylat-Rest einem für organische Polymere typischen Schrumpfungsprozeß unterliegen, der bei reinen Polymethacrylaten (PMMA) bei ca. 20% liegt.<sup>[119]</sup> In dieser Arbeit lag die Volumenschrumpfung von MA-PS hin zu polymerisiertem P-MA-PS bei ca. 10%.

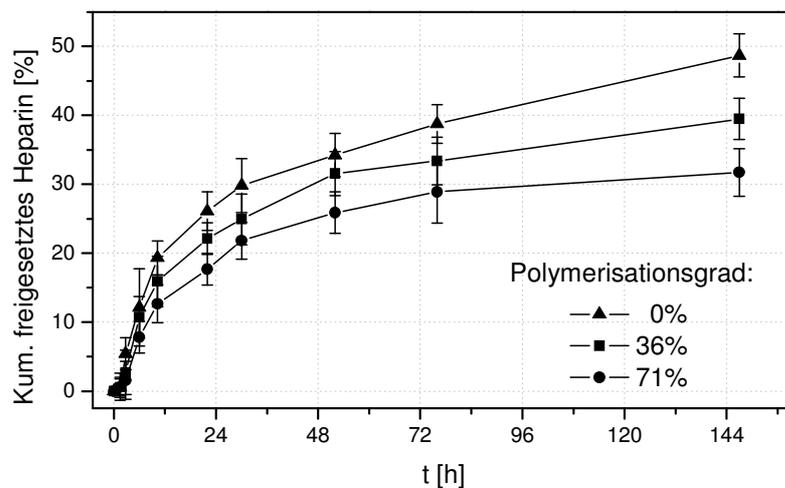
Ein weiterer Grund für die relativ starke Abnahme der Porosität mit steigenden Polymerisationsgraden liegt in der Meßmethode selbst. Die zusätzliche organische Vernetzung führt wahrscheinlich dazu, dass sich die Poren verkleinern bzw. räumlich vollständig eingeschlossen werden und somit deren Interkonnektivität verloren geht. Hierbei muss berücksichtigt werden, daß Ethanol aufgrund seines räumlichen Anspruchs nicht in kleinste bzw. abgeschlossene Poren eindringen kann und die somit experimentell erhaltenen Porositäten für die polymerisierten Proben tendenziell eher kleiner sind, als die real vorliegenden. Nach Brinker und Scherer dringt die von der Probe zu absorbierende Flüssigkeit in die Poren mit dem größten Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis ein, da dies die größte Absenkung des Energiepotentials des Systems zu Folge hat.<sup>[118]</sup>

## 5.5 Heparin-Freisetzung

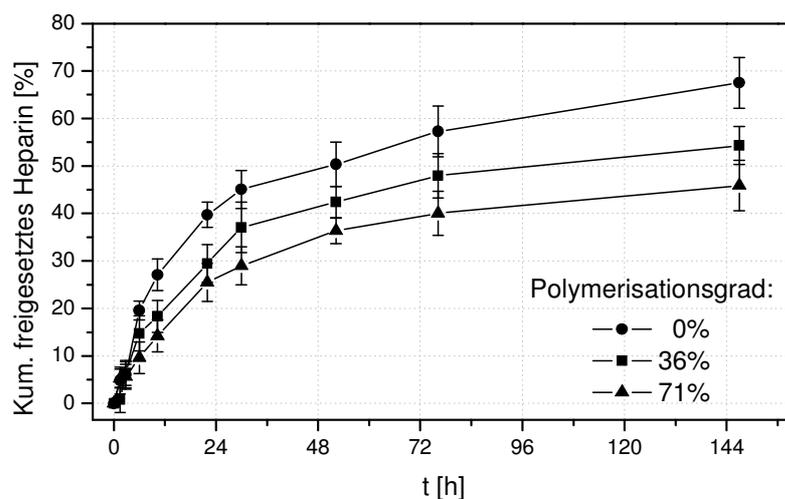
Während der Versuchsdurchführung erfolgte die Heparin-Freisetzung aus den unterschiedlich polymerisierten und mit verschiedenen Mengen an Wirkstoff beladenen Matrices näherungsweise nach einer Kinetik erster Ordnung, zurückzuführen auf die Endlichkeit des im Depot eingebetteten Wirkstoffs (s. Abb. 5.6, Abb. 5.7 & Abb. 5.8).



**Abb. 5.6:** Freisetzung von Heparin aus P-MA-PS-Proben mit Polymerisationsgraden von 0, 36 und 71% bei 2.7% Wirkstoffgehalt. Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert aus drei Messungen, die Fehlerbalken sind Standardabweichungen



**Abb. 5.7:** Freisetzung von Heparin aus P-MA-PS-Proben mit Polymerisationsgraden von 0, 36 und 71% bei 5.4% Wirkstoffgehalt. Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert aus drei Messungen, die Fehlerbalken sind Standardabweichungen

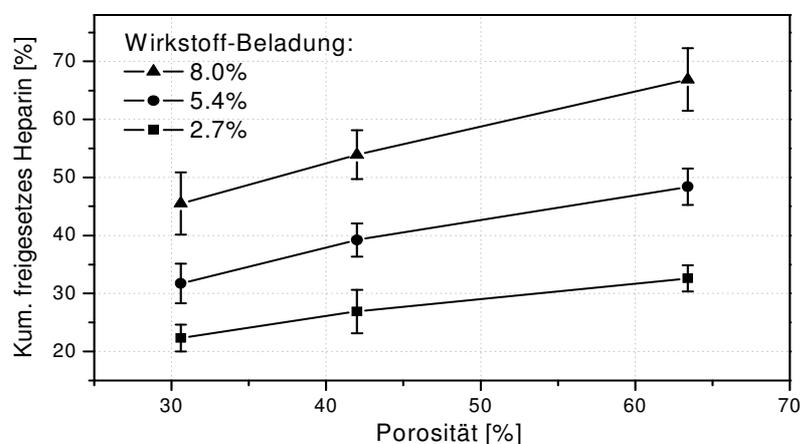


**Abb. 5.8:** Freisetzung von Heparin aus P-MA-PS-Proben mit Polymerisationsgraden von 0, 36 und 71% bei 8.0% Wirkstoffgehalt. Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert aus drei Messungen, die Fehlerbalken sind Standardabweichungen

Der initial steile Freisetzungsanstieg („burst release“) von Wirkstoffen aus Matrices ist ein bekanntes Problem, welches für Systeme mit größerer Oberfläche wahrscheinlicher ist und zunimmt, wenn das molekulare Gewicht von Heparin abnimmt und die Menge an eingebettetem Heparin steigt.<sup>[68]</sup> Da das in dieser Arbeit verwendete Heparin als Fraktion vorliegt und dadurch Molekulargewicht (13-18 kDa) bzw. Kettenlänge variieren, können in der ersten Freisetzungsphase kleinere Wirkstoffmoleküle aus dem Depot schneller

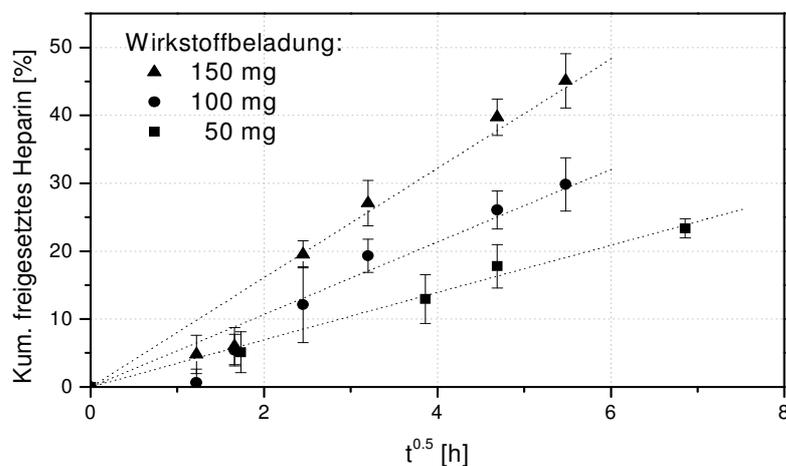
ausdiffundieren, weil sie beim Austritt einer geringeren sterischen Hinderung durch die Matrix unterliegen. Desweiteren ist die Heparinkonzentration zu Beginn der Freisetzung an der Matrixoberfläche noch groß, was mit einem kurzen Austrittsweg aus der Matrix in das Medium einhergeht. Beide Effekte sind neben anderen für den „burst release“ verantwortlich, wenn auch gleich dieses Phänomen in seiner gesamten Komplexität noch immer nicht vollständig verstanden ist.<sup>[120]</sup>

Nach dem initial sprunghaften Anstieg bei der Freisetzung des Wirkstoffs stabilisierte sich das Freisetzungprofil zunehmend im Laufe der Zeit. Es konnte gezeigt werden, dass die aus den unpolymerisierten Probenkörpern freigesetzte Menge an Heparin mit steigendem Wirkstoffgehalt zunahm, wie z.B. 144 h nach Beginn des Experiments, als zwischen 30-70% des ursprünglich in die Matrix eingebetteten Wirkstoffs ausdiffundiert war. Dies traf auch auf die organisch polymerisierten P-MA-PS-Proben zu. Hier konnte beobachtet werden, daß die aus den verschiedenen Hybrid-Xerogelen freigesetzte Menge an Heparin zunahm, je höher deren Wirkstoffbeladung zwischen 2.7-8.0 wt% und je niedriger deren Polymerisationsgrad zwischen 0-71% war. Hierbei wurde die Freisetzung bei höherer Wirkstoff-Beladung dadurch noch begünstigt, dass die in der Matrix suspendiert vorliegenden Heparin-Partikel bei der Auslaugung zusätzliche Poren in der Matrix erzeugten, die das Ausdiffundieren weiterer Moleküle beschleunigten.<sup>[77]</sup> Desweiteren unterlag der Wirkstoff beim Austritt aus der Matrix bei höheren Polymerisationsgraden einer größeren sterischen Hinderung, bedingt durch deren geringere Porosität. Die Abhängigkeit der Heparin-Freisetzung von der Porosität aus den mit verschiedenen Mengen an Wirkstoff bepackten Proben ist in Abb. 5.9 dargestellt.

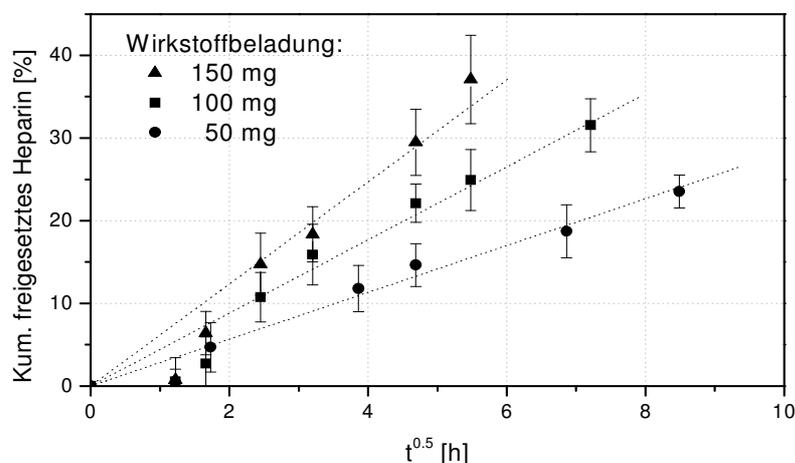


**Abb. 5.9:** Korrelation der Porosität mit der kumulativ freigesetzten Wirkstoffmenge für die mit verschiedenen Mengen an Wirkstoff bepackten Probenkörper (144 h nach Beginn des Freisetzungsexperiments). Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert aus drei Messungen, die Fehlerbalken sind Standardabweichungen

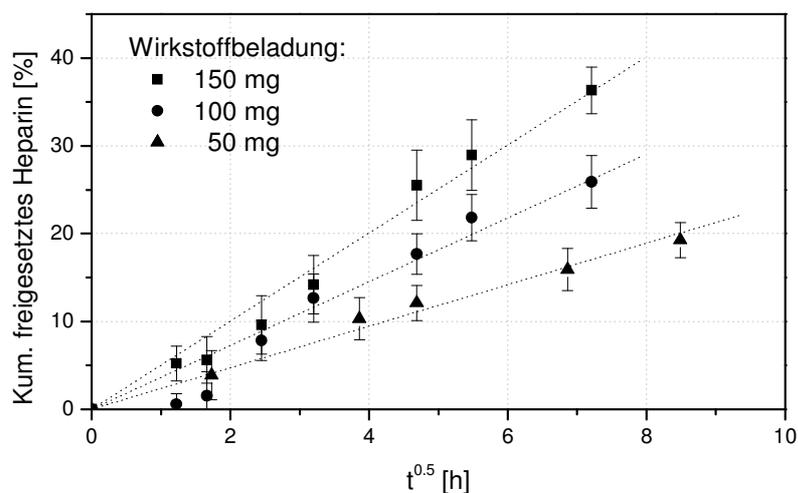
Zur Beschreibung der Freisetzungskinetik von Wirkstoffen aus Sol-Gel-Matrices kann wie in Kapitel 2.6.3 bereits beschrieben die sogenannte Higuchi-Gleichung herangezogen werden, aus der sich ableiten läßt, dass die freigesetzte Wirkstoffmenge pro Flächeneinheit eine Funktion der Zeit ist. Trägt man die kumulativ freigesetzte Wirkstoffmenge gegen die Wurzel aus der Zeit auf, dann ergibt sich nach Formel 2.2 eine Gerade. Um die Anwendbarkeit der Higuchi-Gleichung auf die Freisetzungskinetik von Heparin aus den in dieser Arbeit entwickelten P-MA-PS Matixsystemen zu ermitteln, wurden die experimentell bestimmten Wirkstoffmengen gegen die Wurzel aus der Zeit aufgetragen (Abb. 5.10, Abb. 5.11 & Abb. 5.12) und anschließend einer linearen Regression unterzogen.



**Abb. 5.10:** Auftragung nach Higuchi: Die kumulativ freigesetzte Menge an Heparin aus den unpolymersierten (Polymerisationsgrad = 0%) und mit verschiedenen Mengen an Wirkstoff beladenen Proben ist gegen die Wurzel aus der Zeit aufgetragen. Die gestrichelten Linien stellen die jeweiligen linearen Regressionen dar



**Abb. 5.11:** Auftragung nach Higuchi: Die kumulativ freigesetzte Menge an Heparin aus den polymerisierten (Polymerisationsgrad = 36%) und mit verschiedenen Mengen an Wirkstoff beladenen Proben ist gegen die Wurzel aus der Zeit aufgetragen. Die gestrichelten Linien stellen die jeweiligen linearen Regressionen dar



**Abb. 5.12:** Auftragung nach Higuchi: Die kumulativ freigesetzte Menge an Heparin aus den polymerisierten (Polymerisationsgrad = 71%) und mit verschiedenen Mengen an Wirkstoff beladenen Proben ist gegen die Wurzel aus der Zeit aufgetragen. Die gestrichelten Linien stellen die jeweiligen linearen Regressionen dar

Der Fehlerbereich ( $\pm$ ) der jeweiligen Steigung  $k_H$  (Tabelle 5.2) der Regressionsgeraden ist ein Maß dafür, wie gut das Higuchi-Modell auf P-MA-PS Matrixsysteme anwendbar ist. Die Fehler der Steigungen  $k_H$  aus Tabelle 5.2 nehmen für kleinere Mengen an kumulativ freigesetztem Wirkstoff ab und für höhere Mengen an freigesetztem Heparin zu. Dennoch liegen die relativen Fehler alle zwischen 2-7%, was bedeutet, dass das rein Diffusionskontrollierte Higuchi-Modell für das Wirkstofffreisetzungprofil aus P-MA-PS Matrices relativ gut anwendbar ist. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Untersuchungen zu  $\text{SiO}_2$ -Wirkstoffdepots in der Literatur, die ebenfalls über den Sol-Gel-Prozeß hergestellt wurden und deren Freisetzung von Heparin ebenfalls mithilfe des Higuchi-Modells untersucht wurde.<sup>[68]</sup>

| Polym.grad [%]    | 0    |      |      | 36   |      |      | 71   |      |      |
|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Hep.beladung [mg] | 50   | 100  | 150  | 50   | 100  | 150  | 50   | 100  | 150  |
| $k_H$             | 3.48 | 5.34 | 8.05 | 2.83 | 4.42 | 6.17 | 2.36 | 3.63 | 5.02 |
| Fehler ( $\pm$ )  | 0.10 | 0.35 | 0.44 | 0.07 | 0.24 | 0.41 | 0.06 | 0.22 | 0.17 |

**Tabelle 5.2:** Über lineare Regression ermittelte Steigungen ( $k_H$ ) für die verschiedenen polymerisierten und mit Wirkstoff beladenen Probenkörper aus den Abb. 5.10–Abb. 5.12

Die Abweichungen der experimentell ermittelten Daten zum Higuchi-Modell können dadurch erklärt werden, dass für die Anwendbarkeit der Higuchi-Gleichung Anforderungen bzw. Vereinfachungen gelten (s. Kapitel 2.6.3), die experimentell nicht vorlagen. Das Higuchi-

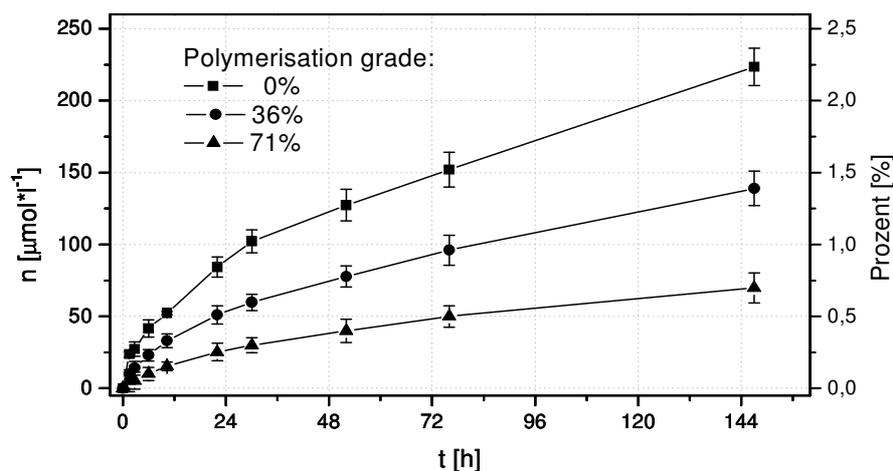
Modell postuliert, dass sich die dem Freisetzungsmedium zugängliche Oberfläche während der Freigabeuntersuchung nicht durch Quellen oder Degradation der Matrix verändern darf. Bei experimentellen Untersuchung fanden beide Prozesse jedoch geringfügig statt (s. Kapitel 5.6). Desweiteren sollten bei der Freisetzung von Wirkstoffen aus Matrices Sinkbedingungen vorherrschen, die in der experimentellen Durchführung durch Schütteln der Versuchsanordnung nur näherungsweise simuliert werden konnten. Die relativ gute Anwendbarkeit der Higuchigleichung auf die Freisetzungskinetik aus P-MA-PS Wirkstoffdepots ist sehr wahrscheinlich auf die über den Sol-Gel-Prozess und die Polymersiation erlangte gleichmäßige Vernetzung von MAS zurückzuführen, was der Anforderung des Higuchi-Modells nach homogener Porosität bzw. Porenverteilung im Werkstoff entspricht.

In zukünftigen Arbeiten könnte die Freisetzungskinetik von Heparin aus P-MA-PS Matrices durch zusätzliche Modifizierung dieser mit Molekülen gezielt gesteuert werden, die Heparin kovalent bzw. ionisch binden können, um dadurch die Freisetzungsrates des Wirkstoffs kontrolliert auf Wochen und Monate hinweg zu verlängern. Hierzu könnte P-MA-PS der Haftvermittler APMS zugesetzt werden, der einerseits chemisch in die Matrix eingebunden würde und zusätzlich noch den Wirkstoff kovalent binden könnte.<sup>[63]</sup> Um Heparin ionisch zu binden könnten der Matrix Polyelektrolyte wie beispielsweise Polyethylenimin (PEI) zugesetzt werden, die den Wirkstoff durch eine elektrostatische Wechselwirkung binden könnten, wobei diese Art der Bindung jedoch schwächer als die kovalente wäre.<sup>[121]</sup>

## 5.6 Degradation der anorganischen Matrix

Die Freisetzung von Heparin, das in einer anorganischen Matrix dispergiert vorliegt, erfolgt aufgrund eines kombinierten Prozesses von Diffusion durch mit Lösungsmittel gefüllte Kapillar-Kanäle und der Erosion der Matrix in ungiftige ionische Produkte. Letzteres Phänomen, auch Biodegradation genannt, findet durch die Hydrolyse von Siloxanbindungen zu  $R_mSi(OH)_{4-m}$  statt, welches dann vom Implantat in das Blut- und Lymphsystem diffundiert und durch die Nieren ausgeschieden wird.<sup>[113]</sup> Aus diesem Grund ist es von Bedeutung, das Degradationsverhalten eines potentiellen Implantatwerkstoffs in vitro zu bestimmen, um dessen Materialeigenschaften für einen klinischen Einsatz besser einschätzen zu können. Üblicherweise wird die Degradation von  $SiO_2$ -Xerogelen im wässrigen Milieu über die

Menge an gelöstem  $\text{Si}(\text{OH})_4$  bestimmt. Dieses kann kolorimetrisch bei 820 nm als Molybdänblau-Komplex quantifiziert werden.<sup>[122]</sup> Da die in dieser Arbeit vorliegenden Xerogele organisch modifiziert vorlagen, konnte die Quantifizierung über die Komplexbildung nicht realisiert werden. Anstelle dessen wurde die Quantifizierung UV-VIS-spektroskopisch direkt über die Signalintensität der C=C-Doppelbindung des organischen Methacrylatrests bei 220 nm vorgenommen.



**Abb. 5.13:** Degradation der anorganischen Matrix, korreliert mit verschiedenen Polymerisationsgraden des organischen Methacrylatrests. Jeder Datenpunkt ist das Mittel aus drei Messwerten, die Fehlerbalken sind Standardabweichungen

Die Ergebnisse zeigen, dass eine zusätzliche organische Vernetzung die Degradation der anorganischen Matrix auf einen Bruchteil senkt, was diesen Effekt für die kontrollierte Einstellung des Degradationsverhalten interessant macht. Da alle Probenkörper den gleichen Hydrolysebedingungen unterlagen kann darauf geschlossen werden, dass die Menge an eingebettetem Heparin keinen Einfluß auf die Hydrolysegeschwindigkeit besitzt. Dies bedeutet, dass die verschiedenen Mengen an eingebettetem Wirkstoff keine Veränderung in der chemischen Struktur der P-MA-PS-Matrix nach sich ziehen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit neueren Untersuchungen zu  $\text{SiO}_2$ -Wirkstoffdepots, deren Matrices durch die Menge an eingebettetem Wirkstoff ebenfalls keiner nachweisbaren chemischen Veränderung unterlagen.<sup>[123]</sup>

### 5.7 Wirksamkeit des ausdiffundierten Heparins

Die Wirksamkeit des aus den mit unterschiedlichen Mengen an Wirkstoff bepackten und verschieden polymerisierten Depots ausdiffundierten Heparins wurde wie in Kapitel 7.7 (Assay B) beschrieben untersucht, die so erhaltenen Werte sind in in Tabelle 5.3 dargelegt. Aufgrund der extrem hohen Kosten der Messmethode wurde die Wirksamkeit des aus den verschiedenen Probenkörpern ausdiffundierten Heparins jeweils nur einfach bestimmt.

| Hep. in Depot [mg]              | 50        |            |           | 100       |           |           | 150       |           |            |
|---------------------------------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| Polym.grad [%]                  | 0         | 36         | 71        | 0         | 36        | 71        | 0         | 36        | 71         |
| Hep.menge [ $\mu\text{g/ml}$ ]  | 0.46      | 0.41       | 0.33      | 0.67      | 0.58      | 0.50      | 0.99      | 0.83      | 0.70       |
| Aktivität <sub>max</sub> [U/ml] | 0.080     | 0.071      | 0.058     | 0.116     | 0.100     | 0.087     | 0.172     | 0.144     | 0.120      |
| Absorption <sub>ist</sub>       | 1.55      | 1.59       | 1.68      | 1.24      | 1.48      | 1.48      | 0.94      | 1.09      | 1.15       |
| Aktivität <sub>ist</sub> [U/ml] | 0.074     | 0.072      | 0.055     | 0.115     | 0.083     | 0.083     | 0.153     | 0.135     | 0.126      |
| Wirksamkeit [%]                 | <b>93</b> | <b>102</b> | <b>95</b> | <b>99</b> | <b>83</b> | <b>95</b> | <b>89</b> | <b>94</b> | <b>105</b> |

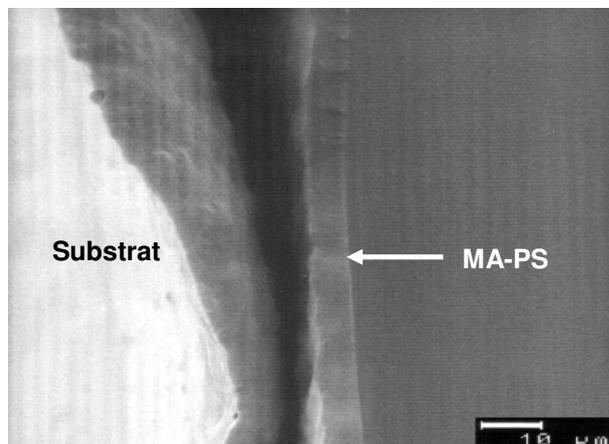
**Tabelle 5.3:** Wirksamkeit von Heparin, das aus den verschiedenen polymerisierten und mit unterschiedlich viel Wirkstoff beladenen Proben ausdiffundierte (Hep. = Heparin & Polym. = Polymerisations). Für die mit 50 mg Heparin beladenen Depots erfolgte die Bestimmung der Wirksamkeit des Heparins in der Lauge 72 h nach Einbringung des Depots in das wässrige Medium, für die mit 100 bzw. 150 mg Heparin beladenen Proben erfolgte die Wirksamkeitsbestimmung auf selbige Weise nach 76 h. Wirksamkeiten über 100% liegen im Fehlerbereich der Meßmethode

Die Ergebnisse veranschaulichen, dass das aus den verschiedenen polymerisierten und mit Wirkstoff beladenen Probenkörpern ausdiffundierte Heparin seine Fähigkeit behielt, Thrombin zu inaktivieren. Die Wirksamkeit des ausdiffundierten Heparins betrug bei allen vermessenen Proben mindestens 83%. Dies traf auf jedes getestete Xerogel zu und es gab keinen signifikanten Anhaltspunkt dafür, daß die verschiedenen Polymerisationsgrade bzw. Wirkstoffbeladungen die Wirksamkeit von Heparin beeinflussen würden.

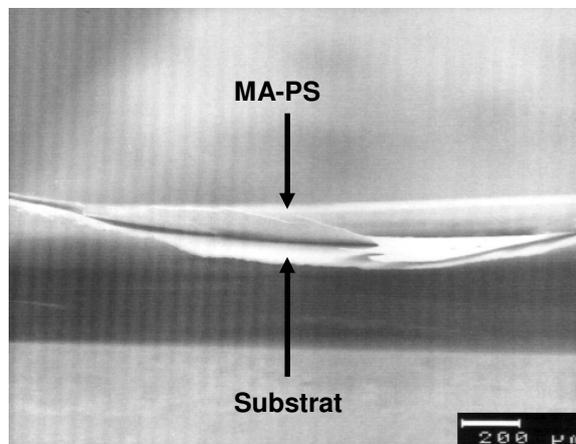
### 5.8 Herstellung definierter MA-PS-Beschichtungen auf Al-/TiO<sub>2</sub>-Folie

Die Dicke der über den Spin-coating Prozeß auf Al- und TiO<sub>2</sub>-Folie (Substrate) aufgetragenen MA-PS-Schichten kann wie bereits beschrieben (s. Kapitel 7.4.6) rasterelektronenmikroskopisch (REM) durch Abbildung der Abrißkante bestimmt werden. Im Falle der Beschichtung der Al-Folie (Abb. 5.14 & Abb. 5.15) ist gut zu erkennen, dass die Schichten beim „Zerreißen“ der Folie durch die mechanische Krafteinwirkung delaminieren, was auf

den relativ schwachen adhäsiven Bund zwischen MA-PS und dem Substrat zurückzuführen ist.<sup>[69]</sup> Die gezielte Einstellung der Schichtdicken konnte durch den Verdünnungsgrad des Sol-Gel-Ansatzes mit Aceton erreicht werden (Abb. 5.19).

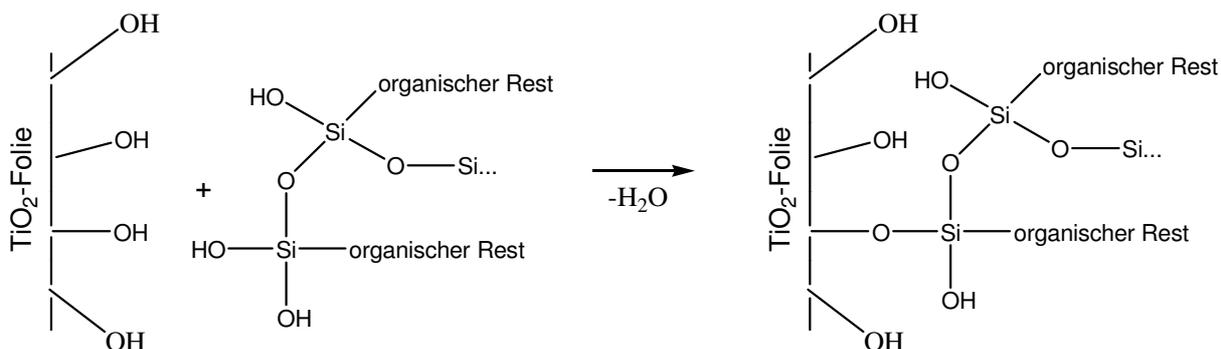


**Abb. 5.14:** Vertikale Ansicht der Abrißkante (10  $\mu\text{m}$  Skalierung) von Al-Folie, die mit MA-PS über Spin-Coating beschichtet wurde (rechts: delaminierte Schicht, links: Al-Folie)



**Abb. 5.15:** Horizontale Ansicht der Abrißkante (200  $\mu\text{m}$  Skalierung) von Al-Folie, die ebenfalls mit MA-PS über Spin-Coating beschichtet wurde (oben: delaminierte Schicht, unten: Al-Folie)

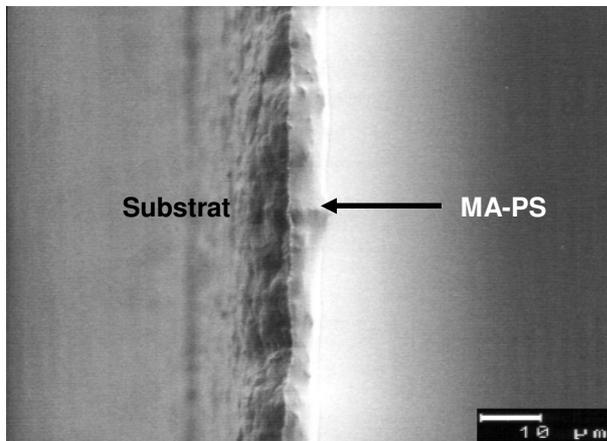
Wird hingegen  $\text{TiO}_2$ -Folie als Substrat beschichtet, so bilden die OH-Gruppen der hydroxylierten Oberfläche des  $\text{TiO}_2$  durch Kondensation mit den Si-OH-Gruppen des hydrolysierten MAS eine kovalente Si-O-Ti-Bindung aus (s. Abb. 5.16).



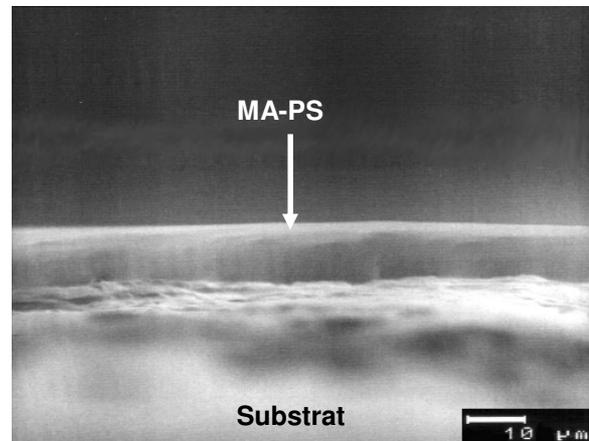
**Abb. 5.16:** Schematische Darstellung der Ausbildung kovalenter Ti-O-Si-Bindungen bei der Beschichtung von  $\text{TiO}_2$ -Folie mit MA-PS

Diese kovalente Anhaftung der Schicht ist deutlich stärker als reine Adhäsionkräfte, was selbst beim „Zerreißen“ der  $\text{TiO}_2$ -Folie nicht zur Delamination der Schicht führt (Abb. 5.17 & Abb. 5.18). Dieser Effekt ist wünschenswert, falls die mit MA-PS beschichtete Substrate mechanischen Belastungen ausgesetzt werden und diesen über einen langen Zeitraum

standhalten müssen, wie beispielsweise bei der Oberflächenfunktionalisierung von entsprechenden Dauerimplantaten.

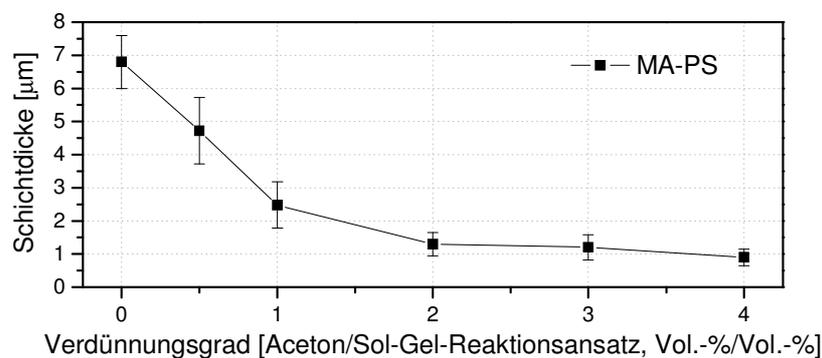


**Abb. 5.17:** Vertikale Ansicht auf die Abrißkante (10 µm Skalierung) von TiO<sub>2</sub>-Folie, die mit MA-PS über Spin-coating beschichtet wurde (rechts: anhaftende Schicht, links: TiO<sub>2</sub>-Folie)



**Abb. 5.18:** Horizontale Ansicht auf die Abrißkante (10 µm Skalierung) von TiO<sub>2</sub>-Folie, die mit MA-PS über Spin-coating beschichtet wurde (oben: anhaftende Schicht, unten: TiO<sub>2</sub>-Folie)

Die Schichtdickenbestimmung über REM wurde anhand von Al-Folie als Substrat vorgenommen, da hierbei die Delamination die Differenzierung zwischen Substrat und Beschichtung optisch vereinfachte. Zur definierten Einstellung der unterschiedlichen Schichtdicken wurde der Sol-Gel-Ansatz sukzessive mit Aceton verdünnt. Die so erhaltenen Schichtdicken weisen bei Verdünnung des Sol-Gel-Ansatzes mit Aceton einen exponentiellen Abfall auf (Abb. 5.19).



**Abb. 5.19:** Die Schichtdicke in Abhängigkeit des Verdünnungsgrades (Volumenverhältnis von Aceton/Sol-Gel-Ansatz). Jeder Meßpunkt ist der Mittelwert aus zwei Messungen, die Fehlerbalken sind Standardabweichungen

Desweiteren können MA-PS-Beschichtungen zusätzlich zu der anorganischen Vernetzung photochemisch polymerisiert werden. Dies hätte zwar keine Auswirkung auf deren

Anbindung zum Substrat, aber Schichteigenschaften wie Härte, Porosität und damit auch eine erwünschte Freisetzungskinetik eines eingebetteten Wirkstoffs können somit gezielt gesteuert werden. Der Einsatz von P-MA-PS Probenkörpern als Wirkstoffdepots wurde bereits in Kapitel 5.5 beschrieben.

## 5.9 Ausblick

Die organisch modifizierten  $\text{SiO}_2$ -Matrices konnten ausgehend von MAS (Methacryloxypropyltrimethoxysilan) anorganisch über den Sol-Gel Prozeß und nachfolgend organisch über photochemische Polymerisation vernetzt werden, was IR- bzw. RAMAN-spektroskopisch verfolgt werden konnte. Über die Wirkstoffbeladung und die Steuerung des Polymerisationsgrads der organischen Matrix zwischen 0-71% konnte die Freisetzungskinetik von Heparin gezielt eingestellt werden. Es konnte gezeigt werden, daß hohe Wirkstoff-Beladungen und niedrige Polymerisationsgrade mit einer schnelleren Freisetzung des Heparins korrelierten, die aufgrund der Endlichkeit des Wirkstoffs im Depot einer Kinetik 1. Ordnung unterlag. Die kumulativ freigesetzten Wirkstoffmengen verhielten sich hierbei proportional zur Wurzel aus der Zeit, was dem Higuchi-Modell zur Diffusions-kontrollierten Wirkstofffreisetzung aus Sol-Gel-Matrices entsprach. Die durch Hydrolyse bedingte Degradation der anorganischen Matrix erfolgte nach einer Kinetik pseudo-0. Ordnung. Es gab keinen Anhaltspunkt dafür, dass unterschiedliche Mengen an eingebettetem Heparin einen Einfluß auf die Degradation und somit auf die chemische Struktur der Matrix hatten. Da der ausdiffundierte Wirkstoff seine biologische Aktivität beibehielt, sind P-MA-PS Wirkstoffdepots interessant für die Beschichtung metallischer Oberflächen, die im Kontakt mit Blut stehen. Denkbar wäre der klinische Einsatz bei wirkstofffreisetzenden Stents („Drug-eluting stents“).

## 6 Zusammenfassung/Summary

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Funktionalisierung von Titanoberflächen mit dem Glycosaminoglycan Heparin, um bei Kontakt des Werkstoffs mit Blut die Gerinnungskaskade nicht auszulösen und das Material für Stents (Gefäßstützen) im arteriellen System einsetzbar zu machen. Für die Modifizierungen wurden als Modell der oxidierten Titanoberfläche sowohl oxidierte cp-Titanplättchen als auch  $\text{TiO}_2$ -Pulver verwendet. Heparin kam zum Einsatz, da es sowohl die Hämostase (Blutgerinnung) als auch die Proliferation (Überwucherung) mit glatten Muskelzellen unterdrückt und somit eine Restenose (Wiederverengung) des in die verengte Arterie eingebrachten Stents verhindert.

Die kovalente Immobilisierung des Wirkstoffs erfolgte über bifunktionale Spacer (Haftvermittlermoleküle), die einerseits an das Substrat und andererseits an den Wirkstoff kovalent binden konnten und deren Länge die biologische Wirksamkeit von Heparin beeinflusste. Spacer waren 3-(Trimethoxysilyl)-propylamin (APMS), *N*-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan (Diamino-APMS) und *N*<sup>1</sup>-[3-(Trimethoxysilyl)-propyl]diethylentriamin (Triamino-APMS). Geklärt werden sollte daneben der Einfluss der primär gebildeten Titanoxid-Schicht auf die Anhaftung des Haftvermittlers, hierzu wurden über unterschiedliche Verfahren (Sol-Gel Prozeß, PVD, Thermische und Anodische Oxidation) oxidierte cp-Titan-Plättchen mit den verschiedenen Haftvermittlern modifiziert, um den Zusammenhang zwischen der Topographie und der Zusammensetzung der  $\text{TiO}_2$ -Schichten und der Menge an gebundenem Haftvermittler aufzuzeigen. Für cp-Titanplättchen, die über verschiedene Verfahren oxidiert wurden, konnten prinzipiell zwei Tendenzen festgestellt werden. Die höchsten Mengen an Haftvermittler wurden im Falle von APMS (115-212 nmol/cm<sup>2</sup>) und die niedrigsten im Falle von Triamino-APMS (102-176 nmol/cm<sup>2</sup>) auf den verschiedenen  $\text{TiO}_2$ -Schichten erhalten. Hierbei zeigte sich, dass auf den  $\text{TiO}_2$ -Schichten mit der größten spezifischen Oberfläche (PVD>Thermisch>Anodisch> Sol-Gel) signifikant die größte Menge an Haftvermittler immobilisiert werden konnte.

Der qualitative und quantitative Nachweis der Funktionalisierung von  $\text{TiO}_2$  mit Haftvermittler bzw. Heparin erfolgte durch schwingungsspektroskopische Methoden, komplexometrische Farbreaktionen sowie der Bestimmung des Zetapotentials im Elektrolytkontakt. Durch die Anbindung von APMS, Di- und Triamino-APMS stieg das Zetapotential von ca. -26 mV auf

positive Werte zwischen +41 und +45 mV. Ein Absinken des Zetapotentials belegte die erfolgreiche Anbindung von Heparin (Werte zwischen -39 und -37 mV) an die verschiedenen Haftvermittler, ebenso wie das Vorhandensein der symmetrischen  $\text{SO}_3$ -Valenzschwingung bei  $1040\text{ cm}^{-1}$ . Der quantitative Nachweis der immobilisierten Aminogruppen über die Ninhydrinreaktion ergab für die  $\text{TiO}_2$ -Pulver Werte zwischen  $17\text{-}20\text{ NH}_2/\text{nm}^2$ , wobei die dichteste Funktionalisierung mit APMS und die niedrigste mit Triamino-APMS erzielt werden konnte. Alle Werte lagen im Bereich von Multilayern, da ein Monolayer aus ca.  $2\text{-}3\text{ NH}_2/\text{nm}^2$  besteht. Die immobilisierte Menge an Heparin war bei Verwendung von APMS am größten ( $53.3\pm 3.6\text{ ng/cm}^2$ ) und bei Triamino-APMS am geringsten ( $32.1\pm 5.7\text{ ng/cm}^2$ ). Die biologische Wirksamkeit des gebundenen Heparins wurde über das chromogene Substrat ChromozymTH<sup>®</sup> bestimmt und verblieb bei Anbindung an den Spacer mit der größten Moleküllänge (Triamino-APMS) mit ca. 70% am wirksamsten.

Mit Hilfe der QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring) Technik wurde das Adsorptionsverhalten des extrazellulären Plasmaproteins Fibrinogen auf den über die verschiedenen Haftvermittler (APMS, Di- und Triamino-APMS) heparinisierten Oberflächen untersucht. Im Falle der Heparinisierung über Triamino-APMS wurde zwar am wenigsten Protein adsorbiert, es lag jedoch im Vergleich zu den über APMS und Diamino-APMS modifizierten Oberflächen weniger starr gebunden vor. Dies legt den Schluß nahe, dass das adsorbierte Fibrinogen eine geringere Konformationsänderung erfährt und die auf diese Weise funktionalisierte Oberfläche das Auslösen der Hämostase (Blutgerinnung) weniger begünstigt und somit eine bessere Hämokompatibilität nach sich zieht.

Neben der kovalenten Anbindung des Wirkstoffs an Spacer zielte diese Arbeit auf die Entwicklung von organisch modifizierten, porösen  $\text{SiO}_2$ -Wirkstoffdepots (P-MA-PS; Polymethacryloxypropylpolysilsesquioxane) für Heparin ab, die sowohl als Volumenwerkstoffe als auch zur Modifikation von Titan(dioxid)oberflächen anwendbar wären. Die Matrices wurden ausgehend von MAS (Methacryloxypropyltrimethoxysilan) über den Sol-Gel Prozeß anorganisch und anschließend über photochemische Polymerisation zusätzlich organisch vernetzt. Die Quantifizierung des Polymerisationsgrads erfolgte über die Signalintensität der methacrylischen  $\text{C}=\text{C}$ -Doppelbindung bei  $1635\text{ cm}^{-1}$  durch Integration einer Gauß-Funktion. Über den Polymerisationsgrad der organischen Matrix zwischen 0-71% konnte die Freisetzungskinetik von Heparin je nach therapeutischer Anforderung eingestellt werden. Es konnte gezeigt werden, daß hohe Wirkstoff-Beladungen und niedrige Polymerisationsgrade

mit einer schnelleren Freisetzung des Heparins korrelierten, die aufgrund der Endlichkeit des Wirkstoffs im Depot einer Kinetik 1. Ordnung unterlag. Die kumulativ freigesetzten Wirkstoffmengen verhielten sich hierbei proportional zur Wurzel aus der Freisetzungszeit, was dem Higuchi-Modell zur Wirkstofffreisetzung aus porösen Matrices mit einem rein Diffusions-kontrollierten Mechanismus entsprach. Die durch Hydrolyse bedingte Degradation der anorganischen Matrix, die UV-VIS-spektroskopisch bei  $\lambda = 220$  nm gemessen wurde, folgte einer Kinetik pseudo-0. Ordnung. Da das freigesetzte Heparin seine biologische Wirksamkeit beibehielt, sind P-MA-PS Matrices interessant für klinische Anwendungen, wie z.B. für die Beschichtung von Gefäßstützen, die im Blutkontakt stehen.

Abschliessend kann gesagt werden, dass sowohl die kovalente Bindung des Wirkstoffs an Substratoberflächen als auch die Einbettung von Heparin in Depots, mit denen Implantatoberflächen beschichtet werden können, einen wichtigen Schritt hinsichtlich der Entwicklung hämokompatibler Implantatoberflächen darstellen. Hierbei gewährleistet die Immobilisierung des Wirkstoffs eine langanhaltende Funktionalisierung der Substratoberfläche, wohingegen Depots eine lokal kontrollierte Freigabe von Heparin ermöglichen, die gezielt auf den gewünschten Implantationsort eingestellt werden kann.

## Summary

Aim of this work was the functionalization of titanium surfaces with the glycosaminoglycane heparin to improve the surface hemocompatibility for an application in the field of coronary stenting. Surface modification was performed using both TiO<sub>2</sub> powder and titanium sheets as substrates imitating the (oxidized) surface of titanium implants. The substrates were modified with heparin to prevent side effects like blood coagulation and neointimal proliferation after implantation, which can both lead to restenosis of the acute artery closure. Surfaces can be modified either by covalent bonding of the drug to the metal by a silane spacer or by embedding the active agent into a polymer matrix for the controlled release over a certain period of time.

Covalent attachment of heparin to titanium metal and TiO<sub>2</sub> powder was carried out using the coupling agents 3-(Trimethoxysilyl)-propylamine (APMS), *N*-[3-(Trimethoxysilyl)-propyl]-

ethylenediamine (Diamino-APMS) and  $N^1$ -[3-(Trimethoxysilyl)-propyl]-diethylenetriamine (Triamino-APMS). Additionally, the influence of primary accomplished  $\text{TiO}_2$  films on the density of surface bound spacer was determined. Therefore, polished titanium substrates were covered with thin ( $< 2 \mu\text{m}$ )  $\text{TiO}_2$  layers by means of thermal/anodic oxidation, physical vapor deposition (PVD) or the sol-gel process and were then modified with the different spacer molecules, respectively. Aim was a correlation between the composition/topography of the  $\text{TiO}_2$  layers and the amount of bound spacer molecules. At this, two tendencies could be observed. Firstly, the density of surface bound spacer was generally highest for APMS (115-212  $\text{nmol}/\text{cm}^2$ ) and lowest for Triamino-APMS (102-176  $\text{nmol}/\text{cm}^2$ ), which was due to that smaller molecules underlie less intermolecular sterical hindrance onto surfaces. And secondly, on  $\text{TiO}_2$  surfaces with a higher roughness and therewith a higher specific surface area more spacer molecules could be immobilized (in the sequence: PVD  $>$  heat treated  $>$  anodized  $>$  sol-gel).

The amount of surface bound coupling agent and heparin was quantified photometrically by the ninhydrin reaction and the toluidine-blue test. The biological potency of heparin was determined photometrically by the chromogenic substrate Chromozym TH and fibrinogen adsorption on the modified surfaces was investigated using the QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring) technique. Zeta-potential measurements confirmed the successful coupling reaction; the zeta-potential of the unmodified anatase surface (approx. -26 mV) shifted into the positive range ( $> +40$  mV) after silanisation. Binding of heparin resulted in a strongly negatively charged surface with zeta-potentials of approx. -39 mV. The successful heparinization could also be followed using RAMAN-spectroscopy by the occurrence of the peak at  $1040 \text{ cm}^{-1}$  (S=O vibration) caused by the drug. The amount of covalently attached primary amino groups on  $\text{TiO}_2$  powder was the highest for APMS (20  $\text{NH}_2/\text{nm}^2$ ) and decreased for Di- and Triamino-APMS (19 & 17  $\text{NH}_2/\text{nm}^2$ ). The hereby accomplished aminosilane layers were all in the range of multilayers since a monolayer is approx. 2-3  $\text{NH}_2/\text{nm}^2$ . On the APMS spacer, the greatest amount of  $53.3 \pm 3.6 \text{ ng}/\text{cm}^2$  heparin was immobilized compared to Di- and Triamino-APMS ( $41.2 \pm 6.9$  &  $32.1 \pm 5.7 \text{ ng}/\text{cm}^2$ ). The retaining biological activity of heparin was found to be the highest (70%) for the covalent attachment with Triamino-APMS as coupling agent due to the long chain of this spacer molecule and therefore the highest mobility of the drug. Furthermore, the adsorption of fibrinogen on the differently heparinized surfaces in real time showed a lower viscosity for adsorbed fibrinogen films on heparinized surfaces bound by means of Triamino-

APMS. This effect is accompanied with higher  $\Delta D/\Delta f$  ratios and associated with better biocompatible properties of the substrates in contact with the biosystem.

Moreover, this work aimed to investigate the use of an organically modified porous silica matrix (Poly(methacryloxypropyl)-poly(silsesquioxane); P-MA-PS) as a release system for heparin. The matrices were obtained from the precursor methacryloxypropyltrimethoxysilane (MAS) via the sol-gel process under acidic conditions following photochemical polymerization and cross-linking of the organic matrix. Modulation of the polymerization degree of the organic matrix in the range 0-71% allowed to adjust the release kinetics of heparin according to therapeutic needs. It was demonstrated that higher drug loads and a decreasing polymerization degree resulted in a faster release profile of heparin, which followed a square root of time kinetic according to the Higuchi model. The hydrolytic degradation of the xerogel was found to follow a zero-order kinetic whereas the heparin concentration did not show an influence on the degradation rate of the anorganic matrix. Since the released heparin retained its biological activity, P-MA-PS matrices may be interesting for clinical application, for instance as coating on drug eluting coronary stents.

In conclusion, we have designed two new strategies to improve the hemocompatibility of titanium. On the one hand heparin was immobilized with silane coupling agents. The length of the spacer molecules influenced the performance of the drug and moreover, this way of functionlization ensured a long-lasting effect. Furthermore, we have synthesized a novel drug delivery system based on an organically modified silica xerogel, which can be used as coating material for titanium. Modulation of the polymerization degree of the organic matrix allowed to adjust the release properties according to therapeutic needs.

## 7 Experimententeil

### 7.1 Reagenzien

Adipinsäure, Fa. Fluka (Buchs, Schweiz)

3-Amino-1-propanol, Fa. Fluka (Buchs, Schweiz)

3-Aminopropyltrimethoxysilan („APMS“), Fa. Fluka (Buchs, Schweiz)

*N*-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan („Diamino-APMS“), Fa. Merck (Darmstadt)

Antithrombin III (Rinderplasma), Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)

Ascorbinsäure, Fa. Aldrich (Steinheim)

Benzoinmethylether (96%), Fa. Aldrich (Steinheim)

Chromozym TH (engl.:  $\beta$ -Ala-Gly-Arg-*p*-nitroanilide diacetate), Fa. Sigma (Steinheim)

Dermatansulfat, Fa. Sigma (Steinheim)

Dichlormethan, Fa. Merck (Darmstadt)

Dimethylsulfoxid (DMSO), Fa. Merck (Darmstadt)

Dinatriumhydrogenphosphat, Fa. Merck (Darmstadt)

Eisessig, Fa. Roth (Karlsruhe)

Essigsäureethylester, Fa. Aldrich (Steinheim)

Ethanol, Apotheke des Klinikums (Universität Würzburg)

Fibrinogen, Fraction I from Sheep Plasma, Fa. Sigma (Steinheim)

Heparin Natriumsalz, from Porcine Intestinal Mucosa, 173 IE/mg, Fa. Sigma (Steinheim)

Kaliumchlorid, Fa. Merck (Darmstadt)

Kaliumdihydrogenphosphat, Fa. Merck (Darmstadt)

K<sub>2</sub>EDTA (Dikaliummethylenediamintetraessigsäure), Fa. Merck (Darmstadt)

Lithiumhydroxid  $\times$  H<sub>2</sub>O, Fa. Riedel de Haën (Seelze)

Methacryloxypropyltrimethoxysilan (MAS; Silan A 174), Fa. Merck (Darmstadt)

Methanol, Fa. Merck (Darmstadt)

*N*-3-Dimethylaminopropyl-*N'*-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC), Fa. Sigma (Steinheim)

2-Morpholinoethansulfonsäure Monohydrat (MES), Fa. Fluka (Buchs, Schweiz)

Natriumchlorid, Fa. Merck (Darmstadt)

Natriumhydroxid, Fa. Merck (Darmstadt)

N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-methyl-p-toluolsulfonat (CMC), Fa. Fluka (Buchs, Schweiz)  
*n*-Hexan, Fa. Riedel de Haën (Seelze)  
N-Hydroxysuccinimid (NHS), Fa. Fluka (Buchs, Schweiz)  
Ninhydrin, Fa. Riedel de Haën (Seelze)  
1,4-Phenylendiisothiocyanat, Fa. Fluka (Buchs, Schweiz)  
Salzsäure konzentriert (32%), Fa. Merck (Darmstadt)  
Tetra-*n*-butoxytitanat, Fa. Aldrich (Steinheim)  
Thrombin (Rinderplasma), Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)  
Titandioxid, Anatas bzw. Rutil Fa. Merck (Darmstadt)  
Toluidinblau, Fa. Fluka (Buchs, Schweiz)  
Toluol, puriss. absolut über Molekularsieb, Fa. Fluka (Buchs, Schweiz)  
Triethylaluminium-Lösung (0,9 M, ca. 15% AlEt<sub>3</sub> in Hexan), Fa. Aldrich (Steinheim)  
N<sup>1</sup>-[3-(Trimethoxysilyl)-propyl]diethylentriamin („Triamino-APMS“), Fa. Aldrich (Steinheim)  
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)  
Zitronensäure, Fa. Merck (Hohenbrunn)

## 7.2 Vorbehandlung von Titan zur Wirkstoffanbindung

### 7.2.1 Polieren der cp-Titanplättchen

Die cp-Titanplättchen (d = 16 mm × h = 1.0 mm; grade 2, Fa. Jaeckel, Frankfurt) wurden zur Einstellung einer definierten Oberflächenrauigkeit mit Schleifpapier (Fa. Struers, Körnung 4000, Silicon Carbide) in einer Schleifmaschine (Fa. Wirtz, TF250) 1 h poliert. Anschließend wurden die Plättchen in 5%iger EXTRAN-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) 10 min im Ultraschallbad behandelt. Danach wurden die Plättchen jeweils dreimal in 10 ml *i*-Propanol und 10 ml bidest. Wasser für 10 min im Ultraschallbad gereinigt.

### 7.2.2 Anodische Oxidation

Die elektrochemische Oxidation (Anodische Oxidation, Anodisierung) der polierten Titanplättchen (Abschnitt 7.2.1) erfolgte durch Anlegen eines elektrischen Potentials

zwischen Titan (Anode) und einer Platinnetz-Gegenelektrode (Kathode) mit Hilfe des Labornetzgerätes Keithley 236 der Firma Keithley, Germeringen. Die Proben wurden bei 70 V jeweils 45 s oxidiert. Als Elektrolyt wurde 10%ige  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung verwendet.

### 7.2.3 *Thermische Oxidation*

Die polierten Ti-Plättchen (Abschnitt 7.2.1) wurden im Kammerofen der Firma Nabertherm, Nürnberg, unter Normalatmosphäre mit Temperatursteuerung (ProgrammController C19) innerhalb von 30 min auf 550 °C vorgeheizt (um einen Temperaturüberschlag zu vermeiden) und anschließend 90 min bei 600 °C oxidiert. Für die Bestimmung der Dicke der Oxidschicht wurde analog Ti-Folie ( $2,5 \times 2,5$  cm, Dicke 25  $\mu\text{m}$ , Ti > 99.6%, Fa. Goodfellow Metals, Cambridge) thermisch oxidiert und die Schichtdicke durch Abbildung der Abrißkante (REM) bestimmt.

### 7.2.4 *PVD (Physical Vapour Deposition/Physikalische Gasphasenabscheidung)*

Die polierten Titanplättchen (Abschnitt 7.2.1) wurden mit Hilfe einer PVD-Anlage PLS 570 (HF-Magnetronspalterquelle) der Firma Balzers, Liechtenstein mit Titanoxidschichten bedampft. Für die Bestimmung der Dicke der Oxidschicht wurden die zu bedampfenden Proben vorher mit einem Textmarker-Strich versehen, auf welchem das  $\text{TiO}_2$  später mit Aceton wieder entfernt werden konnte. Durch Vermessung der „Kante“ (AFM) zwischen beschichtetem und unbeschichtetem Substrat konnte die Dicke der Oxidschicht ermittelt werden.

Die Anlage wurde jeweils auf einen Hintergrundsdruck von weniger als  $2 \cdot 10^{-5}$  mbar evakuiert. Vor dem eigentlichen Beschichtungsprozeß wurden die Substrate mit einer reinen Titanschicht versehen, die als Haftgrundlage für die  $\text{TiO}_2$ -Schicht diente. Für die Titanbeschichtung wurde reines Argon als Prozeßgas bei einem Gasfluß von 180 sccm eingesetzt und als Target diente eine Ti-Scheibe (Reinheit > 99.9%, Durchmesser: 13 cm). Die Beschichtung erfolgte bei einem Arbeitsdruck von  $7,4 \cdot 10^{-3}$  mbar und einer effektiven Leistung von 250 W. Die Beschichtungszeit betrug 30 min. Die anschließende Beschichtung der Proben mit  $\text{TiO}_2$  erfolgte auf analoge Weise wie die Beschichtung mit reinem Titan, jedoch wurde dem Argongas Sauerstoff beigemischt (Flußrate  $\text{Ar}/\text{O}_2$ : 100/20 sccm; Arbeitsdruck:  $6,3 \cdot 10^{-3}$  mbar), wodurch sich das vom Target „abgesputterte“ Titan in der Gasphase zu  $\text{TiO}_2$  umwandelte (reaktives Sputtern), bevor es auf der Substrate abgeschieden

wurde. Desweiteren wird auch diskutiert, ob sich das „abgesputterte“ Titan erst niederschlägt und dann auf der Substratoberfläche oxidiert wird. Die Beschichtungszeit betrug 4 h.

### 7.2.5 *TiO<sub>2</sub>-Schichten über den Sol-Gel-Prozeß*

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 16.9 g (50.0 mmol) Tetra-*n*-butoxytitanat in 122 g (1.64 mol) *n*-Butanol gelöst. Mit diesem Sol wurden die polierten cp-Titanplättchen über den Spin-Coating Prozeß (Spin-coater „Magnetic Stirrer HI 303N“ der Firma Hanna Instruments, 7200 U/min) mit jeweils 100 µl Sol beschichtet. Die modifizierten Substrate wurden im Anschluß daran 1 h bei Raumtemperatur und danach 1 h bei 500 °C kalziniert.

### 7.2.6 *Funktionalisierung der TiO<sub>2</sub>-Oberflächen mit Haftvermittlern*

Jeweils ein über die verschiedenen Verfahren (PVD, Thermisch/Anodische Oxidation und Sol-Gel Prozeß) oxidiertes Ti-Plättchen wurde über den Spin-Coating Prozeß mit dem jeweiligen Haftvermittler modifiziert. Hierzu wurden je 2 ml APMS (11.3 mmol) bzw. 2,46 ml Diamino-APMS (11.3 mmol) bzw. 2,91 ml Triamino-APMS (11.3 mmol) unter Argon in 10 ml wasserfreies Toluol gegeben und die verschiedenen Substrate bei 7200 U/min mit jeweils 100 µl Reaktionsansatz über den Sin-Coating Prozeß beschichtet.

## 7.3 **Kovalente Immobilisierung von Heparin**

### 7.3.1 *Eigenschaften des TiO<sub>2</sub>-Pulvers (Anatas)*

Als Modell der oxidierten Titanobfläche wurden Titanoxid-Pulver verwendet, deren Partikelgröße mithilfe eines Partikelsizers und deren Modifikation durch Röntgenbeugung (XRD) bestimmt wurde. Die Anzahl an OH-Gruppen pro Flächeneinheit wurde titrimetrisch ermittelt.<sup>[103]</sup> Hierzu wurden 5 bzw. 10 g TiO<sub>2</sub>-Pulver (Anatas) in je 40 ml wasserfreiem *n*-Heptan suspendiert (Ultraschall, 3 min) und mit einem Überschuß von 10 ml 0.9 M AlEt<sub>3</sub>-Lösung (15% AlEt<sub>3</sub> in Hexan) versetzt, woraufhin die Versuchsanordnung sofort luftdicht verschlossen wurde. Das durch die Reaktion entstandene Ethangas wurde zur Volumenbestimmung über einen Schlauch in einen mit Wasser gefüllten Meßzylinder geleitet. Nach ca. 5 min war die Umsetzung nahezu quantitativ.

### 7.3.2 *Funktionalisierung von TiO<sub>2</sub>-Pulver mit APMS, Di- und Triamino-APMS*

Die Modifizierung des TiO<sub>2</sub>-Pulvers (Anatas) erfolgte unter Variation einer veröffentlichten Präparationsvorschrift.<sup>[124]</sup> Es wurden jeweils 2.00 g TiO<sub>2</sub> (25.0 mmol) und 2.00 ml APMS (11.3 mmol) bzw. 2.46 ml Diamino-APMS (11.3 mmol) bzw. 2.91 ml Triamino-APMS (11.3 mmol) unter Argon in 50 ml wasserfreies Toluol gegeben. Die Suspensionen wurden anschliessend für 2 h mit Ultraschall (35 kHz, Sonorex RK 102, Fa. Bandelin, Berlin) behandelt. Danach wurde die funktionalisierten Titandioxide über eine G4-Fritte abgetrennt, mit Toluol gewaschen und für 2 h mit Ethylacetat im Soxhlet-Extraktor gereinigt. Die Trocknung der Proben erfolgte im Vakuum bei Raumtemperatur.

### 7.3.3 *Immobilisierung von Heparin mit EDC & NHS*

Jeweils 500 mg der funktionalisierten Titandioxide wurden in 50 ml MES-Puffer (50 mM, 40% (v/v) Ethanol/Wasser, pH = 5.5) gegeben und 15 min gerührt. Zu den Suspensionen wurden anschliessend 95.0 mg EDC (0.50 mmol), 12.0 mg NHS (0.10 mmol) und 100 mg Heparin (~5.60 µmol) gegeben. Die Reaktionsmischungen wurden 6 h bei Raumtemperatur gerührt und der Feststoff anschließend durch Zentrifugieren abgetrennt. Die Produkte wurden je dreimal mit wässriger Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung (0.10 M), NaCl-Lösung (2.00 M) und entmineralisiertem Wasser gewaschen und im Vakuum bei 40 °C über Nacht getrocknet.

### 7.3.4 *Hydrolysestabilität des gebundenen Heparins*

Jeweils fünf Proben mit je 250 mg der über APMS, Di- und Triamino-APMS mit Heparin funktionalisierten Pulver wurden in Glasfläschchen gegeben und anschließend in 5 ml PBS-Pufferlösung (8.00 g (137 mmol) NaCl, 0.20 g (2.68 mmol) KCl, 1.11 g (9.10 mmol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0.20 g (1.47 mmol) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> gelöst in 1 l H<sub>2</sub>O; pH = 7.4) suspendiert (Ultraschall, 3 min). Die Gläschen wurden daraufhin mit einem Gummistopfen verschlossen und in einen Brutschrank (37 °C) auf einen Schüttler gestellt (70 Schüttlungen pro Minute). Zu den entsprechenden Zeiten (s. Abb. 4.5) wurde je eine Probe der mit den verschiedenen Haftvermittlern modifizierten Pulver entnommen, das Pulver abzentrifugiert, getrocknet und die Menge des an dem Pulver verbliebenen Heparin wie in Kapitel 7.6 photometrisch bestimmt.

### 7.3.5 Übertragbarkeit der Heparinisierung von Pulvern auf plane Oberflächen

Der Nachweis der Heparinisierung planer Oberflächen erfolgte, indem transparente Polystyrol-Substrate funktionalisiert wurden. Hierzu wurden je 2.00 ml APMS (11.3 mmol) bzw. 2.46 ml Diamino-APMS (11.3 mmol) bzw. 2.91 ml Triamino-APMS (11.3 mmol) unter Argon in 10 ml wasserfreies Toluol gegeben und die Styrolsubstrate je 1 min in die verschiedenen Lösungen eingetaucht (Dip-Coating). Nach anschließender Trocknung (24 h bei Raumtemperatur) wurden die mit Haftvermittler modifizierten Substrate mit Heparin funktionalisiert. Dies erfolgte analog den Pulvern (Kapitel 7.3.3), jedoch wurden die Substrate für die jeweiligen Zeiträume in die entsprechenden Reaktionslösungen eingetaucht. Im Anschluß daran wurden die heparinisierten Substrate für jeweils 30 s in eine 1.0%-Lösung Toluidinblau (gelöst in 0.01 N HCl mit 0.2% NaCl) eingetaucht, danach mit reichlich 0.2% NaCl-Lösung gespült und bei  $\lambda = 631$  nm optisch (UV-VIS) in Transmission vermessen.

### 7.3.6 QCM-D Messungen

Für die QCM-D Messungen wurden 5 MHz AT-cut Schwingquarzkristalle mit Gold-elektroden an Unter- und Oberseite (Fa. Q-Sense, Göteborg, Schweden) als Substrate verwendet. Die Adsorption von Fibrinogen auf den entsprechend modifizierten Oberflächen erfolgte in Echtzeit mithilfe einer QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring) der Firma Q-Sense, D300, Schweden. Die Messwertaufnahmen und -darstellungen der Messparameter  $\Delta f$  und  $\Delta D$  erfolgten mit der Software QSoft 301, die Auswertungen mit der Software QTools 301 (beide Fa. Q-Sense, Göteborg, Schweden). Die gekauften Kristalle wurden 5 min mit einer Lösung aus  $\text{H}_2\text{O} : \text{NH}_3(25\%) : \text{H}_2\text{O}_2(30\%)$  im Volumenverhältnis 5 : 1 : 1 bei 75 °C behandelt, um eventuelle Unreinheiten von der Oberfläche zu entfernen. Anschließend wurden sie mit Ethanol und  $\text{H}_2\text{O}$  gespült und unter einem  $\text{N}_2$ -Strom getrocknet.

Die Modifizierung der Quartz Kristalle erfolgte in drei Stufen. Zuerst wurde über über die PVD (s. Kapitel 7.2.4) eine ca. 100 nm dicke  $\text{TiO}_2$ -Schicht aufgetragen,<sup>[125]</sup> gefolgt von der Funktionalisierung mit den Haftvermittlern (APMS, Di- und Triamino-APMS) und Heparin. Die Modifizierung der Kristalle mit Haftvermittler bzw. Heparin erfolgte analog der der Pulver (s. Kapitel 7.3.2 & 7.3.3), nur dass die Quartz Kristalle über eine spezielle Teflon-Halterung in die verschiedenen gerührten Lösungen eingetaucht wurden und kein Ultraschall bzw. Soxleth-Extraktor angewendet wurde. Nachdem die Funktionalisierung mit den Haftvermittler

abgeschlossen war, wurden die Kristalle mit Toluol, Ethanol und H<sub>2</sub>O gespült, wohingegen die Substrate nach der Modifizierung mit Heparin mit 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 M NaCl, Ethanol und H<sub>2</sub>O gespült und abschliessend im N<sub>2</sub>-Strom getrocknet wurden. Für die Messungen wurde der Quarzkristall in der Messzelle montiert. Nach dem Befüllen der Messzelle mit PBS-Puffer wurde gewartet bis sich die Werte für  $\Delta f$  und  $\Delta D$  und die Temperatur auf 20.0 °C stabilisiert hatten. Daraufhin wurden 5 ml in PBS-Puffer gelöstes Fibrinogen (50.0  $\mu\text{g}$  Fibrinogen/ml PBS) bei Raumtemperatur in die Messzelle eingefüllt. Am Ende der Messung (ca. 5 h; bis zur Sättigung) wurde nochmal mit PBS gespült, um eine mögliche Desorption des Proteins festzustellen. Die adsorbierte Gesamtmasse an Fibrinogen (bei jeweiliger Sättigung) auf den über die verschiedenen Haftvermittler heparinisierten Quartz-Kristalle konnte über die Sauerbrey-Gleichung (Formel 2.3 mit  $n = 3$  und  $C = 17.7 \text{ ng cm}^{-2}\text{Hz}^{-1}$ )<sup>[126]</sup> berechnet werden, da sich die Resonanz-Frequenz  $\Delta f$  proportional zu der adsorbierten Masse  $\Delta m$  verhält. Die Dissipation bei der jeweiligen Frequenz wurde vom Gerät direkt angezeigt.

## 7.4 Nanoporöse Wirkstoffdepots

### 7.4.1 Herstellung von nanoporösen Hybrid-Wirkstoffdepots (P-MA-PS)

Die organischen/anorganischen Wirkstoffdepots wurden in einer zweistufigen Synthese hergestellt, ausgehend vom Precursor Methacryloxypropyltrimethoxysilan (MAS). Zuerst wurde die Trimethoxysilyl-Gruppe über den Sol-Gel-Prozeß anorganisch kondensiert (MA-PS), danach folgte die photoinitierte radikalische Polymerisation der Methacrylat-Funktion (P-MA-PS). Der Sol-Gel-Prozeß wurde unter Ausschluß von Feuchtigkeit unter Argonatmosphäre durchgeführt. Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine bekannte Literaturvorschrift.<sup>[74,75]</sup> In einen 50 ml-Kolben wurden 3.3 ml Methanol, 9.62 ml (40.3 mmol) MAS und 432  $\mu\text{l}$  (24.0 mmol) H<sub>2</sub>O vorgelegt, mithilfe eines Eisbads auf 0 °C vorgekühlt und anschließend langsam unter Entfernung der Kühlquelle mit 420  $\mu\text{l}$  (4.20 mmol) konzentrierter Salzsäure (HCl, 32%) versetzt, woraufhin sich die Lösung unter Erwärmung langsam von hellgelb nach klar färbte. Das molare Verhältnis des Sols MAS : CH<sub>3</sub>OH : HCl : H<sub>2</sub>O betrug 1 : 2 : 0.1 : 0.6. Danach wurde das Reaktionsgemisch noch 2 h zum Sieden erhitzt und daraufhin auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Im Anschluß daran wurden dem Reaktionsgemisch 0.45 g (2.00 mmol) Benzoinmethylether (UV-Initiator) zugesetzt und die so erhaltene Lösung gut vermischt. Von dieser Lösung wurden jeweils 3.5

ml-Portionen in separate Gefäße gegeben und mit 1.5 ml Methanol verdünnt. Zu diesen Ansätzen wurden jeweils 50, 100 oder 150 mg Heparin gegeben, was einer Wirkstoffmenge von 1.7-5.0wt% im Sol (bzw. 2.7-8.0wt% im getrockneten Xerogel) entsprach. Nach guter Durchmischung wurden die Reaktionsgemische in Plastik-Formen mit einem Durchmesser von 5 cm gegossen und 3 d bei 20 °C getrocknet. Um die so generierten wirkstoffbeladenen MA-PS-Volumenwerkstoffe im Anschluß daran organisch zu polymerisieren, wurden sie für 1 oder 15 min UV-Licht ausgesetzt (150 W XBO Xenonkurzbogenlampe der Fa. Osram, ofr (engl.: ozone-free), 200-1100 nm, Betriebsdruck: 2 bar).

#### 7.4.2 Ermittlung des Polymerisationsgrades

Um den Polymerisationsgrad der Materialien zu bestimmen, wurden FT-RAMAN-Spektren der ausgehärteten und an der Luft getrockneten Xerogele aufgenommen. Als Vergleich dienten Spektren der nicht polymerisierten Substanzen. Zur quantitativen Auswertung wurden die Flächen der Peaks der methacrylischen C=C-Bindung bei 1635 cm<sup>-1</sup> herangezogen, als Referenz die Fläche der aromatischen C=C-Bindung des UV-Initiators Benzoinmethylether bei 1605 cm<sup>-1</sup>. Die Ermittlung der Flächen der einzelnen Peaks erfolgte durch Anpassen einer Gauß-Funktion. Der Polymerisationsgrad der Doppelbindungen errechnet sich nach Formel 7.1:

$$\text{Polymerisationsgrad} = \left( 1 - \frac{C = C_{\text{Polymer}}}{C = C_{\text{Edukt}}} \right) \times 100 [\%] \quad \text{Formel 7.1}$$

$C = C_{\text{Edukt}}$  = Anzahl der Doppelbindungen im Edukt,  $C = C_{\text{Polymer}}$  = Anzahl der Doppelbindungen im Polymer

Unter Verwendung der Flächen der methacrylischen Doppelbindung  $A_{\text{Methacryl}}$  und der aromatischen Doppelbindung  $A_{\text{Aromat}}$  aus den Edukten und den polymeren Verbindungen ergibt sich nach Formel 7.4 der Polymerisationsgrad:

$$C = C_{\text{Edukt}} = \frac{A_{\text{Methacryl}}^{\text{Edukt}}}{A_{\text{Aromat}}^{\text{Edukt}}} \quad \text{Formel 7.2} \quad \& \quad C = C_{\text{Polymer}} = \frac{A_{\text{Methacryl}}^{\text{Polymer}}}{A_{\text{Aromat}}^{\text{Polymer}}} \quad \text{Formel 7.3}$$

$$\text{Polymerisationsgrad} = \left( 1 - \frac{A_{\text{Methacryl}}^{\text{Polymer}} \times A_{\text{Aromat}}^{\text{Edukt}}}{A_{\text{Aromat}}^{\text{Polymer}} \times A_{\text{Methacryl}}^{\text{Edukt}}} \right) \times 100 [\%] \quad \text{Formel 7.4}$$

### 7.4.3 Porosität der Matrix

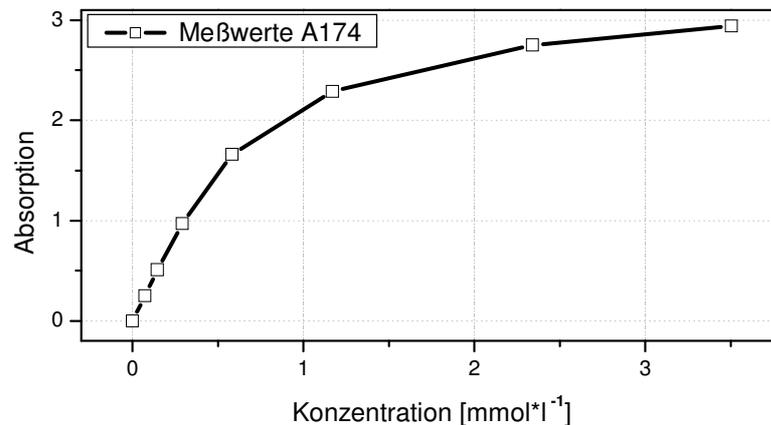
Für die Herstellung der Probenkörper wurden jeweils 0.50 ml des Sol-Gel Ansatz (s. Kapitel 7.4.1) in Plastikformen gegossen ( $r = 6.10$  mm,  $h = \text{ca. } 3$  mm) und diese anschließend 24 h bei RT und daraufhin weitere 24 h bei  $60$  °C getrocknet. Die Polymerisation der Proben erfolgte ebenfalls wie bereits beschrieben. Im Anschluß daran wurden die Proben für 24 h in jeweils 10 ml Ethanol eingelegt und nach der Entnahme direkt gewogen.

### 7.4.4 Kumulative Heparin-Freisetzung

Um die Menge an Heparin zu bestimmen, die aus den hergestellten nanoporösen Wirkstoffdepot-Volumenwerkstoffen (Kapitel 7.4.1) ausdiffundiert, wurden diese jeweils in 500 ml Glaskolben mit Glasverschluß in 250 ml SBF bei  $37$  °C ausgelaugt. Von den Proben, die mit 50 mg Heparin beladen waren, wurde jeweils 1.00 ml, von den mit 100 mg je 0.50 ml und von denen mit 150 mg je 0.33 ml der Laugenflüssigkeit zu den entsprechenden Zeiten entnommen und über den Toluidinblautest die Menge an Wirkstoff quantifiziert. Hierzu wurden die jeweiligen Volumina an Heparin enthaltender Lauge mit NaCl (0.2%) auf ein Gesamtvolumen von 2.5 ml aufgefüllt und daraufhin ebenso wie bei der Kalibrierung des Heparinstandards in Kapitel 7.6 verfahren.

### 7.4.5 Degradation der Matrix

Die Bestimmung der Degradation der Matrix erfolgte anhand selbiger Proben wie die Quantifizierung der Heparin-Freisetzung in Kapitel 7.4.4. Die Degradation konnte UV-VIS-spektroskopisch über die Absorption der C=C-Doppelbindung des Precursors Methacryloxypropyltrimethoxysilan in der Lauge direkt verfolgt werden. Hierzu wurde den unterschiedlich mit Wirkstoff beladenen und polymerisierten Proben zu den entsprechenden Zeitpunkten jeweils ein Volumen von 3,8 ml der Lauge entnommen. Dieses konnte ohne weitere Verdünnung photometrisch direkt bei  $\lambda = 220$  nm vermessen und anschließend der Lauge wieder zurückgeführt werden. Um die so erhaltenen Absorptionswerte mit Konzentrationen korrelieren zu können, wurden Kalibrierungslösungen bekannter Konzentrationen (0, 0.07, 0.14, 0.29, 0.58, 1.17, 2.33, 3.50 mmol/l) aufgenommen (s. Abb. 7.1).



**Abb. 7.1:** Kalibrierungskurve für verschiedene Konzentrationen von A174, aufgetragen gegen die Absorption bei  $\lambda = 220 \text{ nm}$

#### 7.4.6 Herstellung dünner Schichten auf Al-/TiO<sub>2</sub>-Folie

Titan- ( $2.5 \times 2.5 \text{ cm}$ ,  $d = 25 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $\text{Ti} > 99.6\%$ , Fa. Goodfellow Metals, Cambridge) bzw. Aluminiumfolie ( $2.5 \times 2.5 \text{ cm}$ ,  $d = 15 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $\text{Al} > 98.0\%$ , Fa. Melitta, Minden) wurden mit 5%iger EXTRAN-Lösung je 10 min im Ultraschallbad gereinigt und danach dreimal je 10 min mit bidestilliertem Wasser abgespült. Anschließend wurden die Folien auf ein Titanplättchen geklebt, mit jeweils 100  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz bzw. mit Verdünnungen des Ansatzes mit Aceton (Verdünnungsgrade = 0, 0.5, 1, 2, 3, 4; Aceton/Sol-Gel-Reaktionsansatz Vol.-%/Vol.-%) über den Spin-Coating Prozeß beschichtet (Spin-coater „Magnetic Stirrer HI 303N“ der Firma Hanna Instruments, 7200 U/min) und nach dem Trocknen in zwei ungefähr gleichgroße Teile „zerrissen“. Die so entstandene Abrisskante wurde mittels REM vermessen, wodurch die Schichtdicke direkt abgebildet werden konnte.

## 7.5 Ninhydrinreaktion

Um die Menge an immobilisierten primären Aminogruppen photometrisch zu bestimmen wurde die Ninhydrinreaktion durchgeführt.

### *Herstellung der benötigten Reagenzien*

Die folgenden für die Reaktion benötigten Reagenzien wurden in Anlehnung an die von Moore und Stein veröffentlichte Synthesvorschrift hergestellt.<sup>[50]</sup>

#### *a) Synthese von Hydrindantin*

1.50 g Ninhydrin (8.42 mmol) wurden in 38 ml destilliertem H<sub>2</sub>O gelöst und die so erhaltene gelbe Lösung wurde auf 90 °C erwärmt. Zu der Lösung wurde eine 40 °C warme Lösung von 1.50 g Ascorbinsäure (8.52 mmol) in 7.5 ml H<sub>2</sub>O gegeben. Die Heizquelle wurde entfernt woraufhin die Kristallisation des Hydrindantins unverzüglich einsetzte. Sie wurde über Nacht bei 7 °C vervollständigt. Die weißen Kristalle wurden abfiltriert und mit reichlich H<sub>2</sub>O gewaschen. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Hydrindantins wurde das Produkt im Dunkeln aufbewahrt und im Trockenschrank bei 80 °C getrocknet.

#### *b) 4 M Lithiumacetatpuffer (pH 5.2)*

41.9 g LiOH × H<sub>2</sub>O (0.10 mol) wurden in 100 ml H<sub>2</sub>O unter Rühren etwa zur Hälfte gelöst. Durch Zugabe von 73 ml Eisessig (1.27 mol) erwärmte sich die Lösung, was zu vollständigem Lösen des LiOH führte. Die Lösung wurde mit H<sub>2</sub>O auf fast 250 ml aufgefüllt und mit Essigsäure ein pH von 5.2 eingestellt. Anschließend wurde sie mit H<sub>2</sub>O auf das Endvolumen von 250 ml gebracht und der pH-Wert wurde nachgeprüft.

#### *c) Zitronensäurepuffer (pH 5.0)*

4.27 g Zitronensäure (22.2 mmol) und 1.78 g NaOH (44.5 mmol) wurden in 100 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Mit 10 N NaOH wurde ein pH von 5.0 eingestellt.

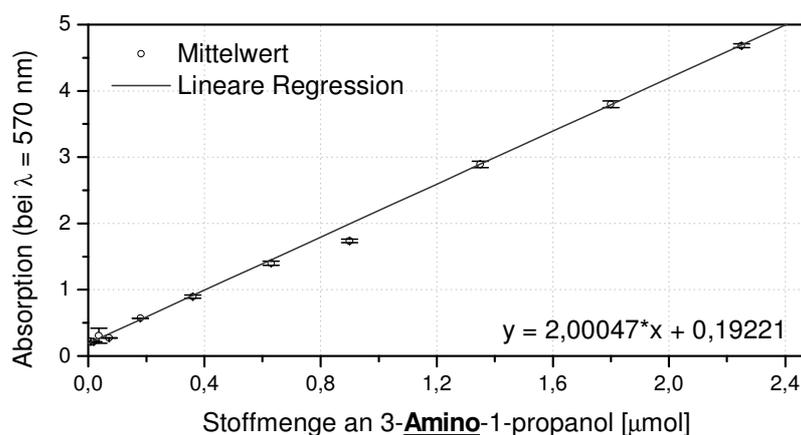
#### *d) Ninhydrinreagenz*

In 37.5 ml DMSO wurden unter Argonatmosphäre unter starkem Rühren 1.00 g Ninhydrin (5.61 mmol) und anschließend 0.15 g Hydrindantin (0.47 mmol) gelöst. Zu der orange-gelben Lösung wurden 12.5 ml 4 M Lithiumacetatpuffer (pH 5.2) gegeben, worauf eine sofortige

Violettfärbung eintrat. Das Ninhydrinreagenz wurde schließlich noch 30 min mit Argon gespült und lichtgeschützt unter Argon bei 7-10 °C gelagert.

#### Der Ninhydrintest

Zur photometrisch Bestimmung der Konzentration an immobilisierten Aminogruppen gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz wurde zunächst eine Kalibrierungsgerade erstellt. Dafür wurden Standardlösungen unterschiedlicher Konzentration an 3-Amino-1-propanol mit Werten von 0, 10, 20, 40, 80, 200, 400, 700, 1000, 1500, 2000 und 2500  $\mu\text{M/L}$  verwendet. Für die Ninhydrinreaktion wurde je 0.9 ml der Kalibrierungslösungen (Abb. 7.2) bzw. eine Suspension aus je 0.9 ml bidestilliertem Wasser mit jeweils verschiedenen Mengen des mit APMS (2.36, 3.36, 5.91, 10.3, 14.3 mg), Diamino-APMS (1.82, 4.94, 11.0, 14.8, 22.2 mg), Triamino-APMS (3.70, 5.29, 6.00, 11.1, 30.3 mg) funktionalisierten  $\text{TiO}_2$ -Pulvers bzw. je 0.9 ml bidestilliertes Wasser und ein mit dem entsprechenden Haftvermittler modifiziertes cp-Titanplättchen in 10 ml Glasröhrchen eingefüllt.



**Abb. 7.2:** Kalibrierungsgerade für die quantitative Bestimmung primärer Aminogruppen. Jeder Meßpunkt stellt den Mittelwert aus drei Werten dar, die Fehlerbalken sind Standardabweichungen

Zu den Messsubstanzen wurden je 2.1 ml Zitronensäurepuffer und 1.5 ml Ninhydrinreagenz gegeben und die Röhrchen wurden sorgfältig mit Alufolie verschlossen. Anschließend wurden die Proben 25 min im 100 °C heißen Ölbad erhitzt, wobei sich die Farbe der Lösung abhängig von der Konzentration an Aminogruppen von hellbraun (niedrige Konzentration) bis dunkel violett (hohe Konzentration) änderte. Danach wurden die Proben durch Zugabe von 5.5 ml einer Lösung  $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$  (Volumenverhältnis 1:1) gekühlt, luftdicht verschraubt, zum Schutz vor Licht mit Alufolie umwickelt und 1 min. geschüttelt, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten. Nachdem sich die Probenlösungen abgekühlt hatten wurden sie innerhalb von

1 h nach dem Erwärmen am UV-VIS-Spektrometer (Cary-1, Fa. Varian) bei einer Wellenlänge von 570 nm vermessen.

## 7.6 Toluidinblautest

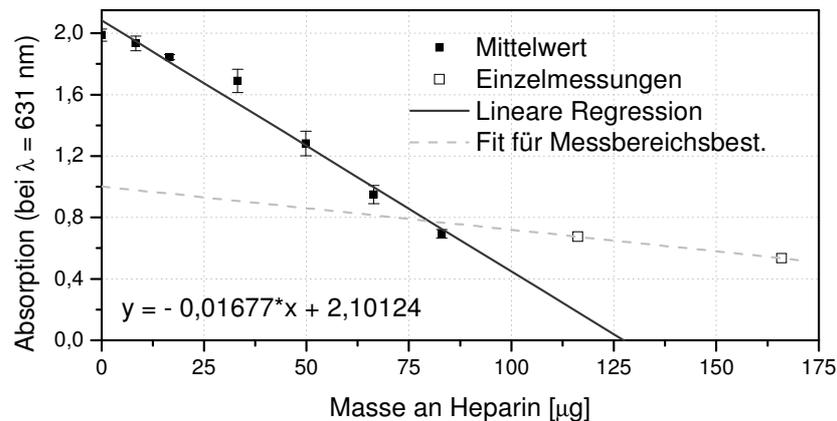
Um die Menge an immobilisiertem Heparin photometrisch zu bestimmen wurden folgende Reagenzien benötigt:<sup>[127]</sup>

- a) Heparin Standard (0.166‰)  
aus 16.6 mg Heparin in 100 ml 0.2% NaCl-Lösung
- b) *o*-Toluidinblaulösung (0.05‰)  
aus 12.5 mg Toluidinblau in 250 ml HCl (0.01 N) mit 0.2% NaCl
- c) 0.2% NaCl
- d) *n*-Hexan

Für die Erstellung der Eichgeraden wurden in 15 ml Glasröhrchen unterschiedliche Mengen des Heparin Standards gegeben, die einer Menge von 10-70 µg (0, 8.30, 16.6, 33.2, 49.8, 66.4, 83.0, 116, 166 µg) Heparin entsprachen. Sämtliche Röhrchen wurden mit 0.2%iger NaCl auf ein Gesamtvolumen von 2.5 ml aufgefüllt. Dann wurden in jedes Röhrchen jeweils 2.5 ml der vorbereiteten *o*-Toluidinblaulösung gegeben und die Lösungen wurden 30 s geschüttelt. Um den Heparin-Farbstoffkomplex abzutrennen wurden in jedes Röhrchen 5 ml *n*-Hexan gefüllt und es wurde wiederum 30 s stark geschüttelt. Direkt danach wurde die Extinktion der abgetrennten wässrigen Phase beim Absorptionsmaximum von 631 nm UV-VIS-spektrometrisch bestimmt. Die lineare Beziehung zwischen der Extinktion des *o*-Toluidinblaus bei 631 nm und der Menge an eingesetztem Heparin wurde verwendet, um eine Kalibrierungsgerade zu erstellen (Abb. 7.3).

Um das am TiO<sub>2</sub> immobilisierte Heparin quantitativ zu bestimmen wurden unterschiedliche Mengen der entsprechend funktionalisierten TiO<sub>2</sub>-Pulver in Glasröhrchen gefüllt. Von dem über APMS gebundenen Heparin wurden 13.4, 21.9, 23.7, 40.8 mg, von dem über Diamino-APMS gebundenen wurden 10.2, 19.6, 21.1, 39.8 mg und von dem über Triamino-APMS gebundenen wurden 13.0, 23.5, 23.8, 48.4 mg des jeweilig funktionalisierten TiO<sub>2</sub>-Pulvers verwendet. Zu den Pulvern wurden jeweils 2.5 ml der 2%igen NaCl-Lösung gegeben und die

Suspensionen wurden 3 min ins Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurden je 2.5 ml der *o*-Toluidinblaulösung zu den Suspensionen zugegeben. Um eine vollständige Komplexbildung zu gewährleisten wurden die Reaktionsmischungen 1 h bei RT stengelassen. Dann wurden je 5 ml *n*-Hexan in die Röhrchen gefüllt und 30 s geschüttelt. Nach Abtrennung der wässrigen Phase durch einen Spritzenfilter (0.2 µm, Celluloseacetat der Fa. Schleicher & Schuell, FP 30/0.2 CA-S, Rotrand) wurde die Absorption des in Lösung verbleibenden Toluidinblaus bei einer Wellenlänge von 631 nm gemessen und mit Hilfe der Kalibrierungsgerade die Menge an immobilisiertem Heparin bestimmt.



**Abb. 7.3:** Kalibrierungsgerade für die Quantifizierung von Heparin. Verschiedene Massen an eingesetztem Heparin sind gegen die Absorption (UV-VIS) des in Lösung verbleibenden *o*-Toluidinblaus aufgetragen. Die Meßpunkte mit Fehlerbalken (Standardabweichung) bilden den Mittelwert aus jeweils drei Messungen, die anderen Meßpunkte sind Einzelwerte, die dargestellt sind, um die obere Grenze des Meßbereiches zu veranschaulichen

## 7.7 Bestimmung der Wirksamkeit von Heparin

Um die Wirksamkeit von Heparin photometrisch zu bestimmen, wurde die Methode über das chromogene Substrat Chromogen TH<sup>®</sup> herangezogen.

### *Herstellung der benötigten Reagenzien*

Die folgenden für die Reaktion benötigten Reagenzien wurden in Anlehnung an die von Larsen et al. veröffentlichte Synthesvorschrift hergestellt.<sup>[38]</sup>

*a) Puffer-Lösung*

In 250 ml bidestilliertem Wasser wurden 6.06 g (50.0 mmol) TRIS (= Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) gelöst (0.2 M). Zu dieser Lösung wurden 20 ml HCl (0.1 N), 30 ml K<sub>2</sub>EDTA (0.25 M) und 700 ml 0.26 M NaCl gegeben. Der pH-Wert der Lösung wurde durch die Zugabe von konz. HCl (ca.10 N) von 9.4 auf den gewünschten Wert von 8.4 eingestellt.

*b) Antithrombin III-(AT-III)-Lösung*

Zu 50 Units (1 Ampulle) AT-III wurden erst 1 ml H<sub>2</sub>O und anschließend 2 ml Pufferlösung gegeben. Die insgesamt 3 ml Stammlösung wurden zu je 1 ml (17 U/ml) portioniert und aufgrund der hohen Temperaturempfindlichkeit eingefroren und erst kurz vor Gebrauch auftauen gelassen. Zu dem jeweils 1 ml Stammlösung wurden dann noch 16 ml Pufferlösung gegeben um eine Arbeitslösung mit einer Konzentration von 1 U/ml zu erhalten.

*c) Thrombin-Lösung*

100 U (1 Ampulle) wurden in 3 ml NaCl (0.15 M) gelöst, woraus eine Stammlösung mit 33 U/ml resultierte. Diese wurde zu je 1 ml portioniert und aufgrund der hohen Temperaturempfindlichkeit sofort bei -20 °C eingefroren (maximal 3 Monate lagerbar). Die Stammlösungen wurden durch Zugabe von je 3.15 ml NaCl (0.15 M) zu Arbeitslösungen mit 8 U/ml verdünnt, die auf Eis gelagert innerhalb von 1 h umgesetzt wurden.

*d) Chromozym TH<sup>®</sup>-Lösung*

20.0 mg (30.2 µmol) Chromozym TH<sup>®</sup> wurden in 40 ml Wasser gelöst woraus eine 0.75 mM Arbeitslösung resultierte, die bei 4 °C im Dunkeln für maximal 3 Wochen gelagert werden kann.

*e) Heparin-Standard*

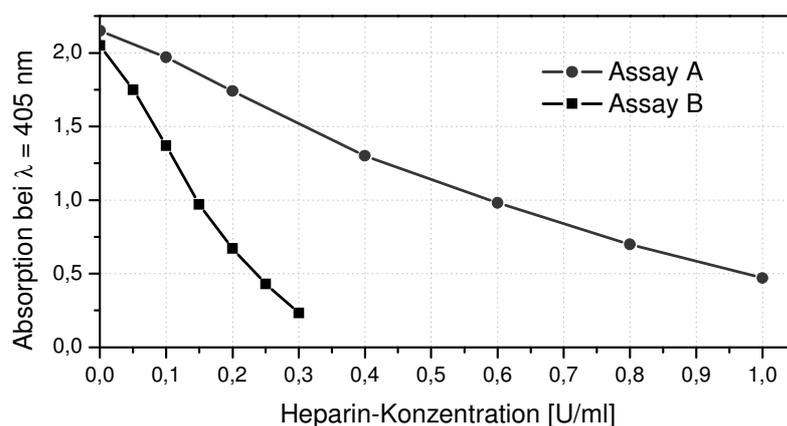
10 mg Heparin (173 U/mg) wurden in 1.73 l NaCl (0.15 M) gelöst, woraus eine Stammlösung mit 1 U/ml resultierte. Diese wurde zur Erstellung der Eichgeraden mit 0.15 M NaCl-Lösung verdünnt, um Konzentrationen von 0.01-0.3 und 0.2-1.0 U/ml für die beiden Kalibrierungsgeraden zu erhalten.

*Herstellung der Assays A und B*

Für den Fall niedriger Konzentration bzw. Aktivität von Heparin (0.01-0.30 U/ml) und höherer (0.2-1.0 U/ml) wurden zwei verschiedene Assays A & B verwendet.

*Assay A) Heparin-Aktivität 0.2-1.0 U/ml*

Für die Kalibrierungsgerade wurden jeweils 20 µl des Heparinstandards unterschiedlicher Konzentration (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 und 1,0 U/ml), 200 µl AT-III-Lösung und 800 µl Pufferlösung in ein Glasröhrchen gegeben, vermischt und anschließend 2-6 min in einem 37 °C warmen Wasserbad vorgewärmt. *Phase 1* wird durch die Zugabe von 500 µl Thrombin zu der Lösung gestartet. Nach exakt 30 s wird *Phase 2* durch die Zugabe von 1.00 ml chromogenen Substrats in die Reaktionslösung initiiert. Exakt weitere 60 s später (90 s nach dem Start von Phase 1) wird die Amidolyse des Substrats zum Farbstoff durch die Zugabe von 1,50 ml konzentrierte Essigsäure (Eisessig) in die Reaktionslösung gestoppt, wobei eine gute Durchmischung gewährleistet sein muß. Die Absorption des Farbstoffs kann spektrophotometrisch gegen destilliertes Wasser in Makro-Küvetten bei einer Wellenlänge von 405 nm vermessen werden. Der Mittelwert aus je zwei parallelen Messungen wurde für die Kalibrierungsgerade herangezogen (Abb. 7.4). Um die Wirksamkeit des an die Pulver über die jeweiligen Haftvermittler immobilisierten Heparins zu bestimmen wurden je 3.8, 4.1 mg (APMS), 4.8, 5.2 mg (Diamino-APMS) und 4.7, 5.2 mg (Triamino-APMS) der Pulver in 1 ml NaCl (0.15 M) suspendiert und 3 min mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden je 20 µl der Suspensionen abpipettiert und so wie bei der Kalibrierung des Heparinstandards (Assays A) verfahren.



**Abb. 7.4:** Kalibrierungen für die Assays A & B

*Assay B) Heparin-Aktivität 0.01-0.30 U/ml*

Für die Kalibrierungsgerade wurden jeweils 100 µl des Heparinstandards unterschiedlicher Konzentration (0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 und 0.3 U/ml), 100 µl AT-III-Lösung und 800 µl Pufferlösung in ein Glasröhrchen gegeben und dann wie unter Assay A beschrieben

fortgefahren. Um die Wirksamkeit des aus den unterschiedlich polymerisierten und wirkstoffbeladenen Depots ausdiffundierten Heparins zu bestimmen, wurde nach 72 h von den mit 50 mg Wirkstoff beladenen und unterschiedlich polymerisierten Proben (0, 36 & 71%) jeweils 100 µl der Lauge entnommen und mit 0.15 M NaCl-Lösung auf ein Gesamtvolumen von je 1.11 ml aufgefüllt. Von den mit 100 mg Heparin beladenen und verschieden polymerisierten Proben (0, 36 & 71%) wurden nach 76 h jeweils 100 µl Lauge entnommen und auf ein Gesamtvolumen von je 2.22 ml aufgefüllt. Von den mit 150 mg Wirkstoff beladenen und verschieden polymerisierten (0, 36 & 71%) Proben wurde nach 76 h je 100 µl Lauge entnommen und auf ein Gesamtvolumen von je 3.33 ml aufgefüllt. Von den auf diese Weise erhaltenen 9 verschiedenen Proben wurden jeweils 100 µl entnommen und wie bei der Kalibrierung des Heparinstandards (Assay B) vorgefahren.

## 8 Charakterisierung

### 8.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Für die entsprechenden Abbildungen wurde ein Rasterelektronenmikroskop DSM 940 (Fa. Zeiss, Oberkochen) bei 10 kV Anodenspannung und variabler Vergrößerung verwendet. Die nicht leitenden zu mikroskopierenden Substrate wurde für die REM Aufnahmen mit Gold bedampft.

### 8.2 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Topographie/Rauigkeit der unterschiedlich funktionalisierten cp-Titanplättchen wurden durch rasterkraftmikroskopische Messungen bestimmt. Es wurde ein AFM AutoProbe<sup>®</sup>CP der Fa. Park Scientific Instruments verwendet und die Messungen wurden im Kontakt-Modus durchgeführt. Der vermessene Oberflächenausschnitt hatte eine Seitenlänge von 1  $\mu\text{m}$ .

### 8.3 Particle Sizer

Zur Partikelgrößenanalyse im Bereich von 0,1-600  $\mu\text{m}$  stand ein Laserbeugungsspektrometer der Firma Horiba, Typ LA-300 zur Verfügung. Das Prinzip der Messung beruht darauf, dass eine Probe des zu untersuchenden Feststoffes in einer Dispergierflüssigkeit (Wasser oder organisches Lösungsmittel) suspendiert und im Kreislauf durch eine Meßzelle gefördert wird, durch die ein Laserstrahl hindurchtritt (Abb. 8.1). Die in der Suspension enthaltenen Feststoffpartikel beugen das Licht in einem ihrer Größe entsprechenden Beugungswinkel, so daß hinter der Meßzelle ein für die Partikelgrößenverteilung der Probe charakteristisches Beugungsspektrum entsteht. Dieses wird von einem hinter der Meßzelle befindlichen 36-Kreisring-Photodetektor gemessen. Durch sechs zusätzliche, seitlich angeordnete Photodetektoren wird der gestreute Lichtanteil erfaßt. Auf der Grundlage der Theorien von Fraunhofer und Mie zur Lichtbeugung und -brechung wird anschließend die Partikelgrößen-

verteilung mit einer Auflösung von 64 Partikelgrößenklassen berechnet. Das Gerät verfügt über ein integriertes Ultraschallbad zur Dispergierung von Feststoffagglomeraten, die typische Meßzeit beträgt ca. 10 s.

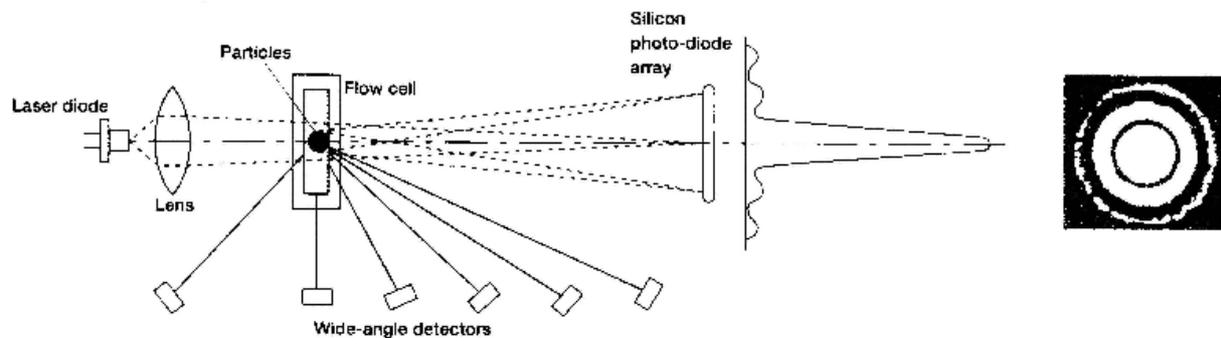


Abb. 8.1: Meßprinzip des Laserbeugungsspektrometers

#### 8.4 Zetapotentialmessungen

Befinden sich geladene Partikel in Suspensionen, wird deren Potential (Nernst-Potential) durch Anlagerung von Ionen im Suspensionsmedium kompensiert. Auf der Partikeloberfläche lagern sich fest gebundene Ionen in der sogenannten Helmholtz-Schicht an. Weitere Ionen lagern sich eher locker gebunden in einer diffusen, ungeordneten Schicht (Gouy-Chapman-Schicht) an. Damit erscheinen die Partikel nach außen elektrisch neutral, da alle Partikelladungen durch Ionen des Suspensionsmediums kompensiert werden (Abb. 8.2).<sup>[128]</sup>

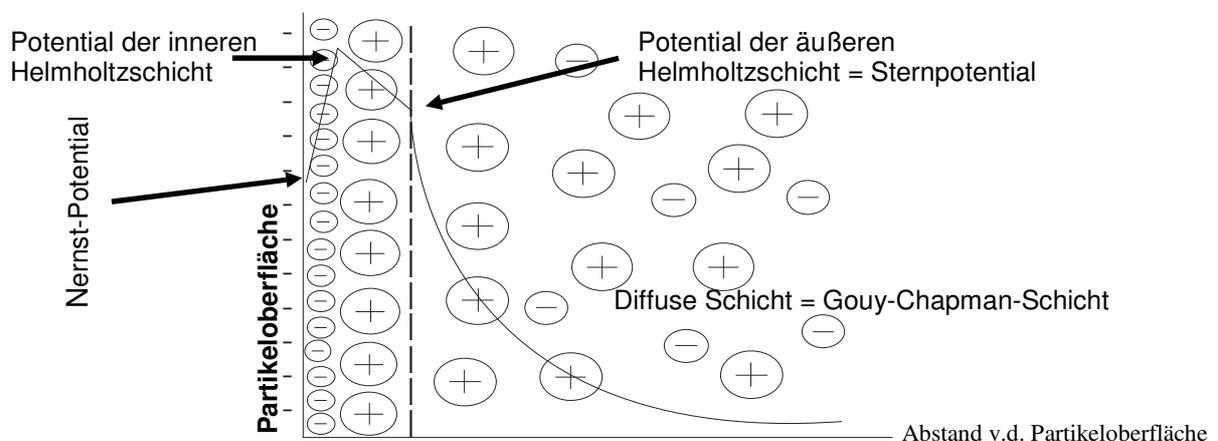


Abb. 8.2: Potentialverlauf eines negativ geladenen Partikels im Suspensionsmedium als Funktion des Abstands zur Partikeloberfläche

Bewegen sich die Partikel im Suspensionsmedium, so wird durch Reibung ein Teil der locker gebundenen diffusen Schicht abgeschert und die Partikel erscheinen nicht mehr elektrisch neutral, sondern besitzen wieder ein Potential. Dieses Potential an der Abschergrenze wird als Zeta-Potential bezeichnet. Damit ist es bei gleichem Medium eine relative Meßgröße für das Oberflächenpotential und somit für die Ladung der Partikel. Gemessen werden kann das Zeta-Potential, indem die geladenen Partikel durch ein angelegtes elektrisches Feld bewegt werden. Die daraus resultierende Geschwindigkeit ist dann ein Maß für das Zeta-Potential.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zetapotentiale mit dem Zetasizer 3000 der Firma Malvern Instruments vorgenommen. Das Gerät bedient sich hierbei dem Prinzip der Elektrophorese, d.h. es mißt die Wanderungsgeschwindigkeit elektrisch geladener Teilchen im einem elektrischen Feld. Die Bestimmung des Zetapotentials erfolgt nach Helmholtz-Smoluchowski (Formel 8.1):<sup>[129]</sup>

$$\zeta = \frac{4\pi\eta v}{E\varepsilon} \quad \text{Formel 8.1}$$

$\zeta$  = Zetapotential,  $\eta$  = Viskosität des Suspensionsmediums,  $v$  = Partikelgeschwindigkeit,  $E$  = Feldkonstante,  $\varepsilon$  = Dielektrizitätskonstante des Suspensionsmediums

Beim Zetasizer 3000 wurde die Partikelgeschwindigkeit über Laser-Doppler-Anemometrie bestimmt. Hierbei werden zwei sich auf stationärer Ebene kreuzende Laserstrahlen verwendet.

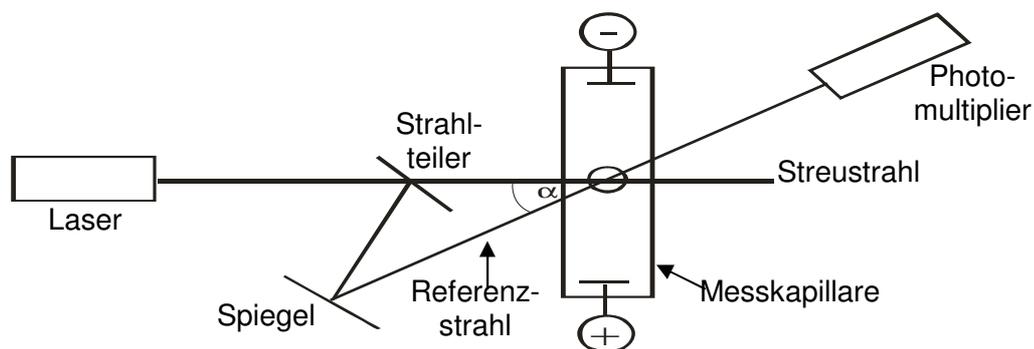


Abb. 8.3: Optischer Aufbau des Zetasizers 3000

Das Licht des direkt in den Photomultiplier führenden Referenzstrahls wird hierbei mit dem durch die Partikelwanderung gestreuten Licht des intensitätsstärkeren Streustrahls verglichen (Abb. 8.3).

Über einen Korrelator können die Signale ausgewertet werden, wobei sich die Wanderungsgeschwindigkeit aus der Frequenzverschiebung des gebildeten Interferenzmusters nach Formel 8.2 ergibt:<sup>[130]</sup>

$$v = \frac{\Delta f \cdot \lambda}{2 \cos(\alpha) \cdot \sin(\alpha/2)} \quad \text{Formel 8.2}$$

$v$  = Geschwindigkeit des Teilchens,  $\Delta f$  = Frequenzverschiebung,  $\lambda$  = Wellenlänge des Lasers,  $\alpha$  = Winkel zwischen den Laserstrahlen

Die Kalibrierung des Meßgeräts erfolgte mit einem Latex-Standard (Malvern DTS0050), der ein Zetapotential von  $50 \pm 5$  mV besaß. Um die Sauberkeit der Messkapillare zu überprüfen, wurden vor jeder Messreihe Leermessungen mit bidestilliertem Wasser durchgeführt, das nur bei einer sauberen Messkapillare ein Zetapotential von  $0 \pm 5$  mV aufwies. Die Messungen wurden in destilliertem Wasser durchgeführt und verfolgten das Ziel, die einzelnen Stufen der Oberflächenmodifikationen an den  $\text{TiO}_2$ -Pulvern zu überprüfen. Die Konzentration des Pulvers in der Suspension wurde so gewählt, dass während der Messung eine Zählrate von 250-400 kct/s (kilocounts/s) erreicht wurde. Die hierzu verwendeten schwach getrübbten (opalfarben) Pulversuspensionen wurden mit Ultraschall hergestellt, um Pulveragglomerate im Suspensionsmedium zu vermeiden.

## 8.5 FT-IR-Spektroskopie

FT-IR-Spektren wurden mit einem Nicolet 320 Spektrometer (Fa. Nicolet, Offenbach) vermessen. Es wurde im Wellenzahlbereich von  $4000$ - $400$   $\text{cm}^{-1}$  und mit einer spektralen Auflösung von  $8$   $\text{cm}^{-1}$  aufgenommen. Die Charakterisierung der funktionalisierten  $\text{TiO}_2$ -Titanplättchen erfolgte in diffuser Reflexion (DRIFTS) und in abgeschwächter Totalreflexion (ATR).

## 8.6 Mikro-RAMAN-Spektroskopie

RAMAN-Spektren wurden mit einem RAMAN-Spektrometer Serie 1000 (Fa. Renishaw, Pliezhausen) bei einer Anregungswellenlänge des HeNe-Lasers von 633 nm aufgenommen. Der Laserstrahl wurde mit einem PL Fluotar-Objektiv (Leica DMLM Mikroskop) bei 50-facher Vergrößerung auf die Probe fokussiert. Die modifizierten TiO<sub>2</sub>-Pulverproben wurden hierfür mit einem Glasobjektträger auf eine diffus streuende Metallplatte gepresst, die cp-Titanplättchen auf die Metallplatte gelegt. Die Anregung erfolgte mit 50 mW (4000-900 cm<sup>-1</sup>) bzw. mit 25 mW (4000-100 cm<sup>-1</sup>). Zur Auswertung wurde die Software GRAMS/32 (Fa. Galactic Industries Corporation) verwendet.

## 8.7 XRD

Röntgendiffraktometrische Untersuchungen wurden mit einem Diffraktometer D5005 der Firma Siemens, Karlsruhe durchgeführt. Um Anisotropien der gebeugten Strahlung auszugleichen, wurden die Prüfkörper während der Messung durch einen Spinner rotiert.

## 8.8 UV-VIS-Spektroskopie

Die Spektren wurden mit einem UV-Visible-Spektrophotometer Cary 100 der Firma Varian aufgenommen. Die Proben wurden in 2,5 ml-Makroküvetten (12,5 × 12,5 × 45 mm) der Firma Plastibrand im Wellenlängenbereich von 190-900 nm vermessen, als Referenz wurde eine Küvette mit reinem Lösungsmittel verwendet.

$$\Delta E = \epsilon_{mol} \cdot c \cdot d \quad \text{Formel 8.3}$$

$\Delta E$  = Extinktionsdifferenz,  $\epsilon_{mol}$  = molarer Extinktionskoeffizient (l·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>), Konzentration (mol·l<sup>-1</sup>),  $d$  = Durchmesser der Küvette;

Das UV-Spektrometer misst die Extinktion, d.h. die Abschwächung der Strahlungsintensität beim Durchgang durch eine absorbierende Substanz und korreliert es über das Lambert-Beersche Gesetz mit der Konzentration der absorbierenden Substanz (Formel 8.3).

## 9 Literatur

- [1] R. Erbel, A. Fischer: Flexible Unterstützung. *Essener Unikate* **2000**, *13*, 94-111.
- [2] K. Jellinger in *Cerebral Aneurysms*, H. Pia, W.C. Langmaid, J. Zierski (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin **1979**, 5-19.
- [3] Q. Tan, J. Ji, M.A. Barbosa, C. Fonseca, J. Shen: Constructing thromboresistant surface on biomedical stainless steel via layer-by-layer deposition anticoagulant. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4699-4705.
- [4] D. Holmes, K. Garratt, J. Popma: Stent complications. *J Invasive Cardiol* **1998**, *10*, 385-395.
- [5] S.W. Kim, C.D. Ebert, J.C. McRea, C. Briggs, S.M. Byun, H.P. Kim in *Surface phenomena in hemorheology*, A. L. Copley (Hrsg.), The New York Academy of Science, New York **1983**, 513-524.
- [6] H.J. Breme, M.A. Barbosa, L.A. Rocha; (**1998**) Adhesion to ceramics. In: J.A. Helsen, H.J. Breme (Hrsg.) *Metals as biomaterials*. Wiley & Sons, New York, p. 219-290.
- [7] E. Wintermantel, S.-W. Ha: *Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen: Implantate für Medizin und Umwelt*; Springer, **1996**.
- [8] R.K. Schenk in *Perspectives on biomaterials* eds. O.C.C. Lin and E.Y.S. Chao 11-16 Elsevier, Taipei, Taiwan, **1986**.
- [9] M. Wiedmann-Al-Ahmad, R. Gutwald, G. Lauer, U. Hubner, R. Schmelzeisen: How to optimize seeding and culturing of human osteoblast-like cells on various biomaterials. *Biomaterials* **2002**, *23*, 3319-3328.
- [10] D.A. Puelo, R.A. Kissling, M.-S. Sheu: A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy. *Biomaterials* **2002**, *23*, 2079-2087.
- [11] F. Rupp: Grenzflächenanalytische Untersuchungen des beschichteten und unbeschichteten dentalen Implantatwerkstoffs Titan. Dissertation, Universität Tübingen **2000**.
- [12] D.M. Grant, W.J. Lo, K.G. Parker, T.I. Parker: Biocompatible and mechanical properties of low-temperature deposited quaternary (TiAlV)N coatings on Ti6Al14V titanium alloy substrates. *J Mater Sci Mater Med* **1996**, *7*, 579-584.
- [13] F. Macionczyk, R. Thull: Oberflächenmodifikation von Hüftendoprothesenschäften mit strukturierter (Ti,Nb)ON-Schicht. *Biomaterialien* **2001**, *2*, 25-30.
- [14] D.J. Müller, M. Amrein, M. Engel: Adsorption of Biological Molecules to a Solid Support for Scanning Probe Microscopy. *Journal of Structural Biology* **1997**, *119*, 172-188.
- [15] P. Francois, P. Vaudaux, M. Taborelli, M. Tonetti, D.P. Lew, P. Descouts: Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. (II) Adsorption isotherms and biological activity of immobilized fibronectin. *Clin Oral Implants Res* **1997**, *8*, 217-25.
- [16] A.G. Gristina: Biomaterial-Centered Infection: Microbial Adhesion Versus Tissue Integration. *Science* **1987**, *237*, 1588-1595.
- [17] E. Wintermantel, S.-W. Ha: *Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen; Implantate für Medizin und Umwelt*, Springer-Verlag, Heidelberg **1998**.
- [18] D.I. Bardos in *Concise Encyclopedia of Medical & Dental Materials*, D. Williams (Hrsg.), Pergamon Press, Oxford **1990**, 360-365.
- [19] K. Päßler in *Titan in der Zahnmedizin*, J. Wirz, H. Bischoff (Hrsg.), Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin **1997**, 42-48.

- [20] B. Feng, J. Weng, B.C. Yang, J.Y. Chen, J.Z. Zhao, L. He, S.K. Qi, X.D. Zhang: Surface characterization of titanium and adsorption of bovine serum albumin. *Mater Charac* **2002**, *49*, 129-137.
- [21] S. Tosatti, S.M. De Paul, A. Askendal, S.V. VandeVondele, J.A. Hubbell, P. Tengvall, M. Textor: Peptide functionalized poly(L-lysine)-g-Poly(ethylene glycol) on titanium: resistance to protein adsorption in full heparinized human blood plasma. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4949-4958.
- [22] H.F. Kappert: Titan als Werkstoff für die zahnärztliche Prothetik und Implantologie. *Dtsch Zahnärztl Z* **1994**, *49*, 573-583.
- [23] H.F. Hildebrand, A. Ralison, I. Floquet, P. Rocher, J. Brems, E. Eisenbarth in *Werkstoffe für die Medizintechnik (Symposium 4)*, J. Brems, (Hrsg.), DGM Informationsgesellschaft, Frankfurt **1997**, 91-98.
- [24] P. Didisheim, J.T. Watson in *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, B.D. Ratner (Hrsg.), Academic Press, San Diego **1996**, 283-297.
- [25] J. Rassow: Biochemie (Duale Reihe) **2006**, Thieme Verlag, Stuttgart.
- [26] Mündliche Mitteilung von L. Hein in der Vorlesung Pharmakologie und Toxikologie I für Studierende der Zahnheilkunde WS 03/04, Universität Würzburg.
- [27] M. Bourin, U. Lindahl: Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. *Biochem J* **1993**, *289*, 313-330.
- [28] B. Kemkes-Matthes, Gerd Oehler: *Blutgerinnung und Thrombose*, Georg Thieme Verlag **1998**, S. 3.
- [29] S.R. Hanson, L.A. Harker in *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, B.D. Ratner (Hrsg.), Academic Press. San Diego **1996**, 193-199.
- [30] E. Pilger, K.L. Schulte, C. Diehm, E. Gröchening: Arterielle Gefäßerkrankungen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart **2002**, 222.
- [31] K. Barth: Funktionalisierung von Titanoberflächen mit kovalent gebundenen Wirkstoffen für den Blutkontakt. *Diplomarbeit* **2004**, Würzburg.
- [32] R.D. Rosenberg: Heparin, Antithrombin and abnormal clotting. *Ann Rev Med* **1978**, *29*, 367-378.
- [33] B. Casu in *Heparin and related polysaccharides: structure and activities*, F. Oforu, I. Danishefsky, J. Hirsh (Hrsg.), The New York Academy of Science, New York **1989**, 1-17.
- [34] S.M. Opal, C.M. Kessler, J. Roemisch, S. Knaub: Antithrombin, heparin and heparan sulfate. *Crit Care Med* **2002**, *30*, 325-331.
- [35] P.A. Hårdhammar, H.M.M. van Beusekom, H.U. Emanuelsson, S.H. Hofma, P.A. Albertsson, P.D. Verdouw, E. Boersma, P.W. Serruys, W.J. van der Giessen: Reduction in Thrombotic Events With Heparin-Coated Palmaz-Schatz Stents in Normal Porcine Coronary Arteries. *Circulation* **1996**, *93*, 423-430.
- [36] P.K. Smith, A.K. Mallia, G.T. Hermannson: Colorimetric method for the assay of heparin content in immobilized heparin preparations. *Anal Biochem* **1980**, *109*, 466-473.
- [37] I.K. Kang, O.H. Kwon, Y.M. Lee, Y.K. Sung: Preparation and surface characterization of functional and heparin-immobilized polyurethanes by plasma glow discharge. *Biomaterials* **1996**, *17*, 841-847.
- [38] M.L. Larson, U. Abildgaard, A.N. Teien, K. Gjesdal: Assay of plasma heparin using thrombin and the chromogenic substrate H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S-2238). *Thromb Res* **1978**, *13*(2), 285-288.
- [39] R. Hall, R.G. Malia, editors. *Medical laboratory haematology*, 1<sup>st</sup> ed. London: Butterworths, **1984**, p. 629.
- [40] V.L. Gott J.D. Whiffen, R.C. Dutton: Heparin bonding on colloidal graphite surfaces. *Science* **1963**, *142*, 1297-1298.

- [41] Z. Chen, R. Zhang, M. Kodama, T. Nakaya: Anticoagulant Surface Prepared by the Heparinization of Ionic Polyurethane Film. *J Appl Polym Sci* **2000**, 76, 382-390.
- [42] I.-K. Kang, O.H. Kwon, M.K. Kim, Y.M. Lee, Y.K. Sung: In vitro blood compatibility of functional group-grafted and heparin immobilized polyurethanes prepared by plasma glow discharge. *Biomaterials* **1997**, 18, 1099-1107.
- [43] M. Erdtmann, R. Keller, H. Baumann: Photochemical Immobilization of heparin, dermatan sulphate, dextran sulphate and endothelial heparan sulphate onto cellulose membranes for the preparation of athrombogenic and antithrombogenic polymers. *Biomaterials* **1994**, 15, 1043-1048.
- [44] H. Kim, M.W. Urban: Reactions of Thromboresistant Multilayered Thin Films on Poly(vinyl chloride) (PVC) surfaces: A Spectroscopic Study. *Langmuir* **1998**, 14, 7235-7244.
- [45] G.P.A. Michanetzis, N. Katsala, Y.F. Missirlis: Comparison of haemocompatibility improvement of four polymeric biomaterials by two heparinization techniques. *Biomaterials* **2003**, 24, 677-688.
- [46] W.K. Lee, K.D. Park, Y.H. Kim: Improved calcification resistance and biocompatibility of tissue patch grafted with sulfonated PEO or heparin after glutaraldehyde fixation. *J Biomed Mat Res* **2001**, 58(1), 27-35.
- [47] M. Chvapil, D. Speer, W. Mora, C. Eskelson: Effect of tanning agent on tissue reaction to implanted collagen sponge. *J Surg Res* **1983**, 35, 402-409.
- [48] D.G. Hoare, D.E. Koshland: A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins. *J Biol Chem* **1967**, 242, 2447-2453.
- [49] A. Agarwal, I. Danishefsky: Requirement of free carboxyl groups for the anticoagulant activity of heparin. *Thromb Res* **1982**, 42, 673-680.
- [50] a) S. Moore, W.H. Stein: Photometric ninhydrin method for use in chromatography of amino acids. *J Biol Chem* **1948**, 176, 367-388. b) S. Moore, W.H. Stein: A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J Biol Chem* **1954**, 211, 907-913. c) S. Moore: Amino acid analysis: Aqueous dimethyl sulfoxid as solvent for the ninhydrin reaction. *J Biol Chem* **1968**, 243, 6281-6283.
- [51] Bayer, Walter: Lehrbuch der Organischen Chemie. 21. Auflage, S. Hinzl Verlag, Stuttgart, **1988**.
- [52] D.G. Hoare, D.E. Koshland: A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins. *J Biol Chem* **1967**, 242, 2447-2453.
- [53] L.H.H.O. Damink, P.J. Dijkstra, M.J.A. van Luyn, P.B. van Wachem, P. Nieuwnhuis, J. Feijen: Cross-linking of dermal sheep collagen using a water soluble carbodiimide. *Biomaterials* **1996**, 17, 765-773.
- [54] D. Neut, H. van de Belt, J.R. van Horn, H.C. van der Mei, H.J. Busscher: Residual gentamicin-release from antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads after 5 years of implantation. *Biomaterials* **2003**, 24, 1829-31.
- [55] H. Wahlig, E. Dingeldein, R. Bergmann, K. Reuss: Experimental and pharmacokinetic studies with gentamicin PMMA beads (author's transl). *Zentralbl Chir* **1979**, 104, 923-33.
- [56] H.-J. Wang et al.: Heparin-loaded zein microsphere film and hemocompatibility. *Journal of Controlled Release* **2005**, 105, 120-131.
- [57] G. Dangas et al.: Effectiveness of the concomitant use of Bivalirudin and drug-eluting stents. *Am J Cardiol* **2005**, 96, 659-663.
- [58] D.E. Cutlip, D.S. Baim, K.K. Ho, J.J. Popma, A.J. Lansky, D.J. Cohen, J.P. Carrozza Jr, M.S. Chauhan, O. Rodriguez, R.E. Kuntz: Stent thrombosis in the modern era: a pooled analysis of multicenter coronary stent clinical trials. *Circulation* **2001**, 103, 1967-1971.

- [59] M. Chvapil, D. Speer, W. Mora, C. Eskelson: Effect of tanning agent on tissue reaction to implanted collagen sponge. *J Surg Res* **1983**, 35, 402-409.
- [60] D.G. Hoare, D.E. Koshland: A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins. *J Biol Chem* **1967**, 242, 2447-2453.
- [61] Y. Nakayama, S. Nishi, H. Ueda-Ishibashi, T. Matsuda: Fabrication of micropored elastomeric film-covered stents and acute-phase performances. *J Biomed Mat Res Part A* **2003**, 1, 52-61.
- [62] C.R. Riedel, M. Witkowski, E. Plas, H. Pflueger: Heparin coating reduces encrustation of ureteral stents: a preliminary report. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2002**, 19, 507-510.
- [63] C.D. Ebert, E.S. Lee, J. Deneris, S.W. Kim: The anticoagulant activity of derivatized and immobilized heparins. *Advances in Chemistry Series* **1982**, 199, 161-76.
- [64] C.D. Ebert, S.W. Kim: Immobilized Heparin: Spacer arm effects on biological interactions. *Thromb Res* **1982**, 26, 43-57.
- [65] D. Corry, J. Moran: Assessment of acrylic bone cement as a local delivery vehicle for the application of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biomaterials* **1998**, 19, 1295-1301.
- [66] A.J. Rajeev: The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* **2000**, 21, 2475-2490.
- [67] M.S. Ahola, E.S. Säilynoja, M.H. Raitavuo, M.M. Vaahtio, J.I. Salonen, A.U.O. Yli-Urpo: In vitro release of heparin from silica xerogels. *Biomaterials* **2000**, 22, 2163-2170.
- [68] N. Roveri, M. Morpurgo, B. Palazzo, B. Parma, L. Vivi: Silica xerogels as a delivery system for the controlled release of different molecular weight heparins. *Anal Bioanal Chem* **2005**, 381, 601-606.
- [69] S. Sepeur, N. Kunze, B. Werner, H. Schmidt: UV curable hard coatings on plastic. *Thin Solid Films* **1999**, 351, 216-219.
- [70] J.M. Anderson, M.S. Shive: Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced drug delivery reviews* **1997**, 28, 5-24.
- [71] U. Gbureck, S. Grübel, R. Thull, J.E. Barralet: Modified PMMA-cements for a hydrolysis resistant metal-polymer interface in orthopaedic applications. *Acta Biomaterialia* **2005**, 1, 671-676.
- [72] D. Vojvodic, V. Jerolimov, A. Celebic, A. Catovic: Bond strength of silicoated and acrylic resin bonding systems to metal. *J Prosthet Dent* **1999**, 81, 1-6.
- [73] R.D. Mazurat, S. Pesun: Resin-metal bonding systems: a review of the silicoating and Kevloc systems. *J Can Dent Assoc* **1998**, 64, 503.
- [74] T. Gunji, Y. Makabe, N. Takamura, Y. Abe: Preparation and characterization of organic-inorganic hybrids and coating films from 3-methacryoxypropylpolysilsesquioxane. *Appl Organometal Chem* **2001**, 15, 683-692.
- [75] Y. Abe, Y. Honda, T. Gunji: Preparation and properties of silicon-containing polymer hybrids from 3-methacryoxypropylpolysilsesquioxane. *Appl Organometal Chem* **1998**, 12, 749-753.
- [76] N. Hüsing, U. Schubert: Aerogels airy materials: Chemistry, structure, and properties. *Angewandte Chemie-International Edition* **1998**, 37(1-2), 23-45.
- [77] T. Higuchi: Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *J Pharm Sci* **1961**, 50, 874-875.
- [78] T. Higuchi: Mechanism of sustained-action medication. *J Pharm Sci* **1963**, 52, 1145-1149.
- [79] B.C. Lippold: Einführung in die Biopharmazie. *Deut Apoth-Ztg* **1974**, 114, 441-446.

- [80] A.E.J. Gonzales, S.G. Santiago: Structural and optoelectronic characterization of TiO<sub>2</sub> films prepared by the sol-gel technique. *Semiconductor Science and Technology* **2007**, 22(7), 709-716.
- [81] C.J. Brinker, G.W. Scherer: Sol-gel science; the physics and chemistry of sol-gel processing. San Diego, USA: Academic Press Inc., **1990**.
- [82] R.K. Iler: Coagulation of colloidal silica by calcium-ions, mechanism, and effect of particle-size. *Journal of Colloid and Interface Science* **1975**, 53(3), 476-488.
- [83] W. Brockmann. *J Adhesion* **1987**, 22, 71.
- [84] www.wikipedia.de, "Radikalische Polymerisation", **2007**.
- [85] I. Konstantinov, P. Sharlandjiev, T. Babeva, S. Klitova: Simulation of the diffraction by CD-R: thickness determination of the dye recording layer. *Journal of Optics A-Pure and Applied Optics* **2001**, 3(6), 460-465.
- [86] D.W. Schubert, T. Dunkel: Spin coating from a molecular point of view: its concentration regimes, influence of molar mass and distribution. *Materials Research Innovations* **2003**, 7, 314-321.
- [87] F. Höök, J. Vörös, M. Rodahl, R. Kurrat, P. Böni, J.J. Ramsden, M. Textor, N.D. Spencer, P. Tengvall, J. Gold, B. Kasemo: A comparative study of protein adsorption on titanium oxide surfaces using in situ ellipsometry, optical waveguide lightmode spectroscopy and quartz crystal microbalance/dissipation. *Coll Surf B: Biointerf* **2002**, 24, 155-170.
- [88] A. Welle: Untersuchungen biologischer Adsorbate mittels moderner Quarzmikrogravimetrie. *Nachrichten-Forschungszentrum Karlsruhe* **2003**, 35-4, 173-178.
- [89] F. Höök: Development of a novel QCM technique for protein adsorption studies. Dissertation, Chalmers University of Technology and Göteborg University, **1997**.
- [90] M. Rodahl, F. Höök, A. Krozer, P. Brzezinski, B. Kasemo: Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments. *Rev Sci Instrum* **1995**, 66, 3924-3930.
- [91] F. Höök, M. Rodahl, P. Brzezinski, B. Kasemo: Energy dissipation kinetics for protein and Antibody-Antigen Adsorption under Shear Oscillation on a Quartz Crystal Microbalance. *Langmuir* **1998**, 14, 729-734.
- [92] Qsense: the QCM-D Technique revealed. Application example, AB **2004**.
- [93] P.W. Serruys (ed.): Handbook of coronary Stents. Martin Dunitz Ltd., London, **1997**.
- [94] O. Stenzel: Das Dünnschichtspektrum. 1. Auflage, Berlin, Akad. Verl., **1996**, S. 66.
- [95] R. Henninger: Elektroreflexion an CuInS<sub>2</sub>-Solarzellen im Hinblick auf Optimierung der Prozeßparameter bei der Absorber-Herstellung. Dissertation **2000**, Berlin, S. 12-13.
- [96] D. Velten, V. Biehl, F. Aubertin, B. Valeske, W. Possart, J. Breme: Preparation of TiO<sub>2</sub> layers on cp-Ti and Ti6Al4V by thermal and anodic oxidation and by sol-gel coating techniques and their characterization. *J Biomed Mat Res* **2002**, 59(1), 18-28.
- [97] aus: www.plasma.de/.../images/Disse\_img\_54.jpg (**2007**).
- [98] aus: www.wikipedia.de; „Titandioxid“ (**2007**).
- [99] aus: www.wikipedia.de; „Rauigkeit“ (**2007**)
- [100] M. Wiczorek: Herstellung und Charakterisierung funktioneller Titanoxidbeschichtungen. Dissertation **1998**, S. 43.
- [101] S.K. Arya, A.K. Prusty, S.P. Singh, et al.: Cholesterol biosensor based on N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl-trimethoxysilane self-assembled monolayer. *Analytical Biochemistry* **2007**, 363(2), 210-218.
- [102] L.A. Chrisey, G.U. Lee, C.E. O'Ferrall: Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films. *Nucleic Acids Research* **1996**, 24(15), 3031-3039.
- [103] M. Abboud, M. Turner, E. Duguet, M. Fontanille: PMMA-based composite materials with reactive ceramic fillers. *J Mater Chem* **1997**, 7(8), 1527-1532.

- [104] D.A. Puleo: Retention of enzymatic activity immobilized on silanized Co-Cr-Mo and Ti-6Al-4V. *J Biomed Mat Res* **1997**, *37*, 222-228.
- [105] K.D. Park, W.G. Kim, H. Jacobs, D. Okano, S.W. Kim: Blood compatibility of SPUU-PEO-heparin grafted copolymers. *J Biomed Mat Res* **1992**, *26*, 739-756
- [106] J. Sanchez, G. Elgue, J. Riesenfeld, P. Olsson: Inhibition of the plasma contact activation system of immobilized heparin: Relation to surface density of functional antithrombin binding sites. *J Biomed Mat Res* **1997**, *37*, 37-42.
- [107] M.V. Sefton in *Concise Encyclopedia of Medical & Dental Materials*, D. Williams (Hrsg.), Pergamon Press, Oxford **1990**, 219-221.
- [108] R. Thull: Physiochemical principles of tissue material interactions. *Biomol Engin* **2002**, *19*, 42-50.
- [109] E.F. Irwin, J.E. Ho, S.R. Kane, K.E. Healy: Analysis of interpenetrating polymer networks via quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. *Langmuir* **2005**, *21* (12), 5529-5536.
- [110] M. Andersson, J. Andersson, A. Sellborn, et al.: Quartz crystal microbalance-with dissipation monitoring (QCM-D) for real time measurements of blood coagulation density and immune complement activation on artificial surfaces. *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, *21*(1), 79-86.
- [111] O.V. Gorkun, R.I. Litvinov, Y.I. Veklich, et al.: Interactions mediated by the N-terminus of fibrinogen's B beta chain. *Biochemistry* **2006**, *45*(49), 14843-14852.
- [112] S. Radin, G. El-Bassyouni, E.J. Vresilovic, E. Schepers, P. Ducheyne: Tissue reactions to controlled release silica xerogel carriers. *Bioceramics* **1998**, *11*, 529.
- [113] P. Kortesu, M. Ahola, S. Karlsson, I. Kangasniemi, J. Kiesvaara, A. Yli-Urpo: Silica xerogel as an implantable for controlled drug delivery - evaluation of drug distribution and tissue effects after implantation. *Biomaterials* **2000**, *21*(2), 193-198.
- [114] C. Sanchez, M. In: Molecular design of alkoxide precursors for the synthesis of hybrid organic inorganic gels. *J Non-Cryst Solids* **1992**, *147/148*, 1-12.
- [115] J.L. Ferracane, E.H. Greener: Fourier-Transform Infrared-Analysis of degree of polymerization in unfilled resins – Methods comparison. *J Dent Res* **1984**, *63*(8), 1093-1095.
- [116] F.A. Rueggeberg: Determination of resin cure using infrared analysis without an internal standard. *Dent Mater* **1994**, *10*, 282-286.
- [117] D.R. Azolin, C.C. Moro, T.M. Costa, E.V. Benvenuti: Effects of organic content and H<sub>2</sub>O/TEOS molar ratio on the porosity and pore size distribution of hybrid naphthaleneaminepropylsilica xerogel. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2004**, *337*, 201-206.
- [118] C.J. Brinker, G.W. Scherer: Sol-gel science; the physics and chemistry of sol-gel processing. San Diego, USA: Academic Press Inc., **1990**.
- [119] O. Kim, M.S. Gong: Preparation and dental properties of polymeric dental restorative composites using oligoethyleneglycol diluent system. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **2003**, *9*(3), 233-242.
- [120] X. Huang, C.S. Brazel: On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* **2001**, *73*, 121-136.
- [121] Q. Tan, J. Ji, M.A. Barbosa, C. Fonseca, J. Shen: Constructing thromboresistant surface on biomedical stainless steel via layer-by-layer deposition anticoagulant. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4699-4705.
- [122] K. Grasshoff, K. Kremling, M. Ehrhardt (editors): Methods of Seawater Analysis. Wiley-VCH, New-York, **1983**, 174-183.
- [123] M. Ahola, P. Kortesu, I. Kangasniemi, J. Kiesvaara, A. Yli-Urpo: Silica xerogel carrier material for controlled release of toremifene citrate. *Int J Pharmacol* **2000**, *195*, 219-227.

- [124] K.V.P.M. Shafi, A. Ulman, X. Yan, N.-L. Yang, M. Himmelhaus, M. Grunze: Sonochemical preparation of Silane-Coated Titania Particles. *Langmuir* **2001**, *17*, 1726-1730.
- [125] M.B. Casu, W. Braun, K.R. Bauchspieß, S. Kera, B. Megner, C. Heske, R. Thull, E. Umbach: A multi-technique investigation of TiO<sub>2</sub> films prepared by magnetron sputtering, in press (**2006**).
- [126] A. Hemmersam, M. Foss, J. Chevallier, F. Besenbacher: Adsorption of fibrinogen on tantalum oxide, titanium oxide and gold studied by the QCM-D technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2005**, *43*, 208-215.
- [127] P.K. Smith, A.K. Mallia, G.T. Hermansson: Colorimetric method for the assay of heparin content in immobilized heparin preparations. *Anal Biochem* **1980**, *109*, 466-473.
- [128] R.H. Müller: Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart **1996**.
- [129] M.P. Hofmann: Physikalische Charakterisierung von Calciumphosphat-Pulvern zur Einstellung von Prozessparametern für die Herstellung von Knochenzement, Dissertation, Universität Würzburg, **2003**.
- [130] M. Oberseider, F. Erler, C. Jakob, T. Lampke, S. Steinhäuser, B. Wielage: Eigenschaften von nanoskaligen Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- und TiO<sub>2</sub>-Partikeln in Metallelektrolyten. 47. Internationales Wissenschaftliches Kolloquium, TU Ilmenau, 23.-26. September **2002**.

## Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht

D. Tebbe, R. Thull, U. Gbureck: Correlation between heparin release and polymerization degree of organically modified silica xerogels from 3-methacryloxypropylpolysilsesquioxane. *Acta Biomaterialia* **2007**, im Druck.

D. Tebbe, R. Thull, U. Gbureck: Influence of spacer length on heparin coupling efficiency and fibrinogen adsorption of modified titanium surfaces. *BioMedical Engineering OnLine* **2007**, 6: 31. (online erhältlich: [www.biomedical-engineering-online.com/content/6/1/31](http://www.biomedical-engineering-online.com/content/6/1/31))

D. Tebbe, R. Thull, U. Gbureck: Vorbehandlung von Titan zur kovalenten Anbindung von Amino-funktionalisierten Silanspacern. *BIOmaterialien* **2007**, eingereicht.

D. Tebbe, U. Gbureck (Authors): Modifying titanium surfaces with glycosaminoglycans for haemocompatibility (Chapter 4.3.3, page 92-101). In *Metallic Biomaterial Interfaces* **2007**; R. Thull, J. Kirkpatrick, J. Breme (Editors), Wiley-VCH Verlag, Weinheim.

D. Tebbe, U. Gbureck, R. Thull: Quantifizierung des an TiO<sub>2</sub> über verschiedene Haftvermittler immobilisierten Heparins. *BIOmaterialien* **2005**, 6(3), 250.

## **Danksagung**

An erster Stelle danke ich meinem akademischen Lehrer Herrn Prof. Dr.-Ing. R. Thull für die Bereitstellung dieses äußerst interessanten Themas und für die Betreuung dieser Arbeit über sein Ausscheiden aus dem Klinikum hinaus. Für seinen Ruhestand wünsche ich Ihm das Beste!

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. I. Fischer, der sich dazu bereit erklärt hat, als Erstgutachter für diese Arbeit zur Verfügung zu stehen. Hierfür vielen, vielen Dank!

Herrn PD Dr. U. Gbureck danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, das Korrekturlesen selbiger und der Veröffentlichungen.

Bei allen Mitgliedern und Ehemaligen der Arbeitsgruppe, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanke ich mich für das gute Arbeitsklima und die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Ganz besonders möchte ich mich bei Eltern und Großeltern bedanken, ohne deren – nicht nur finanzielle – Unterstützung dieses Studium nicht möglich gewesen wäre.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn R. Michalek, der einen Teil des „Weges“ mit mir gemeinsam beschrift und der mir ein treuer Weggefährte wurde.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei Frau E. Stuckert für die schöne Zeit in Würzburg bedanken, die wir miteinander verbracht haben – und für die Zeit, die noch kommen wird...

# Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation

**»Funktionalisierung von Titan(dioxid)oberflächen mit kovalent gebundenem und in  
Depots eingebrachtem Wirkstoff für den Blutkontakt«**

selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg,

(David Tebbe)

---