

**Auf dem Weg zu neuartigen Biomaterialien für die
Nervenregeneration:
Immobilisierung von Polysialinsäure**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Stephanie Steinhaus

geboren am 12.02.1981 in Hannover

2009

**Auf dem Weg zu neuartigen Biomaterialien für die
Nervenregeneration:
Immobilisierung von Polysialinsäure**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

**Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Chem. Stephanie Steinhaus

geb. am 12.02.1981 in Hannover

2009

Referent: Prof. Dr. Peter Behrens
Korreferentin: PD Dr. Cornelia Kasper
Tag der Promotion: 24.06.2009

Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation „Auf dem Weg zu neuartigen Biomaterialien für die Nervenregeneration: Immobilisierung von Polysialinsäure“ selbständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zur Hilfeleistung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit herangezogen.

Hannover, den 14. April 2009

(Stephanie Steinhaus)

Inhaltsübersicht

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Immobilisierung von Polysialinsäure auf verschiedenen Substraten, um ihre Eignung als biokompatibles Material für die Nervenregeneration zu untersuchen. Polysialinsäure ist ein Polysaccharid, das während der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des Nervensystems und des Nervenwachstums spielt. Ebenso tritt Polysialinsäure beim Heilungsprozess nach Verletzungen des peripheren Nervensystems auf. Darüber hinaus ist die Polysialinsäure ein ideales Substrat für das Wachstum von für die Nervenregeneration essentiellen Schwann-Zellen.

Die Anbindung der Polysialinsäure wurde über zwei verschiedene Linkersysteme sowohl auf Glas und Siliconen als auch auf Sipernat[®]-Partikeln als Modellsubstanz für die Oberflächenmodifizierung von Silica-Nanopartikeln vorgenommen. Die Immobilisierung von Polysialinsäure erfolgte in den beiden ersten Fällen nach Beschichtung der Substrate mit einem Silan, bei dem es sich um 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan (GOPTMS) bzw. 3-Aminopropyl-triethoxysilan (APTES) handelte. Für die Modifizierung des Sipernats[®] wurde ausschließlich APTES verwendet. Die Anbindung der Polysialinsäure erfolgte im ersten Fall direkt an die mit GOPTMS modifizierten Oberflächen, während bei der zweiten Methode zunächst Bernsteinsäureanhydrid (BSAH) an die mit APTES funktionalisierten Materialien gebunden wurde und erst in einem weiteren Schritt die Anbindung der Polysialinsäure nach Aktivierung mit *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid resultierte. Die Aktivierung der Siliconoberfläche vor der Anbindung der Silane wurde durch Behandlung mit Ozon oder einem Stickstoff-Plasma vorgenommen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Anbindung von Polysialinsäure auf Glas- und Siliconoberflächen über beide Reaktionswege ebenso wie die Immobilisierung der Polysialinsäure auf Sipernat[®] unter Verwendung des Linkersystems APTES/BSAH möglich war. Dabei zeigte sich, dass die immobilisierte Menge an Polysialinsäure größer war, wenn GOPTMS zur Anbindung verwendet wurde. Während die Konzentration des GOPTMS die Menge an immobilisierter Polysialinsäure nicht beeinflusst, stellte sich heraus, dass das APTES die Anbindung der Polysialinsäure stört. Mit Hilfe von Zellviabilitäts- und Zelladhäsionsexperimenten konnte für alle untersuchten Materialien eine hervorragende Biokompatibilität festgestellt werden, erste *in vivo*-Anwendungen von mit Polysialinsäure modifizierten Siliconschläuchen in der Ratte bestätigten durch das Auftreten einer Regeneration über einen 10 mm-Defekt die Eignung der Materialien für die Nervenregeneration.

Stichworte: Biomaterialien, Nervenregeneration, Polysialinsäure, Siliconmodifizierung

Abstract

The present work deals with the immobilization of polysialic acid on different substrate materials with regard to the applicability as a biocompatible material for peripheral nerve regeneration. Polysialic acid, a polysaccharide, plays a crucial role during the embryonic development of the nervous system and also takes part in the healing process occurring after nerve lesions in the peripheral nervous system. In addition, polysialic acid is a favourable substrate for the culturing of Schwann cells which are essential for nerve regeneration.

The immobilization of polysialic acid was performed via two different immobilization methods on glass and silicone as well as on Sipernat[®] particles which are a model substance for the surface modification of silica nano-particles. The immobilization of polysialic acid was carried out in both methods after coating the substrate materials with a silane, which was either 3-glycidyloxypropyltrimethoxysilane (GOPTMS) or 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES). Using the first method, polysialic acid was directly bound to the GOPTMS modified surfaces whereas the immobilization of polysialic acid in the second method only took place after coupling of succinic anhydride (BSAH) to surfaces functionalized with APTES and an activation with *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC). The activation of the silicone surfaces was carried out using ozone or nitrogen-plasma treatments.

In this work, it could be demonstrated that the immobilization of polysialic acid was successful using both reaction pathways on glass and silicone substrates as well as the immobilization of polysialic acid on sipernat[®] using APTES and BSAH. It could be shown that the amount of polysialic acid was higher when GOPTMS was used for immobilization. Whereas there is no distinct influence of the concentration of GOPTMS on the amount of polysialic acid immobilized it could be revealed that, in contrast, APTES disturbed the immobilization of polysialic acid. With the support of cell viability and cell adhesion experiments it could be shown that polysialic acid-modified materials exhibit an excellent biocompatibility. The first *in vivo* experiments in rats with silicone tubes on which polysialic acid was immobilized confirmed the applicability of these materials for peripheral nerve regeneration by showing the regeneration of a disrupted nerve across a 10 mm gap.

Keywords: biomaterials, nerve regeneration, polysialic acid, silicone modification

Danksagung

Bei der Erstellung dieser Arbeit haben mir viele Menschen auf die eine oder andere Art hilfreich zur Seite gestanden, denen ich hiermit danken möchte.

Der erste Dank geht an Herrn Prof. Dr. Peter Behrens, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und mir ein Thema gegeben hat, das sich auch mit meinem (medizinischen) Interesse deckt. Darüber hinaus bin ich für die Möglichkeiten meine Ergebnisse auf Tagungen präsentieren zu können dankbar, die Verbesserungsvorschläge zu Vorträgen und Präsentationen habe ich als wertvolle Hilfe empfunden. Ebenfalls in Erinnerung werden mir unsere Diskussionen über die neuesten Biathlon-, Radsport und Dopingereignisse genauso wie die Betrachtung von Arthroskopie- und MRT-Bildern bleiben.

Bei Frau PD Dr. Cornelia Kasper möchte ich mich für die Anfertigung des Zweitgutachtens und einer reibungslosen Zusammenarbeit bezüglich der Untersuchung meiner Proben in und durch die Technische Chemie bedanken.

Herrn Prof. Dr. Franz Renz danke ich für die Bereitschaft, sich als weiterer Prüfer zur Verfügung zu stellen.

Ebenfalls danken möchte ich sämtlichen Mitgliedern der PolySia-Forschergruppe für die Zusammenarbeit und der Möglichkeit, tiefere Einblicke in die Biochemie und der Neuroanatomie zu gewinnen. Danken möchte ich Dr. David Schwarzer und Friedrich Freiberger aus der Zellulären Chemie, die mir die endoNF kurzfristig bereit gestellt und sogar „frei-Haus“ geliefert haben, als es zeitlich eng wurde. Darüber hinaus möchte ich mich bei Yohannes Haile für das Messen von Proben und Janett Schaper-Rinkel (beide Neuroanatomie) für das Auszählen tausender Axone bedanken. Ein großer Dank geht an Dr. Kirsten Haastert für die Ermöglichung der extrem kurzfristigen Implantation meiner Siliconschläuche und der Erkenntnis, dass Ratten teilweise eben auch nur Menschen seien (also faul). Darüber hinaus möchte ich mich in der Organischen Chemie bei Dr. Silke Berski für die hilfreichen „organischen“ Tipps die PolySia betreffend und bei Ulrike Eggert, die mir die ersten Ozonisierungsversuche ermöglicht hat, bedanken. Ein großer Dank geht an Stefanie Böhm, Stephanie Bruns, Stefanie Röker und Yvonne Stark aus der Technischen Chemie, die mich nicht nur in den TBA-Test eingewiesen und trainiert haben, sondern auch die ELISA-Tests und die Zellkulturexperimente (vor allem gegen Ende) durchgeführt haben. Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Angehörigen der

Technischen Chemie für die freundliche Aufnahme bedanken, die mir bei meinen bisweilen täglichen „Mess-Besuchen“ zu teil wurde.

Außerdem möchte ich mich bei Matthias Lückmann aus dem Deutschen Institut für Kautschuktechnologie bedanken, der die Plasma-Behandlung meiner Siliconschläuche durchgeführt hat.

Für die Durchführung der TG-Messungen möchte ich mich bei Birgit Beiße, Dr. Falk Heinroth und Olga Kufelt bedanken.

Außerdem danke ich Torben Halfer für die Arbeit an und mit den Sipernat[®]-Proben und Ramona Winkler für ihre Ausdauer beim Messen der Kontaktwinkel.

Darüber hinaus bin ich sehr dankbar, meine Doktorandenzeit in diesem Arbeitskreis verbracht haben zu dürfen. Dabei möchte ich mich nicht nur bei der aktuellen Besetzung (Birgit Beiße, Felix Brieler, Imke Bremer, Anne Christel, Janosch Cravillon, Nina Ehlert, Sebastian Fessel, Birgit Förster, Britta Hering, Olga Kufelt, Jare Lohmeier, Reimar Münnekhoff, Songül Noyun, Georg Platz, Andreas Schaate, Kay Schaper, Andreas Schneider, Christian Schröder, Florian Waltz, Michael Wiebcke, Sina Williams), sondern auch bei den Ehemaligen (Katrin Bokelmann, Falk Heinroth, Michael Jahns, Stefan Klingelhöfer, Christin Menneking, Simon Münzer, Boris Ufer) für die fachliche und soziale Unterstützung zu allen Zeiten bedanken. Unvergessen bleiben vor allem die Arbeiten zu den „Chemical Ghostbusters“, die gemeinsamen Besuche einiger Heimspiele von Hannover 96, das gemeinsame Lösen von Kreuzworträtseln und Sudokus sowie die kulinarisch hochwertigen Weihnachtsfeiern, in deren Anschluss man auch die Möglichkeit erhielt, seine Anatomie-Kenntnisse vor allem bezüglich der Schulter mit Hilfe eines Spanferkels zu erweitern. Ebenfalls viel Spaß hat unser Paddel-Ausflug auf der Örtze gemacht, bei dem es zwei meiner Kollegen und mir mangels mangelhafter Steuerkünste nicht nur gelungen ist, jeden tief hängenden Ast zu erwischen und auf gerade Strecke in einem rechten Winkel in eine Böschung zu fahren, sondern auch unseren Chef und seine Crew zielsicher zu versenken. Vermissen werde ich auf jeden Fall unsere wöchentlichen Fußball-Einheiten, in denen wir vor allem taktische Disziplin, nicht aber unbedingt unsere technischen Fähigkeiten verbessert haben. Trotzdem hat mir unser „Rumpel-Fußball“ fast immer Freude bereitet.

Der größte Dank geht an meine Eltern, die mich in all den Jahren immer und überall unterstützt haben. Deshalb sei ihnen diese Arbeit in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Grundlagen	5
2.1 Nerven	5
2.1.1 Das Nervensystem	5
2.1.2 Periphere Nervenverletzungen und Regeneration	8
2.1.3 Nervenleitschienen	13
2.2 Polysialinsäure.....	18
2.3 Silicone	22
2.3.1 Anwendung von Siliconen in der Medizin	22
2.3.2 Aktivierung von Siliconen	23
3 Analytische Methoden.....	27
3.1 Kontaktwinkelmessungen.....	27
3.2 Infrarot-Spektroskopie.....	28
3.3 Peroxid-Nachweis auf Silicon-Oberflächen.....	28
3.4 Röntgen-Pulverdiffraktometrie.....	29
3.5 Thermoanalytische Methoden	29
3.6 SEARS-Zahl-Bestimmung	29
3.7 PolySia-ELISA	30
3.8 Spezifischer Abbau durch Endosialidase	31
3.9 Zellkulturexperimente	32
3.9.1 Zelladhäsion.....	32
3.9.2 Zellviabilität.....	32
3.10 Thiobarbitursäure-Test	33
3.11 <i>In vivo</i> -Implantation von mit Polysialinsäure beschichteten Siliconschläuchen.....	34

4 Experimenteller Teil.....	37
4.1 Deacetylierung von Polysialinsäure	38
4.2 Anbindung von Polysialinsäure an Glasoberflächen.....	38
4.2.1 Anbindung über 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan	39
4.2.2 Anbindung über 3-Aminopropyltriethoxysilan und Bernsteinsäureanhydrid ...	39
4.3 Anbindung von Polysialinsäure auf Siliconoberflächen	40
4.3.1 Anbindung über 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan	40
4.3.2 Anbindung über 3-Aminopropyltriethoxysilan und Bernsteinsäureanhydrid ...	40
4.3.3 Anbindung über 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan nach Plasma- Behandlung	41
4.4 Anbindung von Polysialinsäure auf Sipernat [®]	42
5 Ergebnisse und Diskussion	43
5.1 Anbindung von Polysialinsäure auf Glas	43
5.1.1 Anbindung von Polysialinsäure über 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan.....	43
5.1.2 Anbindung von Polysialinsäure über 3-Aminopropyltriethoxysilan und Bernsteinsäureanhydrid	71
5.1.3 Vergleichende Diskussion zur Anbindung von Polysialinsäure auf Glasoberflächen	82
5.2 Anbindung von Polysialinsäure auf Siliconen	84
5.2.1 Grundlagen zur Ozon-Behandlung	84
5.2.2 Anbindung von Polysialinsäure über 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan.....	86
5.2.3 Anbindung von Polysialinsäure über 3-Aminopropyltriethoxysilan und Bernsteinsäureanhydrid	107
5.2.4 Vergleichende Diskussion für die Anbindung von Polysialinsäure auf Siliconen	119
5.3 Anbindung von Polysialinsäure auf Sipernat [®]	124
6 Zusammenfassung und Ausblick	134
7 Literaturverzeichnis	134
Anhang.....	134

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
BDNF	brain-derived nerve growth factor
BSA	bovine serum albumin
BSAH	Bernsteinsäureanhydrid
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIK	Deutsches Institut für Kautschuktechnologie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extracellular matrix
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
endoNF	Endosialidase NF
FAS	Fluoralkylsilan
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast growth factor
GNDF	glial-cell-line-derived neurotrophic factor
GOPTES	3-Glycidyoxypropyltriethoxysilan
GOPTMS	3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan
HRPO	horseradish peroxidase
IGF	insulin-like growth factor
IR-	Infrarot-
ISC	immortalisierte Schwann-Zellen
LM	Lösungsmittel
LUH	Leibniz Universität Hannover
Kdn	5-Deamino-3,5-dideoxy-Neuraminsäure
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
MTT	3-(4,5-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N.	<i>Nervus</i>

NCAM	Neurales Zell-Adhäsionsmolekül
NCS	newborn calf serum
Neu5Ac	5- <i>N</i> -Acetyl-Neuraminsäure
Neu5Gc	5- <i>N</i> -Glycol-Neuraminsäure
NGF	nerve growth factor
OTS	Octadecyltrichlorsilan
PBS	phosphate buffered saline
PDMS	Polydimethylsiloxan
PGA	Polyglycolsäure
PLA	Poly-L-Lactid
PNS	peripheres Nervensystem
PolySia	Polysialinsäure
PSA-NCAM	polysialisiertes neurales Zell-Adhäsionsmolekül
PST	Sialyltransferase ST8Sia IV
PTFE	Polytetrafluorethylen
SDS	sodium dodecylsulfate
STX	Sialyltransferase ST8Sia II
TBA	Thiobarbitursäure
TEOS	Tetraethoxysilan
TG	Thermogravimetrie
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Der Bedarf an Biomaterialien, die in der Medizin eingesetzt werden, nimmt mit steigender Lebenserwartung der Bevölkerung stark zu. Dabei müssen die als Implantate verwendeten Materialien vielfältige Ansprüche und Aufgaben erfüllen. Die wichtigste Eigenschaft der Biomaterialien ist dabei die Biokompatibilität, d.h. sie dürfen nach der Implantation keine toxische Wirkung wie z.B. die Entstehung von Entzündungsprozessen im Organismus, in den sie eingebracht wurden, ausüben. Außerdem sollten diese Biomaterialien auch eine dem Bedarf angepasste Biobeständigkeit besitzen, so dass sie vom Wirt-Organismus nicht unkontrolliert abgebaut werden können. In nahezu allen Bereichen der Medizin hat im letzten Jahrzehnt insbesondere die Nachfrage nach bio-resorbierbaren Implantaten stark zugenommen, diese werden je nach Anwendungszweck nach einer gewissen Zeitspanne vom Körper abgebaut bzw. lösen sich langsam auf. Ein Beispiel hierfür ist der in der arthroskopischen Schulterstabilisierung verwendete Suretac-Anker aus Polyglycolsäure, der nach sechs Wochen, sobald die Einheilung des damit befestigten Kapsel-Labrum-Komplex weit genug fortgeschritten ist, seine Festigkeit zu verlieren beginnt und sich nach ca. sechs Monaten komplett aufgelöst hat [1]. Um den herkömmlich verwendeten Fadenankern aus Titan, die lebenslang im Organismus verbleiben, überlegen zu sein, dürfen die Abbauprodukte ebenfalls keine entzündlichen Prozesse hervorrufen, da ansonsten weitere operative Eingriffe notwendig werden.

In Bezug auf die Behandlung von Verletzungen des peripheren Nervensystems ist die Notwendigkeit für die Entwicklung von geeigneten Implantaten allein durch die Zahl von über 300000 jährlich registrierten Verletzungen des peripheren Nervensystems in Europa gegeben [2]. Das periphere Nervensystem betreffende Verletzungen entstehen im Gegensatz zu den Verletzungen des zentralen Nervensystems, die insbesondere als Folge von Hochrasanztraumen auftreten, durch Schnitt- oder Quetschverletzungen sowie als Folge von Knochenbrüchen, bei denen dann die Knochenfragmente zu einer Durchtrennung der peripheren Nerven führen. In diesem Zusammenhang mit aufgeführt werden müssen iatrogene Verletzungen, bei denen es sich um durch den Arzt verursachte Schädigungen eines Nervs handelt. Diese können als Komplikationen bei Operationen auftreten, wenn eine unsachgemäße Lagerung des Patienten vorgenommen oder eine falsche Schnitfführung ausgeführt wurde. Im Gegensatz zum zentralen Nervensystem weisen periphere Nerven ein gewisses Potential für eine Regeneration auf, dennoch kommt es in vielen Fällen zu bleibenden motorischen und sensorischen Missempfindungen bzw. Ausfallerscheinungen, die im schlimmsten Fall mit einem totalen Funktionsverlust einhergehen. Die Fähigkeit zur Nervenregeneration durchtrennter Nerven hängt insbesondere von der Größe des Nervendefekts zwischen dem proximalen (körpernahen) und distalen

(körperfernen) Nervenstumpf ab, eine spontane Regeneration ist beim Menschen bis zu einer Länge von zehn Millimetern zu beobachten. Ist die vorhandene Nervenlücke größer, so muss zwangsläufig ein chirurgischer Eingriff erfolgen. Abhängig von der Größe des Defekts und von der Qualität des Nervenmaterials kann der Chirurg eine direkte Naht der beiden Nervenstümpfe vornehmen oder ein an einer anderen Stelle des Verletzten entnommenes autologes (körpereigenes) Transplantat zur Überbrückung des Defekts verwenden. Da die direkte Naht nur in wenigen Fällen möglich ist und die Verwendung eines autologen Nerventransplantats zwangsläufig mit der Notwendigkeit eines zweiten chirurgischen Eingriffs und einem permanenten Funktionsverlust an der Entnahmestelle des Transplantats einhergeht, wird in den letzten Jahrzehnten vermehrt an der Entwicklung von künstlichen Nervenleitschienen gearbeitet. Diese Nervenleitschienen haben die Aufgabe, das Eindringen von narbenbildenden Zellen an die Defektstelle zu verhindern und sämtliche für die Nervenregeneration notwendigen Transmitter und Zellen an der Läsionsstelle zu konzentrieren und den neu ausprossenden Axonen eine äußere Leitstruktur vorzugeben.

In dieser Arbeit wurde an der Entwicklung einer aus Silicon bestehenden Nervenleitschiene gearbeitet, die mit Polysialinsäure auf der Oberfläche modifiziert wurde. Silicone werden aufgrund ihrer chemischen Inertheit und einer hohen Biokompatibilität seit Jahrzehnten in der Medizin nicht nur als Material für Katheter und Schläuche, sondern darüber hinaus auch für Implantate in der Plastischen Chirurgie und der Orthopädie verwendet. Künstliche Nervenleitschienen aus Siliconen werden bereits seit Jahren in der Praxis eingesetzt und konnten Defekte von bis zu 30 mm erfolgreich überbrücken. Polysialinsäure, ein Homopolymer der α -2,8-verknüpften Sialinsäure, kann während der embryonalen Entwicklung in hohen Dosen im sich entwickelnden Gehirn gefunden werden, wird in der postnatalen Phase weitgehend abgebaut und findet sich im Gehirn des Erwachsenen nahezu ausschließlich in den Bereichen, in denen die neurale Plastizität, also Neuverknüpfung von Nerven und Synapsen, weiterhin stattfindet. Da sie darüber hinaus die Wanderung von neuronalen Stammzellen und das Auswachsen von Nervenzellen nach Verletzungen ebenso wie die axonale Wegfindung fördert und zusätzlich in der Lage ist, durch Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten ein permissives Medium für die Nervenregeneration zu schaffen, ist die Polysialinsäure eine geeignete Substanz, um die Nervenregeneration zu verbessern. Ein weiterer positiver Aspekt der Polysialinsäure ist ihre immunologische Unbedenklichkeit, da sie auf vielen Zellen als Bestandteil des „Zuckermantels“ (Glycocalyx) gefunden wird, was einige neuroinvasive Bakterien wie *Neisseria meningitidis* (Verursacher der Hirnhautentzündung) zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ausnutzen. Darüber hinaus besitzt der menschliche Organismus kein Enzym, das die Polysialinsäure spe-

zifisch abbauen könnte, so dass der Zeitpunkt des Abbaus exakt bestimmt werden kann, wenn das abbauende Enzym, die Endosialidase, von außen zugeführt wird.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Immobilisierung von Polysialinsäure auf verschiedenen Oberflächen ist eines von mehreren Projekten, die innerhalb der DFG-Forschergruppe 548 „Polysialinsäure“ bearbeitet werden. Die Forschergruppe, in der eine interdisziplinäre Zusammenarbeit von Chemikern mit Zellbiologen und Neuroanatomen sowie Polymerchemikern stattfindet, besticht durch ein engmaschiges Netz von Erfahrungs- und Materialaustausch, das in Abb. 1 gezeigt ist.

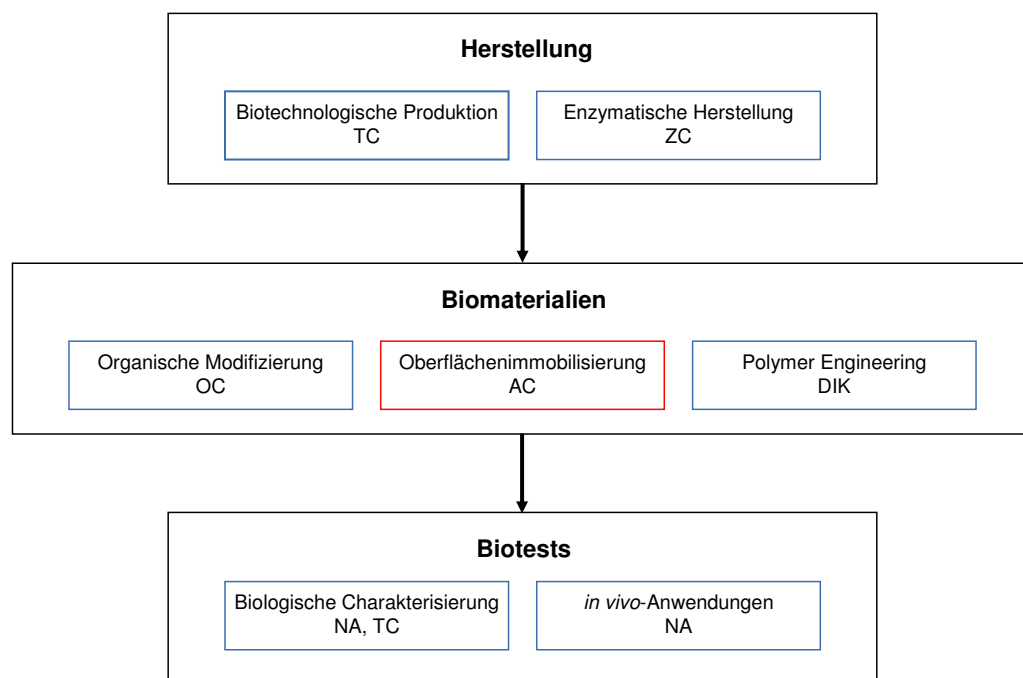


Abb. 1: Struktur der DFG-Forschergruppe 548 „Polysialinsäure“, daran beteiligte Institute: Technische Chemie (TC), Organische Chemie (OC), Anorganische Chemie (AC) (alle Leibniz Universität Hannover); Zelluläre Chemie (ZC), Neuroanatomie (NA) (beide Medizinische Hochschule Hannover); Deutsches Institut für Kautschuktechnologie (DIK).

Ziel der Forschergruppe ist es, Gerüste auf der Basis von Polysialinsäure zu entwickeln, die insbesondere für eine verbesserte Regeneration peripherer Nerven nach Läsionen sorgen sollen.

Die Produktion der Polysialinsäure erfolgt zum einen in Bioreaktoren der Technischen Chemie (Leibniz Universität Hannover, LUH), zum anderen mit Hilfe von Enzymen in der Zellulären Chemie (Medizinische Hochschule Hannover, MHH). Aus der so gewonnenen Ausgangssubstanz werden durch chemische Modifizierungen an den Seitenketten der PolySia verschiedene Derivate mit unterschiedlichen Eigenschaften (Löslichkeit, Quervernetzung) erzeugt. Diese können entweder direkt an die die *in vitro*- und *in vivo*-Charakterisierung vor-

nehmenden Institute der Technischen Chemie oder der Neuroanatomie (MHH) weitergegeben werden oder sie dienen der Anorganischen Chemie (LUH) sowie dem Deutschen Institut für Kautschuktechnologie (DIK) als Ausgangsmaterialien. Im DIK werden Lösungen von Polysialinsäure für das Elektrosponnen verwendet, bei dem Fasern, die u.a. aus PolySia bestehen zu einer Art Netzwerk gesponnen werden können, um z.B. anschließend ein möglicherweise gerichtetes Wachstum von Zellen auf diesen Materialien zu untersuchen. Die Charakterisierung sämtlicher Materialien hinsichtlich der Biokompatibilität und Zellverträglichkeit findet in der Technischen Chemie und der Neuroanatomie statt, wobei letztere auch für die *in vivo*-Untersuchungen zuständig sind. Hierbei werden die von den einzelnen Instituten hergestellten Materialien in defekte Nervenstränge von Ratten eingesetzt und der Erfolg der Nervenregeneration nach einer bestimmten Zeit durch eine Vielzahl von Tests (histomorphometrisch, sensorisch, motorisch, funktionell) bestimmt.

Das Ziel dieser Arbeit war die Immobilisierung von Polysialinsäure auf Siliconschläuchen, um diese dann im Hinblick auf eine mögliche Anwendung als Nervenleitschienen zu untersuchen. Es wurden zwei verschiedene Anbindungssysteme für die Polysialinsäure verwendet. Die erste Methode zur Immobilisierung auf den Substraten bestand aus der Anbindung der Polysialinsäure über ein Epoxysilan (3-Glycidylxypropyltrimethoxysilan), bei der zweiten Methode wurde nach der Beschichtung der Substrate mit einem Aminosilan (3-Aminopropyltriethoxysilan) zunächst Bernsteinsäureanhydrid und in erst in einem weiteren Schritt die Polysialinsäure nach Aktivierung mit *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid immobilisiert. Da die Aktivierung von Siliconen und die Charakterisierung zum einen der aktivierten und zum anderen der mit Polysialinsäure modifizierten Siliconoberflächen nicht ganz einfach ist, wurde die Immobilisierung der Polysialinsäure zunächst auf Glasoberflächen durchgeführt, um die Anbindung der Polysialinsäure als solche zu untersuchen. Der erste Abschnitt der Ergebnisse befasst sich daher mit dem Versuch, die für die Anbindung der Polysialinsäure optimalen Bedingungen auf diesem Substrat herauszufinden. Der zweite Abschnitt des Ergebnisteils beschäftigt sich dann mit der Anbindung von Polysialinsäure auf aktivierten Siliconmaterialien. Außerdem wird das Ergebnis eines ersten *in vivo*-Experiments hinsichtlich der Verwendung von mit Polysialinsäure modifizierten Siliconschläuchen in der Nervenregeneration gezeigt. Der letzte Teil befasst sich mit der Anbindung von Polysialinsäure auf Sipernat[®]-Partikeln, die häufig als Modellsubstanz für die Oberflächenmodifizierung von Nanopartikeln verwendet werden. Die Immobilisierung der Polysialinsäure wurde dabei ausschließlich mit Hilfe der zweiten Anbindungsmethode über das Aminosilan und das Bernsteinsäureanhydrid vorgenommen.

2 Grundlagen

2.1 Nerven

2.1.1 Das Nervensystem

Das Nervensystem des Menschen steuert zusammen mit dem Hormonsystem den Gesamtorganismus, es regelt die Tätigkeit der Atmungsorgane und Eingeweide ebenso wie die der Fortpflanzungsorgane und der Skelettmuskulatur. Die Hauptaufgaben des Nervensystems sind zum einen die Auseinandersetzung des Individuums mit seiner Umwelt und zum anderen die Koordination der einzelnen Organe zu einer funktionellen Einheit. Nach morphologischen Kriterien, d.h. gemäß der Lokalisation im menschlichen Körper, kann das Nervensystem in das zentrale Nervensystem (ZNS) und das periphere Nervensystem (PNS) gegliedert werden. Das ZNS setzt sich aus dem Gehirn und dem Rückenmark zusammen und bildet das Steuerzentrum, in dem Informationen aus dem Körper und der Außenwelt verarbeitet werden. Das periphere Nervensystem stellt eine Verbindung in Form von Nerven zwischen dem zentralen Nervensystem und den Organen her, indem es Informationen in Form von Erregungen aus dem Körper zum ZNS und in Gegenrichtung die Steuerbefehle aus dem ZNS in die peripheren Organe leitet (Abb. 2). Dies geschieht über die zwölf Paare von Hirnnerven, die sowohl rechts als auch links aus dem Hirnstamm entspringen, sowie über 31-33 Paare von Spinalnerven (Rückenmarksnerven), die aus je einem Rückenmarksegment entspringen (8 Hals-, 12 Brust-, 5 Lenden-, 5 Kreuzbein-, 1-3 Steißbeinnerven) [3, 4].

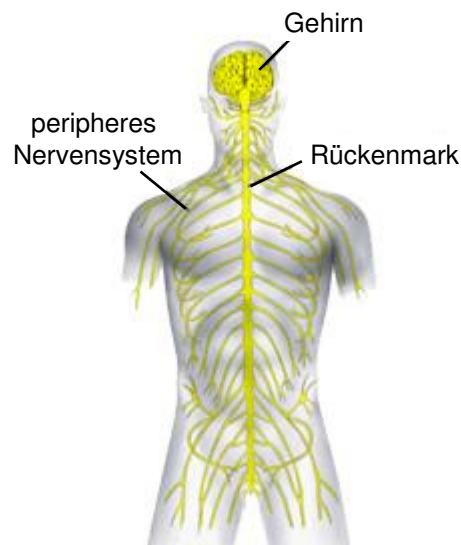


Abb. 2: Wichtigste Strukturen des Nervensystems [5].

Im peripheren Nervensystem wird zwischen afferenten und efferenten Nervenbahnen unterschieden, da Erregungen von Nervenenden oder Sinneszellen nur in eine Richtung geleitet werden können. Dabei leiten afferente Nervenzellen die Erregungen aus der Peripherie zum ZNS, wo die Erregung als Empfindung bewusst wird, während die efferenten Nervenzellen Erregungen vom ZNS in die Peripherie (z.B. zu einem Muskel) leiten.

Auf zellulärer Ebene besteht das Nervensystem im Wesentlichen aus zwei Zelltypen, den Nervenzellen (Neuronen) und den Gliazellen (Stützzellen). Nervenzellen bestehen aus einem Zellkörper (Soma) und zwei Arten von Fortsätzen: Axonen und Dendriten (Abb. 3).

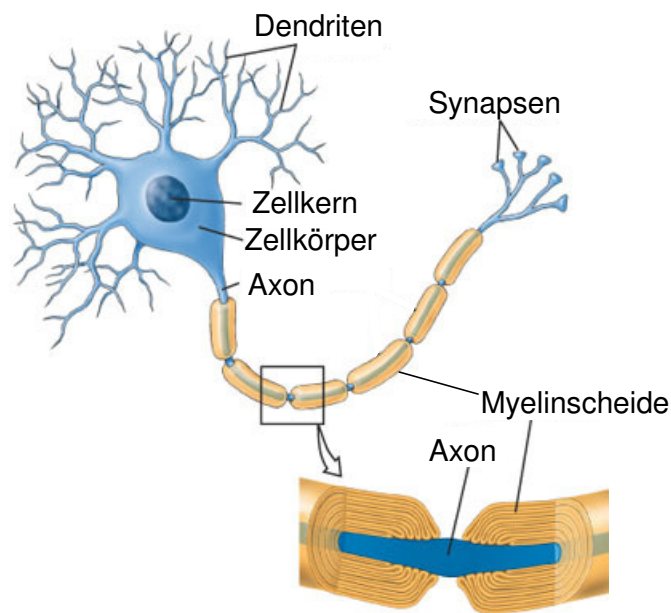


Abb. 3: Aufbau einer Nervenzelle [6].

Der Dendrit ist der afferente Teil einer Nervenzelle, der Erregungen aufnimmt und sie an die übrigen Abschnitte der Nervenzelle weiterleitet. Diese Informationsweiterleitung erfolgt über das Axon, das den efferenten Teil der Nervenzelle darstellt. Jede Nervenzelle besitzt nur ein Axon, das sich allerdings in Seitenäste verzweigen kann, die Länge des Axons kann dabei über einen Meter betragen. Nervenzellen sind hochspezialisiert und haben die Fähigkeit zur Zellteilung verloren, so dass sie bei einer Schädigung nicht ersetzt werden können. Die im Vergleich zu den Neuronen weitaus häufiger vorkommenden Gliazellen bilden eine Art Stützgerüst mit isolierender, schützender und ernährender Funktion. Darüber hinaus bilden die Gliazellen Wachstumsfaktoren, Ionen und bestimmte Botenstoffe. Allen Gliazellen ist gemein, dass sie ihre Teilungsfähigkeit während des Lebens beibehalten und so in der Lage sind, sich an veränderte Situationen anzupassen und neues Nervengewebe zu bilden. Die wichtigsten Gliazellen im ZNS sind Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia, letztere sind Immun-

zellen, die Abbau- und Zerfallsprodukte des ZNS beseitigen. Zu den wichtigsten Gliazellen im PNS gehören die Schwann-Zellen, die die Axone in unterschiedlichem Ausmaß umhüllen und damit an der Bildung myelinisierter und nicht-myelinisierter Nervenfasern beteiligt sind. Dabei umhüllt eine Schwann-Zelle mit unterschiedlich vielen Zellmembranwicklungen jeweils einen Abschnitt des Axons, diese Hülle aus Membranwicklungen wird auch als Myelinscheide bezeichnet. An den Stellen, an denen die Myelinscheiden benachbarter Schwann-Zellen aufeinander treffen, entsteht ein Ranvier-Knoten. Bei nicht-myelinisierten Nervenfasern unterbleibt das Einwickeln in die Zellmembranen der Schwann-Zellen, die Axone senken sich lediglich unterschiedlich tief in aufeinander folgende Schwann-Zellen ein (Abb. 4). Aufgrund der unterschiedlichen Umhüllung erreichen myelinisierte Nervenfasern eine knapp einhundertmal schnellere Reizweiterleitung als nicht-myelinisierte Nervenfasern.

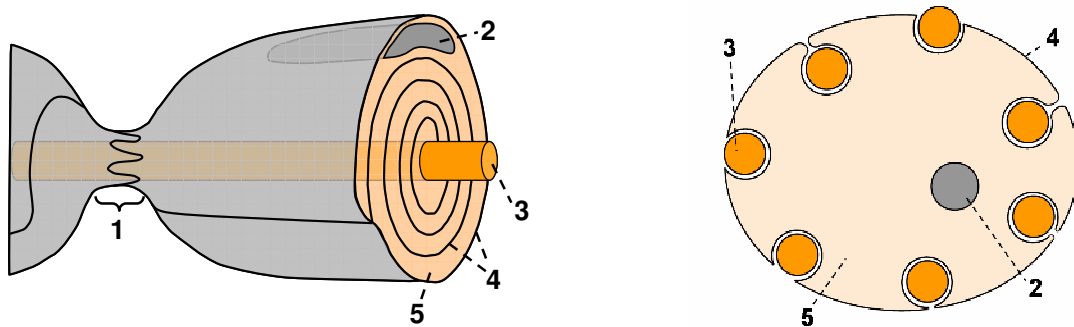


Abb. 4: Myelinisierte (links) und nicht-myelinisierte (rechts) Nervenfaser im PNS. Es gilt: 1 = Ranvier-Knoten, 2 = Zellkern der Schwann-Zelle, 3 = Axon, 4 = Zellmembran der Schwann-Zelle, 5 = Cytoplasma der Schwann-Zelle. Nach [3] und [4].

Ein peripherer Nerv besteht prinzipiell aus drei Komponenten: Bündeln von Nervenfasern, Hüllgeweben und feinen Blutgefäßen. Nach außen hin ist ein peripherer Nerv von einer lockeren Bindegewebsschicht (Paraneurium) umgeben, an das sich nach innen das Epineurium anschließt (Abb. 5). Dieses besteht aus Kollagenfasern und spielt für die elastischen Eigenschaften (Dehnbarkeit, Elastizität) eine wichtige Rolle. Im Inneren des Epineuriums befinden sich mehrere Nervenfaserbündel, die ihrerseits vom Perineurium umhüllt werden. Hauptelemente des Nervenfaserbündels sind die Axone, die in unterschiedlicher Zahl in den Nervenfaserbündeln vorhanden sind und zwischen denen das die Blutgefäße enthaltende Endoneurium liegt.

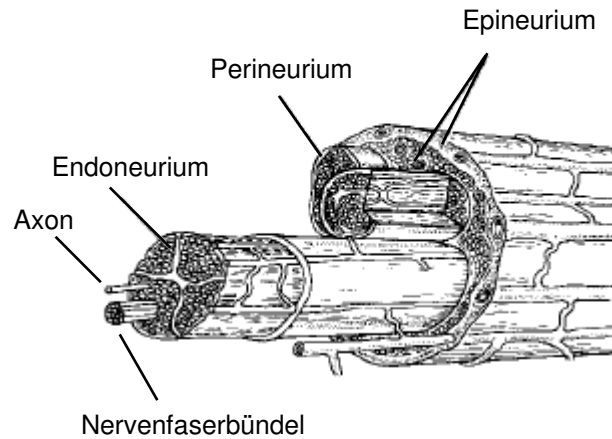


Abb. 5: Struktur eines Nervs, modifiziert nach [7].

2.1.2 Periphere Nervenverletzungen und Regeneration

Nervenverletzungen treten typischerweise als Folge von Unfällen auf; Verletzungen des zentralen Nervensystems entstehen meist durch Verkehrsunfälle, Hochrasanztraumen und Stürzen und führen zu Rückenmarksverletzungen, während es zu Verletzungen der peripheren Nerven in der Regel durch Schnitt- oder Stichverletzungen kommt (Abb. 6).

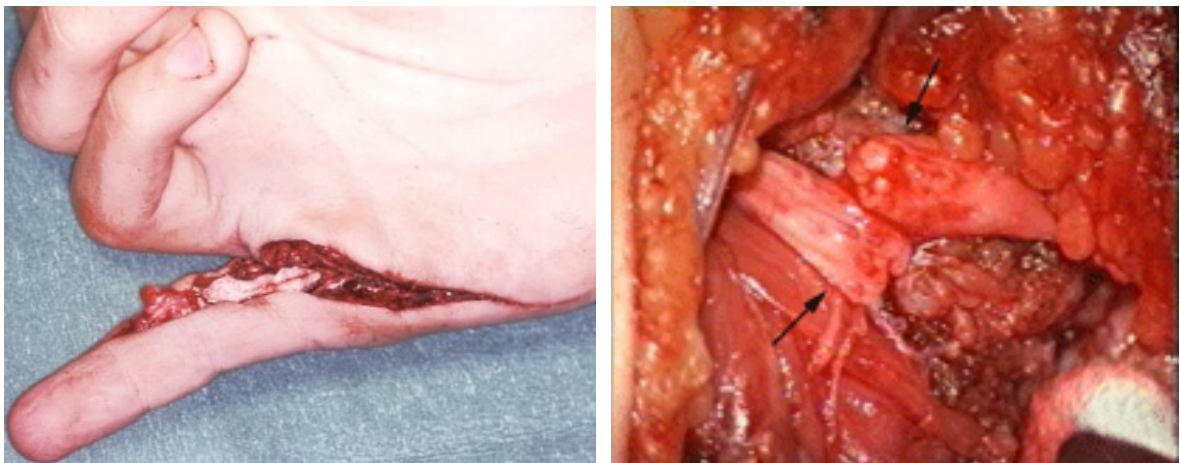


Abb. 6: Schnittverletzung, die zu einer Nervenläsion geführt hat (links); Ansicht eines durchtrennten Nervs (rechts), die Pfeile markieren die beiden Nervenstümpfe [8, 9].

Auch bei Knochenbrüchen treten Nervenverletzungen als Begleitschäden auf, besonders gefährdet sind der *plexus brachialis* und *N. axillaris* bei Schulterluxationen, *N. radialis* bei Humerusfrakturen sowie *N. tibialis* bei Unterschenkelbrüchen [10]. Als Folge von Nervenverletzungen entstehen im ZNS je nach Lage der Verletzung partielle oder totale Querschnitts-

lähmungen, dabei sind diejenigen Organfunktionen betroffen, deren Nerven unterhalb der Läsionsstelle aus dem Rückenmark austreten. Bei Verletzungen peripherer Nerven kann es sowohl zu sensorischen als auch motorischen Ausfallerscheinungen in unterschiedlichen Schweregraden kommen.

Verletzungen des Nervengewebes sind so folgenschwer, da ausgereifte Nervenzellen die Fähigkeit zur Zellteilung verloren haben und somit nicht ersetzt werden können. Welche Folgen eine Schädigung der Nervenzelle zur Folge hat, ist abhängig von der Schwere und der Stelle der Schädigung. Schädigungen am Zellkörper, die im Rückenmark stattfinden, sind nicht reparabel, da der Zellkörper das steuernde Zentrum des Neurons ist. Daher wirkt sich eine Schädigung immer auf alle Zellfortsätze aus. Stirbt eine Nervenzelle ab, so degenerieren in der Folge sämtliche Dendriten, das Axon und die dem Neuron zugehörigen Synapsen. Liegt hingegen „nur“ eine Verletzung am Axon vor, so kann es zu einer Regeneration kommen. Als erste Folge bei einer Axondurchtrennung verliert die Nervenfasern die Fähigkeit zur Reizweiterleitung, der distale (körperferne) Teil des Axons degeneriert in jedem Fall. Unter gewissen Bedingungen kann der proximale (körpernahe) Teil des Axons, der eine Verbindung zum Zellkörper besitzt, wieder in den distalen Teil einwachsen. Die Wahrscheinlichkeit hierfür ist umso größer, je distaler die Läsionsstelle gelegen ist, da die zurückzulegende Strecke damit kürzer ist. Neben dem proximalen Teil des Axons spielen auch die umliegenden Gliazellen eine wichtige Rolle für die Regeneration.

Als Folge der Läsion kommt es innerhalb weniger Tage distal der Läsionsstelle zur WALTERSCHEN Degeneration [11], bei der die aus Schwann-Zellen gebildete Myelinscheide abgebaut wird. Dies geschieht unter dem Einfluss von Proteasen und erfolgt sowohl durch Schwann-Zellen wie auch durch Makrophagen [12, 13]. Diese Zellen schütten Mitogene aus, die Schwann-Zellen und Fibroblasten zur Mitose animieren, und produzieren Cytokine, die die Synthese von Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen stimulieren [14, 15]. Zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren gehören der Nervenwachstumsfaktor (NGF), ein vom Gehirn gebildeter Nervenwachstumsfaktor (BDNF), Neurotrophin 4/5, ein Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor (IGF) sowie Wachstumsfaktoren, die von Gliazellen (GDNF) und Fibroblasten (FGF) gebildet werden. Diese Wachstumsfaktoren sorgen für das Überleben von Nervenzellen und unterstützen die Nervenregeneration [16, 17]. Neben den neurotrophen Faktoren sind auch extrazelluläre Matrices wie Laminin, Collagen, Fibronectin und Zelladhäsionsmoleküle essentiell für eine erfolgreiche Nervenregeneration [18, 19]. Zu Beginn der Regeneration bilden sich am proximalen Ende des Axons ausgehend von den RANVIER-Knoten Axonstümpfe aus, die als Wachstumskegel bezeichnet werden (Abb. 7).

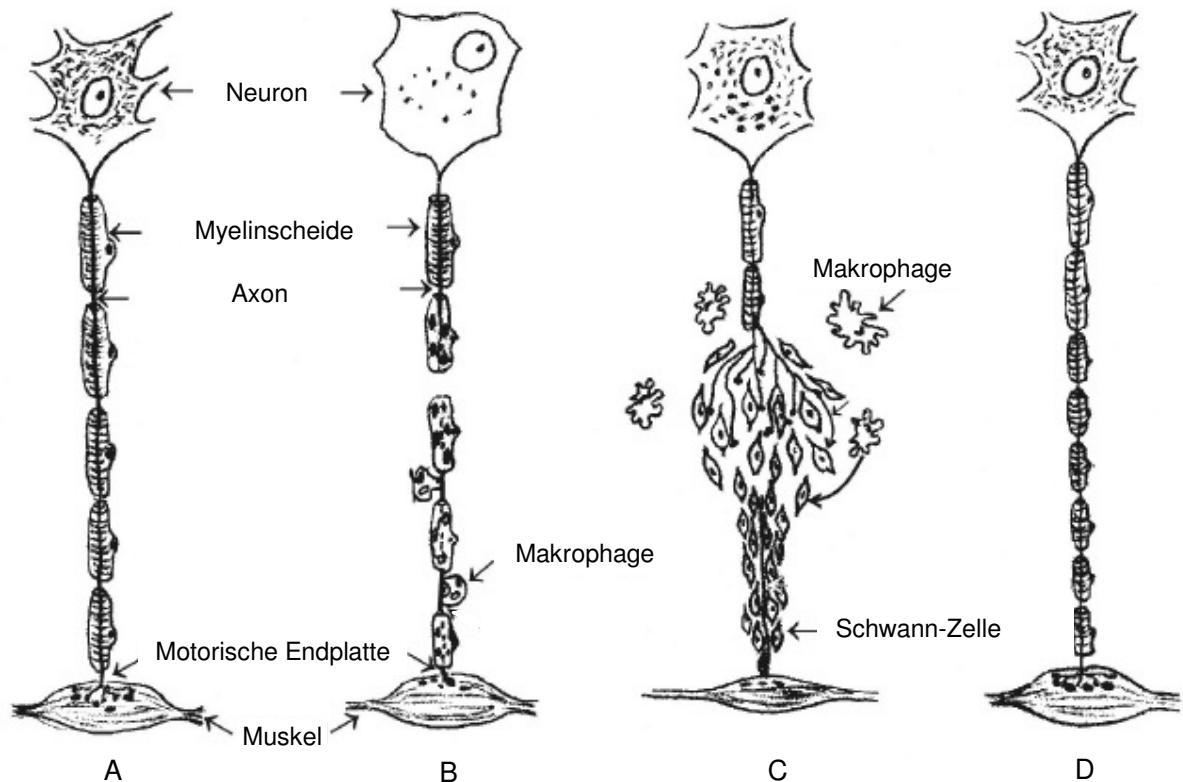


Abb. 7: Schema der Nervenregeneration, entnommen aus [10]. A: kompletter Nerv, B: Nervendurchtrennung, Abbau der Myelinscheide durch Makrophagen im distalen Stumpf, C: Neuaussprossung des Axons im proximalen Stumpf und Bildung des BÜNGNERSCHEN Bandes durch Schwann-Zellen im distalen Stumpf, D: regenerierter Nerv.

Aus diesen Wachstumskegeln sprosst eine Anzahl dünner Fortsätze aus, die in verschiedener Richtung in das Gewebe einwachsen [16]. Im Idealfall erreicht ein Axonspross das Erfolgsorgan, alle anderen gehen zugrunde. Damit dem neu aussprossenden Axon die Wegfindung leichter gemacht wird, bilden proliferierende (sich vermehrende) Schwann-Zellen im distalen Abschnitt eine Zellsäule innerhalb der Basalmembran, das BÜNGNERSCHE Band, das dem Axon als Leitschiene dient [20, 21]. Durch Produktion des Nervenwachstumsfaktors, von Zelladhäsionsmolekülen und anderen trophischen Faktoren bilden die Schwann-Zellen einen idealen Wachstumsuntergrund für das neu aussprossende Axon. Die Wachstumsfaktoren sind nicht nur für das Überleben und Wachstum der beschädigten Axone wichtig, sie leiten auch das neu aussprossende Axon in Richtung des distalen Stumpfes [22]. Schon während des Wachstums wird das dünne Axon durch Schwann-Zellen myelinisiert, die Wachstumsgeschwindigkeit beträgt ein bis vier Millimeter am Tag. Sobald die Re-Innervation des Zielorgans erfolgt ist, setzt das Dickenwachstum ein, der gesamte Regenerationsprozess nimmt in der Regel Monate in Anspruch. Als Komplikationen bei der Regeneration können „falsche“ Innervationen auftreten, bei denen die Axone ein anderes Endorgan erreichen, so dass die ü-

bergeordneten Neurone neu programmiert werden müssen. Außerdem kann es zur Bildung schmerzhafter Neurome kommen, die dann entstehen, wenn es zu einem ungerichteten Wachstum der proximalen Schwann-Zellen kommt, die gemeinsam mit dem auswachsenden Axon einen geschwulstartigen Knoten bilden. Dieses wachstumshemmende Narbengewebe verhindert das weitere Vorwachsen der Axone, so dass die Innervation des Zielorgans unterbleibt [23]. Der wichtigste Faktor ist allerdings die Größe der Lücke zwischen dem proximalen und distalen Nervenstumpf. Bei einer zu großen Defektlücke können die BÜNGNERSCHEN Bänder diese nicht mehr überbrücken und das Axon findet kein Zielorgan. Die Unterstützung der Axonausprossung wird nur wenige Wochen gewährt, erfolgt in dieser Zeit keine Re-Innervation, so bleibt die Regeneration im Falle von motorischen Nerven erfolglos, so dass der entsprechende Muskel seine Funktion verliert [24].

Bei kleinen Defektlücken zwischen den verbliebenen Nervenstämmen ist die Nervennaht die häufigste Behandlungsmöglichkeit [25]. Bei der im Allgemeinen als direkte end-to-end-Naht ausgeführten Technik werden Epineurium und die Perineuralscheiden der jeweiligen Stümpfe der Nervenfaserbündel mit einem extrem dünnen Nahtmaterial, das dünner als ein Haar ist, miteinander vernäht (Abb. 8) [24]. Die so vernähten Strukturen dienen den auswachsenden Axonen analog zu den BÜNGNERSCHEN Bändern als natürliche Leitschienen. Die Naht muss allerdings spannungsfrei erfolgen [26, 27], weil andernfalls die Regeneration unterbleibt.

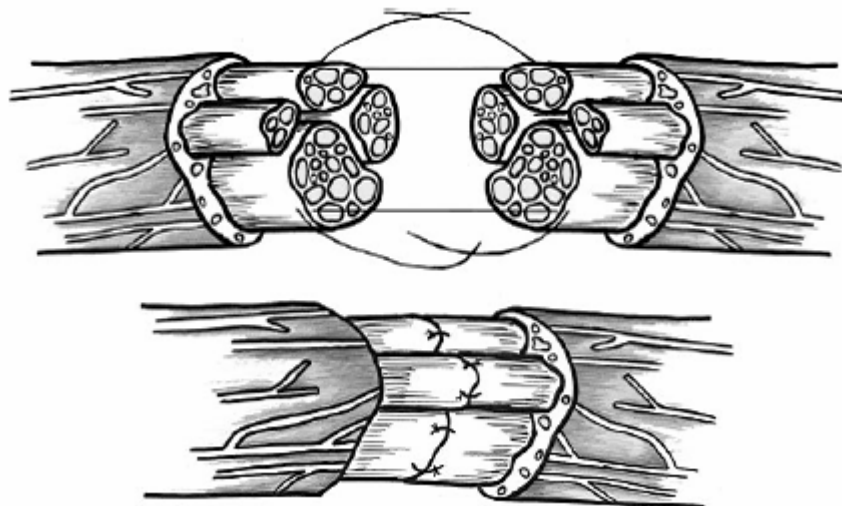


Abb. 8: Nervennaht, entnommen aus [26].

Ist dieses nicht möglich, weil die Defektstrecke zu groß ist, so werden als „goldener Standard“ autologe (körpereigene) Transplantate zur Überbrückung des Defekts verwendet. Am häufigsten werden Nervensegmente des sensorischen *N. suralis* aus dem Fußknöchelbereich verwendet (Abb. 9), aber auch der *N. cutaneus antebrachii medialis* und *N. cutaneus femoris lateralis* werden hierfür eingesetzt [28, 29].

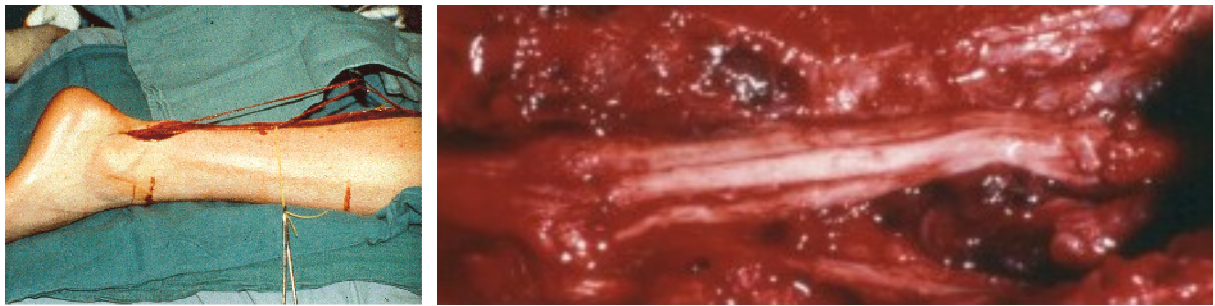


Abb. 9: Entnahme des *N. suralis* (links) und vier Stränge des *N. suralis* als autologes Transplantat (rechts); entnommen aus [30] und [31].

Die Verwendung autologer Transplantate ist allerdings problematisch, da die Entnahme dieser Nerven zu einem permanenten „vertretbaren“ Funktionsverlust führt. Weitere Nachteile sind die Notwendigkeit eines zweiten chirurgischen Eingriffs, die geringe Anzahl an geeigneten Donornerven und ein häufiges mis-match hinsichtlich von Größe und Durchmesser zwischen Donor- und Empfängernerv [29]. Technisch schwierig ist die Annäherung der Endoneuralröhren des Donornervs und des Nervenstumpfs, so dass es zu einer unvollständigen Re-Innervation kommt. Darüber hinaus kann es zur Bildung schmerzhafter Neurome, Narbenbildung und Sensibilitätsstörungen kommen, da auch häufig motorische Nerven mit sensorischen Fasern überbrückt werden müssen.

Auch allogene (körperfremde) Transplantate wurden zur Defektüberbrückung eingesetzt. Hier können aber nicht alle Zellen des Spendernervs komplett durch körpereigene ersetzt werden, so dass mit Abstoßungsreaktionen durch das Immunsystem gerechnet werden muss. Diese Immunreaktion richtet sich vor allem gegen die Schwann-Zellen und die Myelinscheide des Transplantates, so dass eine axonale Regeneration ausgeschlossen ist [32, 33]. Durch Gabe von Immunsuppressiva können diese Immunreaktionen vermieden werden, jedoch kann es hierbei zu lebensbedrohlichen Komplikationen kommen. Auch die Verwendung tierischer Transplantate (Xenografts) für die Behandlung von Nervendefekten ist denkbar, die Probleme aufgrund der auftretenden Immunreaktionen und des Infektionsrisikos haben aber genau wie die schlechten Resultate dazu geführt, dass sich diese Methode nicht etablieren konnte [34, 35].

2.1.3 Nervenleitschienen

Seit einigen Jahrzehnten sind autologe Transplantate das am häufigsten verwendete Nerveninterponat zur Defektüberbrückung peripherer Nerven. Aufgrund der schlechten Verfügbarkeit und auftretender Komplikationen trat aber die Suche nach künstlichen Nervenleitschienen (nerve guidance channels) in den letzten Jahren in den Vordergrund. Beiden Behandlungsmöglichkeiten liegt das Prinzip zu Grunde, den aussprossenden Axonen eine künstliche Leitschiene zu bieten, damit diese die Defektstrecke überwinden können und es so zur erfolgreichen Re-Innervation kommen kann. Die Nervenleitschienen konzentrieren darüber hinaus die vom verletzten Nerv gebildeten chemischen Substanzen wie den Nervenwachstumsfaktor sowie Schwann-Zellen im Inneren der Nervenleitschienen und verhindern das Eindringen von Collagen und narbenbildenden Zellen wie den Fibroblasten. Die ersten Nervenleitschienen wurden 1880 von GLÜCK erfolglos aus Knochen hergestellt [34], nur zwei Jahre später konnte VANLAIR eine Nervenregeneration über eine Defektstrecke von 30 mm durch einen entcalcifizierten Knochen beobachten [36]. Die Verwendung von Tantalröhren während des Zweiten Weltkriegs lieferte nur schlechte Ergebnisse hinsichtlich einer Nervenregeneration [37].

Die an die künstlichen Nervenleitschienen gestellten Anforderungen sind sehr vielfältig: sie müssen biokompatibel sein, dürfen keine toxischen Auswirkungen auf Zellen haben und müssen darüber hinaus auch die geeigneten mechanischen Eigenschaften aufweisen. Nervenleitschienen sollten vor allem dünnwandig und flexibel sein, um dem Chirurgen das Handling während der Operation zu erleichtern. Darüber hinaus ist es vorteilhaft, wenn sie transparent sind, damit der Regenerationsfortschritt beobachtet werden kann, außerdem sollten sie möglichst preiswert und in verschiedenen Längen und Durchmessern zugänglich sein.

Die in den letzten Jahren erforschten Nervenleitschienen können sowohl aus körpereigenem Gewebe sowie natürlichen und synthetischen Polymeren bestehen, sie können sowohl leer als auch mit regenerationsfördernden Substanzen und Zellen befüllt implantiert werden [38, 39]. Bei den aus körpereigenem Gewebe bestehenden Nervenimplantaten handelt es sich vor allem um Muskel- und Veneninterponate, aber auch gemischte Versionen wurden mehr oder weniger erfolgreich eingesetzt. MALIZOS verwendete Veneninterponate, um die sensorischen Nerven des *N. digitalis palmaris* im Unterarm zu ersetzen [40]. Die Ergebnisse, die durch Verwendung der 12 bis 28 mm langen Veneninterponate erzielt wurden, waren dabei geringfügig besser als bei einer herkömmlichen end-to-end-Naht. TANG konnte durch Applikation von 20 bis 45 mm langen Veneninterponaten, in denen je nach Länge des Interponats ein oder zwei jeweils etwa 1 mm lange Stücke von autologem Nervengewebe eingesetzt waren, gute Rege-

nerationsergebnisse bei der Behebung von Defekten in den verschiedenen Unterarmnerven erzielen [41]. Bei Defekten, die größer als 50 mm waren, blieb die Regeneration aus. Venentransplantate haben den Vorteil, dass sie in großer Stückzahl relativ frei verfügbar sind, nachteilig sind ihre dünnen Wände, die besonders bei langen Interponaten zum Zusammenfallen neigen. Die Verwendung von Muskelimplantaten liefert ebenfalls zufrieden stellende Ergebnisse. GLASBY gelang hiermit die Überbrückung von 30 mm-Defekten in den Ulnar- und Radialnerven von Primaten [42]. Bei der Verwendung von Muskelinterponaten werden zuvor die zellulären Bestandteile durch Behandlung mit flüssigem Stickstoff zerstört, die Regeneration findet dann in der intakten Basalmembran der Muskelfasern statt, die den Axonen als Leitschiene dient. Auch die Verwendung kombinierter Muskel-Venen-Interponate kann zu guten Regenerationsergebnissen führen. SPARMANN konnte zeigen, dass Muskelinterponate in gewendeten Venen eine qualitativ fast ebenso gute Regeneration wie autologe Transplantate zeigen [29]. Allerdings ist diese Methode präparativ sehr aufwändig, da sowohl eine Vene gehoben und gewendet als auch Muskelfasergewebe in diese Vene eingeführt werden muss.

Bei den nicht aus körpereigenem Gewebe bestehenden Leitschienen kann zwischen natürlichen und synthetischen Polymeren unterschieden werden. Zu den natürlich vorkommenden Polymeren gehören Laminin, Fibronectin und Collagen, die Bestandteile der extrazellulären Matrix sind. Sie spielen eine wichtige Rolle in der axonalen Entwicklung und bei Regenerationsprozessen im Körper [18]. Collagen, Hauptbestandteil von Sehnen, kann sowohl als Außenmaterial des Nerveninterponats verwendet werden als auch als Füllung von synthetischen Nervenleitschienen die Regeneration beeinflussen. Defekte des *N. ischiadicus* in Ratten konnten nur mit mäßigem Erfolg durch Sehnentransplantate überbrückt werden [43], während in Affen (*macaca fascicularis*) die Verwendung von Rinderbeugesehnen zur Behandlung von 5 mm-Defekten im Handgelenk ähnlich gute Ergebnisse wie eine direkte Nervennaht erzielte [44]. Am häufigsten werden die Proteine der extrazellulären Matrix als Füllmaterial für beispielsweise Siliconschläuche verwendet. CHEN füllte Laminin, Fibronectin und Collagen in Siliconschläuche, die bei 10 mm-Defekten im Hüftnerf von Ratten bessere Resultate als leere Siliconschläuche lieferten [45]. Die Applikation von Fibronectinsträngen und Collagenfilamenten in Ratten über Defekte von 10 bzw. 20 bis 30 mm führte zu ähnlichen Ergebnissen wie mit Hilfe von autologen Transplantaten [46, 47].

Nervenleitschienen, die aus synthetischen Polymeren bestehen, können in biodegradierbare und dauerhafte Implantate unterteilt werden. Zu den abbaubaren Materialien gehören Poly-L-Lactid (PLA), Polycaprolactone, Polyurethane, Polyorganophosphazene, Poly-3-hydroxybutyrat, Polyglycolsäure (PGA) sowie gemischte Gelatine-Collagen-Implantate [16, 48]. Wäh-

rend diese Polymere zumeist durch Hydrolyse langsam in für den Körper ungefährliche Stoffe abgebaut werden, verbleiben Nervenleitschienen aus Polytetrafluorethylen (PTFE) oder Silicon dauerhaft im Körper [49]. Die Applikation von dauerhaften Implantaten beinhaltet das Risiko von Entzündungen und chronischer Nervenkompression, wenn das Interponat einen für den regenerierten Nerv zu geringen Durchmesser aufweist. Dennoch sind Siliconschläuche das am häufigsten verwendete Material für Nervenleitschienen bei Defekten mit einer maximalen Länge von 10 mm [50, 51], bei Behandlung größerer Defekte sind die Ergebnisse deutlich schlechter [52]. Siliconschläuche besitzen einerseits die Vorteile von Inertheit und Elastizität, andererseits sind sie impermeabel gegenüber Sauerstoff und Nährstoffen, können Entzündungen verursachen und sind häufig der Auslöser für eine chronische Nervenkompression (Abb. 10) [53-55]. BRAGA-SILVA verwendete Siliconröhrchen zur Behandlung von Nervendefekten im Unterarm von bis zu 30 mm und erhielt in über 70 % der Fälle ein gutes oder sehr gutes Regenerationsergebnis, wobei bei einem Viertel der Patienten eine Explantation aufgrund von Beschwerden vorgenommen werden musste.

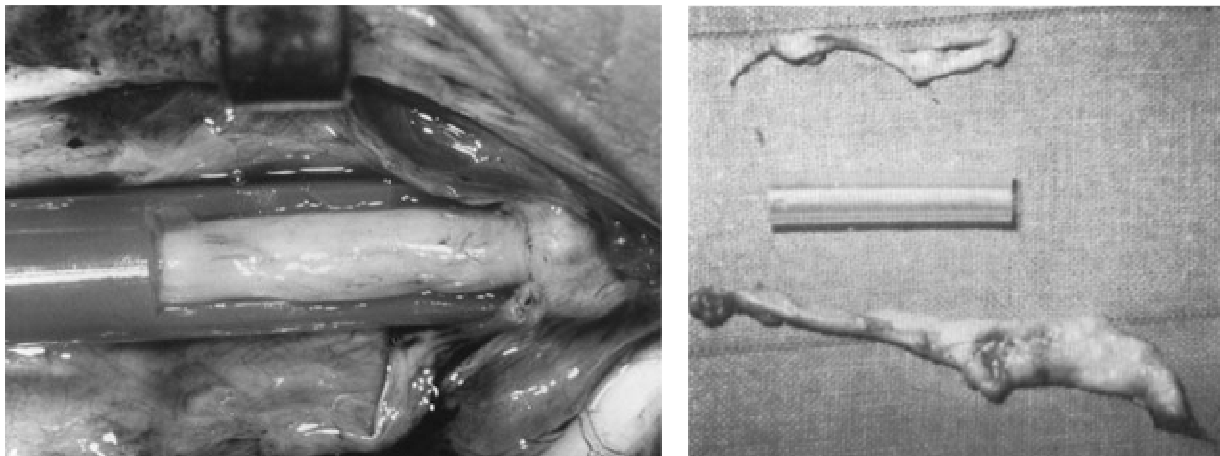


Abb. 10: Regenerierter Nerv in Siliconröhrchen (links), leeres Siliconröhrchen (rechts, Mitte) und entferntes überschüssiges Bindegewebe: aus dem Siliconschlauch (rechts, oben) und externes Bindegewebe (rechts, unten). Entnommen aus [54] und [53].

Auch DAHLIN und LUNDBORG konnten in Langzeituntersuchungen zeigen, dass die Verwendung von Siliconröhren als Nerveninterponate zu ebenso guten klinischen Resultaten wie die Nervennaht führt [51, 55, 56]. Der Gebrauch von PTFE für Nervenleitschienen führt zu widersprüchlichen Ergebnissen. Während SPARMANN von nur dünnen, gruppenweise angeordneten Nervenregeneraten und großen bindegewebigen Narben berichtet [29], führte die von STANEC und STANEC vorgenommene Behandlung eines 29 mm langen Defekts des *N. ulnaris* zu exzellenten motorischen und sensorischen Resultaten [57].

Die Applikation bioresorbierbarer Nerveninterponate soll den Vorteil der Vermeidung von Langzeitschäden wie Entzündungen oder Nervenkompression bieten. Die ideale Nervenprothese soll in einem Zeitrahmen von circa einem Jahr abgebaut werden, da diese Zeitspanne in etwa für die Regeneration eines Nervs benötigt wird. Darüber hinaus sollten die Nervenleitschienen permeabel sein, um Zellen und regenerationsfördernden Substanzen den Zugang zur Defektstelle zu ermöglichen. Die Interponate müssen darüber hinaus mechanisch so stabil sein, dass sie vom Chirurgen mit den Nervenstümpfen vernäht werden und den Bewegungen des Patienten standhalten können [58]. Weitere Eigenschaften eines idealen Nerveninterponats wären die Fähigkeit bioaktive Faktoren wie NGF kontrolliert abzugeben, das Vorhandensein von regenerationsfördernden Zellen wie den Schwann-Zellen sowie eine die Zellmigration vorgebende Matrix im Inneren des Röhrchens wie z.B. intraluminale Kanäle, die die Struktur der Nervenfasern nachahmen [16].

Zu den ersten zugelassenen synthetischen Polymeren für die Nervenregeneration gehörten Polyester wie Polyglycolsäure und Poly-L-Lactid, mit denen Nervendefekte von bis zu 30 mm mit exzellenten Resultaten erfolgreich behoben werden konnten [59]. Polyglycolsäure wird innerhalb von sechs Monaten vollständig resorbiert, führt aber zu ebenso guten klinischen Ergebnissen wie die Nervennaht oder autologe Transplantate [60, 61]. Weitere Polymere, die ihr Potential für die Verwendung als Nervenleitschienen schon bewiesen haben, sind Polyurethane [62], Polyorganophosphazene [63], Polycaprolactone [64, 65], Poly-3-hydroxybutyrat [66, 67] und Hydrogele auf der Basis von Methacrylat [68].

Nicht nur das für die Nervenleitschiene verwendete Material spielt eine wichtige Rolle für die Nervenregeneration, auch in das Interponat angebundene oder eingefüllte Zellen und neurotrophe Faktoren haben einen großen Einfluss darauf. Die Anwesenheit von Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibrin, Collagen und Laminin als Gel-Füllung in künstlichen Nervenleitschienen steigerte das Ausmaß der Regeneration im Vergleich zu leeren Nerveninterponaten, jedoch kann eine zu hohe Konzentration dieser Substanzen die Regeneration auch behindern [69]. Bessere Ergebnisse bezüglich des Ausmaßes der Re-Innervation konnten erreicht werden, wenn die Fibrillen des Collagen-Gels zuvor durch ein Magnetfeld ausgerichtet wurden [70]. DODLA und BELLAMKONDA konnten zeigen, dass ein Konzentrationsgradient von Laminin und NGF einen Einfluss auf die Regenerationsfähigkeit peripherer Nerven besitzt [71]. Sie verwendeten anisotrope Gerüste aus Agarose-Hydrogel, die unterschiedliche Gradienten von Laminin und NGF enthielten. Bei der Behandlung von 20 mm-Defekten des *N. ischiadicus* in Ratten konnten vier Monate nach der Operation nur regenerierte Axone in

den mit dem Konzentrationsgradienten versehenen Hydrogelen beobachtet werden, bei Hydrogelen mit isotroper Verteilung fand keinerlei Regeneration statt.

Aufgrund der besonderen Bedeutung von Schwann-Zellen für die Nervenregeneration gilt ihnen besondere Beachtung, wenn es um die Verbesserung von Nervenleitschienen geht. Während die Wachstumsrate von Axonen in der Maus $77 \mu\text{m}$ pro Tag ohne Schwann-Zellen beträgt, wird sie in deren Anwesenheit mit $283 \mu\text{m}$ pro Tag angegeben [72]. ANSELLIN konnte durch Verwendung von mit autologen Schwann-Zellen besetzten Collagenröhrchen zeigen, dass eine Regeneration der peripheren Nerven über einen 18 mm-Defekt des *N. ischiadicus* in Ratten nur in Anwesenheit der Schwann-Zellen möglich ist [33]. Die als Kontrolle verwendeten, nur mit physiologischer Salzlösung befüllten Collagenröhren führten zu keiner Nervenregeneration. Die Regeneration in Anwesenheit der Schwann-Zellen war überdies abhängig von der Anzahl der eingesetzten Schwann-Zellen, je größer die Zahl der Schwann-Zellen war, umso schneller verlief der Regenerationsprozess. Elementar für diesen Prozess sind vor allem die von den Schwann-Zellen produzierten strukturellen und adhäsiven ECM-Moleküle wie Collagen und Laminin genauso wie die verschiedenen neurotrophen Faktoren, mit denen sie die Nervenregeneration positiv beeinflussen [48]. RUTKOWSKI konnte zeigen, dass die Struktur der Nervenleitschienen ebenfalls einen Einfluss auf die Regenerationsfähigkeit von peripheren Nerven besitzt [73]. Unter Verwendung biodegradierbarer poröser Nervenröhrchen aus Polylactid mit einer strukturierten inneren Oberfläche konnten die Regenerationszeit und die Qualität der Regeneration bei der Behandlung von 10 mm-Defekten des *N. ischiadicus* in Ratten gesteigert werden. Die verwendeten Abmessungen für die Strukturierung mit 4 cm langen, $10 \mu\text{m}$ breiten und $4.3 \mu\text{m}$ tiefen Rillen hatten sich zuvor in *in vitro*-Studien als optimal für die Orientierung von Schwann-Zellen und Neuriten herausgestellt [74]. Der Gruppe um BOZKURT gelang es mit einer dreidimensionalen Struktur auf der Basis von Collagen und einem verbundenen Porensystem die bei der Nervenregeneration gebildeten BÜNGNERSCHEN Bänder nachzuahmen und somit die Nervenregeneration zu verbessern [75].

Auch die Applikation genetisch veränderter Schwann-Zellen wurde bereits eingehend untersucht [76]. Die Verwendung von vermehrt FGF-2 ausschüttenden Schwann-Zellen in einer Matrigel-Füllung von Siliconschläuchen sorgte für eine Regeneration des *N. ischiadicus* über einen 15 mm-Defekt [77, 78], bei dem normalerweise keine spontane Regeneration zu erwarten ist [50]. GRAVVANIS veränderte Schwann-Zellen genetisch derart, dass sie vermehrt Sialyltransferase-X (STX) produzieren [79]. STX ist ein Enzym, das das neurale Adhäsionsmolekül (NCAM) in seine polysialylierte Form überführt, die für die Direktion von Axonen von großer Bedeutung ist. Die genetisch veränderten Schwann-Zellen wiesen eine wesentlich grö-

ßere Beweglichkeit auf und führten sowohl zu einer Erhöhung des Durchmessers der Nervenfasern als auch der Dicke der Myelinscheide und verbesserten das funktionelle Resultat, wenn sie in Siliconschläuchen eingesetzt wurden.

2.2 Polysialinsäure

Polysialinsäure (PolySia) ist ein lineares Homopolymer der α -2,8-verknüpften Sialinsäure und wurde 1982 von FINNE [80] als ein Bestandteil des Gehirns von Vertebraten entdeckt. Bei den Sialinsäuren handelt es sich um α -Keto-Zucker, die eine Kettenlänge von neun Kohlenstoffatomen besitzen und am Kohlenstoffatom C-1 eine Carboxylfunktion tragen (Abb. 11).

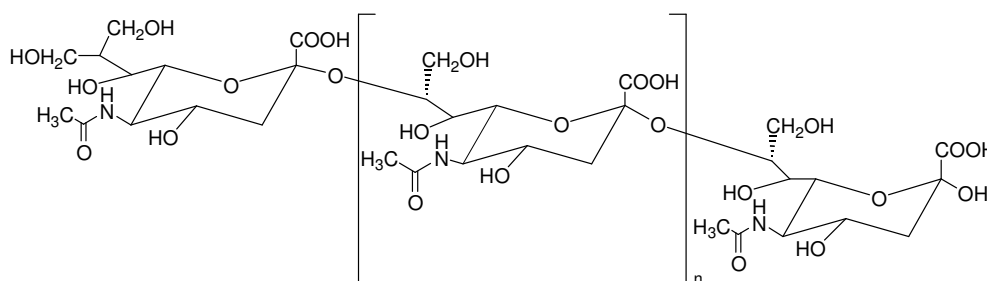


Abb. 11: Beispiel für die Struktur der Polysialinsäure aus α -2,8-verknüpften 5-*N*-Acetyl-Neuraminsäureeinheiten.

Von den mehr als 50 bekannten Sialinsäuren gehören die 5-*N*-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac), die 5-*N*-Glycol-Neuraminsäure (Neu5Gc) und die 5-Deamino-3,5-Dideoxy-Neuraminsäure (Kdn) zu den drei häufigsten Baueinheiten der Polysialinsäure (Abb. 12) [81, 82].

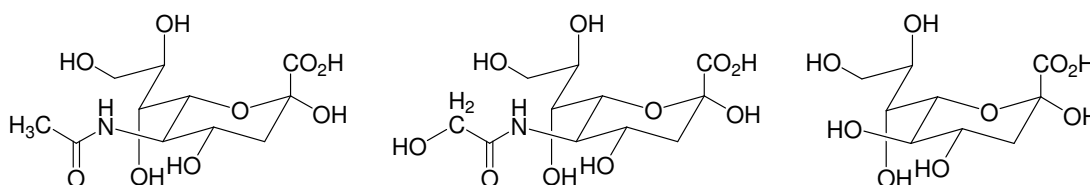


Abb. 12: Strukturen der häufigsten Baueinheiten der Polysialinsäure: 5-*N*-Acetyl-Neuraminsäure (links), 5-*N*-Glycol-Neuraminsäure (Mitte) und 5-Deamino-3,5-Dideoxy-Neuraminsäure (rechts).

Kommerziell erhältlich ist das Natriumsalz der Polysialinsäure, Colominsäure, die einen Polymerisierungsgrad von 30 bis 60 aufweist und durch saure Hydrolyse aus der Polysaccharid-Kapsel von *Escherichia coli* K1 isoliert werden kann [83].

In der Natur kommt Polysialinsäure hauptsächlich im Nervensystem von Vertebraten vor, wird aber auch als Bestandteil des Zuckermantels (Glycocalyx) von Bakterien gefunden. Einige neuroinvasive Bakterien wie *Escherichia coli* K1 und *Neisseria meningitidis*, die zu den

Hauptverursachern von Meningitis (Hirnhautentzündung) und Sepsis gehören, produzieren Polysialinsäure und präsentieren diese auf ihrer Zelloberfläche [84]. Diese Polysialinsäure ist chemisch und immunologisch identisch zu der Polysialinsäure, die im menschlichen Körper vorkommt, so dass durch die Nachahmung körpereigener Strukturen (Mimikrie) das Immunsystem die Bakterien nicht als körperfremd erkennt und so das Immunsystem keine Möglichkeit besitzt, Antikörper zu produzieren und die Eindringlinge zu bekämpfen [85, 86].

Anders als viele andere Kohlenhydrate, die in Vertebraten Bestandteil der Glycocalyx sind, ist die Polysialinsäure nahezu ausschließlich an das neurale Zell-Adhäsions-Molekül (NCAM) gebunden [87-89]. Das NCAM gehört zur Familie der Immunoglobuline, wird auf der Oberfläche von Zellen gefunden und regelt die Zelladhäsion und Zell-Zell-Erkennung zwischen verschiedenen Zellen [90, 91]. Während der embryonalen Entwicklung kann das polysialisierte NCAM (PSA-NCAM) nahezu im gesamten Gehirn gefunden werden, während in der postnatalen Phase die Bildung von Polysialinsäure stark zurückgeht. Im erwachsenen Gehirn kann die Polysialinsäure nur noch in den Bereichen gefunden werden, in denen ununterbrochen die Neubildung von Nervenzellen (Neurogenese), Migration von Nervenzellen und Synapsenbildung stattfindet, z.B. im Hippocampus oder *bulbus olfactoris* (Riechkolben) [92]. Die Bildung der Polysialinsäure wird durch zwei Sialyltransferasen, ST8Sia II (STX) und ST8Sia IV (PST) enzymatisch katalysiert. Diese beiden Enzyme sind während der Entwicklung zu unterschiedlichen Zeiten aktiv. Während STX die Ausschüttung von PSA-NCAM während der embryonalen, peri-natalen und frühen postnatalen Entwicklung steuert, ist die PST im adulten Gehirn aktiv [93, 94].

Eine der Hauptaufgaben der Polysialinsäure ist die Regulation der durch das NCAM vermittelten Zell-Zell-Kontakte. Durch ihren sterischen Anspruch und ihre Ladung sorgt die Polysialinsäure für eine anti-adhäsive Wirkung, so dass die Anzahl der Zell-Zell-Kontakte verringert wird (Abb. 13) [91].

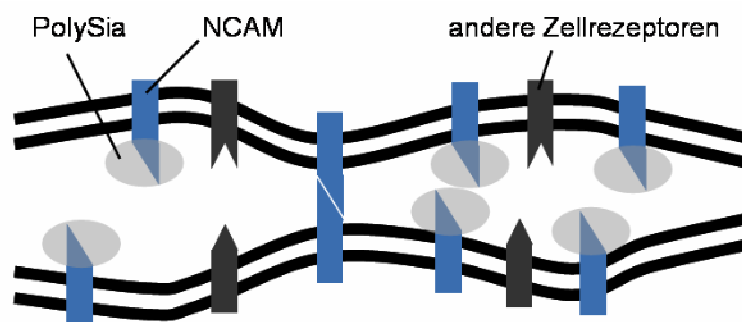


Abb. 13: Verringerung der Zell-Zell-Kontakte durch sterischen Einfluss der Polysialinsäure [91].

Durch diese anti-adhäsive Wirkung der Polysialinsäure entsteht ein permissives Medium, das für die Migration von Zellen [95, 96], dem Aussprossen und der Wegfindung von Axonen [97] sowie der Neubildung bzw. Neuverknüpfung von Synapsen [98, 99] eine wichtige Rolle spielt.

Wie durch Versuche an polysialinsäure-defizitären Mäusen gezeigt werden konnte [87], bei denen Einschränkungen in der räumlichen Orientierung in Folge einer krankhaften Veränderung des Hippocampus bestehen, wird der Polysialinsäure ebenfalls eine große Bedeutung in Lern- und Gedächtnisprozessen zugeschrieben [92, 100]. Wird beispielsweise während der Wanderung von neuronalen Vorläuferzellen aus der subventrikulären Zone in Richtung des *bulbus olfactoris* die Polysialinsäure entfernt, so reichern sich die Zellen auf dem so genannten rostralen Migrationsweg an, so dass der *bulbus olfactoris* in Ermangelung an Zellen eine deutlich geringere Größe und somit auch Funktion aufweist [95]. Im Zusammenhang mit dem Aussprossen von Axonen ist die permissive Rolle der Polysialinsäure eminent wichtig. Im peripheren Nervensystem wird die Bildung von Polysialinsäure von Motoneuronen forciert, wenn sie sich zu muskelspezifischen Nervenfaserbündeln anordnen. Wird nun die Polysialinsäure durch die Endosialidase (endoNF), ein für den Abbau von Polysialinsäure spezifisches Enzym, entfernt, so kommt es zu Fehlern in der axonalen Wegfindung. TANG et. al. konnten ebenfalls nachweisen, dass die Entfernung von Polysialinsäure durch endoNF zu einer vermehrten Bündelung der Axone mit ihren jeweiligen Nachbarn kommt (Abb. 14) [101].



Abb. 14: Neu aussprossende Axone in Anwesenheit (links) und in Abwesenheit (rechts) von PolySia. Deutlich zu erkennen ist die vermehrte Bündelung der Axone nach Entfernung der PolySia durch endoNF, dadurch geringe Innervationsrate am Zielorgan; nach [101].

Dadurch ist die Aussprossung wesentlich geringer und den Axonen fehlt die Möglichkeit, auf äußere Einflüsse hinsichtlich einer Verknüpfung mit dem Zielorgan (z.B. einem Muskel) zu reagieren, so dass diese Verknüpfung unterbleibt [102]. Bei genetisch veränderten Mäusen, bei denen die für die Synthese der Polysialinsäure zuständigen Enzyme STX und PST ausgeschaltet wurden, wurden neben einer Hydrozephalusbildung auch ein gestörtes post-natales

Wachstum und eine deutlich erhöhte Morbiditätsrate festgestellt [103]. Durch zusätzliches Ausschalten des für die NCAM-Bildung zuständigen Gens konnten einige der oben beschriebenen Defekte verhindert werden, womit gezeigt werden konnte, dass die auftretenden Defekte durch einen Gewinn an NCAM-Funktionen in Abwesenheit der Polysialinsäure entstehen. Dieser Sachverhalt verdeutlicht, wie wichtig Polysialinsäure für die Kontrolle und Koordination von NCAM und somit auch Zell-Zell-Kontakten u.a. bei der Entwicklung des Gehirns ist.

Polysialinsäure kann spezifisch nur durch die Endosialidase (endoNF) abgebaut werden, die aus einem *Escherichia coli K1* infizierenden Phagen isoliert wird. Da im menschlichen Körper dieses Enzym nicht vorhanden ist, besitzt die Polysialinsäure eine lange Halbwertszeit im Blutkreislauf. Somit besitzt sie ein großes Potential, um als Trägermolekül für drug-delivery-Systeme eingesetzt zu werden [104]. Polysialinsäure wird darüber hinaus als Tumormarker verwendet. Zahlreiche bösartige, stark streuende Tumore wie Wilms' Tumor, Neuroblastoma oder Rhabdomyosarcoma verursachen eine Freisetzung von hohen Dosen an Polysialinsäure, die in vielen Fällen mit einer schlechten Prognose für den Patienten einhergehen [105, 106].

Für eine Anwendung von Polysialinsäure in der Nervenregeneration sprechen mehrere Aspekte. Zum einen üben weder die Polysialinsäure noch ihre nach Anwendung von endoNF entstehenden Spaltprodukte eine toxische Wirkung auf Zellen aus – sie dienen sogar den Zellen als Nahrungsquelle – zum anderen ist sie unter Zellkulturbedingungen stabil und lässt sich daher gut kultivieren [107]. Außerdem besteht die Möglichkeit, den Zeitpunkt des Abbaus durch Applikation von endoNF genau zu terminieren. Dass die Polysialinsäure neben ihrer wichtigen Funktion bei der Neubildung von Nervenverbindungen während der Entwicklung des Nervensystems auch fördernd für die Nervenregeneration ist, konnten MULLER et al. durch Messungen anhand der für die Bildung von neuen Synapsen über eine Läsionsstelle benötigten Zeit zeigen. In Abwesenheit von PSA-NCAM kommt es zu einer Verzögerung im Aussprossen der Axone, so dass daraus geschlossen werden kann, dass die Anwesenheit von Polysialinsäure förderlich für die Nervenregeneration ist [108]. Die Gruppe von LAVDAS konnte die Migration der für die Nervenregeneration essentiellen Schwann-Zellen fördern, indem sie diese genetisch so verändert haben, dass diese Polysialinsäure ausschütten, ohne Einschränkungen hinsichtlich der Überlebensfähigkeit und Differenzierung hinnehmen zu müssen [109]. FRANZ et al. beobachteten, dass die Axone von Motoneuronen nach einer Läsion beim Überschreiten der Läsionsstelle Polysialinsäure in hohen Dosen ausschütten [110]. Außerdem konnten sie feststellen, dass die Motoneuronen in Anwesenheit von Polysialinsäure selektiv eine Innervation im Muskelgewebe anstrebten, während in polysialinsäure-defizitären Mäusen die-

ses nicht der Fall war. Ohne die Anwesenheit von Polysialinsäure war auch die Aussprossung der Axone sowie die Rückbildung fehlgeleiteter Axone deutlich verringert, was für die Wichtigkeit der Polysialinsäure für eine selektive Innervation von sich neu bildenden Nervenverknüpfungen spricht.

2.3 Silicone

Silicone gehören zu den synthetischen Polymeren, deren Rückgrat aus sich wiederholenden (Si–O)-Bindungen besteht. Zusätzlich binden die Siliciumatome an organische Gruppen, die im Falle von Polydimethylsiloxan (PDMS) Methylgruppen sind (Abb. 15).

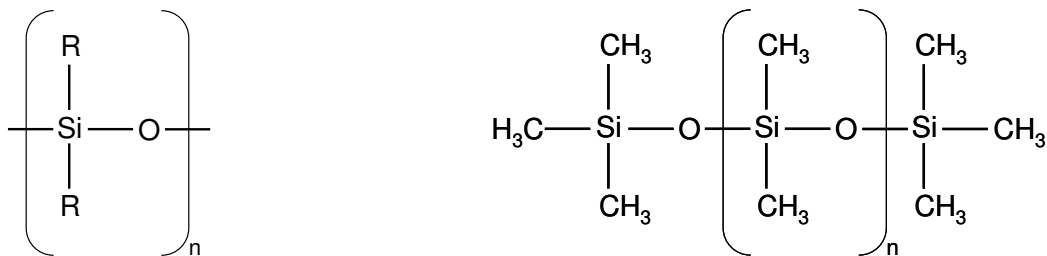


Abb. 15: Allgemeine Struktur von Siliconen (links) und Struktur von PDMS (rechts).

Die Methylgruppen können dabei auch durch andere funktionelle Gruppen wie Vinyl, Phenyl oder Trifluoropropyl ersetzt werden. Aufgrund dieser Mischung zwischen organischen Seitenketten und anorganischem Gerüst besitzen Silicone einzigartige Eigenschaften, die eine Anwendung als Flüssigkeit, Emulsion, Harz oder Elastomer ermöglichen. Silicone werden beispielsweise aufgrund ihres geringen Gewichts und ihrer Beständigkeit gegenüber hohen und niedrigen Temperaturen in der Luft- und Raumfahrtindustrie verwendet. Außerdem sind sie elektrische Isolatoren und werden wegen ihrer Langzeitstabilität gegenüber Witterungseinflüssen als Dichtungsmaterial, Klebstreifen und wasserdichte Beschichtungen eingesetzt. Darüber hinaus sind sie sowohl resistent gegenüber UV-Licht als auch inert gegenüber den meisten Chemikalien.

2.3.1 Anwendung von Siliconen in der Medizin

Eines der wichtigsten Einsatzgebiete von Siliconen ist die Medizin, da Silicone sowohl biokompatibel wie auch biobeständig sind. Silicone verursachen also weder unerwünschte Prozesse wie Entzündungen oder Mutationen im Körper noch werden sie vom Körper abgebaut. Darüber hinaus haben sie eine anti-adhäsive und anti-koagulierende Wirkung, so dass es bei-

spielsweise nicht zur Verklumpung von Blut auf Siliconoberflächen kommt [111]. Diese Eigenschaften liegen insbesondere in der Hydrophobizität, der geringen Oberflächenspannung und der thermischen sowie chemischen Stabilität der Silicone begründet.

Zu den ersten berichteten Anwendungen im menschlichen Körper gehörte der von LAHEY 1946 durchgeführte Ersatz der Gallenwege, der nur zwei Jahre später durch eine künstliche Harnröhre gefolgt wurde [112, 113]. Weitere wichtige Anwendungen von Siliconen in der Medizin sind der Hydrocephalus-Shunt, über den angesammelte Hirnflüssigkeit bei der Behandlung des „Wasserkopfes“ abgeführt werden kann, Katheter, Dränagen, Spritzen sowie Komponenten in Herz-Lungen-Maschinen, Dialyseapparaten und Bestandteile von Herzklappen. Darüber hinaus werden sie als Gelenkersatz in den kleineren Gelenken von Händen und Füßen [114, 115], aber auch als Ersatz des Ulnaköpfchens und als Bestandteil von Knieprothesen eingesetzt [116]. Siliconmaterialien werden außerdem als Implantate in der Plastischen Chirurgie verwendet, wenn es um den Ersatz oder die Neumodellierung von Brüsten, Hodensäcken, Kinnen, Nasen, Wangen, Waden oder des Gesäßes geht. Hierbei wird in der Regel ein Silicongel verwendet, das nur schwach quervernetzt ist und dem weder Silica noch andere Füllmaterialien beigemischt worden sind. In der Zahnmedizin sind Silicone für die exakte Abformung der Zahnreihen und der Kiefer unerlässlich, um Präzisionsmodelle herstellen zu können. Eine weitere wichtige Anwendung ist der Einsatz von Siliconschläuchen als Nervenleitbahnen in der Behandlung von Läsionen peripherer Nerven [50]. Dabei überbrückt der Siliconschlauch die Lücke zwischen den verbliebenen Nervenstümpfen, verbessert die Nervenregeneration durch Konzentration von Zellen und neurotrophen Faktoren im Inneren des Schlauches und verhindert das Eindringen von narbenbildenden Zellen.

2.3.2 Aktivierung von Siliconen

Der Einsatz von Siliconen in der Medizin erfolgt vor allem deshalb, weil Silicone inert sind und nur wenig negative Einflüsse auf den menschlichen Körper haben. Um die Biokompatibilität zu erhöhen, wird die Siliconoberfläche in der Regel mit Proteinen oder Polyethylenglycol (PEG) modifiziert. PEG-modifizierte Oberflächen haben anti-adhäsive Eigenschaften gegenüber Proteinen, Komponenten des Blutes sowie Zellen, was zur Folge hat, dass die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Blutgerinnseln und Verkalkungen reduziert wird [117-119].

Die am häufigsten verwendete Methode, um das inerte Polymer Silicon reaktiv zu machen, ist die Oberflächenoxidation, bei der eine Vielzahl von polaren Gruppen auf der Oberfläche generiert wird. Werden Silicone einem Plasma von oxidierenden Gasen oder der Luft nach Behandlung mit einem Inertgas-Plasma ausgesetzt, so bilden sich nicht nur Peroxide, sondern

auch Carbonyl- und Carboxylgruppen auf der Oberfläche [120]. Die entstandenen Peroxide sind in der Lage, die radikalische Polymerisation von Vinylmonomeren zu initialisieren [121]. Peroxide können ebenfalls durch Bestrahlung mit Gamma-Strahlung, Elektronenstrahlen oder UV-Licht sowie durch Glimm- und Coronaentladung erzeugt werden [122-124]. Neben der Bildung von Peroxiden finden durch die Plasma-Behandlung bis in eine Tiefe von bis zu mehreren hundert Nanometern unter der Polymeroberfläche noch weitere chemische Veränderungen statt. Es kommt vor allem zur Bildung polarer Gruppen, die Hydroxylgruppen enthalten, und die zum Entstehen einer hydrophilen Oberfläche beitragen. OWEN berichtet sogar von einer dünnen (ca. 10 nm), Silica-ähnlichen Schicht, die sich im Anschluss an eine Plasma-Behandlung in unterschiedlichen Gasen wie Argon, Helium, Sauerstoff und Stickstoff auf der Oberfläche von Siliconen bildete [125]. Diese Schicht weist mit 47 % einen höheren Sauerstoff- und mit 31 % einen niedrigeren Kohlenstoff-Gehalt als unbehandelte Stellen des Polymers auf (26 % Sauerstoff, 50 % Kohlenstoff); die Siliciumatome sind überwiegend an drei oder vier Sauerstoffatome gebunden. In dieser Silica-Schicht befinden sich in der Regel zwischen 0.3 und 0.5 μm tiefe Risse [126, 127], die für das so genannte „hydrophobic recovery“, also für die Wiederherstellung der hydrophoben Oberfläche nach einer Plasma-Behandlung, verantwortlich sind. In diesen Rissen findet eine durch die Oberflächenspannung hervorgerufene Migration von freien Polymerketten aus dem Inneren des Materials an die Siliconoberfläche statt, wo die durch die Aktivierung gebildeten polaren Gruppen von den freien Polymerketten geschützt werden.

Eine weitere Methode zur Oberflächenaktivierung von Siliconen ist die Ozonisierung. Hierbei können durch die Behandlung mit Ozon gleichmäßig Peroxide auf der Siliconoberfläche erzeugt werden, auch dann, wenn beispielsweise komplizierte Formen oder Geometrien vorliegen [128].

Das mit Hilfe eines Ozonisators erzeugte Gas besitzt eine komplexe Zusammensetzung aus verschiedenen Molekülen und Ionen in angeregten Zuständen. Neben einzelnen Sauerstoffatomen, Sauerstoff- und Ozonmolekülen treten auch folgende Spezies auf: $\text{O}, \text{O}_2, \text{O}_3, \text{O}_4, \text{O}^+, \text{O}_2^+, \text{O}_3^+, \text{O}_4^+$ [129]. Ozon entsteht, wenn Luft oder Sauerstoff zwischen zwei Elektroden hindurchgeleitet wird und dabei stille elektrische Entladungen erfährt. Die Ozonisierung ist somit ein einfach zu handhabendes und ökonomisches Verfahren, um eine Silicon- bzw. Polymeroberfläche zu funktionalisieren. DIAZ-QUIJADA und WAYNER modifizierten PDMS-Oberflächen mit 3-Aminopropyltriethoxysilan nach einer Ozonbehandlung [130], woran sich in einem zweiten Schritt die Immobilisierung eines Oligonucleotids anschloss. Gegenüber vorhergehenden Publikationen [131] gelang ihnen auch ohne gleichzeitige UV-

Bestrahlung eine relativ homogene Oxidation der Siliconoberfläche. Überdies hinaus ist die Oberfläche angeraut, aber nicht beschädigt, wie es nach eine Plasma-Behandlung oder Coronaentladung der Fall wäre. XU konnte beobachten, dass eine Behandlung von Siliconfilmen mit 2-Methacryloyloxyethylphosphorylcholin nach Ozonisierung zu einer verbesserten Hemo-kompatibilität führt, da im Vergleich zu unmodifizierten Siliconfilmen keine Adhäsion von Thrombozyten auftritt [132]. Dieses Material ist somit geeignet für die Beschichtung von medizinischen Apparaturen, die mit Blut in Kontakt kommen.

3 Analytische Methoden

3.1 Kontaktwinkelmessungen

Die Messungen des statischen Kontaktwinkels wurden in dieser Arbeit genutzt, um nach den einzelnen Reaktionsschritten die Oberflächenmodifizierung auf den Objektträgern und Siliconplatten zu überprüfen. Als Kontaktwinkel wird der Winkel zwischen einem Flüssigkeitstropfen und einer Festkörperoberfläche bezeichnet (Abb. 16).

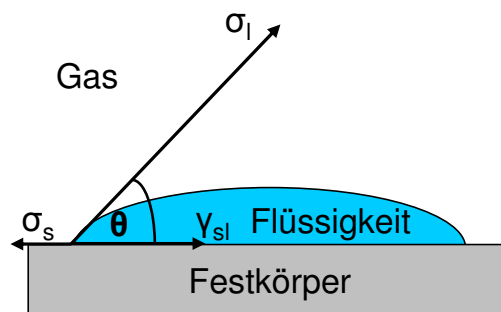


Abb. 16: Kontaktwinkelbildung auf einer Festkörperoberfläche nach YOUNG.

Hierbei bezeichnen σ_s und σ_l die Oberflächenspannungskomponenten der festen bzw. der flüssigen Phase, γ_{sl} die Grenzflächenspannung zwischen den beiden Phasen und θ den Kontaktwinkel. YOUNG formulierte für diese Größen folgenden Zusammenhang:

$$\cos \theta = \frac{\sigma_s - \gamma_{sl}}{\sigma_l} \quad (1)$$

Da eine Schicht des Epoxysilans GOPTMS im Vergleich zu PolySia eine wesentlich geringere Hydrophilie aufweist, kann anhand der Messung des statischen Kontaktwinkels auf den Erfolg der Immobilisierung der PolySia geschlossen werden, da in diesen Fall der Kontaktwinkel deutlich kleiner wird.

Die Kontaktwinkelmessungen wurden mit dem SURFTENS UNIVERSAL der Firma OEG (Frankfurt/Oder) durchgeführt. Pro Objektträger wurden acht Messwerte aufgenommen, wobei die Wassertropfen mindestens 0.5 cm vom Rand abgesetzt wurden. Die Kontaktwinkel wurden anschließend gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

3.2 Infrarot-Spektroskopie

Bei der Infrarot-Spektroskopie (IR-Spektroskopie) werden in einer Probe durch Absorption von Infrarot-Strahlung Schwingungen und Rotationen angeregt. Die zu untersuchende Probe wird mit infraroter Strahlung bestrahlt und die transmittierte bzw. reflektierte Strahlung detektiert. Da viele funktionelle Gruppen bei Einstrahlung polychromatischer Strahlung charakteristische Absorptionsbanden zeigen, ist eine Identifizierung der betreffenden Gruppen in definierten Bereichen des IR-Spektrums möglich.

In dieser Arbeit wurde die IR-Spektroskopie verwendet, um die fortschreitende Modifizierung der Oberfläche nach den einzelnen Reaktionsschritten zu überprüfen. Dazu wurde zur Untersuchung der Objektträger die aufgetragene Probe mechanisch entfernt, mit Kaliumbromid fein verrieben, in Tablettenform gepresst und in den Probenhalter eingespannt. Die Messung der Probe erfolgte in Transmission, wobei Daten im Bereich von 400 bis 4000 cm^{-1} aufgenommen wurden. Die Siliconschläuche und -platten wurden mit Hilfe der ATR-Technik (abgeschwächte Total-Reflexion) vermessen. Die Siliconmaterialien wurden auf eine Diamantoberfläche gelegt und mit einer speziellen Halterung angepresst. Der IR-Strahl wird dabei durch einen Diamanten gelenkt. Die Messung erfolgt in einem Bereich von 600 bis 4000 cm^{-1} . Für alle Messungen betrug die Auflösung 4 cm^{-1} , es wurden jeweils 64 Scans aufgenommen. Alle Messungen wurden mit dem IR-Spektrometer Tensor 27 von BRUKER aufgenommen. Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit der Software OPUS 5.0 der Firma BRUKER.

3.3 Peroxid-Nachweis auf Silicon-Oberflächen

Zum Nachweis von reaktiven Peroxid-Gruppen auf mit Ozon behandelten Siliconschläuchen wurde die Iodid-Methode verwendet, bei der das Oxidationspotential von Peroxiden ausgenutzt wird. Das für den Nachweis verwendete Iodid wird durch an der Silicon-Oberfläche befindliche Peroxide oxidiert. Das entstehende Iod bildet mit Iodid das Triiodid-Anion, das sich mit gelbbrauner Farbe in einer wässrigen Kaliumiodidlösung löst. Durch Titration mit Natriumthiosulfat wird das Iod reduziert und die Lösung farblos, über den Verbrauch an Thiosulfat lässt sich die Konzentration der Peroxide berechnen.

Die Siliconschläuche wurden nach der Behandlung mit Ozon für 30 Minuten im Sauerstoffstrom von eventuell adsorbiertem Ozon befreit und anschließend in eine frisch präparierte Mischung aus je fünf Millilitern Schwefelsäure (2 M) und Kaliumiodid (0.2 M) unter Zusatz von 100 μL Ammoniumheptamolybdat (1 mM) gegeben. Durch alle verwendeten Lösungen war zuvor mehrere Stunden lang Stickstoff durchgeleitet worden, um die Menge an gelöstem Sau-

erstoff so gering wie möglich zu halten. Zehn Minuten nach dem Eintauchen der Schläuche wurde die gelbbraun gefärbte Nachweislösung mit einer 0.1 N Natriumthiosulfat-Lösung bis zur Farblosigkeit titriert und aus dem Verbrauch die Peroxid-Konzentration berechnet.

3.4 Röntgen-Pulverdiffraktometrie

Die Messung der mit einer mesoporösen Silica-Schicht versehenen Objektträger erfolgte in θ - θ -Reflexionsgeometrie. Es wurde ein Diffraktometer der Firma STOE mit Szintillationszählrohr, Graphit-[002]-Sekundärmonochromator und energiedispersivem Zähler verwendet. Bei der eingesetzten Strahlung handelte es sich um $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung. Die Messungen wurden in einem Messbereich von $0.7^\circ 2\theta$ bis $3^\circ 2\theta$ durchgeführt. Zur Messung und Auswertung wurde das Programmpaket WinXPOW Version 1.08 der Firma STOE verwendet.

3.5 Thermoanalytische Methoden

Thermogravimetrische (TG-) Messungen wurden durchgeführt, um über die aufgezeichnete Massenänderung als Funktion der Temperatur Aufschlüsse über mögliche qualitative und quantitative Änderungen in der Zusammensetzung der dargestellten Proben zu erhalten. Die Messungen erfolgten in einem Temperaturbereich von Raumtemperatur bis 1000°C bei einer Aufheizrate von $5^\circ\text{C}/\text{min}$ unter Luftatmosphäre mit dem Simultaneous Thermal Analyser 429 der Firma NETZSCH, als Probengefäß dienten Korundtiegel. Simultan zur Thermogravimetrie wurden Differenzthermoanalyse-Messungen vorgenommen. Zur Auswertung der Messdaten wurde das Programm PROTEUS THERMAL ANALYSIS 4.3.1. der Firma NETZSCH verwendet.

3.6 SEARS-Zahl-Bestimmung

Die Bestimmung der SEARS-Zahl ist eine Methode zur Bestimmung der Größe der Oberfläche von Silica-Partikeln durch Titration, die 1956 von G.W. SEARS entwickelt wurde [133]. Hierbei wird über den Verbrauch an Natronlauge (NaOH) zwischen pH 4 und 9 die Anzahl der Silanolgruppen an der Partikeloberfläche bestimmt. Unter der Annahme, dass die Silanolgruppendichte in verschiedenen Materialien konstant ist, kann so über eine empirische Formel die Oberfläche des Materials bestimmt werden (Gl. 1).

$$S = 32 \cdot V - 25 \quad (2)$$

S : Oberfläche

V : Verbrauch an 0.1 M NaOH

Die SEARS-Zahl wird in dieser Arbeit nicht zur Bestimmung der Oberfläche, sondern als Kennzahl herangezogen, mit der das Ausmaß der Oberflächenfunktionalisierung bestimmt wird. Dieses ist möglich, da die Zahl der freien Silanolgruppen an der Oberfläche im Verlauf der Oberflächenfunktionalisierung reduziert wird.

Es wurde eine modifizierte Vorschrift von HEINROTH et al. [134] verwendet, die sich teilweise von der Originalvorschrift nach SEARS unterscheidet. Zunächst werden 2.5 g Sipernat in 60 mL Methanol dispergiert, anschließend 40 mL Wasser zu der homogenen Suspension gegeben und 30 Sekunden stark gerührt. Mit weiteren 100 mL Wasser werden an den Gefäßwänden anhaftende Partikel in die Lösung gespült und eine weitere Minute gerührt. Mit Hilfe einer TITROLINE 96 der Firma SCHOTT wird die Suspension mit 0.1 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 6 eingestellt, bevor 20 mL einer 4.3 M Natriumchloridlösung hinzugefügt und für 60 Sekunden gerührt werden. Diese Suspension wird im nächsten Schritt mit einer TITROLINE 96 mit 0.1 M NaOH bis zu einem pH-Wert von 9 titriert. Da der pH-Wert unter 9 absinkt, wird nach 60 Sekunden erneut mit NaOH nachtitriert. Die SEARS-Zahl entspricht dem Gesamtverbrauch an NaOH.

3.7 PolySia-ELISA

Die Immobilisierung der PolySia auf den unterschiedlichen Materialien wurde mit Hilfe eines ELISA-basierten Tests (ELISA: enzyme linked immunosorbent assay) untersucht, in dem der polySia-spezifische monoklonale Antikörper mab735 verwendet wurde. Auf den mit PolySia modifizierten Proben wurden am Institut für Technische Chemie von Stephanie Bruns und Yvonne Stark sowie in der Neuroanatomie der Medizinischen Hochschule Hannover von Johannes Haile zunächst die unspezifischen Bindungsstellen durch 30 minütige Behandlung mit 1%-igem BSA (bovine serum albumin) in PBS (phosphate buffered saline) geblockt (alternativ über Nacht bei 4 °C). Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit 250 µL mab735 (1:400 verdünnt aus 5 µg/mL in 1 % BSA in PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Materialien erneut dreimal mit PBS gewaschen, bevor die Zuga-

be von 250 μL des sekundären Antikörpers goat-anti-mouse-HRPO (HRPO: horseradish peroxidase; 1:3000 verdünnt in PBS + 1 % BSA) für eine Stunde Inkubation unter Lichtausschluss erfolgte. Zur Entwicklung des ELISA-Tests wurden die Proben nach dreimaligem Waschen mit PBS mit 300 μL 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonsäure) (ABTS) versetzt. Die Absorption wurde nach 30 Minuten bei 405 nm mit einem micro-plate reader (BIO-RAD, München) gemessen, als Negativ-Kontrolle dienten unbehandelte Materialien.

3.8 Spezifischer Abbau durch Endosialidase

Unter Verwendung des für den Abbau von Polysialinsäure spezifischen Enzyms Endosialidase (endoNF) wurde untersucht, inwieweit ein Abbau der immobilisierten PolySia möglich ist. Dafür wurde der am Institut für Zelluläre Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover von Dr. David Schwarzer aus einem *Escherichia coli* K1-Phagen stammende Wildtyp der endoNF verwendet. Für die Herstellung der endoNF-Stammlösung wurden 38.57 μL einer 0.5 μM endoNF-Lösung (2.52 mg/mL in 10 mM Natriumphosphat-Puffer) zu 811 μL eines Natriumphosphat-Puffers (10 mM) gegeben. Um die Wirkung der endoNF auf die acetylierte und deacetylierte Polysialinsäure in Lösung zu testen, wurden Stammlösungen mit einem Gehalt von jeweils 60 mg/mL hergestellt. Von diesen Lösungen wurden jeweils 216 μL mit 27 μL der endoNF und 27 μL Natriumphosphat-Puffer (100 mM, pH 7.4) versetzt und bei 37 °C inkubiert. Um den Einfluss des Puffers zu untersuchen wurden ebenfalls 216 μL der PolySia-Stammlösungen (acetyliert und deacetyliert) mit 54 μL Natriumphosphat-Puffer (100 mM, pH 7.4) vermischt und ebenfalls bei 37 °C inkubiert. Zu bestimmten Zeiten wurden jeweils 20 μL abgenommen und mit dem gleichen Volumen an eiskaltem, absoluten Ethanol (-21 °C) versetzt und für 15 Minuten auf Eis gestellt, um die Wirkung des Enzyms zu stoppen. Nach dem Auffüllen mit Wasser auf 100 μL wurde das beim TBA-Test beschriebene Protokoll ab der Zugabe der Oxidationslösung verwendet.

Zur Untersuchung des Abbaus der immobilisierten Polysialinsäure wurden die Siliconschläuche und Glasfritten mit 200 μL endoNF-Lösung und 200 μL Natriumphosphat-Puffer (100 mM) versetzt, zur Kontrolle des Puffer-Einflusses wurde das doppelte Volumen des Puffers, ohne Zusatz der endoNF, verwendet. Wie oben beschrieben wurden zu bestimmten Zeitpunkten jeweils 20 μL abgenommen, mit 20 μL eiskaltem Ethanol versetzt und für 15 Minuten auf Eis gestellt. Nach dem Auffüllen mit Wasser auf 100 μL wurden wie im TBA-Test beschrieben mit der Zugabe der Oxidationslösung fortgefahren.

3.9 Zellkulturexperimente

Sämtliche Zellkulturexperimente wurden am Institut für Technische Chemie von Stefanie Böhm, Stephanie Bruns, Stefanie Röker und Yvonne Stark durchgeführt. Die dafür verwendeten immortalisierten Schwann-Zellen (ISC) und PC-12-Zellen wurden in einem Medium bestehend aus DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10 % FCS (fetal calf serum), Penicillin (100 U/mL), Streptomycin (100 µg/L), L-Glutamin (2 mM) und Natriumpyruvat (1 mM) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Kultivierung der Hep-G2-Zellen war ähnlich, hier wurde FCS durch NCS (newborn calf serum) ersetzt und auf den Zusatz von Glutamin verzichtet. Die zu testenden Materialien wurden vor der Besiedelung durch Einlegen in 70 % Isopropanol über Nacht desinfiziert und anschließend im Kulturmedium für eine weitere Nacht (ISC) bzw. zwei Nächte (PC-12- und Hep-G2-Zellen) inkubiert. Nach Entfernen des Mediums erfolgte die Besiedelung mit 3000 ISC/pro Material in 50 µL Medium bzw. 5000 Hep-G2- bzw. 1500 PC-12-Zellen/pro Material in 200 µL Medium. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle drei Tage.

3.9.1 Zelladhäsion

Die Zelladhäsion der ISC auf den mit PolySia modifizierten Materialien wurde zwei Wochen nach der Inkubation mit der DAPI-Färbung bestimmt. DAPI (4',6-Diamino-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzmolekül, das an die DNA bindet und so den Zellkern sichtbar macht. Nach dem Waschen der zu untersuchenden Materialien mit PBS wurden die Zellkerne mit 200 µL DAPI-Lösung unter Verwendung eines Standardprotokolls angefärbt [135]. Die Materialien wurden für 20 Minuten bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Betrachtung der Materialien im UV-Licht erfolgte mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (OLYMPUS, Hamburg).

3.9.2 Zellviabilität

Um die mit PolySia modifizierten Materialien auf eine mögliche Toxizität gegenüber Zellen zu testen, wurde der MTT-Test verwendet, der einen Aufschluss auf die Viabilität von Zellen zulässt. Hierbei wird die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen gemessen. Nur lebende, stoffwechselaktive Zellen sind in der Lage, die wasserlösliche gelbe Verbindung MTT (3-(4,5-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in einen wasserlöslichen blauen Formazankomplex umzusetzen. MTT dringt in die Zellen ein, in denen der Tetrazoliumring von den Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien aufgebrochen und in das alkohollösliche dunkelblaue Formazan umgewandelt wird [136-138]. Der blaue Farbstoff fällt aus und reichert sich in den Zellen an. Durch Behandlung mit SDS (sodium dodecylsulfate) werden die Zellen lysiert und das Formazan freigesetzt, die Intensität kann photometrisch be-

stimmt werden. Da die Geschwindigkeit der Umsetzung des MTT sowohl von der Viabilität als auch von der Anzahl der Zellen abhängig ist, gibt die Intensität des blauen Farbstoffs Auskunft über die Viabilität und die Anzahl der Zellen und somit Hinweise auf die Zellverträglichkeit der getesteten Materialien.

Die ISC wurden für 14 Tage auf den mit PolySia modifizierten Materialien kultiviert. Es wurden 300 μL Medium (DMEM + 10 % FCS + 1 % Natriumpyruvat + 1 % L-Glutamin + 1 % Antibiotika (Penicillin/Streptomycin)) und 30 μL MTT-Lösung hinzugegeben und vier Stunden bei 37 °C (5 % CO_2) inkubiert. Nach steriler Filtration wurden 300 μL SDS-Lösung (1 g/10 mL 0.01 M HCl) hinzugefügt und über Nacht inkubiert. Die Messung der Absorption wurde bei 570 nm mit einem Micro-plate-reader (BIO-RAD, München) bestimmt.

3.10 Thiobarbitursäure-Test

Der Thiobarbitursäure-Test (TBA-Test) wurde zuerst von L. WARREN und D. AMINOFF eingesetzt, um Sialinsäuren in hoher Spezifität und Sensitivität nachzuweisen [139, 140]. Für den Nachweis und die Quantifizierung von PolySia wird diese durch saure Hydrolyse zunächst in einzelne Sialinsäuremoleküle gespalten. Durch Oxidation der freien reduzierenden Enden mit Periodat entsteht Formylpyruvat, das mit Thiobarbitursäure ein Chromophor bildet, das UV-spektroskopisch nachgewiesen werden kann. PAERELS und SCHUT konnten zeigen, dass bei der Oxidation von Sialinsäure durch Periodat zunächst ein Pre-Chromogen (1) gebildet wird (Abb. 17) [141].

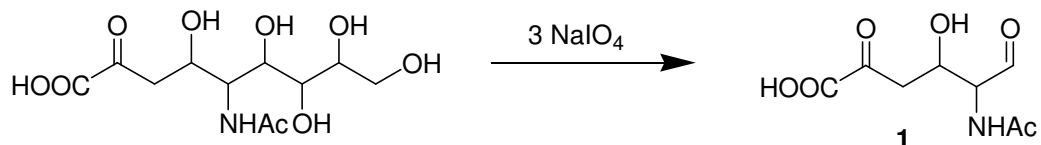


Abb. 17: Bildung des Pre-Chromogens (1) aus Neu5Ac durch Periodat-Oxidation.

Dieses Pre-Chromogen reagiert dann unter sauren Bedingungen in einer Aldolspaltung zum eigentlichen Chromogen β -Formylpyruvinsäure (2) (Abb. 18).

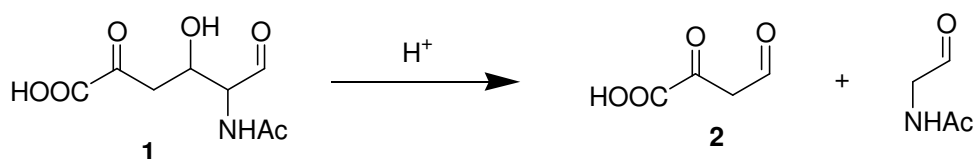


Abb. 18: Aldol-Spaltung zum Chromogen β -Formylpyruvinsäure (2).

Die β -Formylpyruvinsäure bildet schließlich mit zwei Molekülen Thiobarbitursäure den Methinfarbstoff (3), der ein Absorptionsmaximum bei 549 nm besitzt (Abb. 19).

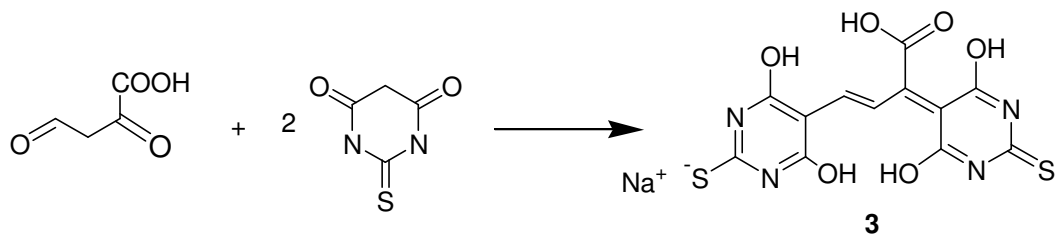


Abb. 19: Bildung des Chromophors (3) aus β -Formylpyruvinsäure und Thiobarbitursäure.

Die mit PolySia modifizierten Materialien wurden zunächst für 18 Stunden mit einer Lösung aus 25 μ L Phosphorsäure (0.1 M) und 225 μ L Wasser bei 70 °C behandelt. Nach Neutralisation mit 100 μ L NaOH (0.025 M) wurden der Lösung 100 μ L einer Lösung aus Periodsäure (0.2 M) in 0.5 % H_3PO_4 zugefügt. Die Oxidation wurde nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C durch Addition von 500 μ L einer Natriumarsenitlösung (0.38 M in 2 % H_2SO_4) gestoppt. Nach Verschwinden der braunen Farbe wurden 500 μ L TBA-Lösung (0.2 M in 1.2 % NaOH) hinzugefügt und es wurde für 13 Minuten bei 95 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen im Wasserbad wurden 400 μ L der pink gefärbten Lösung mit 700 μ L Cyclohexanon vermischt und die Absorption der organischen Phase bei 549 nm mit einem Multiskan Spectrum der Firma THERMO LABSYSTEMS (Waltham, USA) gemessen.

3.11 *In vivo*-Implantation von mit Polysialinsäure beschichteten Siliconschläuchen

Die *in vivo*-Experimente wurden von Dr. Kirsten Haastert am Institut für Neuroanatomie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Bei den getesteten Materialien handelte es sich zum einen um unbehandelte Siliconschläuche (1.5/2.3 mm, Länge 13 mm) und solche, auf denen 3 μ g PolySia/cm² über GOPTMS (10 Massen-%) als Linker im Anschluss an eine Ozon-Behandlung angebunden worden waren (Reaktionsbedingungen: 30 Minuten Ozon-Behandlung, 85 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h; PolySia-Lösung (0.2 M)). In jeder der beiden Versuchsgruppen wurde je fünf adulten Sprague Dawley-Ratten der *N. ischiadicus* auf einer Länge von zehn Millimetern durchtrennt. Anschließend wurden die mit Kochsalzlösung befüllten Siliconschläuche über den Nervendefekt gestülpt und sowohl am proximalen als auch am distalen Ende mit dem Nerv vernäht (Abb. 20).

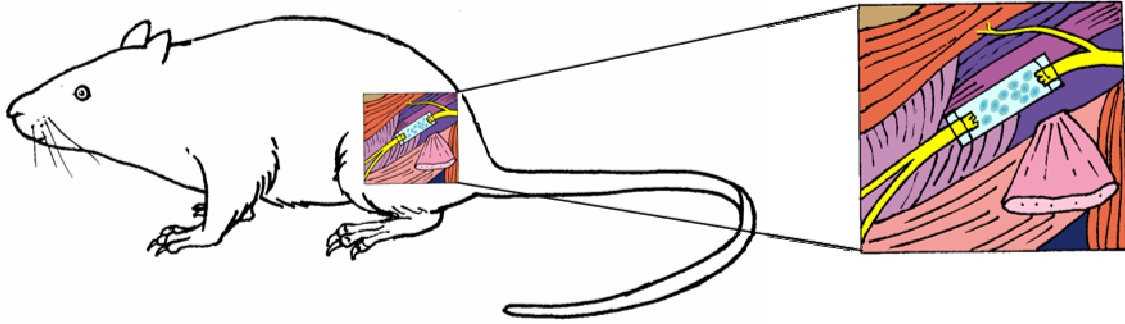


Abb. 20: Einsatz von unbehandelten bzw. mit PolySia modifizierten Siliconschläuchen als Nervenleitbahnen zur Überbrückung eines 10 mm-Defekts des *N. ischiadicus* in adulten Sprague Dawley-Ratten. In jeder Versuchsgruppe wurden fünf Schläuche für drei Wochen implantiert.

Drei Wochen nach der Implantation fand die Explantation statt, die Nervenregenerate wurden optisch bewertet und anschließend in eine Matrix eingebettet, um einer histomorphometrischen Untersuchung unterzogen zu werden, die derzeit noch andauert.

4 Experimenteller Teil

Im Folgenden werden zwei verschiedene Synthesewege für die Anbindung von Polysialinsäure auf den verschiedenen Substratmaterialien (Glas, Silicon, Sipernat[®]) beschrieben. Der erste besteht in der Funktionalisierung des Substrats mit dem Epoxysilan 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (GOPTMS) und anschließender Anbindung der Polysialinsäure aus wässriger Lösung (Abb. 21).

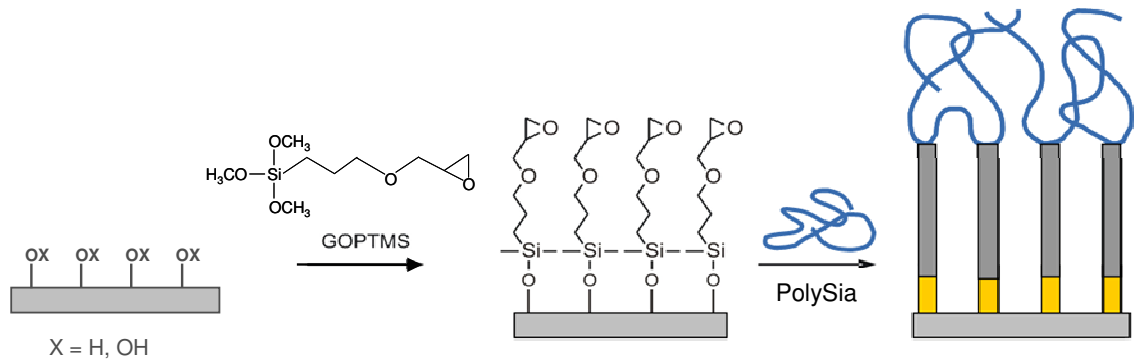


Abb. 21: Oberflächenfunktionalisierung mit GOPTMS als Linker für die Anbindung von PolySia.

Die zweite Synthesevariante beginnt mit der Oberflächenfunktionalisierung durch Aufbringen des Aminosilans 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES), an das anschließend Bernstein säureanhydrid (BSAH) angebunden wird, bevor in einem letzten Schritt die PolySia nach Aktivierung mit *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) angebunden wird (Abb. 22) [142].

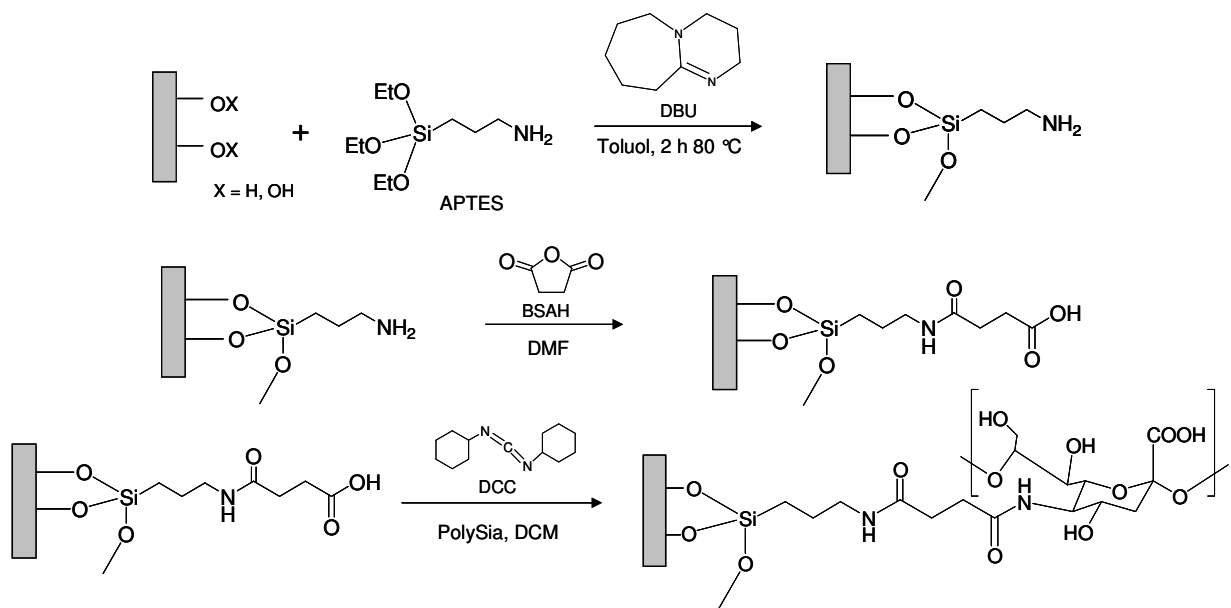


Abb. 22: Oberflächenfunktionalisierung mit APTES und BSAH und anschließende Anbindung von PolySia nach Aktivierung mit DCC.

4.1 Deacetylierung von Polysialinsäure

Damit die Polysialinsäure an die reaktiven Gruppen der modifizierten Substratmaterialien angebunden werden kann, muss die Polysialinsäure zunächst am Kohlenstoffatom C-5 deacetyliert werden, so dass hier anstatt eines Amids eine reaktivere Aminofunktion vorliegt.

Hierzu werden 2 g Colominsäure und 120 mL Ethanol zu einer Lösung aus 4.8 g Natriumhydroxid und 7.4 mL Wasser gegeben und über Nacht bei 80 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert zwischen 8 und 9 eingestellt. Die gelbe Lösung wird anschließend am Rotationsverdampfer stark eingeeengt. Nach Filtration der aufkonzentrierten braunen Lösung erfolgt eine eintägige Dialyse gegen pH 9. Die Lösung wird am nächsten Tag am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt, der erhaltene braune Feststoff im Kühlschrank gelagert und zeitnah verbraucht.

4.2 Anbindung von Polysialinsäure an Glasoberflächen

Alle verwendeten Glasmaterialien (Objektträger, Deckgläschen, Filterplatten) wurden zunächst mit Piranha-Säure gereinigt. Hierzu wurden die Glassubstrate für 15 min in eine Mischung aus 6 Teilen konzentrierter Schwefel- und 5 Teilen konzentrierter Salzsäure gegeben, anschließend in Wasser gelagert und unmittelbar vor der Verwendung ausgiebig mit Wasser gewaschen und mit Druckluft getrocknet.

Für die Herstellung einer mesoporösen Beschichtung auf den Objektträgern wurden in Anlehnung an YAMADA 3.4 g AL43 (EO₂₀PO₇₀EO₂₀) in 120 mL Ethanol unter Zugabe von 19 mL Wasser und 1.26 mL Salzsäure (2 M) gelöst [143]. Nach 25 Minuten wurden 9.4 mL TEOS hinzugefügt und für 15 Minuten gerührt. Die Beschichtung der Objektträger erfolgte anschließend in einem Dip-Coater (NIMA Technology Ltd., Coventry) für jeweils zwei Minuten mit einer sich daran anschließenden Inkubationszeit von fünf Minuten direkt über der Lösung. Die beschichteten Objektträger wurden über Nacht bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet und anschließend bei 415 °C für sechs Stunden calciniert. Vor der Beschichtung mit der meso-Struktur erfolgte eine Reinigung des Objektträgers mit Piranha-Säure.

4.2.1 Anbindung über 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan

Die gereinigten Glasmaterialien wurden in eine wässrige Lösung von GOPTMS gegeben. Die Beschichtung der Objektträger (ELKA, Sondheim) und Deckgläschen (MENZEL-GmbH & Co KG, Braunschweig) erfolgte mit Hilfe eines Dip-Coaters (NIMA Technology Ltd., Coventry) bei einer mittels gesättigter Glucoselösung eingestellten Luftfeuchtigkeit zwischen 75 und 80 %. Die Objektträger wurden für zehn Minuten in 140 mL einer GOPTMS-Lösung (0.5 bis 25 Massen-%) abgesenkt, anschließend langsam herausgezogen und für weitere fünf Minuten über der Lösung inkubiert. Nach einer Trocknung für eine Stunde bei 60 °C wurde überschüssiges GOPTMS durch Abspülen mit Aceton entfernt und die Objektträger nach kurzem Trocknen mittels Druckluftbehandlung unverzüglich in eine wässrige PolySia-Lösung überführt. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Objektträger zunächst mit Wasser, dann mit Aceton gewaschen und schließlich mit Druckluft getrocknet.

Die Funktionalisierung geviertelter Glasfritten (10 mm Durchmesser, ROBU Glasfilter-Geräte GmbH, Hattert) erfolgte durch eine 25 minütige Inkubation in der GOPTMS-Lösung, die weiteren Reaktionsschritte waren identisch zu denen der Objektträger und Deckgläschen. Es wurden Glasfritten mit den Porositäten 3 bis 5 verwendet, wobei die Porosität ein Maß für die Porengröße ist (Porosität 3: 16-40 µm, Porosität 4: 10-16 µm, Porosität 5: 1-1.6 µm).

In einigen Experimenten erfolgte eine Reacetylierung der auf den Glassubstraten immobilisierten Polysialinsäure. Diese wurde bei einem pH-Wert von 9 mit zehn Äquivalenten Acetanhydrid unter Eiskühlung und unter starkem Rühren über Nacht, mindestens aber für vier Stunden, durchgeführt. Anschließend erfolgte die Verseifung mit zehn Äquivalenten Natriumhydroxid für vier bis sechs Stunden, bevor die Materialien ausgiebig mit Wasser gespült wurden.

4.2.2 Anbindung über 3-Aminopropyltriethoxysilan und Bernsteinsäureanhydrid

Die Beschichtung der mit Piranha-Säure gereinigten Objektträger und Deckgläschen erfolgte mit einem NIMA Dip-Coater. Die Inkubationszeit in etwa 140 mL einer wässrigen APTES-Lösung (0.1 bis 10 Massen-%) betrug zehn Minuten, anschließend wurden die Materialien analog zur Beschichtung mit GOPTMS weitere fünf Minuten über der Lösung hängen gelassen. Danach wurden die beschichteten Glassubstrate bei 60 °C mehrere Stunden getrocknet.

Für die Anbindung des Bernsteinsäureanhydrids (BSAH) wurde 1 g BSAH in eine mit *N,N*-Dimethylformamid (DMF) und mit den APTES-funktionalisierten Materialien gefüllte

Objektträger-Versandbox gegeben und über Nacht stehen gelassen [142]. Anschließend wurden die Glassubstrate ausgiebig mit Ethanol gewaschen und im Trockenschrank getrocknet.

Die BSAH-modifizierten Materialien wurden etwa eine Stunde lang in einer Lösung von 0.08 g *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 20 mL Dichlormethan (DCM) gerührt und anschließend mit 0.1 g deacetylierter PolySia versetzt. Nach zwei Tagen wurden die Glassubstrate zunächst mit Ethanol, dann mit Wasser ausgiebig gespült und mit Druckluft getrocknet.

Die Modifizierung der Glasfritten erfolgte analog, nur wurde der Dip-Coating-Prozess durch Inkubation in der APTES-Lösung ersetzt.

4.3 Anbindung von Polysialinsäure auf Siliconoberflächen

Die verwendeten Siliconmaterialien waren Siliconschläuche (Rotilabo-Siliconschläuche, 10/14 mm, ROTH, Karlsruhe; Siliconschlauch 1.5/2.3 mm, VWR) und Siliconplatten (Silicon-Elastomer, 1 mm Dicke, GOODFELLOW GmbH, Bad Nauheim). Die Siliconmaterialien wurden zunächst mit Isopropanol gereinigt und in einen Luftkühler gelegt. Anschließend wurden die Siliconmaterialien einer mittels eines Labor-Ozonisators 301.7 (ERWIN SANDER Elektroapparatebau GmbH, Uetze-Eltze) erzeugten Ozonatmosphäre ausgesetzt. Hierbei wurden sowohl die Dauer der Ozon-Behandlung wie auch die Menge des erzeugten Ozons variiert. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Silicone unverzüglich in die entsprechende Silanlösung überführt.

Es wurden auch Versuche durchgeführt, bei denen die Siliconmaterialien zunächst in Toluol gequollen und in diesem Zustand der Ozon-Behandlung unterzogen wurden.

4.3.1 Anbindung über 3-Glycidylpropyltrimethoxysilan

Die Siliconmaterialien wurden direkt nach der Ozon-Behandlung in eine wässrige GOPTMS-Lösung überführt. Nach 30 min wurden sie herausgenommen und bei 60 °C getrocknet. Anschließend erfolgte die Inkubation der Siliconmaterialien in einer wässrigen PolySia-Lösung. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Silicone zunächst mit Wasser, dann mit Aceton gereinigt und mit Druckluft getrocknet.

4.3.2 Anbindung über 3-Aminopropyltriethoxysilan und Bernsteinsäureanhydrid

Die Siliconmaterialien wurden direkt nach der Ozon-Behandlung in eine Lösung von 125 µL APTES und 75 µL 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) in Toluol gegeben [142]. Nach zwei Stunden wurden die aufgequollenen Siliconmaterialien dreimal mit Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Siliconmaterialien in eine

Lösung von 2 g BSAH in 20 mL DMF gegeben und über Nacht gerührt. Zur Reinigung wurden die Silicone dreimal mit Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Silicone wurden dann in eine Lösung von 0.04 g DCC in 20 mL DCM eine Stunde gerührt, bevor die Zugabe von 0.1 g deacetylierter PolySia erfolgte. Nach zwei Tagen wurden die Siliconmaterialien dreimal mit Ethanol, einmal mit Wasser und ein weiteres Mal mit Aceton gewaschen und anschließend getrocknet.

4.3.3 Anbindung über 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan nach Plasma-Behandlung

Mit Isopropanol gereinigte Schläuche wurden im Deutschen Institut für Kautschuktechnologie (DIK) in einer selbstgebauten Apparatur durch Matthias Lückmann einer Plasma-Behandlung unterzogen. Es wurde ein Stickstoff-Plasma verwendet, der Abstand zwischen den Plasma-Düsen und dem Siliconmaterial betrug 20 mm (Abb. 23). Zur Erzeugung des Plasmas wurde eine Leistung von 1.6 kW verwendet.

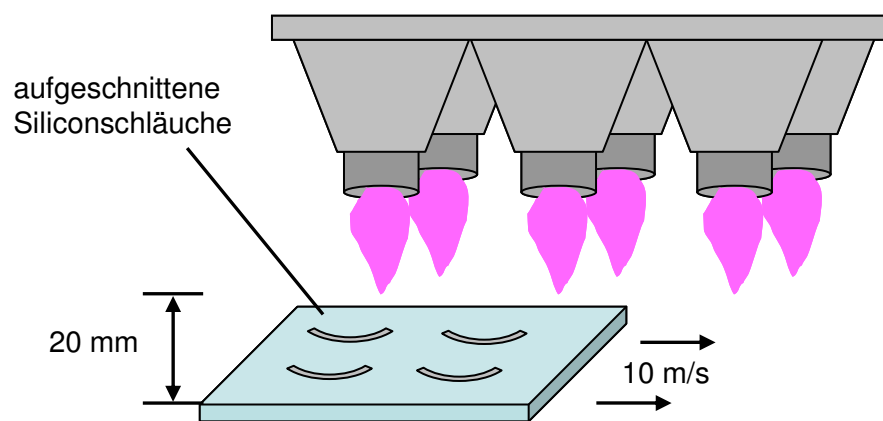


Abb. 23: Schematische Darstellung der Plasma-Behandlung.

Nach der Plasma-Behandlung wurden die Siliconschläuche unverzüglich für eine Stunde in eine wässrige Lösung von GOPTMS überführt. Anschließend wurden die Schläuche zunächst bei 60 °C getrocknet und mit Aceton abgespült, um überschüssiges GOPTMS zu entfernen. Es folgte eine Inkubation in wässriger PolySia-Lösung für einen Tag, danach wurden die Siliconschläuche zuerst mit Wasser, dann mit Aceton gewaschen und mit Druckluft getrocknet.

4.4 Anbindung von Polysialinsäure auf Sipernat[®]

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Sipernat[®] 500 LS handelt es sich um eine kommerziell gefällte Kieselsäure von EVONIC INDUSTRIES, die aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit und einer großen spezifischen Oberfläche von $475 \text{ m}^2/\text{g}$ als Modellsubstanz für Oberflächenmodifizierungen an Nanopartikeln verwendet wurde. Die mittlere Teilchengröße des Sipernat[®] 500 LS beträgt $4.5 \text{ }\mu\text{m}$, wobei 50 % der Teilchen eine Größe besitzen, die kleiner als $6 \text{ }\mu\text{m}$ ist [144].

Für die Oberflächenfunktionalisierung von Sipernat[®] mit APTES wurden nach einer Vorschrift von BREMER 500 mg Sipernat[®] in 20 mL Toluol dispergiert und $125 \text{ }\mu\text{L}$ APTES sowie $75 \text{ }\mu\text{L}$ DBU hinzugefügt [142]. Diese Dispersion wurde für zwei Stunden bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ gerührt, zentrifugiert, dreimal mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die hier angegebenen Werte stellen die Standardbedingungen dar, sowohl die Menge an APTES als auch die Reaktionszeit wurden variiert.

400 mg der mit APTES funktionalisierten Partikel wurden in 20 mL DMF suspendiert und 2 g BSAH hinzugefügt. Nach dem Rühren der Reaktionsmischung über Nacht wurden die Partikel durch Zentrifugieren abgetrennt, dreimal mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Anschließend wurden 250 mg der Partikel in eine Lösung von 0.04 g DCC in 20 mL DCM dispergiert. Nach etwa einer Stunde wurden 0.1 g deacetylierte PolySia hinzugegeben und weitere 48 Stunden gerührt. Zur Aufreinigung wurden die Partikel zunächst zentrifugiert und anschließend erst dreimal mit Ethanol, dann einmal mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Anbindung von Polysialinsäure auf Glas

5.1.1 Anbindung von Polysialinsäure über 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan

Die Anbindung von Polysialinsäure auf Glasoberflächen wurde zunächst auf Objektträgern durchgeführt. Um einen Nachweis für das Gelingen der Reaktion der Polysialinsäure mit dem Epoxysilan zu bekommen, wurden statische Kontaktwinkelmessungen nach beiden Reaktionsschritten durchgeführt. Dieses Vorgehen ist sinnvoll, da die Hydrophilie von GOPTMS und der Polysialinsäure sehr unterschiedlich ist, so dass bei Anwesenheit von PolySia auf einer GOPTMS-Oberfläche der Kontaktwinkel deutlich abnehmen sollte. Abb. 24 zeigt die gemessenen Kontaktwinkel auf einer Glasoberfläche nach Beschichtung mit GOPTMS.

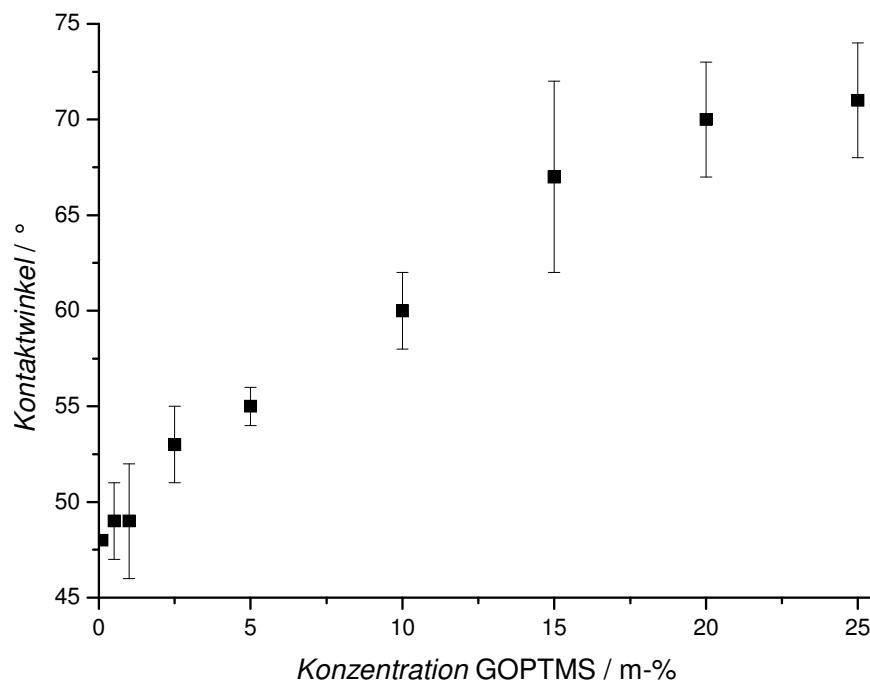


Abb. 24: Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen auf mit GOPTMS beschichteten Objektträgern in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration von GOPTMS.

Es ist deutlich erkennbar, dass mit steigender Konzentration des Epoxysilans in der verwendeten Lösung der Kontaktwinkel zunimmt, bei hohen Konzentrationen aber einem Sättigungswert von etwa 71° zustrebt. Dieses deutet daraufhin, dass die Oberfläche vollständig mit dem Silan abgesättigt ist. Um die Stabilität des Epoxysilans auf den Glasoberflächen hinsichtlich einer möglichen Hydrolyse der Epoxidfunktion zu untersuchen, wurden die beschichteten Ob-

jektträger für einen Tag in Wasser gelagert und anschließend erneut der Kontaktwinkel bestimmt. Dabei zeigten sich keinerlei Änderungen im gemessenen Kontaktwinkel, so dass davon ausgegangen werden kann, dass bei neutralem pH-Wert keine Reaktion zwischen dem Wasser und dem GOPTMS erfolgt (Tab. 1).

Tab. 1: Übersicht über die gemessenen Kontaktwinkel (in °) vor und nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden in Wasser.

Massen-% GOPTMS	vor H ₂ O	nach H ₂ O
0.1	48 ± 0	47 ± 2
0.5	49 ± 2	49 ± 2
1	49 ± 3	49 ± 4
2.5	53 ± 2	54 ± 4
5	55 ± 1	52 ± 1
10	62 ± 2	61 ± 3
15	67 ± 5	70 ± 4
20	70 ± 3	70 ± 3
25	71 ± 3	67 ± 3

Auch gegenüber der Hydrolyse durch Luftfeuchtigkeit sind die beschichteten Objektträger einige Zeit stabil, da die Kontaktwinkel noch mehrere Wochen nach der Beschichtung identisch mit den nach der Reaktion gemessenen waren.

Um diesen Zusammenhang noch einmal genauer zu untersuchen, wurden mit GOPTMS beschichtete Glaträger für einen Tag in Lösungen mit drei verschiedenen pH-Werten zwischen 6 und 10 gelagert und der Kontaktwinkel erneut gemessen. Vor der Lagerung in den wässrigen Lösungen betrug der Kontaktwinkel 60°, nach der Lagerung in einer Lösung mit einem pH-Wert von 6 nur noch 48°. Wurden die Objektträger in wässrigen Lösungen mit den pH-Werten 8 und 10 gelagert, so ergaben sich Kontaktwinkel von 63° bzw. 62°. Es ist auffällig, dass der Kontaktwinkel nur nach Lagerung in Wasser mit einem pH-Wert von 6 um 10 bis 15° absinkt, bei den pH-Werten von 8 bzw. 10 aber konstant bleibt. Das deutet darauf hin, dass die Epoxidgruppe in geringem Maß eine durch die Anwesenheit von Säure katalysierte Ringöffnung erfährt und sich so eine vicinales Diol bildet.

Da die Anbindung der Polysialinsäure bei einem erhöhten pH-Wert von etwa 9 stattfinden sollte, wurden die mit verschiedenen Konzentrationen an GOPTMS beschichteten Objektträger neben einer Lagerung in Wasser ebenfalls für einen Tag in einer wässrigen Lösung bei pH 9 gelagert, auch hier änderte sich der Kontaktwinkel nicht. Ein Abnehmen des Kontaktwinkels

konnte allerdings beobachtet werden, wenn die mit GOPTMS funktionalisierten Objektträger in einer wässrigen Lösung von PolySia (pH 9) gelagert wurden (Tab. 2). Dabei sank der Kontaktwinkel unabhängig von der Ausgangskonzentration des GOPTMS auf einen Wert zwischen 34 und 39° ab, der der Präsenz von PolySia auf der Oberfläche zugeordnet werden kann.

Tab. 2: Übersicht über die gemessenen Kontaktwinkel (in °) nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden in Wasser bzw. PolySia-Lösung (0.02 M) in Abhängigkeit von der Konzentration der GOPTMS-Lösung.

Massen-% GOPTMS	ohne PolySia	H ₂ O	H ₂ O pH 9	PolySia
0.1	48 ± 0	47 ± 2	46 ± 4	34 ± 5
0.5	49 ± 2	49 ± 2	48 ± 2	39 ± 0
1	49 ± 3	49 ± 4	50 ± 5	34 ± 2
2.5	53 ± 2	54 ± 4	53 ± 5	-
5	55 ± 1	52 ± 1	-	36 ± 3
10	62 ± 2	61 ± 3	61 ± 2	34 ± 2

Wird der Kontaktwinkel während der Inkubation der Objektträger in der PolySia-Lösung zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt, so kann eine Zeitabhängigkeit des Kontaktwinkels festgestellt werden (Tab. 3).

Tab. 3: Kontaktwinkelmessungen (in °) nach verschiedenen Inkubationszeiten in PolySia-Lösung (0.02 M).

Massen-% GOPTMS	0 h PolySia	4 h PolySia	1 d PolySia	3 d PolySia
0.1	48 ± 0	-	34 ± 5	33 ± 3
0.5	49 ± 2	-	39 ± 0	34 ± 6
1	49 ± 3	38 ± 2	34 ± 2	34 ± 6
5	55 ± 1	37 ± 3	36 ± 3	-
10	62 ± 2	49 ± 1	34 ± 2	-
15	67 ± 5	52 ± 1	-	-
20	70 ± 3	56 ± 8	-	-

Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden lässt sich erkennen, dass alle Kontaktwinkel kleiner geworden sind. Wird die Inkubation weiter fortgesetzt, so nimmt der Kontaktwinkel weiter ab, wird aber nie kleiner als 34°, was darauf hindeutet, dass dieses der Kontaktwinkel für eine mit PolySia abgesättigte Oberfläche ist.

Werden verschiedene Konzentrationen von Polysialinsäure-Lösungen verwendet, so lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Konzentration und dem Kontaktwinkel erkennen (Tab. 4).

Tab. 4: Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (in °) nach einer Inkubationszeit von vier Stunden in unterschiedlich konzentrierten PolySia-Lösungen.

Massen-% GOPTMS	ohne PolySia	4 h PolySia	c(PolySia) / mol L ⁻¹
5	55 ± 1	37 ± 3	0.02
5	55 ± 1	45 ± 1	0.0005
15	67 ± 5	50 ± 1	0.02
15	67 ± 5	54 ± 1	0.0005

Es wird deutlich, dass die Abnahme des gemessenen Kontaktwinkels nach vier Stunden größer ist, wenn die zur Inkubation verwendete PolySia-Lösung höher konzentriert ist.

Es wurde ebenfalls untersucht, welchen Einfluss das Alter der Silanlösung auf die Beschichtung hat. Dafür wurde eine Beschichtung der Objektträger nach einer bestimmten Zeit aus der gleichen Silanlösung vorgenommen und anschließend der Kontaktwinkel bestimmt (Tab. 5). Dieser liegt unabhängig von dem Zeitpunkt der Beschichtung bei etwa 60°, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sich die Zusammensetzung der Silanlösung im beobachteten Zeitraum nicht wesentlich, z.B. durch Kondensation, verändert.

Tab. 5: Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen in Abhängigkeit der verstrichenen Zeit nach Hydrolyse von GOPTMS (10 Massen-%).

Zeit nach Hydrolyse / min	Kontaktwinkel / °
0	62 ± 2
30	60 ± 1
120	59 ± 1
240	59 ± 2
360	60 ± 3

Auch der Einfluss der Eintauchzeit der zu beschichtenden Glaträger während des Dip-Coating-Prozesses wurde untersucht; wie aus Tab. 6 ersichtlich, hat auch diese keinerlei Einfluss auf den gemessenen Kontaktwinkel.

Tab. 6: Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen in Abhängigkeit von der Eintauchzeit der Objektträger in die GOPTMS-Lösung (10 Massen-%) während des Dip-Coating-Prozesses.

Eintauchzeit / min	Kontaktwinkel / °
0.17	60 ± 2
1	60 ± 3
10	61 ± 2
30	61 ± 2
60	62 ± 1
240	63 ± 3

Die Stabilität der Beschichtung gegenüber Wasser und der gemessene Kontaktwinkel hängen stark von der Nachbehandlung der Probe ab. Wird von der Standardprozedur (eine Stunde bei 60 °C, Eintauchen in Aceton für fünf Sekunden) dahingehend abgewichen, dass die Proben ausschließlich an der Luft getrocknet werden, so sind die gemessenen Kontaktwinkel deutlich kleiner (Tab. 7).

Tab. 7: Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (in °) in Abhängigkeit von der Nachbehandlung nach der Silanisierung und nach einem Tag Lagerung in Wasser (I: eine Stunde 60 °C, Aceton; II: Trocknung an Luft).

Massen-% GOPTMS	I	II
1	49 ± 3	40 ± 4
5	55 ± 1	44 ± 3
10	62 ± 2	48 ± 3
15	67 ± 5	49 ± 2

Wird hingegen nach der Trocknung an der Raumluft eine Aceton-Behandlung angeschlossen, so sind die gemessenen Kontaktwinkel fast gleich (Tab. 8).

Tab. 8: Vergleich der gemessenen Kontaktwinkel (in °) in Abhängigkeit von der Nachbehandlung nach der Silanisierung und nach einem Tag Lagerung in Wasser (I: eine Stunde 60 °C, Aceton; II: Trocknung an Luft, Aceton).

Massen-% GOPTMS	I	I nach H ₂ O	II	II nach H ₂ O
0.1	49 ± 1	47 ± 2	50 ± 1	30 ± 2
0.5	50 ± 2	49 ± 2	52 ± 1	34 ± 2
2.5	54 ± 2	54 ± 4	56 ± 1	46 ± 2
10	60 ± 2	61 ± 3	53 ± 2	44 ± 2

Allerdings lässt sich deutlich erkennen, dass die Stabilität gegenüber einer Einwirkung von Wasser deutlich herabgesetzt ist, da die Kontaktwinkel nach der Lagerung in Wasser signifikant kleiner geworden sind. Dies deutet darauf hin, dass die Kondensation des Silica-Gerüsts noch nicht so weit fortgeschritten ist, so dass das Wasser wieder einzelne Moleküle herauslösen kann. Während der Beschichtung findet sowohl die Anbindung von GOPTMS an die Silica-Oberfläche als auch die Kondensation der GOPTMS-Moleküle untereinander statt. Letztere liefert Kondensationsprodukte, die ebenfalls an die Oberfläche anhaften können. Die Kondensation wird durch die thermische Nachbehandlung (während der Standardbehandlung) noch weiter gefördert, so dass das ganze Konstrukt eine größere Stabilität aufweist.

Es wurde ebenfalls untersucht, ob sich sowohl das GOPTMS wie auch die Polysialinsäure an die Glassubstrate anbinden lassen, wenn diese zuvor mit einer weiteren Silica-Schicht modifiziert wurden. Hierzu wurde mit AL43 als strukturdirigierendem Agens eine mesoporöse Schicht aufgetragen. Abb. 25 zeigt die Röntgen-Pulverdiffraktogramme einer mesoporösen Probe vor und nach der Anbindung von Polysialinsäure über GOPTMS. Es ist offensichtlich, dass die Struktur auch nach der Anbindung der PolySia erhalten bleibt.

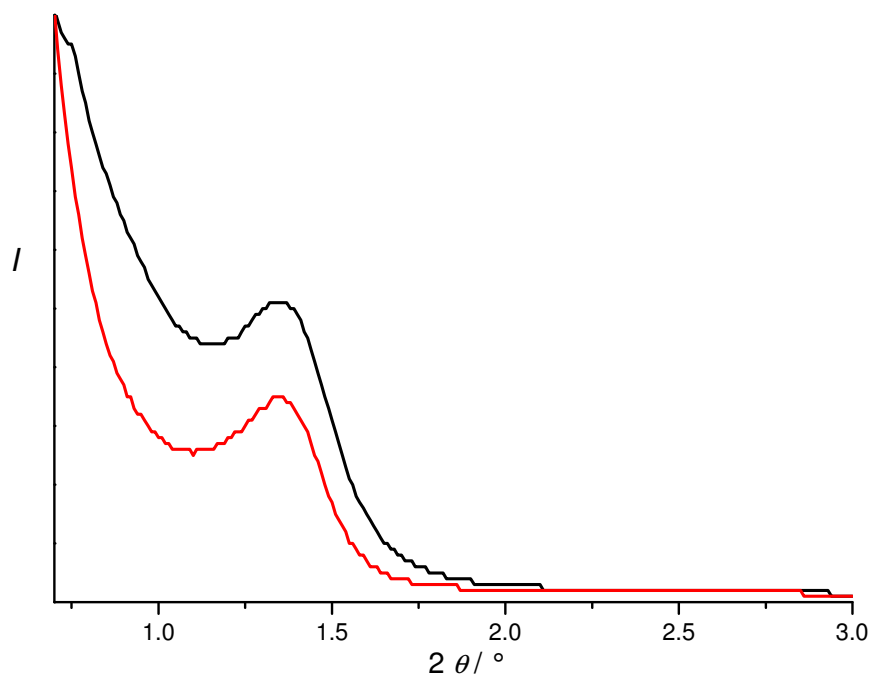


Abb. 25: Röntgen-Pulverdiffraktogramme eines Objektträgers mit mesoporöser Beschichtung vor (schwarz) und nach (rot) der Anbindung von Polysialinsäure via GOPTMS.

Die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen auf dieser zusätzlichen Silica-Schicht vor und nach der Anbindung von GOPTMS sind in Tab. 9 aufgeführt.

Tab. 9: Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (in °) auf Objektträgern, die mit einer mesoporösen Struktur vor der Beschichtung mit GOPTMS modifiziert wurden. Es wurden die Kontaktwinkel nach der mesoporösen Strukturierung (-), nach Behandlung mit Piranha-Säure und der Anbindung von GOPTMS bestimmt. Die mit GOPTMS beschichteten Substrate wurden für einen Tag sowohl in Wasser (neutral und pH 10) als auch in PolySia-Lösung (0.02 M) gelagert.

Massen-% GOPTMS	-	Piranha	GOPTMS	H ₂ O	H ₂ O (pH 10)	PolySia
1	15 ± 3	21 ± 3	30 ± 3	28 ± 3	18 ± 5	22 ± 4
5	17 ± 6	20 ± 3	32 ± 4	27 ± 3	11 ± 7	21 ± 2
10	14 ± 3	19 ± 3	39 ± 3	34 ± 3	20 ± 4	33 ± 3
15	18 ± 9	24 ± 9	39 ± 7	38 ± 6	25 ± 8	33 ± 5
20	18 ± 9	19 ± 8	41 ± 3	39 ± 9	28 ± 8	37 ± 3

Die Glassubstrate, die nur die Silica-Modifizierung aufweisen bzw. mit Piranha-Säure behandelt wurden, haben mit 17 bzw. 20° in etwa den gleichen Kontaktwinkel. Nach der Beschichtung mit GOPTMS kann eine Abhängigkeit des Kontaktwinkels von der eingesetzten Konzentration des GOPTMS erkannt werden, da mit steigender Konzentration der Kontaktwinkel von 30 auf 41° zunimmt. Analog zu den ohne zusätzliche Silica-Schicht hergestellten Proben (Tab. 2) bleibt der Kontaktwinkel auch nach einer eintägigen Lagerung in Wasser unverändert. Allerdings scheint eine Erhöhung des pH-Wertes auf 10 zu einer Zerstörung bzw. zumindest Ablösung der obersten Schicht zu führen, da die Kontaktwinkel deutlich kleiner werden. Ob die Anbindung der PolySia funktioniert hat, ist allein aus den Kontaktwinkelmessungen nicht eindeutig zu beurteilen. Da aber die hierfür gemessenen Werte kleiner sind als die der reinen Silanoberfläche und höher als die nach Behandlung mit pH 10, sollte zumindest bei 10 bis 20 Massen-% GOPTMS die Anbindung erfolgreich gewesen sein, da mit 33 bis 37° in etwa die gleichen Kontaktwinkel wie ohne zusätzliche Silica-Modifizierung gemessen wurden (Tab. 2 und Tab. 3). Für 1 bzw. 5 Massen-% liegen die Werte mit etwa 21° im gleichen Bereich wie der Silica-Untergrund. Allen hier aufgeführten Werten ist gemeinsam, dass sie deutlich geringer als auf den Proben ohne die Modifizierung mit der mesoporösen Silica-Schicht sind. Dieses ist verständlich, da mesoporöse Materialien im Allgemeinen eine große Anzahl von Silanolgruppen auf der Oberfläche besitzen und somit sehr hydrophil sind [134].

Wird das GOPTMS durch das GOPTES (3-Glycidyoxypropyltriethoxysilan) ersetzt, so kann die PolySia ebenfalls an silanisierte Glasoberflächen angebunden werden. Wie in Tab. 10 zu erkennen, sind hier die gemessenen Kontaktwinkel der reinen Silanoberflächen vor allem bei geringen Silankonzentrationen deutlich größer als auf mit GOPTMS modifizierten Oberflächen.

Tab. 10: Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (in °) an mit GOPTES modifizierten Objektträgern vor und nach einer eintägigen Inkubation in PolySia-Lösung (0.02 M).

Massen-% GOPTES	ohne PolySia	mit PolySia
1	71 ± 4	48 ± 1
5	72 ± 3	43 ± 3
10	72 ± 3	39 ± 4
20	74 ± 5	36 ± 2

Schon bei der Verwendung von 1 % GOPTES scheint die Oberfläche vollständig mit dem Silan abgesättigt zu sein, da eine Erhöhung der Menge an GOPTES zu keinerlei Anstieg hinsichtlich des Kontaktwinkels führt. Warum sich das GOPTES hier so deutlich vom GOPTMS unterscheidet, konnte nicht geklärt werden. Der einzige strukturelle Unterschied zwischen den beiden Epoxysilanen liegt in der Abgangsgruppe, da einmal Methanol (GOPTMS) und einem Ethanol (GOPTES) freigesetzt wird. Dabei ist die Bindung des Methanolats zum Siliciumatom weniger stabil als die des Ethanolats, so dass das Methanolat leichter abgespalten werden kann und sich somit auch die für die Hydrolyse benötigte Zeit erniedrigt. Dies führt dazu, dass die für das Verschwinden der GOPTES-Tröpfchen benötigte Zeit beim GOPTES vor allem bei Konzentrationen ab zehn Massenprozent stark ansteigt und mehrere Stunden in Anspruch nimmt. Womöglich war die Hydrolysezeit nicht ausreichend, so dass nicht das ganze Silan hydrolysiert wurde. In diesem Fall müssten bei einer Verlängerung der zur Hydrolyse zur Verfügung stehenden Zeit die Kontaktwinkel bei den hohen GOPTES-Konzentrationen weiter ansteigen. Die nach Inkubation in der PolySia-Lösung gemessenen Kontaktwinkel auf den mit GOPTES modifizierten Oberflächen (Tab. 10) ähneln denen, die auf den GOPTMS-funktionalisierten Objektträgern zu beobachten waren (Tab. 3). Die Kontaktwinkel nehmen nach Inkubation in der Polysialinsäure ab, wobei auch hier Werte um die 35° – analog zu den Werten auf GOPTMS-modifizierten Oberflächen – vorliegen. Eine Anbindung von PolySia über das GOPTES ist also ebenfalls möglich.

Zur weiteren Charakterisierung der Proben wurden IR-spektroskopische Messungen durchgeführt. Abb. 26 zeigt die IR-Spektren von GOPTMS in Lösung und von mit GOPTMS beschichteten Glassubstraten.

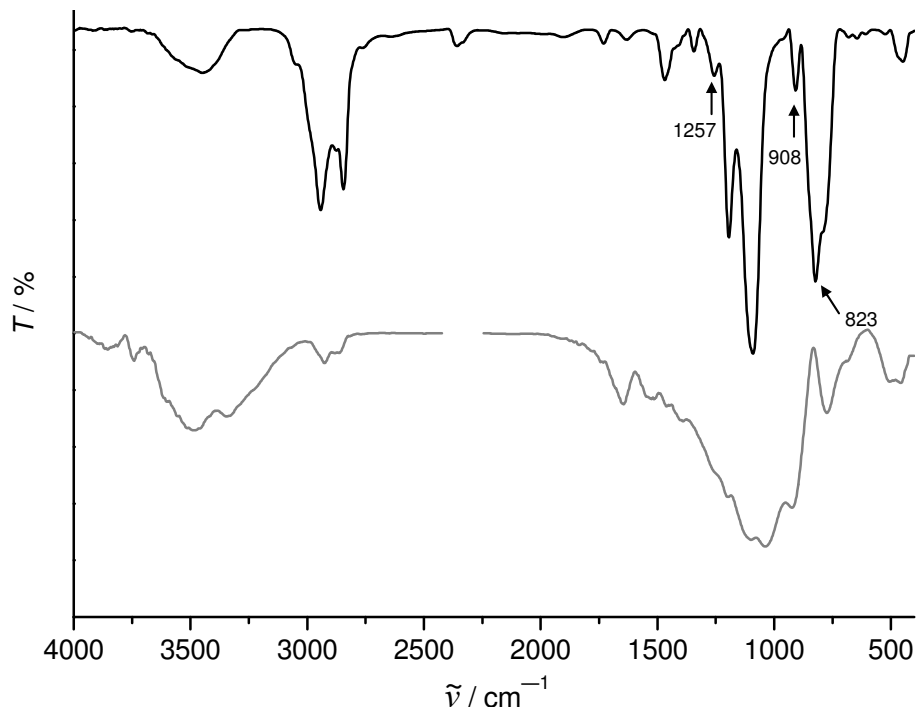


Abb. 26: IR-Spektren von reinem GOPTMS (oben) bzw. von mit GOPTMS beschichteten Objektträgern (unten).

Beim Vergleich der beiden Spektren können die für ein Epoxid charakteristischen Banden bei 1257, 908 und 823 cm^{-1} eindeutig nur in der reinen GOPTMS-Probe erkannt werden, im IR-Spektrum des beschichteten Glassubstrats sind diese Banden in der breiten Bande zwischen 1500 und 900 cm^{-1} versteckt. Dort liegen die dominierenden Schwingungen der (Si–O)-Bindungen, zum einen vom GOPTMS, zum anderen durch bei der Probenvorbereitung eingebrachtes Glas. Eine genaue Zuordnung der Banden kann Tab. 11 entnommen werden.

Tab. 11: Zuordnung der Banden in den IR-Spektren von GOPTMS und von mit GOPTMS beschichteten Glassubstraten (Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ / cm^{-1} , v: versteckt) (GOPTMS auf Glasoberfläche: GPSX) [145].

GOPTMS	GOPTMS auf Glas	Zuordnung	Quelle
-	3740	(Si–OH)-Valenzschwingung	Glas
3700-3200	3700-3100	(O–H)-Valenzschwingung	Wasser
2942	2925	(C–H)-Valenzschwingung	GOPTMS, GPSX
2844	v	(C–H)-Valenzschwingung	GOPTMS, GPSX
1630	1646	(O–H)-Deformationsschwingung	Wasser
1468	v	(C–H)-Deformationsschwingung	GOPTMS, GPSX
1344	v	(C–H)-Deformationsschwingung	GOPTMS, GPSX
1257	v	(C–O)-Valenzschwingung	GOPTMS, GPSX
1194	v	(C–O)-Valenzschwingung	GOPTMS, GPSX
1090	1098	(Si–O–Si)-Valenzschwingung	Glas
-	1037	(C–O)-Valenzschwingung	Glas
-	923	(Si–OH)-Deformationsschwingung	Glas
908	v	(C–O)-Valenzschwingung	GOPTMS, GPSX
823	-	(C–O)-Valenzschwingung	GOPTMS, GPSX
778	774	(Si–O)-Deformationsschwingung	GOPTMS, GPSX, Glas
447	458	(O–Si–O)-Deformationsschwingung	Glas

Nach der Beschichtung der Glasobjektträger mit GOPTMS wurden diese einer Inkubation in wässriger Polysialinsäure unterzogen, ein nach diesem Schritt registriertes IR-Spektrum ist in Abb. 27 gezeigt.

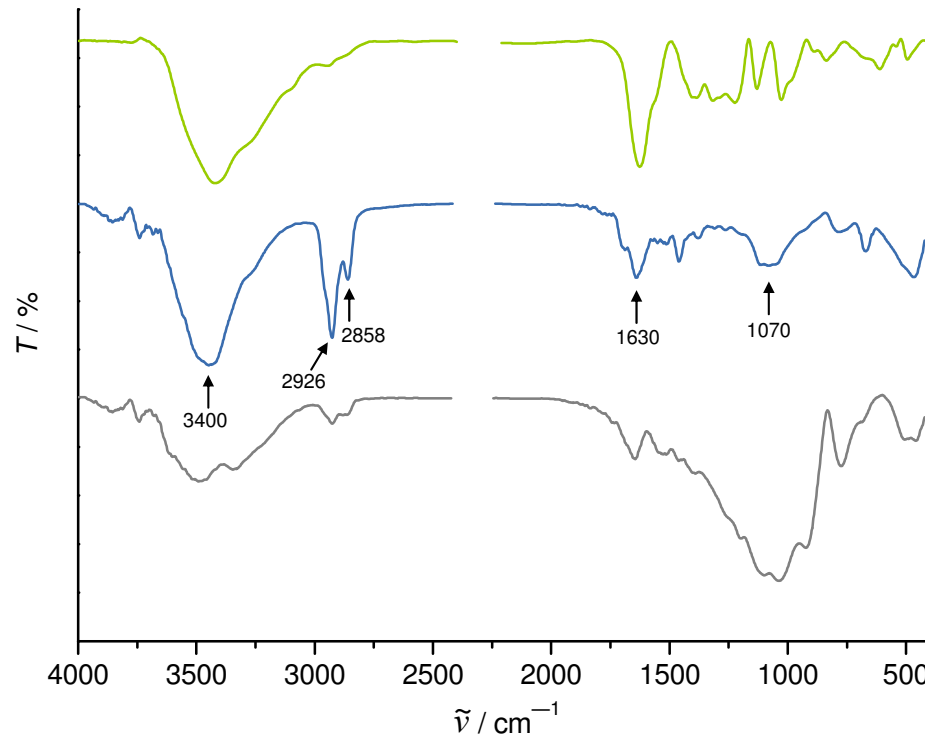


Abb. 27: IR-Spektren von PolySia (oben), PolySia angebonden über GOPTMS (Mitte) bzw. von mit GOPTMS beschichteten Glassubstraten (unten).

Nach der Inkubation in der PolySia-Lösung kommt es zu einer Intensitätszunahme der breiten, für Wasser charakteristischen breiten Bande zwischen 3700 und 3200 cm^{-1} , genauso wie der Bande bei 1630 cm^{-1} . Im Vergleich dazu nimmt die Intensität der breiten Silica-Bande bei 1100-1050 cm^{-1} stark ab, was möglicherweise damit zu erklären ist, dass bei der Probenpräparation weniger Glassplitter in die Probe gelangt sind. Außerdem kann man sehr deutlich die für die (C-H)-Valenzschwingungen charakteristischen Banden bei 2926 und 2858 cm^{-1} erkennen. Eine Auflistung der zu beobachtenden Banden ist in Tab. 12 gegeben.

Tab. 12: Zuordnung der Banden in den IR-Spektren von PolySia und von Glassubstraten, die mit GOPTMS sowie mit GOPTMS und PolySia modifiziert wurden (Wellenzahlen $\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$) (GOPTMS auf Glas angebunden: GPSX) [145].

GOPTMS auf Glas	PolySia	PolySia an GOPTMS	Zuordnung	Quelle
3700-3100	3700-3000	3700-3000	(O–H)-Valenzschwingung	Wasser, PolySia
2925	2937	2926	(C–H)-Valenzschwingung	GPSX, PolySia
2844	-	2858	(C–H)-Valenzschwingung	GPSX, PolySia
1646	1620	1638	(O–H)-Deformationsschwingung	Wasser
-	1650	1638	(C=O)-Valenzschwingung	PolySia
1450	1402	1460	(C–H)-Deformationsschwingung	GPSX, PolySia
1344	1315	1380	(C–H)-Deformationsschwingung	GPSX, PolySia
1257	1276	1262	(C–O)-Valenzschwingung	GPSX, PolySia
1194	1220	-	(C–O)-Valenzschwingung	GPSX, PolySia
1098	-	1080	(Si–O–Si)-Valenzschwingung	Glas, GPSX
1037	1024	-	(C–O)-Valenzschwingung	Glas
923	-	-	(Si–OH)-Deformationsschwingung	Glas
823	827	-	(C–O)-Valenzschwingung	GPSX
774	-	786	(Si–O)-Deformationsschwingung	GPSX, Glas
458	-	469	(O–Si–O)-Deformationsschwingung	Glas

In Ermangelung an für die Polysialinsäure charakteristischen Banden kann nur indirekt auf ihre Präsenz an der Glassubstrat-Oberfläche geschlossen werden. Die typischen Epoxidbanden bei 908 und 823 cm^{-1} sind nach der Inkubation in PolySia-Lösung nicht mehr zu erkennen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese eine Reaktion, eventuell mit der PolySia, eingegangen sind. Weiterhin besitzt die Polysialinsäure eine große Wasseraffinität, so dass auch die Intensitätszunahme der für Wasser charakteristischen Banden zwischen 3700 und 3000 cm^{-1} sowie bei etwa 1630 cm^{-1} ein Indiz für das Vorliegen von immobilisierter PolySia sein könnte. Problematisch ist hierbei allerdings, dass sich eine Vielzahl der IR-Spektren, die nach der Modifizierung mit Polysialinsäure angefertigt wurden, kaum von denen einer reinen GOPTMS-modifizierten Oberfläche unterscheiden, so dass eine Aussage über den Erfolg der Immobilisierung allein aufgrund der IR-Spektroskopie nicht getroffen werden kann.

Für einen direkten Nachweis von PolySia wurde der für Sialinsäure spezifische TBA-Test verwendet, der die freien reduzierenden Enden der Sialinsäure detektiert, so dass über die gemessene Absorption auf die Menge an gebundener PolySia geschlossen werden kann. Der TBA-Test sowie die später folgenden MTT-Tests wurden fast durchgängig mit Glasfritten als Substratmaterial durchgeführt. Dies geschah zum einen aus praktischen Gründen aufgrund der besseren Handhabbarkeit der Glasfritten gegenüber dünnen Glasplättchen, zum anderen besitzen die Glasfritten auch durch ihre poröse Struktur eine dreidimensionale Ausdehnung. Im Gegensatz zu Hydrogelen, die ebenfalls eine dreidimensionale Struktur haben, ist die Oberfläche der Glasfritten uneben, so dass ausplattierte Zellen dort nicht wie bei den Hydrogelen abrutschen.

In Abb. 28 ist gezeigt, wie sich unbehandelte Glasfritten gegenüber mit GOPTMS und PolySia modifizierten Materialien verhalten.

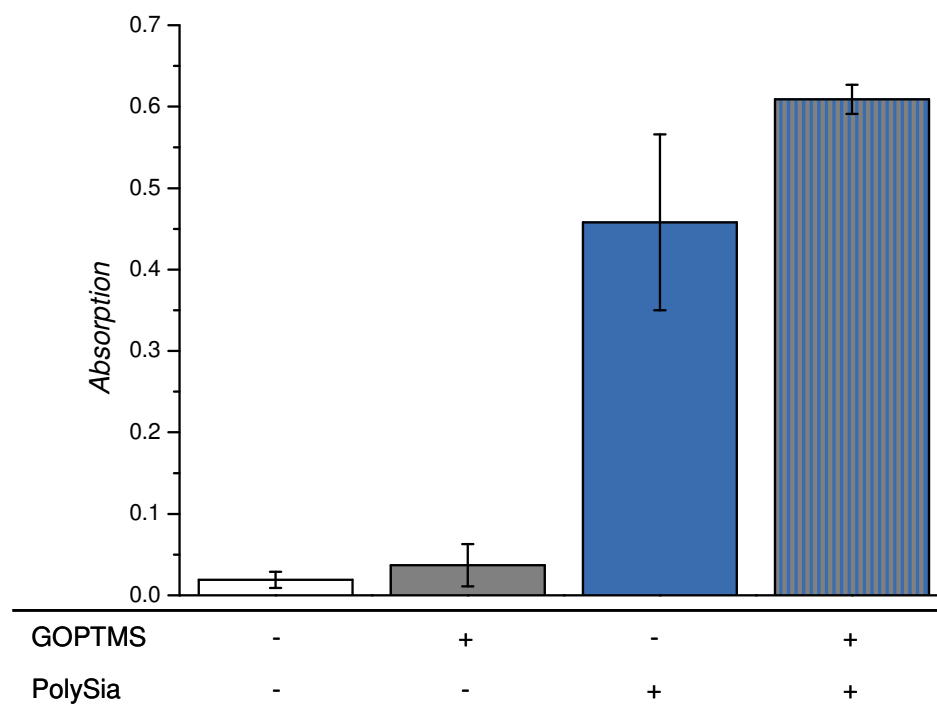


Abb. 28: Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten mit unterschiedlicher Modifizierung (GOPTMS 10 Massen-%, PolySia-Lösung 0.02 M).

Es ist deutlich zu erkennen, dass die unbehandelten bzw. nur mit GOPTMS modifizierten Glasfritten nahezu keine Absorption zeigen, so dass diese bei den folgenden Versuchen vernachlässigt werden kann. Es zeigte sich, dass die Absorption bei einer Anbindung von PolySia über das GOPTMS mit 0.6 deutlich größer war als wenn die PolySia direkt auf der Glasober-

fläche adsorbiert wurde. Tendenziell scheinen beiden Methoden zur Immobilisierung von PolySia auf Glasoberflächen geeignet zu sein.

In Abb. 29 ist dargestellt, welchen Einfluss die Konzentration des GOPTMS auf die Menge an angebundener PolySia besitzt.

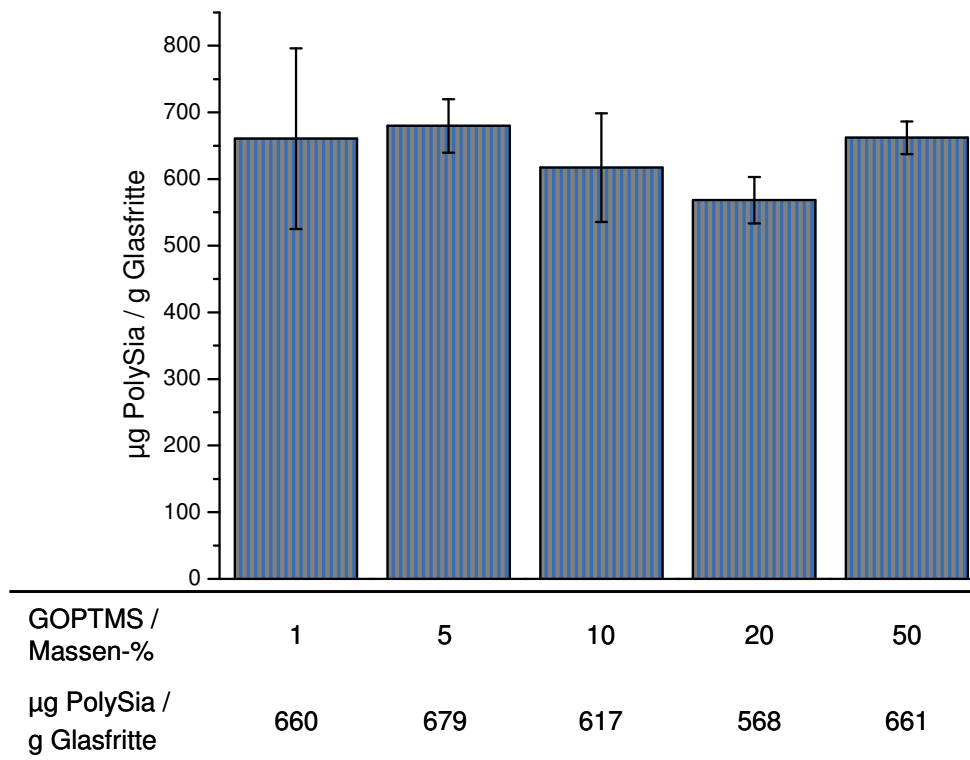


Abb. 29: Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten, auf denen PolySia (PolySia-Lösung 0.034 M) über GOPTMS angebunden wurde, in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration von GOPTMS.

Ein direkter Zusammenhang zwischen der Konzentration von GOPTMS und der Menge an gebundener PolySia kann nicht erkannt werden. Die Mengen variieren zwischen 570 und 680 µg PolySia/g Glasfritte, eine Erhöhung der GOPTMS-Konzentration führt nicht zu einer Steigerung der Menge an immobilisierter PolySia. Dieses Ergebnis korreliert gut mit den Ergebnissen der Kontaktwinkelmessungen, bei denen man erkennen konnte, dass zwar der Kontaktwinkel einer reinen GOPTMS-Oberfläche mit zunehmender Konzentration des Silans anstieg (Abb. 24), der Kontaktwinkel bei Anwesenheit der PolySia auf der Oberfläche aber unabhängig von der gewählten Konzentration des Silans bei etwa 35° lag (Tab. 2). Dieses Resultat gibt einen Hinweis darauf, dass die PolySia aufgrund ihres großen sterischen Anspruchs nur einen Teil der auf der Oberfläche vorhandenen Epoxidgruppen zur Anbindung nutzen könnte. Trotzdem wurde der gleiche Sachverhalt erneut untersucht, allerdings unter Verwendung von GOPTES (Abb. 30).

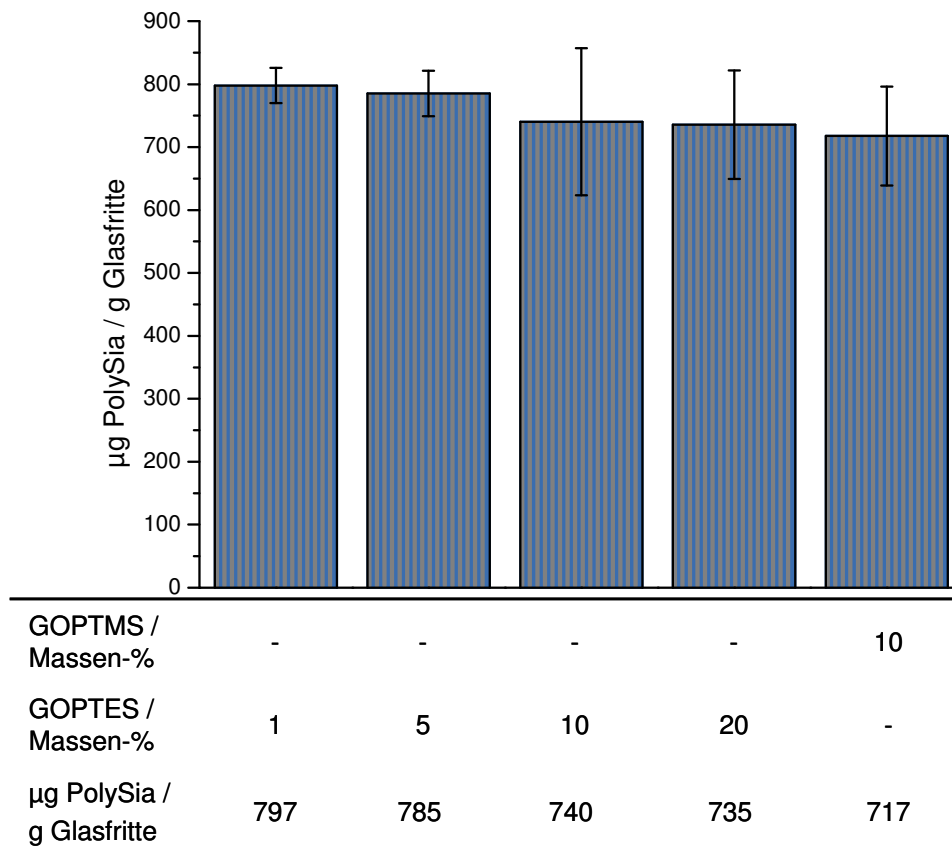


Abb. 30: Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten zur Untersuchung des Einflusses der Konzentration von GOPTES auf die Menge an immobilisierter PolySia (PolySia-Lösung 0.02 M).

Genau wie beim GOPTMS zeigte sich auch hier, dass die Konzentration des zur Anbindung der PolySia verwendeten Silans allenfalls einen geringen Einfluss besitzt. Es gibt lediglich eine leichte Tendenz, die darauf hindeutet, dass mit einer Erhöhung der Konzentration leicht geringere Mengen PolySia gebunden werden können. Ebenfalls ist festzustellen, dass die Anbindung über das GOPTES die gleichen Mengen an PolySia wie das GOPTMS immobilisieren kann.

Anschließend wurde der Einfluss des pH-Wertes der verwendeten PolySia-Lösung auf die Anbindung untersucht (Abb. 31).

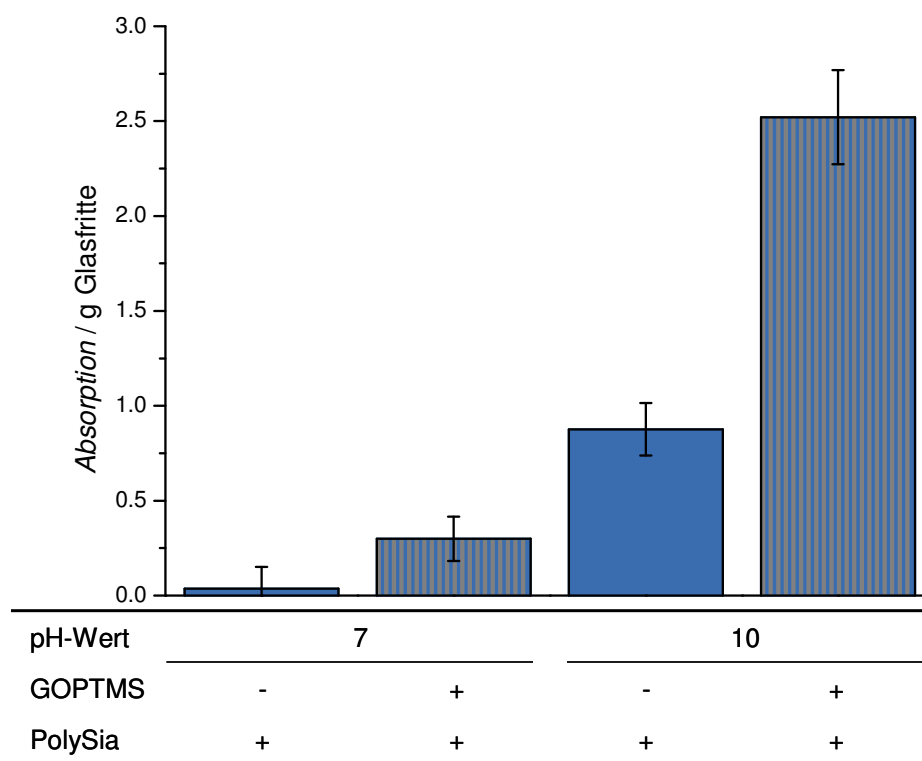


Abb. 31: Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten mit adsorbierter bzw. über GOPTMS (10 Massen-%) angebundener PolySia (PolySia-Lösung 0.026 M) bei zwei verschiedenen pH-Werten.

Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass bei beiden gewählten pH-Werten die Immobilisierung der PolySia über das GOPTMS erheblich besser funktioniert als die einfache Adsorption, was einen Hinweis für eine kovalente Anbindung der PolySia an das Silan darstellt. Erfolgt die Anbindung bei einem pH-Wert von 10 über GOPTMS, so beträgt die Absorption 2.5 bezogen auf ein Gramm Glas, während dieser Wert bei der direkten Adsorption nur bei etwa eins liegt. Es wird ebenfalls deutlich, dass eine Erhöhung des pH-Wertes bei gleicher Immobilisierungsmethode ebenfalls zu einer Steigerung der angebondenen Menge an PolySia führt. Bei der Immobilisierung über das GOPTMS steigt die Menge an gebundener PolySia mit Erhöhung des pH-Wertes um etwa Faktor 8 von 0.3 auf 2.6 pro Gramm Glasfritte, während bei der direkten Adsorption ein Anstieg von 0.04 auf 0.9 pro Gramm Glasfritte zu verzeichnen ist.

Weiterhin wurde untersucht, inwiefern die Dauer der Inkubation der mit GOPTMS beschichteten Glassubstrate in der PolySia-Lösung die angebundene Menge an PolySia beeinflusst (Abb. 32).

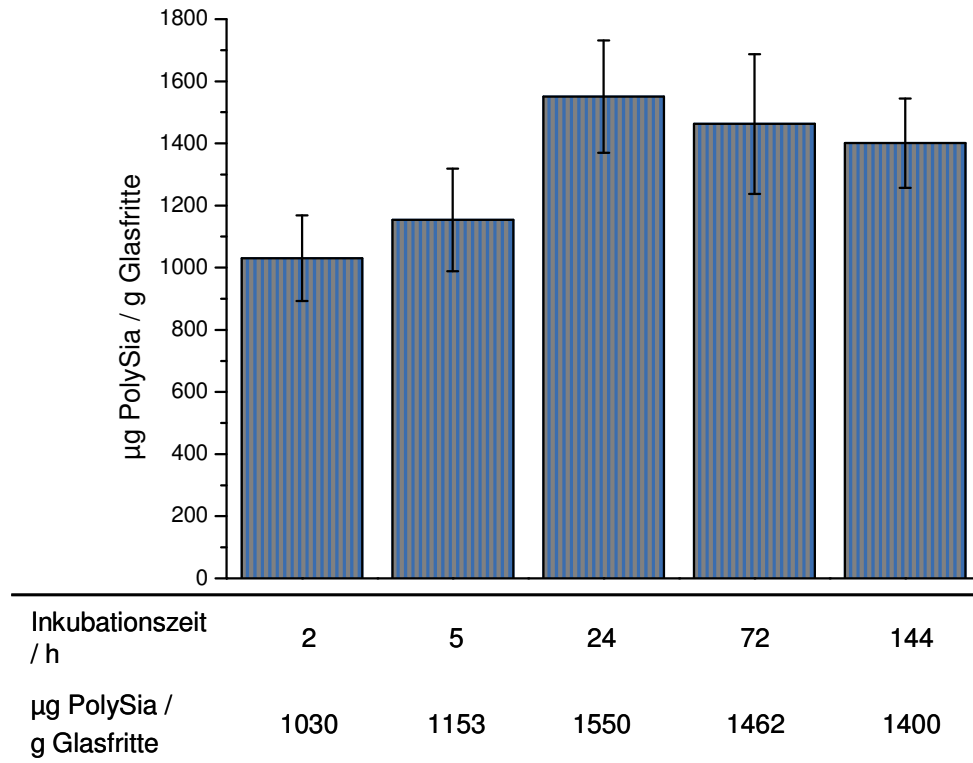


Abb. 32: Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten; Einfluss der Inkubationszeit auf die Menge an über GOPTMS (10 Massen-%) immobilisierter PolySia (PolySia-Lösung 0.026 M).

Liegt die Inkubationszeit bei zwei bzw. fünf Stunden so können etwa 1000 bzw. 1100 µg PolySia/g Glasfritte absorbiert werden. Wird die Inkubationszeit auf einen Tag erhöht, so beträgt die Menge an immobilisierter Polysialinsäure etwa 1500 µg/g Glasfritte. Eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit sorgt nicht für eine weitere Zunahme an immobilisierter Polysialinsäure, sondern strebt wahrscheinlich einem Sättigungswert zu. Daher ist davon auszugehen, dass eine Inkubationszeit von einem Tag für die Anbindung einer großen Menge PolySia ausreichend ist.

Abschließend wurde mit Hilfe des TBA-Tests ebenfalls untersucht, welchen Einfluss die Konzentration der PolySia-Lösung für die immobilisierte Menge an Polysialinsäure besitzt (Abb. 33).

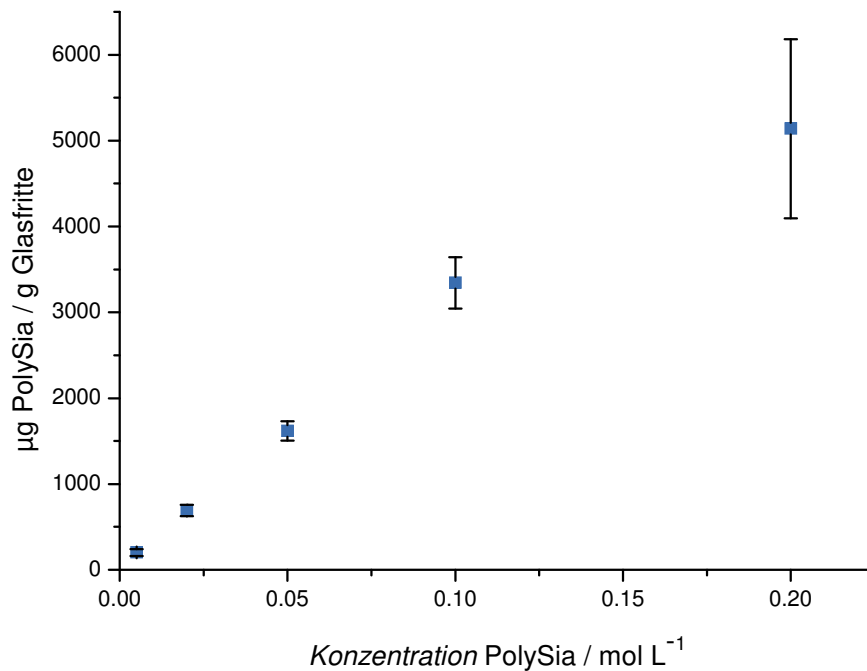


Abb. 33: Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten, bei denen die Anbindung der PolySia über GOPTMS (10 Massen-%) aus Stammlösungen mit unterschiedlicher Konzentration stattfand.

Es lässt sich erkennen, dass für die Immobilisierung von Polysialinsäure auf den mit GOPTMS beschichteten Glasfritten ein deutlicher Zusammenhang mit der Konzentration der verwendeten PolySia-Lösung besteht. Dieses Ergebnis stimmt insofern mit denen der Kontaktwinkelmessungen aus Tab. 4 überein, dass die Anbindung der PolySia bei niedrigen Konzentrationen langsamer verläuft, d.h. bei gleicher Inkubationszeit steigt die Menge an angebundener PolySia mit der Konzentration der verwendeten PolySia-Lösung an. Möglich wäre allerdings ebenfalls, dass sich Polysialinsäure mit steigender Konzentration vermehrt in den Poren der Glasfritte festsetzt und auch durch die späteren Waschschrte nicht entfernt werden konnte, was ebenfalls zu einer Erhöhung der über den TBA-Test nachgewiesenen Menge führen würde.

Um die immobilisierte Polysialinsäure spezifisch nachzuweisen, wurden ELISA-Tests durchgeführt. Unter Verwendung des PolySia-spezifischen Antikörpers mab735 konnten die in Abb. 34 gezeigten Resultate gewonnen werden.

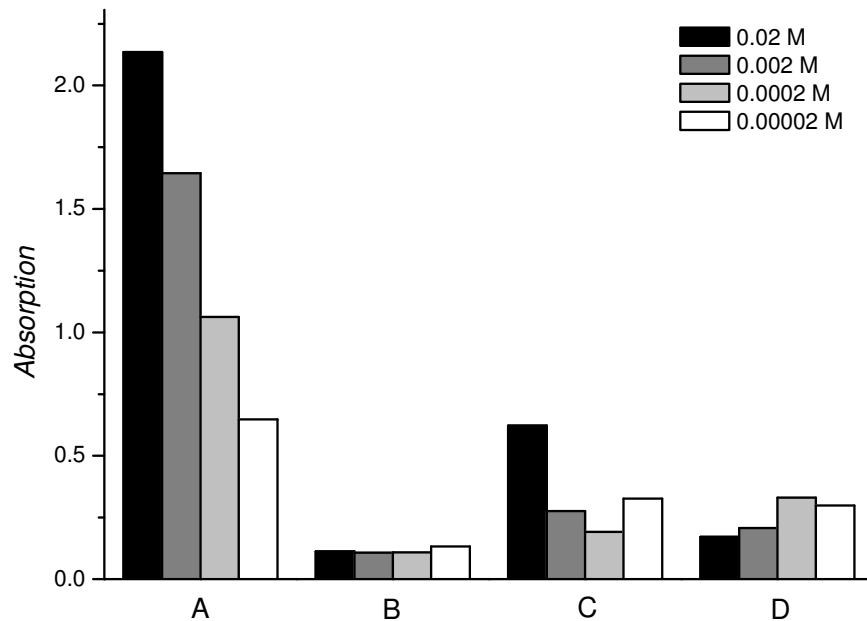


Abb. 34: PolySia-spezifischer ELISA auf Zellkulturplatten und Deckgläschen (A: käufliche Colominsäure und B: deacetylierte PolySia, Adsorption jeweils direkt in Zellkulturplatten durchgeführt; C: Adsorption von deacetylierter PolySia auf Deckgläschen, D: Immobilisierung von deacetylierter PolySia über GOPTMS (10 Massen-%) auf Deckgläschen, Inkubationszeit jeweils ein Tag.

Auffällig ist, dass der für die Polysialinsäure spezifische Antikörper bei gleicher Konzentration wesentlich stärker an die Colominsäure als an die deacetylierte Polysialinsäure bindet und so eine wesentlich größere Absorption verursacht. Bei der Colominsäure, die in der acetylierten Form vorliegt, kann eindeutig ein Zusammenhang mit den Konzentrationen der zur Adsorption eingesetzten Lösungen erkannt werden (Reihe A), da mit sinkender Konzentration auch die gemessene Absorption abnimmt. Im Vergleich dazu scheint bei der Adsorption bzw. Immobilisierung über das GOPTMS keine Konzentrationsabhängigkeit vorzuliegen. Besonders deutlich wird das bei Betrachtung der Adsorption der deacetylierten PolySia (Reihe B) direkt in der Zellkulturplatte, da dort die gemessenen Absorptionen für alle vier eingesetzten Konzentrationen nahezu gleich sind. Wird die Adsorption auf Deckgläschen durchgeführt (Reihe C), so sind die Werte insgesamt größer, aber weiterhin auf einem niedrigen Niveau, eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit kann nicht erkannt werden. Letzteres trifft ebenso auf die über das GOPTMS immobilisierte deacetylierte PolySia zu (Reihe D), hier scheinen die Werte mit sinkender Konzentration leicht anzusteigen. Ein Unterschied hinsichtlich der gemessenen Absorption zwischen der reinen Adsorption und der Anbindung über das Epoxysilan kann nicht

festgestellt werden, so dass die Menge an gebundener PolySia in beiden Fällen in etwa gleich groß zu sein scheint. Da die Werte der deacetylierten Form der PolySia so viel kleiner sind als die der acetylierten Form, ist davon auszugehen, dass der Antikörper im Falle der deacetylierten Variante nicht mehr die nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ passende Bindungsstelle findet, da sich aufgrund der Deacetylierung die Struktur geändert hat.

Wird die Reaktionszeit für die Adsorption bzw. Immobilisierung verlängert und mit einer höheren Konzentration der verwendeten deacetylierten Polysialinsäure durchgeführt, kann ein deutlicher Unterschied zwischen der Adsorption und der Immobilisierung über das GOPTMS beobachtet werden (Abb. 35).

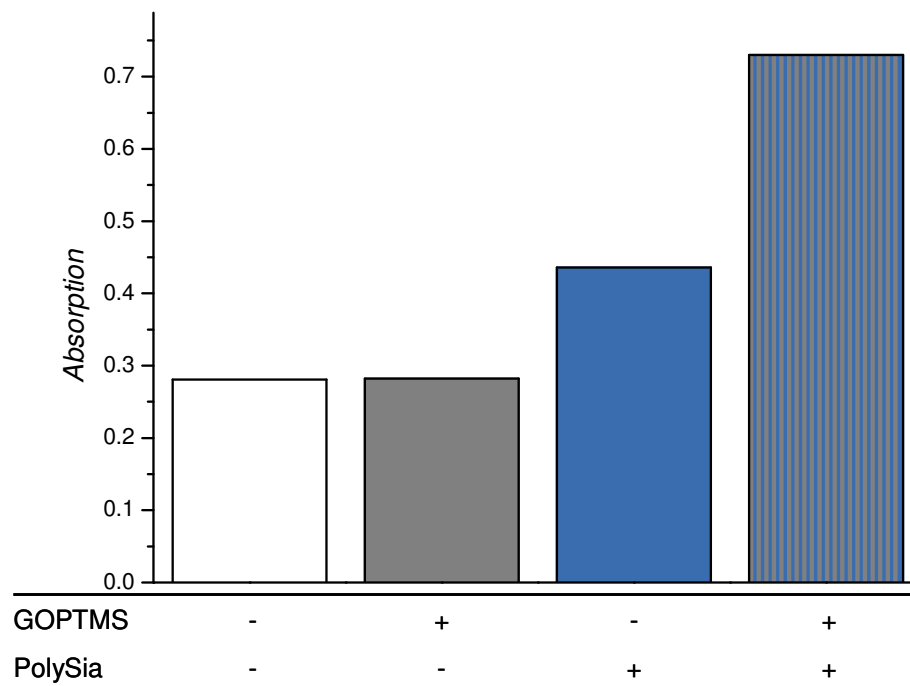


Abb. 35: Ergebnisse des PolySia-spezifischen ELISA-Tests auf Deckgläsern nach Adsorption bzw. Immobilisierung von PolySia (PolySia-Lösung 0.02 M) via GOPTMS (10 Massen-%).

Unbehandelte und nur mit GOPTMS modifizierte Proben haben die gleiche Absorption, die durch unspezifische Bindung des Antikörpers an die Oberfläche hervorgerufen wird. Die direkte Adsorption von Polysialinsäure auf das Glassubstrat ruft eine Absorption von 0.43 hervor, während für die Absorption von über das GOPTMS angebundener PolySia ein wesentlich größerer Wert von 0.73 gemessen werden kann. Der hier am Institut für Neuroanatomie (MHH) bestimmte Wert unterscheidet sich allerdings deutlich von der in der Technischen Chemie (LUH) in Abb. 34 bestimmten Absorption von etwa 0.2. Gewisse Schwankungen bei biologischen Tests können auftreten, ob dieses die alleinige Ursache für die unterschiedlichen Messwerte war oder ob möglicherweise die Qualität der Beschichtungen unterschiedlich war,

konnte nicht eindeutig geklärt werden. Trotzdem spricht das Ergebnis aus Abb. 35 eindeutig dafür, dass die PolySia in größeren Mengen auf den Glassubstraten immobilisiert werden kann, wenn sie über das GOPTMS angebunden wird. Weitergehend kann dieses Ergebnis sogar dahin gehend gedeutet werden, dass eine starke, wohl kovalente Bindung zwischen dem Epoxysilan und der Polysialinsäure vorliegt.

Auch auf den modifizierten Glasfritten wurde ein PolySia-ELISA durchgeführt, das Resultat ist in Abb. 36 gezeigt.

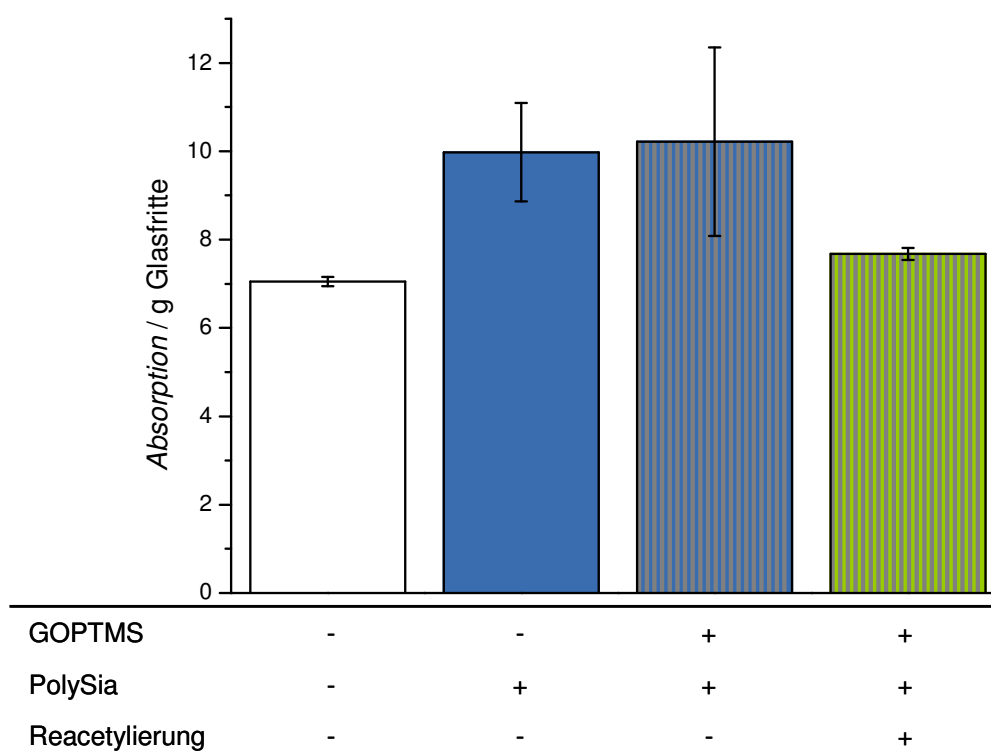


Abb. 36: Ergebnisse des PolySia-spezifischen ELISA-Tests auf Glasfritten, auf denen PolySia (PolySia-Lösung 0.02 M) über Adsorption bzw. über GOPTMS (10 Massen-%) angebunden wurde. Die Reacetylierung wurde mit Acetanhydrid in wässriger Lösung durchgeführt.

Aufgrund der zu beobachteten hohen Absorption von etwa 7 pro Gramm Glasmaterial kann davon ausgegangen werden, dass eine unspezifische Bindung des Antikörpers in relativ großem Maße stattfindet. Dieses könnte im Vergleich zur geringeren unspezifischen Bindung in Abb. 35 auf Deckgläschen vor allem daran liegen, dass aufgrund der Porosität der Glasfritten das Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mehr Zeit in Anspruch genommen hätte als es die Standardprozedur vorsieht, wodurch nicht alle Bindungsstellen geblockt werden konnten. Trotzdem lässt sich erkennen, dass es sowohl durch direkte Adsorption aus einer PolySia-Lösung als auch durch Anbindung über das GOPTMS möglich war, PolySia auf den Glasfritten

zu immobilisieren. Ein Unterschied zwischen den beiden Immobilisierungsmethoden kann nicht erkannt werden. Zusätzlich wurde versucht, die auf den Glasfritten über das GOPTMS immobilisierte PolySia zu reactivity, um dem Antikörper die ursprüngliche Struktur zu präsentieren. Dieses Vorgehen blieb allerdings erfolglos, da aufgrund der gemessenen Absorptionswerte, die im Bereich der unmodifizierten Glasfritten lagen, kein Hinweis auf das Vorliegen von PolySia zu erkennen ist.

Um die mit Polysialinsäure modifizierten Glassubstrate auf eine mögliche toxische Wirkung gegenüber Zellen zu untersuchen, wurden Zelladhäsions- und Zellviabilitätsexperimente durchgeführt. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt, hierzu wurden immortalisierte Schwann-Zellen verwendet. Abb. 37 und Abb. 38 zeigen den Vergleich zwischen unbeschichteten und mit PolySia modifizierten Glasfritten.

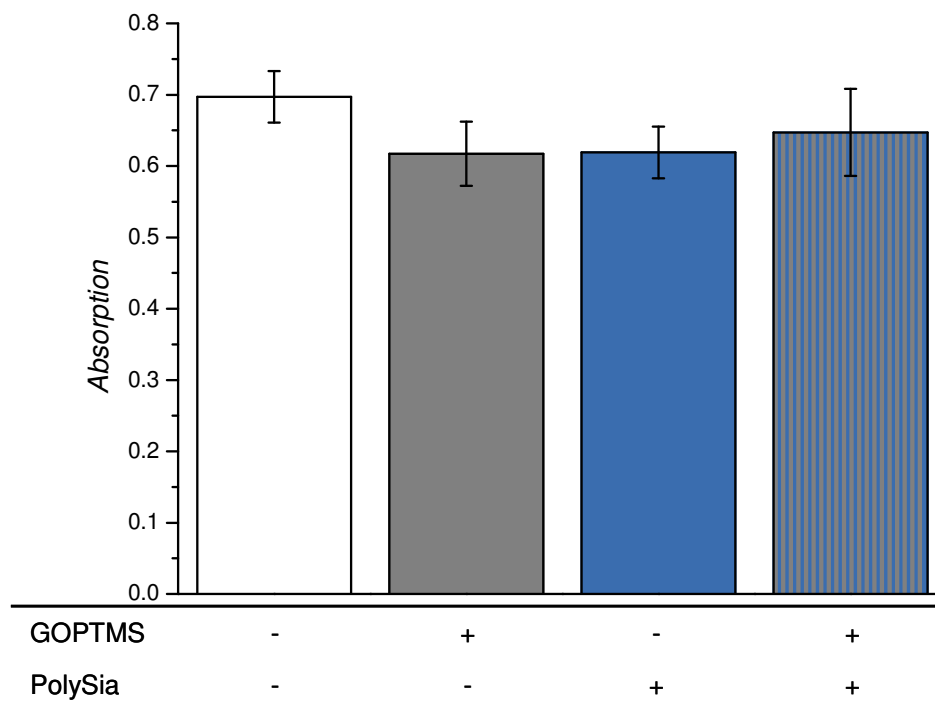


Abb. 37: MTT-Test nach 14 Tagen von immortalisierten Schwann-Zellen auf mit GOPTMS (10 Massen-%) und/oder PolySia (PolySia-Lösung 0.025 M) modifizierten Glasfritten, unbeschichtete Glasfritten als Vergleichsmaterial.

Die über den MTT-Test bestimmte Viabilität von Zellen ist umso größer, je größer die gemessene Absorption ist. Da nur lebende, stoffwechselaktive Zellen in der Lage sind, den gelben Farbstoff MTT in den blauen Formazan-Komplex umzusetzen, können über die Absorption qualitativ Rückschlüsse auf die vorhandene Anzahl an Zellen getroffen werden. Da die Glasfritten alle mit der gleichen Anzahl von Zellen besiedelt wurden und die gemessene Ab-

sorption auf allen Materialien zwischen 0.6 und 0.7 liegt, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Zahl der Zellen nicht signifikant unterscheidet. Das heißt aber auch, dass sich die Zellen auf allen Materialien unabhängig vom Vorhandensein des Silans oder der Polysialinsäure gleich „wohl“ fühlen. Das ist insofern wichtig, insbesondere im Vergleich mit gänzlich unbehandelten Glasfritten, als dass somit auch keine toxische Wirkung von den Beschichtungen auf die Zellen festzustellen ist, so dass eine Anwendung als Implantatmaterial daher möglich ist. Aufgenommene Bilder der angefärbten Glasfritten werden in Abb. 38 präsentiert.

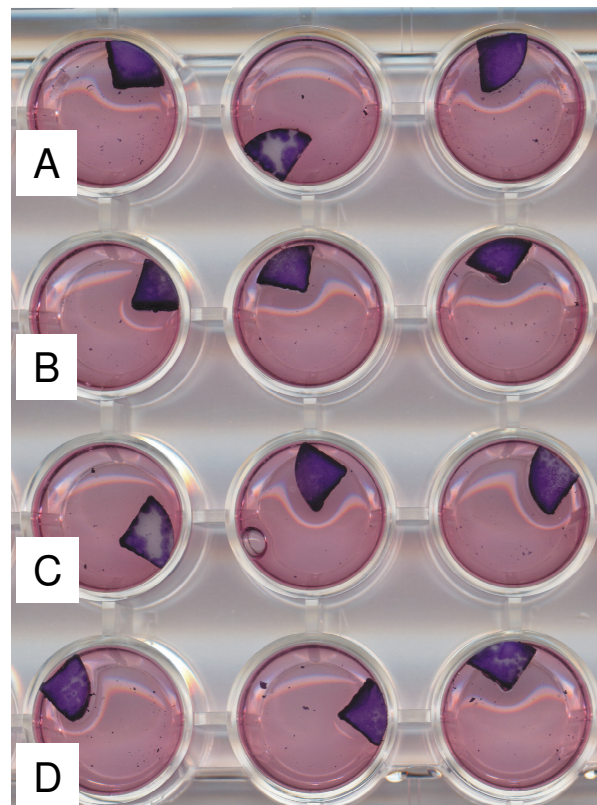


Abb. 38: Bilder vom MTT-Test nach 14 Tagen mit immortalisierten Schwann-Zellen auf mit GOPTMS (10 Massen-%) und/oder PolySia (PolySia-Lösung 0.025 M) modifizierten Glasfritten, unbehandelte Glasfritten als Vergleichsmaterial (A) (B: GOPTMS, C: PolySia, D: GOPTMS + PolySia).

Die modifizierten Fritten wurden ebenfalls mit Hilfe der DAPI-Färbung charakterisiert. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an die DNA von Zellen anlagert, so dass die Zellkerne unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht werden können (Abb. 39).

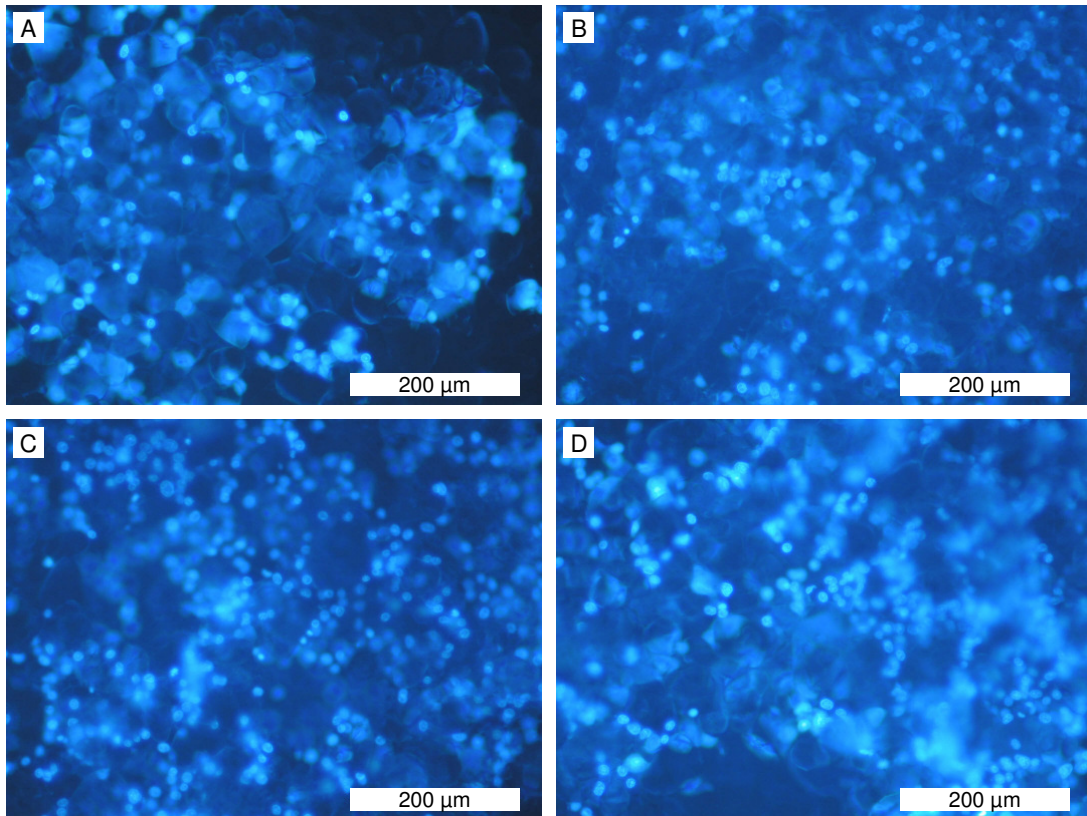


Abb. 39: DAPI-Färbung nach 14 Tagen an mit immortalisierten Schwann-Zellen besiedelten Glasfritten nach deren Modifizierung mit GOPTMS (10 Massen-%) und/oder PolySia (PolySia-Lösung 0.025 M) (A: unbehandelt, B: GOPTMS, C: PolySia, D: GOPTMS + PolySia).

Aus der Abbildung ist erkennbar, dass es zwischen den unterschiedlich modifizierten Glassubstraten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der Zellen gibt. Die Anzahl der Zellen auf den unbehandelten Glasfritten ist etwa ebenso groß wie die auf PolySia-modifizierten Glasfritten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Anbindung von PolySia über GOPTMS als Linker keine toxischen Effekte auf Zellen ausübt.

Es wurde ebenfalls untersucht, inwiefern die Konzentration von GOPTMS einen Einfluss auf die Zellviabilität hat (Abb. 40).

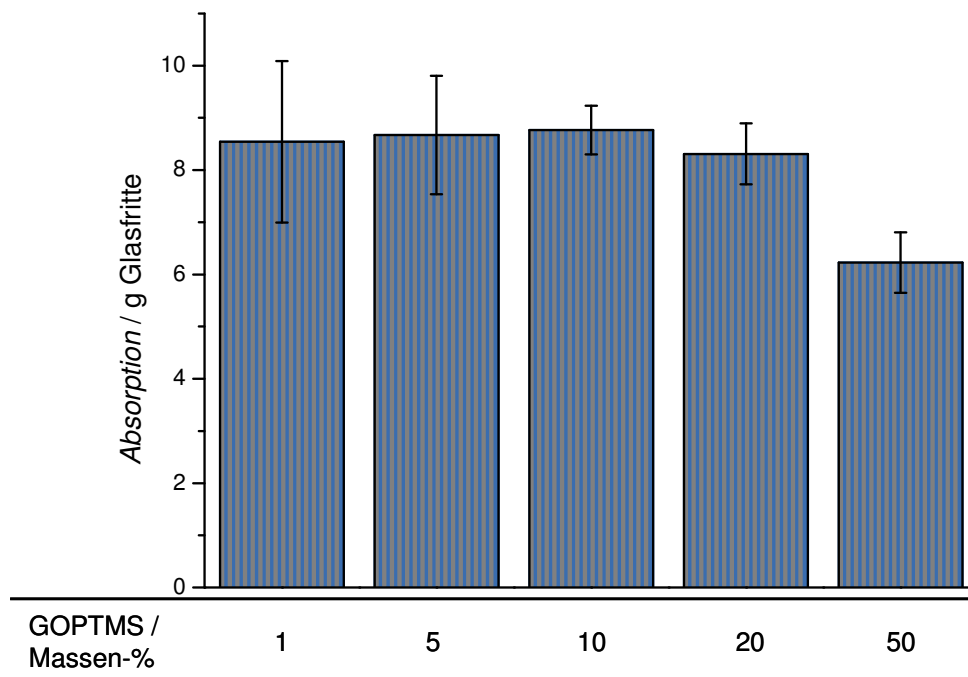


Abb. 40: MTT-Test nach 14 Tagen mit immortalisierten Schwann-Zellen auf Glasfritten, auf denen PolySia (PolySia-Lösung 0.02 M) über GOPTMS angebunden wurde; Einfluss der Konzentration der GOPTMS-Lösung.

Man kann eindeutig erkennen, dass die Absorption pro Gramm Glasfritte bei Massenkonzentrationen zwischen 1 und 20 Massen-% GOPTMS bei etwa 8.5 pro Gramm Glasfritte liegt, nur wenn 50 Massen-% GOPTMS verwendet werden, liegt dieser Wert mit etwa 6 pro Gramm Glasfritte niedriger. Das könnte bedeuten, dass zu hohe Konzentrationen von GOPTMS einen leicht negativen Einfluss auf die verwendeten Zellen haben. Dieses könnte mit einer Erhöhung der Schichtdicke von GOPTMS auf den Glasfritten zu tun haben, so dass sich die Zellen nicht so gut in die vorhandenen Poren einpassen können.

Es wurde ebenfalls untersucht, ob die Immobilisierung bei verschiedenen pH-Werten der PolySia-Lösung einen Einfluss auf die Zellen besitzt. Wie in Abb. 41 zu erkennen, ist die gemessene Viabilität der immortalisierten Schwann-Zellen auf den beschichteten Glasfritten bei allen getesteten Materialien nahezu identisch. Weder bei der direkten Adsorption von Poly-sialinsäure bzw. der Immobilisierung über GOPTMS ist ein Einfluss des pH-Werts festzustellen.

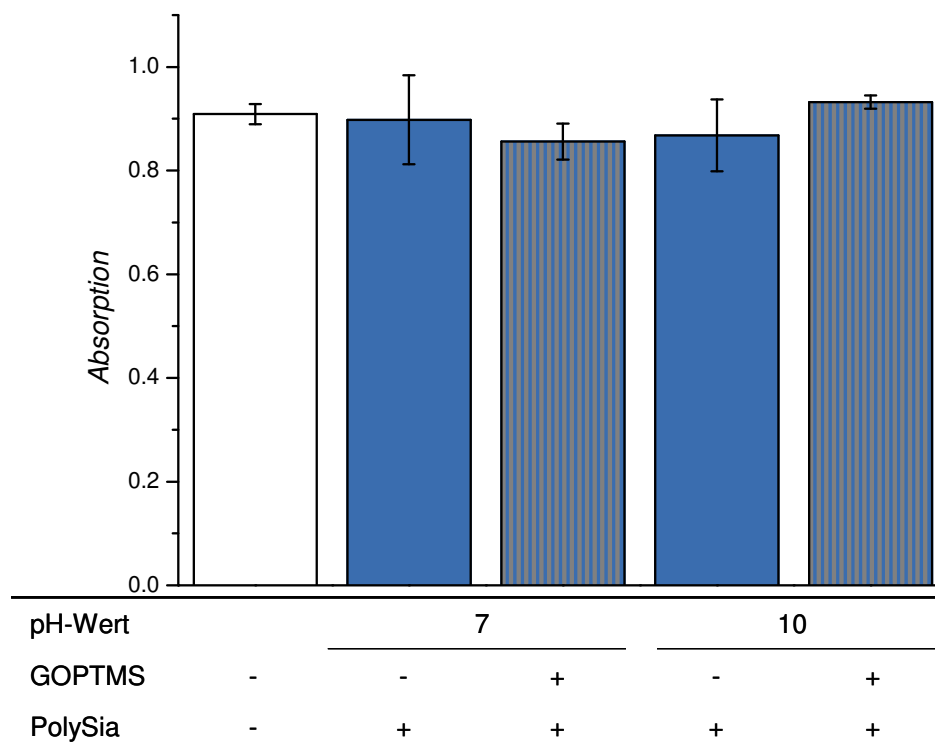


Abb. 41: Ergebnisse des MTT-Tests nach 14 Tagen mit immortalisierten Schwann-Zellen auf mit PolySia bzw. mit GOPTMS (10 Massen-%) und PolySia (PolySia-Lösung 0.026 M) beschichteten Glasfritten. Der pH-Wert der wässrigen PolySia-Lösungen betrug 7 bzw. 10.

Um zu überprüfen, ob die Porengröße der verwendeten Glasfritten einen Einfluss auf die Zellviabilität besitzt, wurde der MTT-Test mit drei verschiedenen Porositäten wiederholt (Abb. 42).

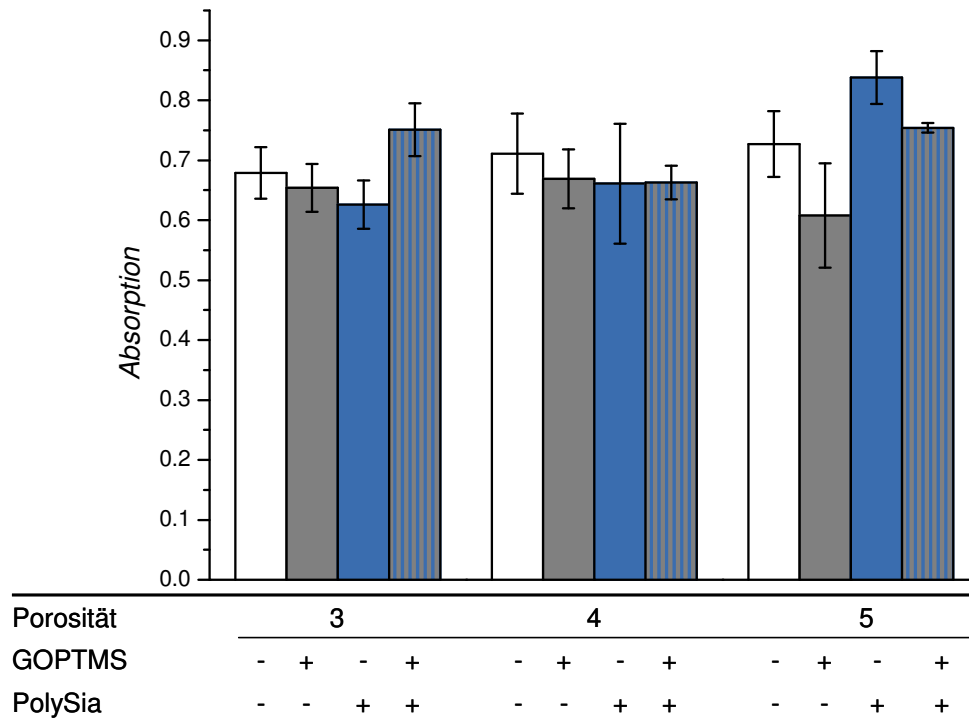


Abb. 42: Ergebnisse des MTT-Tests nach 14 Tagen mit immortalisierten Schwann-Zellen auf mit GOPTMS (10 Massen-%) und/oder PolySia (PolySia-Lösung 0.026 M) modifizierten Glasfritten mit unterschiedlichen Porositäten bzw. Porengrößen (Porosität 3: 16-40 μm , Porosität 4: 10-16 μm , Porosität 5: 1-1.6 μm).

Es zeigte sich, dass die gemessene Absorption bei fast allen Materialien zwischen 0.6 und 0.8 lag. Die Viabilität der Zellen ist daher weder von der Art der Beschichtung (GOPTMS, PolySia) noch von der Porosität der verwendeten Glasfritten abhängig. Die nach dem Anfärben aufgenommenen Bilder sind in Abb. 43 gezeigt.

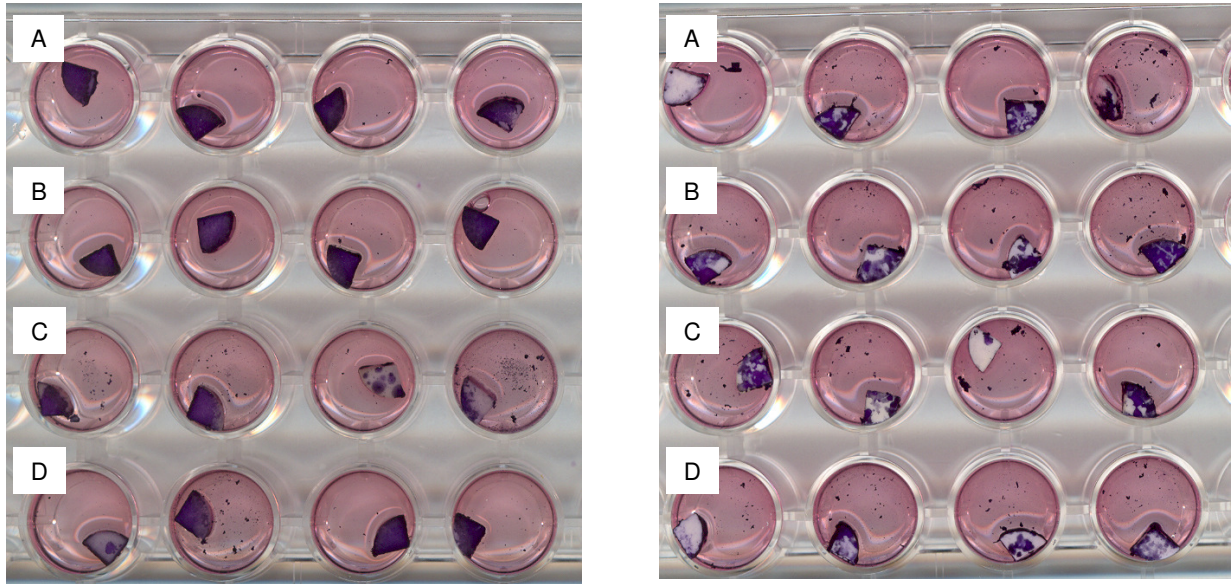


Abb. 43: Bilder des MTT-Tests nach 14 Tagen mit immortalisierten Schwann-Zellen auf mit GOPTMS (10 Massen-%) und/oder PolySia (PolySia-Lösung 0.026 M) beschichteten Glasfritten mit den Porositäten 4 (links) und 5 (rechts) (A: unbehandelt, B: GOPTMS, C: PolySia, D: GOPTMS + PolySia).

Wie bei allen zuvor gezeigten Resultaten des MTT-Tests auf den Glasfritten zeigte sich auch hier eine gute Kompatibilität mit den Schwann-Zellen, da keine toxischen Effekte auf die Zellen zu beobachten waren.

5.1.2 Anbindung von Polysialinsäure über 3-Aminopropyltriethoxysilan und Bernstein-säureanhydrid

Analog zu der Charakterisierung von Materialien, bei denen Polysialinsäure über das GOPTMS auf Glasoberflächen angebunden wurde, wurden auch statische Kontaktwinkelmessungen auf mit APTES und BSAH modifizierten Glassubstraten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 13 zu sehen.

Tab. 13: Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (in °) auf Deckgläschen, die zunächst mit APTES, dann mit BSAH (1 g) und abschließend mit PolySia (0.1 g) modifiziert wurden. Die PolySia-Anbindung wurde zum einen mit DCC (0.08 g) als Aktivierungsreagenz in DCM und zum anderen mit wässriger PolySia-Lösung durchgeführt.

Massen-% APTES	APTES	APTES + BSAH	APTES + BSAH + PolySia (DCM)	APTES + BSAH + PolySia (H ₂ O)
0	-	58 ± 3	62 ± 2	36 ± 9
0.1	70 ± 7	61 ± 5	68 ± 3	39 ± 7
0.5	67 ± 5	64 ± 4	63 ± 6	39 ± 7
1	71 ± 8	59 ± 9	59 ± 7	37 ± 6
5	72 ± 3	67 ± 4	66 ± 6	38 ± 7
10	75 ± 8	65 ± 5	61 ± 6	45 ± 6

Die Kontaktwinkel auf den ausschließlich mit APTES modifizierten Glassubstraten liegen zwischen 67° und 75°. Hierbei ist eine leichte Tendenz zu erkennen, dass mit steigender Konzentration des APTES der Kontaktwinkel zunimmt (Abb. 44).

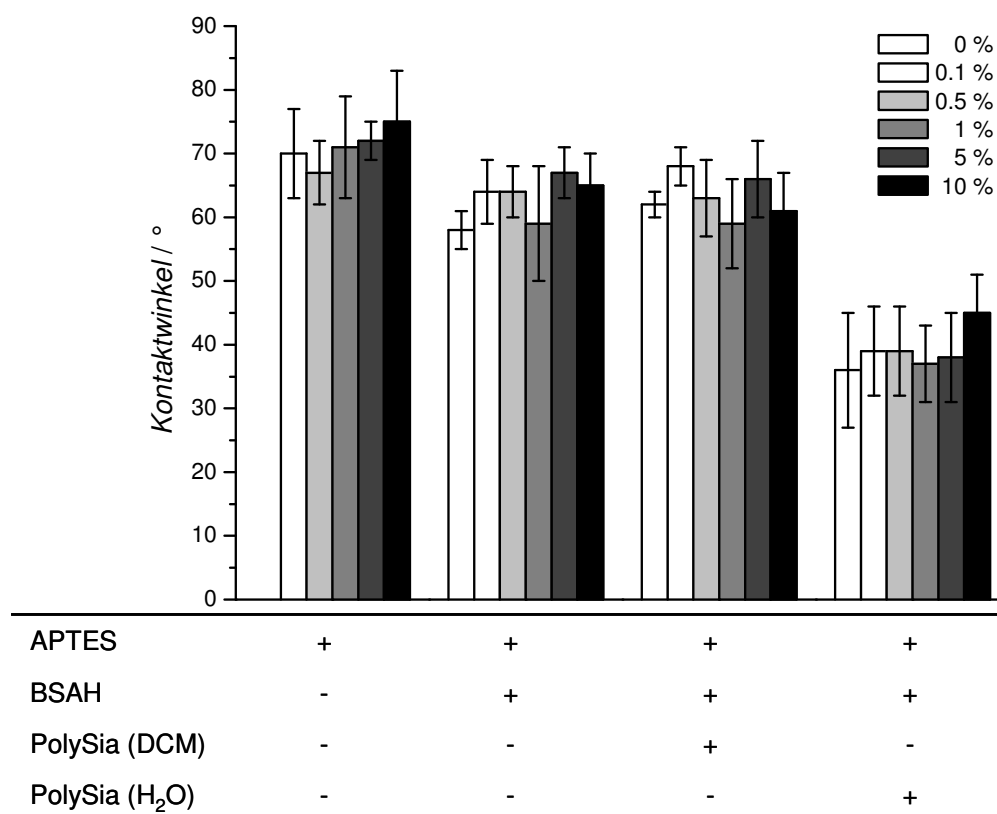


Abb. 44: Darstellung der Kontaktwinkelmessungen auf Deckgläschen in Abhängigkeit von der gewählten Menge an APTES nach den einzelnen Reaktionsschritten mit APTES, mit APTES + BSAH (1 g) und mit APTES + BSAH + PolySia (0.1 g). Dabei wurde die PolySia sowohl in DCM (mit 0.08 g DCC) wie auch in wässriger Lösung aufgebracht.

Wurde nun die Oberfläche durch Anbindung von BSAH an das APTES dahingehend verändert, dass anstatt einer Aminofunktion eine Carbonsäure das freie Ende bildet, so liegen die Kontaktwinkel zwischen 59 und 67° und zwar unabhängig von der Silan-Konzentration. Der Kontaktwinkel einer Glasoberfläche, die ausschließlich mit BSAH modifiziert wurde, weist dagegen einen etwas geringeren Kontaktwinkel von 58° auf. Der Unterschied könnte in einer unvollständigen Absättigung der APTES-funktionalisierten Oberfläche durch das BSAH begründet liegen, weshalb dann die etwas hydrophoberen Aminofunktionen zu einer Erhöhung des Kontaktwinkels beitragen. Wurde die Anbindung der Polysialinsäure mit der Hilfe von DCC als Aktivierungsreagenz in DCM als Lösungsmittel durchgeführt, so änderte sich der Kontaktwinkel nicht, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Anbindung nicht erfolgreich war. Ein Grund hierfür könnten die unterschiedlichen Löslichkeiten von DCC und PolySia sein, da DCC nur in organischen Lösungsmitteln verwendet werden kann, in denen die PolySia aber so gut wie unlöslich ist. Daher wurde auch versucht, die PolySia analog zu der Anbindung über das GOPTMS in wässriger Lösung aufzubringen. Hierbei konnte beobachtet

werden, dass die Kontaktwinkel mit 36 bis 45° deutlich unter denen von mit APTES oder BSAH modifizierten Oberflächen lagen. In genau demselben Bereich lagen auch die Kontaktwinkel, die nach erfolgreicher Anbindung von PolySia über GOPTMS zu beobachten waren (Tab. 2), so dass hier von einer erfolgreichen Anbindung ausgegangen werden kann. Allerdings ist diese erfolgreiche Anbindung nicht so einfach zu erklären, weil es eher unwahrscheinlich ist, dass eine an sich eher unreaktive Carbonsäure, die nach der Reaktion von APTES mit BSAH vorliegt, mit einer Aminogruppe ohne weitere Aktivierung reagiert.

Für eine weitere Charakterisierung der Anbindung von Polysialinsäure über das Linkersystem APTES/BSAH wurden IR-Spektren angefertigt (Abb. 45).

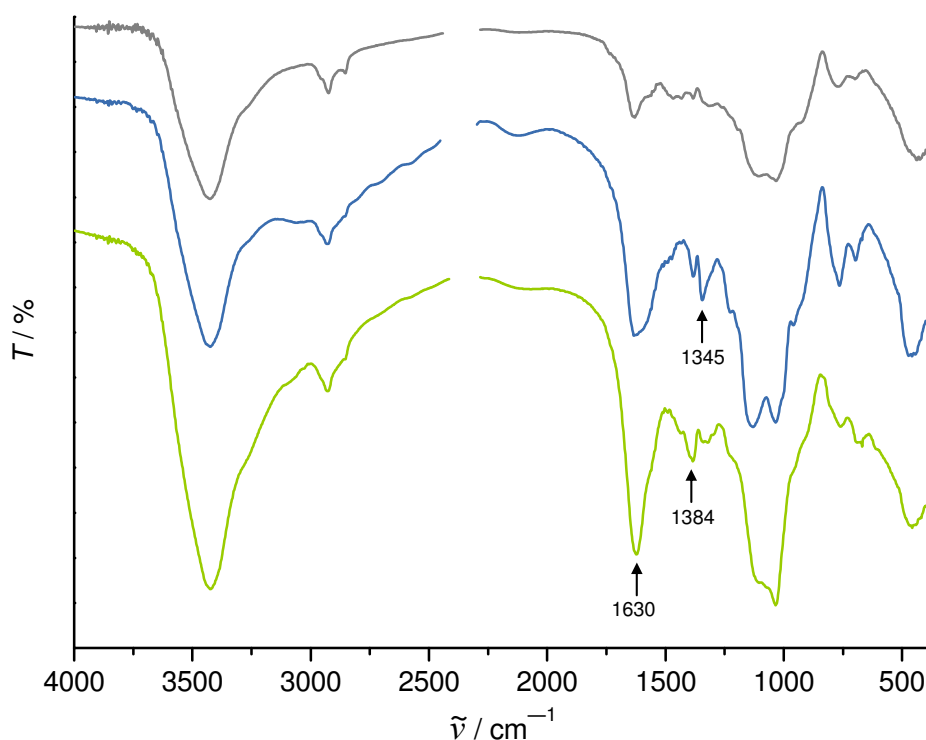


Abb. 45: IR-Spektren von Objektträgern nach der Reaktion mit APTES (oben), mit APTES + BSA (Mitte) sowie mit APTES + BSAH + PolySia (+ DCC) (unten).

Die nach den einzelnen Reaktionsschritten aufgenommenen IR-Spektren sehen sich sehr ähnlich. Alle Spektren enthalten u.a. die breite, für das Vorhandensein von Wasser charakteristische Bande zwischen 3700-3000 cm^{-1} sowie die für (C-H)-Valenzschwingungen typische Bande bei 2928 cm^{-1} ; eine genaue Auflistung der beobachteten Banden gibt Tab. 14.

Tab. 14: Zuordnung der IR-Banden in den Spektren von Objektträgern, die mit APTES, mit APTES + BSAH sowie mit APTES + BSAH + PolySia (+ DCC) behandelt wurden (Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ / cm^{-1}) (APTES auf Glas: AAG; BSAH an AAG: BAAG; PolySia an BAAG: PBAAG) [145].

mit APTES	mit APTES + BSAH	mit APTES + BSAH + PolySia	Zuordnung	Quelle
3700-3000	3700-3000	3700-3000	(O–H)-Valenzschwingung	Wasser
2926	2927	2930	(C–H)-Valenzschwingung	AAG, BAAG, PBAAG
2858	-	-	(C–H)-Valenzschwingung	AAG
1633	1623	1634	(O–H)-Deformationsschwingung	Wasser
1633	1623	1634	(N–H)-Valenzschwingung (Amid)	BAAG (PBAAG)
1466	-	-	(C–H)-Deformationsschwingung	AAG, BAAG, PBAAG
1385	1384	1383	(C–H)-Deformationsschwingung	AAG, BAAG, PBAAG
-	1340	1345	(C–H)-Deformationsschwingung	AAG, BAAG, PBAAG
1106	-	1130	(Si–O–Si)-Valenzschwingung	Glas
1035	1034	1035	(C–O)-Valenzschwingung	Glas, PBAAG
-	-	960	(Si–OH)-Deformationsschwingung	Glas
775	767	765	(Si–O)-Deformationsschwingung	Glas
472	471	474	(O–Si–O)-Deformationsschwingung	Glas

Die einzigen deutlichen Unterschiede liegen im Bereich zwischen der intensiven Bande bei 1630 cm^{-1} und der typischen Silica-Bande bei etwa 1100 cm^{-1} . Zum einen werden die für die (C–H)-Deformationsschwingung typischen Banden bei 1384 und 1345 cm^{-1} intensiver, zum anderen nimmt auch die Intensität der Bande bei 1630 cm^{-1} im Vergleich zur Silica-Bande bei 1100 cm^{-1} zu. Die Bande bei 1630 cm^{-1} ist nicht nur charakteristisch für die (O–H)-Deformationsschwingung, sie deutet ebenfalls auf das Vorhandensein von (N–H)-Valenzschwingungen eines Amids hin. Dieses gibt einen Hinweis auf die Bildung einer Amidbindung durch die Reaktion des Bernsteinsäureanhydrids mit der Aminofunktion des Silans. Der Erfolg der Anbindung der Polysialinsäure an das Amid kann aufgrund des Fehlens von charakteristischen Banden für dieselbe nicht anhand der IR-Spektroskopie geklärt werden.

Um die Immobilisierung der PolySia über APTES und BSAH besser untersuchen zu können, wurde analog zu der Anbindung über GOPTMS der TBA-Test verwendet. Es wurde zunächst untersucht, inwieweit die Reaktionsdauer für die Anbindung des APTES an das Glassubstrat die Menge an angebundener PolySia beeinflusst (Abb. 46).

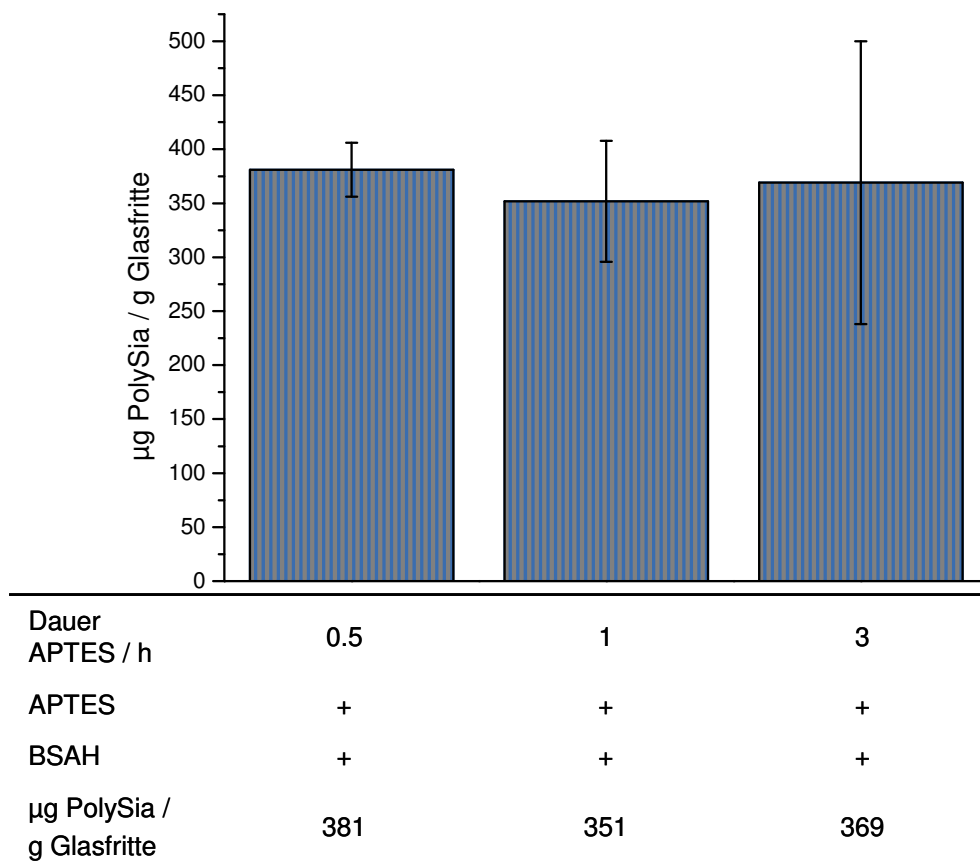


Abb. 46: Ergebnisse des TBA-Tests für die Anbindung von PolySia (0.1 g, sowie 0.08 g DCC) auf Glasfritten über APTES (125 µL) und BSAH (1 g) in Abhängigkeit von der Dauer der APTES-Anbindung.

Unabhängig von den untersuchten Zeiten für die APTES-Anbindung bewegt sich die Menge an immobilisierter PolySia zwischen 350 und 380 µg/g Glasmaterial, d.h. in dem beobachteten Zeitraum hat die Reaktionszeit keinen Einfluss auf die später angebundene Menge an PolySia, so dass für weitere Untersuchungen immer eine Reaktionszeit von zwei Stunden gewählt wurde.

Anschließend wurde untersucht, welchen Einfluss das gewählte Volumen von APTES auf die Immobilisierung der PolySia hat (Abb. 47).

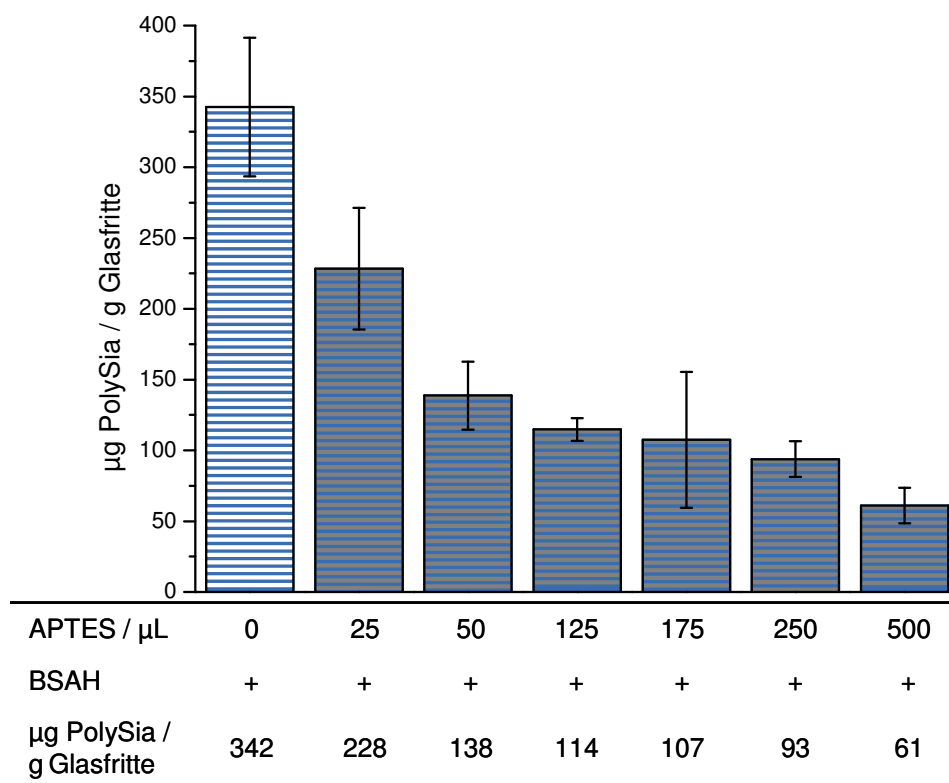


Abb. 47: Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten für die Menge an immobilisierter PolySia (0.1 g) in Abhängigkeit vom eingesetzten Volumen an APTES (sonstige Reaktionsbedingungen: 1 g BSAH, 0.08 g DCC).

Hier ist deutlich zu erkennen, dass mit steigender Menge an APTES die Menge an immobilisierter Polysialinsäure stark abnimmt. Während unter Verwendung von 500 μL APTES 61 μg PolySia/g Glasfritte gebunden werden können, so sind es bei Verwendung von 50 μL APTES mit 138 μg mehr als doppelt so viel. Wird dagegen gar kein APTES zur Anbindung des Bernsteinsäureanhydrids benutzt, so erhält man mit 342 μg PolySia/g Glasmaterial den größten Wert. Dieser Sachverhalt deutet darauf hin, dass das APTES die Anbindung des BSA an die Oberfläche möglicherweise stört. Um diesen Zusammenhang genauer zu überprüfen, wurde in einem weiteren Versuch jeweils auf einen Reaktionspartner (APTES bzw. BSAH) verzichtet und anschließend die Menge an immobilisierter Polysialinsäure verglichen (Abb. 48).

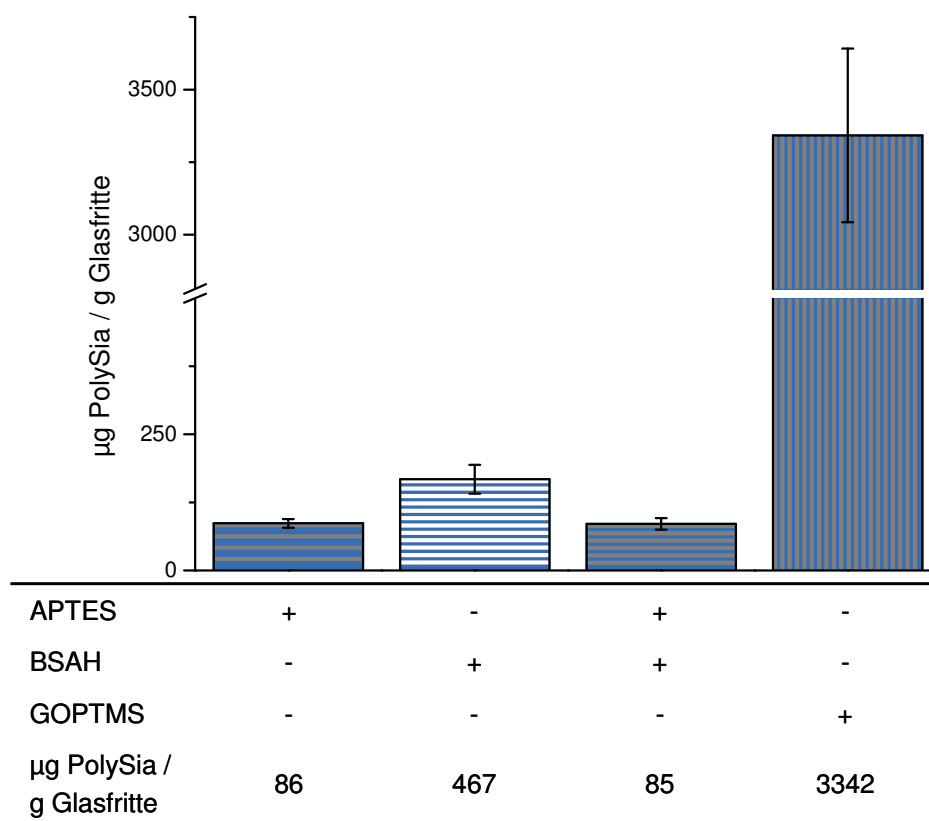


Abb. 48: Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten nach Weglassen von APTES bzw. BSAH im Vergleich zur vollständigen Anbindung über APTES (125 µL) und BSAH (1 g) sowie zur Immobilisierung von PolySia (0.1 g mit 0.08 g DCC) bzw. (0.1 M) über GOPTMS (10 Massen-%).

Betrachtet man nur das Linkersystem APTES/BSAH so fällt auf, dass die größte Menge an immobilisierter Polysialinsäure mit 467 µg/g Glasfritte durch das Weglassen von APTES hervorgerufen wird. Wird der vollständige Syntheseweg beschränkt bzw. auf die Applikation von BSAH verzichtet, so können maximal 86 µg PolySia gebunden werden. Dieses Resultat ergänzt sich ausgezeichnet mit dem aus Abb. 47, da auch dort gezeigt werden konnte, dass die größte Menge an PolySia dann immobilisiert werden konnte, wenn kein APTES verwendet wurde. Es ist daher wahrscheinlich, dass das APTES die Anbindung des Bernsteinsäureanhydrids stört und die Anbindung des BSAH über die Silanolgruppen der Glasoberfläche besser als über die Aminogruppen des APTES funktioniert. Berücksichtigt werden muss in diesem Zusammenhang ebenfalls, dass auch das APTES nach Hydrolyse der Ethoxy-Gruppen Silanolgruppen besitzt, so dass das Bernsteinsäureanhydrid nicht nur mit den Silanolgruppen des Silica-Materials, sondern auch mit denen des APTES reagieren kann. Es ist vorstellbar, dass gerade bei größeren Mengen an eingesetztem APTES Multilayer von APTES auf der Oberfläche ausgebildet werden (Abb. 49).

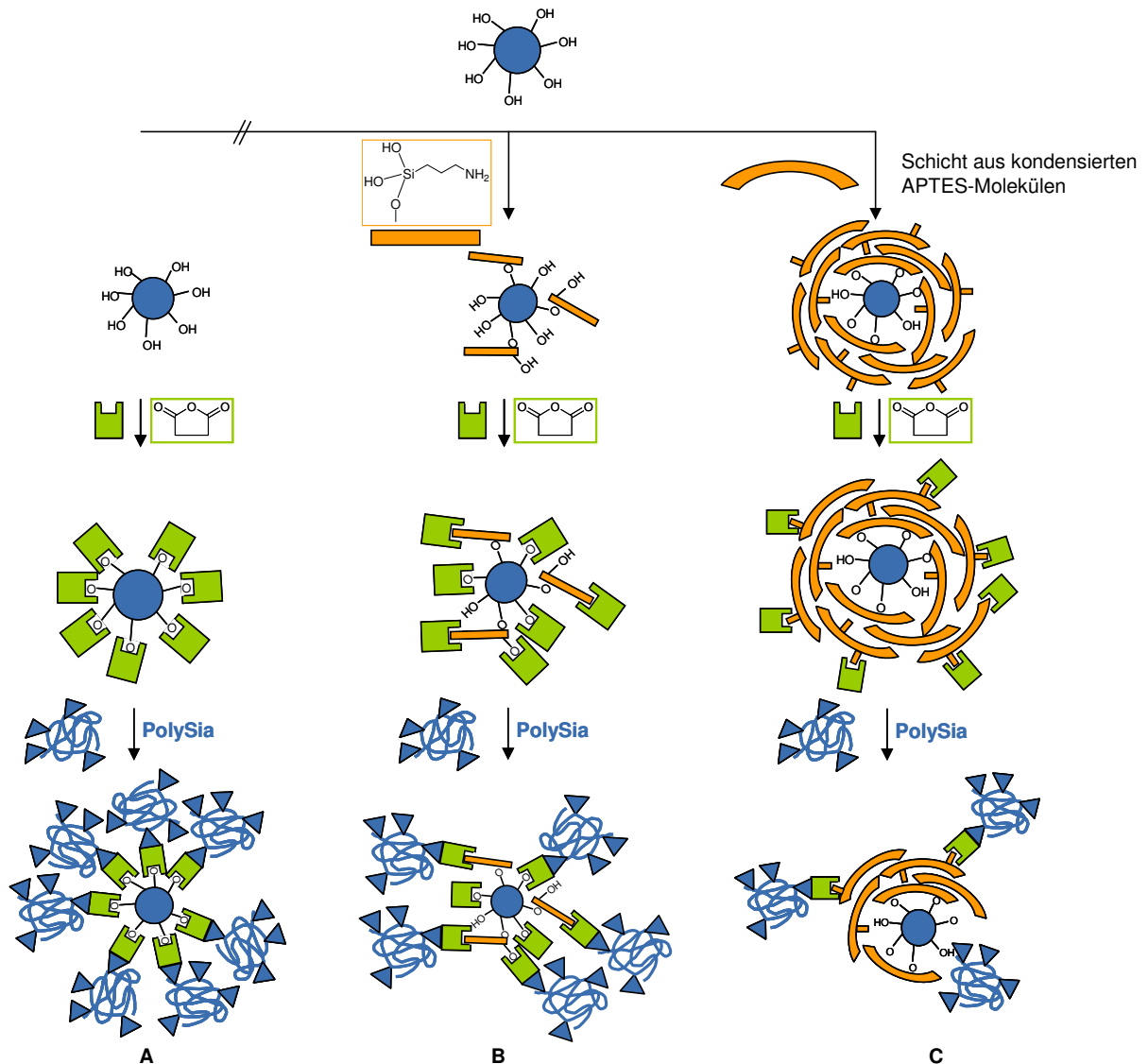


Abb. 49: Schema zur möglichen Hinderung der Anbindung von BSAH bzw. PolySia an mit APTES modifizierte Silica-Materialien (A: ohne APTES, B: wenig APTES, C: viel APTES). In C kann es während der Anbindung von PolySia zur teilweisen Ablösung der äußeren APTES-Schichten z.B. durch Scherung kommen.

Diese Multilayer können einerseits eine sterische Hinderung für die Anbindung des Anhydrids bilden und werden andererseits möglicherweise nur durch schwache VAN DER WAALS-Wechselwirkungen zusammengehalten, so dass es zur Abscherung der äußeren Schichten während der folgenden Reaktionsschritte kommen kann, wodurch die Menge an immobilisierter PolySia abnimmt (s. C in Abb. 49).

Im Vergleich der zwei Anbindungssysteme (APTES/BSAH vs. GOPTMS) fällt auf, dass unter Verwendung des Epoxysilans GOPTMS die Menge an immobilisierter PolySia fast zehnmal so groß ist wie mit Hilfe von APTES und BSAH.

Es wurde weiterhin untersucht, welchen Einfluss die Menge an Bernsteinsäureanhydrid auf die Anbindung der PolySia hat. Wurde der vollständige Syntheseweg über APTES und BSAH gewählt, so resultierte das in Abb. 50 gezeigte Ergebnis.

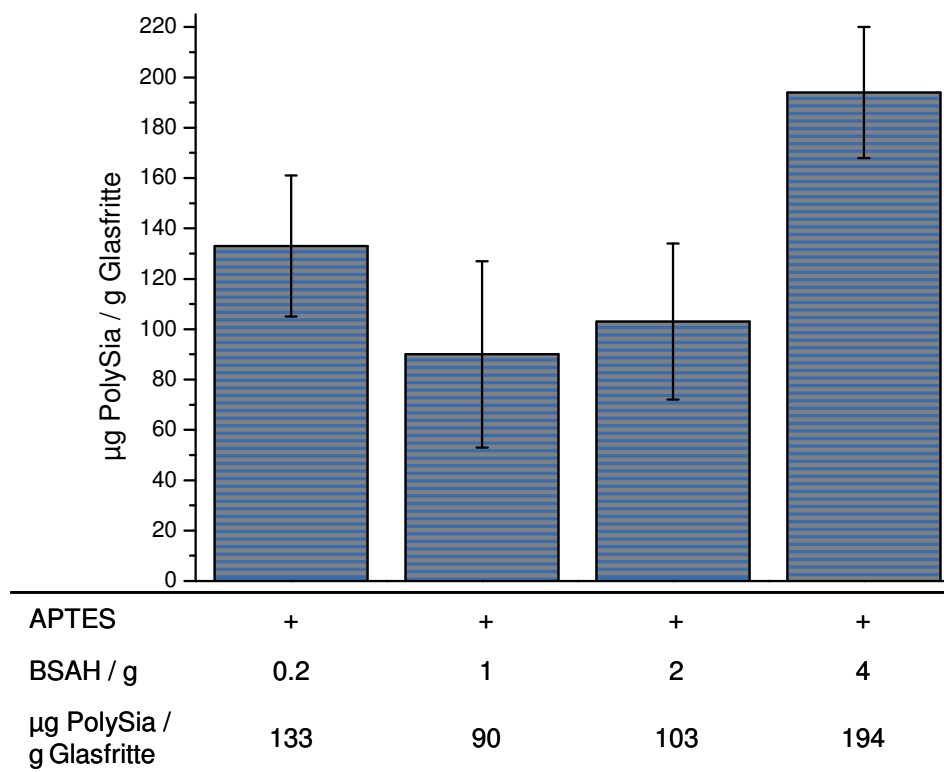


Abb. 50: Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten, Einfluss der gewählten BSA-Menge auf die Immobilisierung von PolySia (0.1 g sowie 0.08 g DCC) über APTES (125 µL) und BSAH.

Es ist zu erkennen, dass die Menge an immobilisierter Polysialinsäure bei der Erhöhung der BSAH-Menge von einem zu vier Gramm von 90 auf 194 µg/g Glasfritte ansteigt. Dies ist insofern nachvollziehbar, als aufgrund von mehr gebundenem BSAH auch die Zahl der für die Anbindung der PolySia zur Verfügung stehenden Carboxylgruppen steigt. Warum auch die Verwendung von 0.2 g zu einer Erhöhung der Menge an immobilisierter PolySia im Vergleich zu einem Gramm BSAH führt, ist unklar. In diesem Fall müsste zumindest teilweise eine direkte Bindung der Carboxylgruppen der PolySia an die Aminofunktionen des APTES stattfinden, was prinzipiell möglich ist. Allerdings sollte man annehmen, dass es dann im Vergleich zur Anbindung über das Bernsteinsäureanhydrid, bei der durch die Ringöffnung des Anhydrids eine Kettenverlängerung um vier Kohlenstoffatome stattfindet, vermehrt zu sterischen Konflikten aufgrund des großen Raumanpruchs der PolySia kommt.

Abb. 51 zeigt das Ergebnis des TBA-Tests, wenn die Anbindung des Bernsteinsäureanhydrids direkt, d.h. ohne vorherige Modifizierung mit APTES, auf die Glasoberfläche vorgenommen wurde.

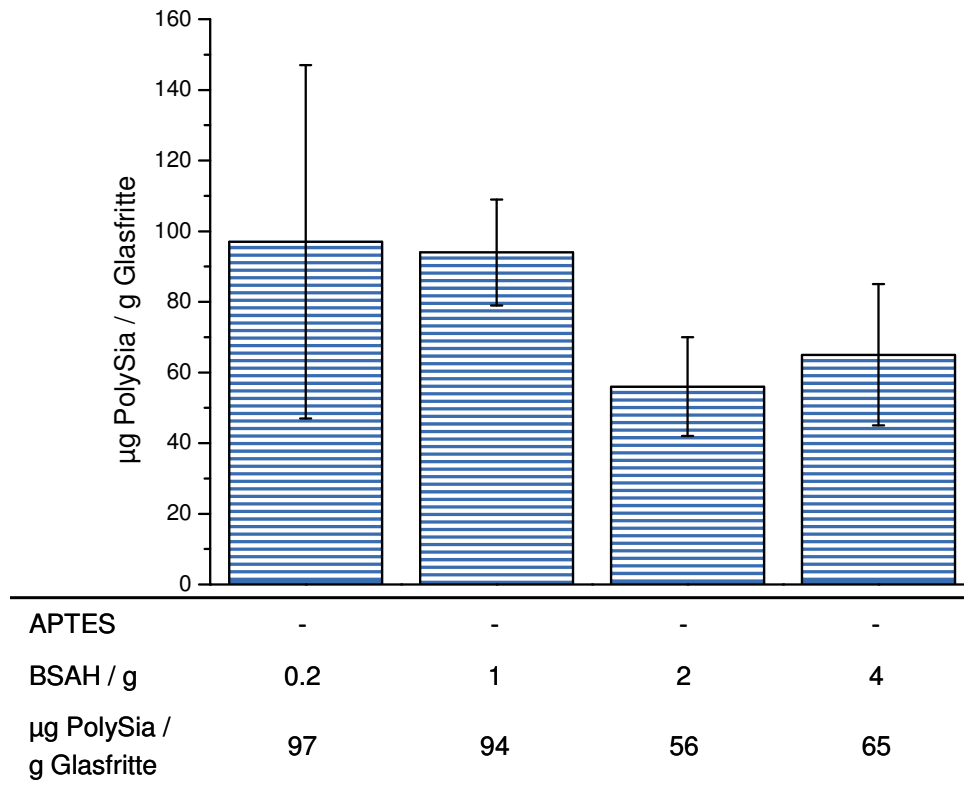


Abb. 51: Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten, Menge an immobilisierter PolySia (0.1 g sowie 0.08 g DCC) in Abhängigkeit der verwendeten Menge an BSAH ohne vorherige Modifizierung der Glassubstrate mit APTES.

Hier zeigte sich, dass die Werte an angebundener Polysialinsäure mit abnehmenden Massen an BSAH anstiegen. Es ist erstaunlich, dass die Anbindung ohne Verwendung von APTES überhaupt funktioniert, da dann das Bernsteinsäureanhydrid über die Silanolgruppen der Glasoberfläche gebunden sein muss. Das ist zwar möglich, allerdings sollte die nucleophile Ringöffnung des Bernsteinsäureanhydrids effektiver durch eine Aminofunktion des APTES als durch eine Silanolgruppe erfolgen. In diesem Zusammenhang noch verwunderlicher ist die Tatsache, dass kleine Mengen an BSAH zu einer Erhöhung der Menge an immobilisierter PolySia führen. Das würde zusammen mit Abb. 47 bedeuten, dass es besser ist, sowohl auf APTES zu verzichten als auch nur geringe Mengen an BSAH zu verwenden. Das könnte darauf hinweisen, dass eine Anbindung der PolySia an die Glasoberfläche dann am effektivsten verläuft, wenn weder APTES noch BSAH verwendet, also die Anbindung direkt auf der Glasoberfläche vorgenommen würde. Möglich ist aber auch, dass kleinere Mengen an BSAH deshalb

besser sind, weil dadurch eine geringere Anzahl von Kontaktstellen für die PolySia zur Verfügung steht und so die sterische Hinderung minimiert wird.

Um die mit APTES und BSAH funktionalisierten Glassubstrate auf ihre Zelltoxizität zu untersuchen, wurden analog zu der Anbindung von PolySia über GOPTMS ebenfalls ein MTT-Test sowie eine DAPI-Färbung durchgeführt. Die Resultate des MTT-Tests sind in Abb. 52 gezeigt.

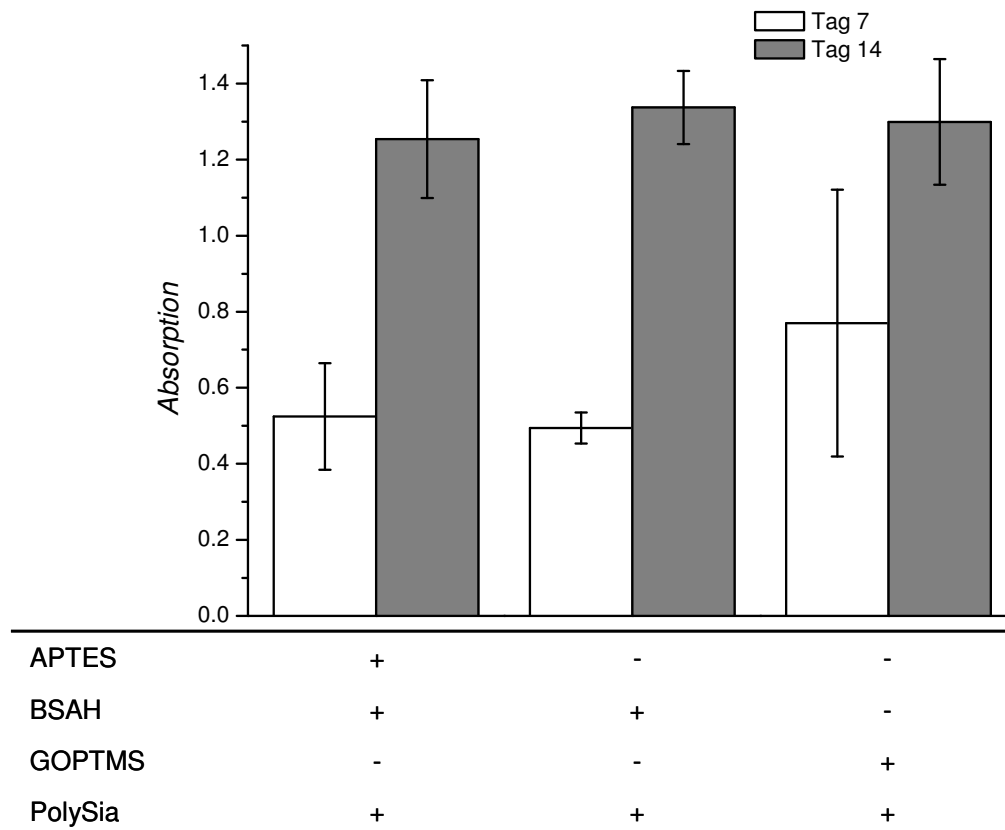


Abb. 52: Ergebnisse des MTT-Tests mit Hep-G2-Zellen auf Glasfritten nach 7 und 14 Tagen. Die Anbindung der PolySia erfolgte sowohl über das Linkersystem APTES/BSAH (125 μ L bzw. 1 g sowie 0.08 g DCC) als auch über GOPTMS (10 Massen-%).

Nach sieben Tagen ist die gemessene Absorption auf den Glasfritten, auf denen die PolySia über APTES/BSAH bzw. nur BSAH immobilisiert wurde, etwa bei 0.5, die Werte für die Immobilisierung über GOPTMS liegen bei 0.7. Nach 14 Tagen kann zwischen den drei verschiedenen Wegen der Immobilisierung kein Unterschied hinsichtlich der Zellviabilität mehr erkannt werden. Für die Anwendung als Implantatmaterial sehr positiv zu sehen ist, dass die Absorption bei allen drei verschiedenen Materialien von Tag 7 nach Tag 14 zunimmt, was mit einer Erhöhung der Anzahl der Zellen korreliert, so dass davon auszugehen ist, dass von den

zur Anbindung der Polysialinsäure verwendeten Linkern keine toxische Wirkung auf Zellen ausgeht.

Die bei der DAPI-Färbung aufgenommenen Fluoreszenzbilder sind in Abb. 53 gezeigt.

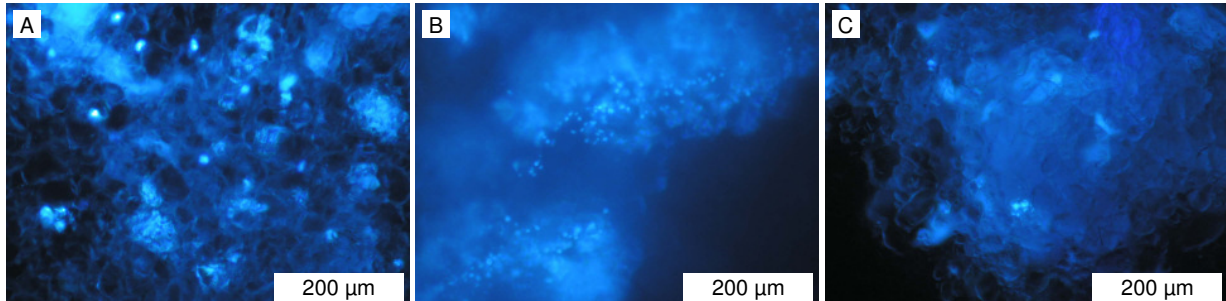


Abb. 53: DAPI-Färbung von Hep-G2-Zellen auf mit PolySia modifizierten Glasfritten nach 14 Tagen. Immobilisierung von PolySia über APTES/BSAH (125 µL bzw. 1 g sowie 0.08 g DCC) (A), BSAH (1 g sowie 0.08 g DCC) (B) und GOPTMS (10 Massen-%) (C).

Auf allen drei Glassubstraten ist die Besiedelung von Hep-G2-Zellen zu erkennen, besonders in Bild A sind die Zellen in den Poren deutlich sichtbar. Die unterschiedliche Anzahl der hier sichtbaren Zellen hat u.a. mit dem dreidimensionalen Charakter der verwendeten Glasfritten zu tun, so dass es bei der Aufnahme der Bilder zu Schwierigkeiten mit der Scharfeinstellung der unterschiedlichen Ebenen kam.

5.1.3 Vergleichende Diskussion zur Anbindung von Polysialinsäure auf Glasoberflächen

Die Anbindung von Polysialinsäure auf Glasoberflächen ist sowohl über GOPTMS als auch über das Linkersystem APTES/BSAH möglich, wobei unter Verwendung von GOPTMS wesentlich mehr PolySia immobilisiert werden kann. Für die Anbindung über GOPTMS geben schon die statischen Kontaktwinkelmessungen einen Hinweis auf das Vorhandensein von PolySia auf der Oberfläche, während bei dem Linkersystem APTES/BSAH dies nur dann der Fall ist, wenn die PolySia aus wässriger Lösung heraus aufgetragen wird. Die IR-Spektroskopie kann in beiden Methoden nur Hinweise für ein erfolgreiches Anbinden von PolySia auf der Oberfläche geben, da es an charakteristischen Banden für die PolySia mangelt. Im Falle von GOPTMS deuten eine Zunahme der Wasserbande aufgrund der großen Wasseraffinität der Polysialinsäure genau wie das Verschwinden der Epoxidbanden des GOPTMS auf eine Anbindung hin, während es bei der Verwendung von APTES und BSAH vor allem das Auftreten der Bande der gebildeten Amidbindung ist.

Mit Hilfe des TBA-Tests konnte bei beiden Anbindungssystemen einwandfrei die Immobilisierung der PolySia bestätigt werden. Es zeigte sich, dass die Anbindung über das GOPTMS unabhängig von der Konzentration des Silans ist, während dieses bei der Anbindung über das System APTES/BSAH einen sehr großen Einfluss hat und die Anbindung womöglich aufgrund sterischer Effekte und der Ausbildung von Multilayern sogar stört. Im Vergleich der beiden Immobilisierungsmethoden ist die Menge an gebundener PolySia bei Verwendung von GOPTMS als Linker fast zehnmal größer als über APTES/BSAH. Die gleiche Tendenz konnte in dieser Arbeit bei der Immobilisierung von Polysialinsäure auf Siliconoberflächen beobachtet werden (Abschnitt 5.2). Diese Resultate stehen allerdings im Gegensatz zu den Ergebnissen von BREMER [142], die auf Sipernat[®] mehr PolySia anbinden konnte, wenn das Linkersystem APTES/BSAH verwendet wurde.

Mit Hilfe des PolySia-spezifischen ELISA-Tests konnte die Anbindung der PolySia über GOPTMS auf Glassubstraten ebenfalls nachgewiesen werden. Zusammen mit einigen Ergebnissen des TBA-Tests gibt es auch Hinweise darauf, dass die Polysialinsäure kovalent gebunden sein könnte. Allerdings scheint der spezifische Antikörper die deacetylierte Form der Polysialinsäure nicht einwandfrei erkennen zu können, was der Vergleich mit der acetylierten Form zeigt, da letztere bei gleicher Konzentration eine deutlich größere Absorption verursacht.

Aus den Zellviabilitäts- und Zelladhäsionsexperimenten geht für beide Anbindungssysteme hervor, dass beide zur Anbindung der PolySia für eine Anwendung im Körper grundsätzlich geeignet wären, da keine zelltoxischen Ereignisse zu verzeichnen waren. Sowohl bei der Anbindung von Polysialinsäure über GOPTMS als auch über APTES/BSAH konnte erkannt werden, dass die Viabilität der Zellen unabhängig von der Art der Modifizierung der Glasfritten war.

5.2 Anbindung von Polysialinsäure auf Siliconen

Die Anbindung von Polysialinsäure wurde auch auf Siliconschläuchen und Siliconplatten durchgeführt. Dabei wurde analog zu den Glassubstraten versucht, die PolySia sowohl über GOPTMS als auch unter Verwendung von APTES und Bernsteinsäureanhydrid zu immobilisieren. Als Aktivierungsmethode wurde in den meisten Fällen die Ozon-Behandlung durchgeführt, in einigen Fällen bei der Anbindung über GOPTMS war zuvor eine Aktivierung im Plasma vorgenommen worden.

5.2.1 Grundlagen zur Ozon-Behandlung

Die Menge des für die Aktivierung der Siliconoberflächen notwendigen Ozons ist abhängig davon, wie die Stromaufnahme des Ozonisators und die Größe des Sauerstoffstroms eingestellt werden. Dabei besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Stromaufnahme des Ozonisators und der produzierten Ozonmenge, denn je größer die Stromaufnahme des Ozonisators, also die Leistung, desto mehr Ozon wird produziert (Abb. 54).

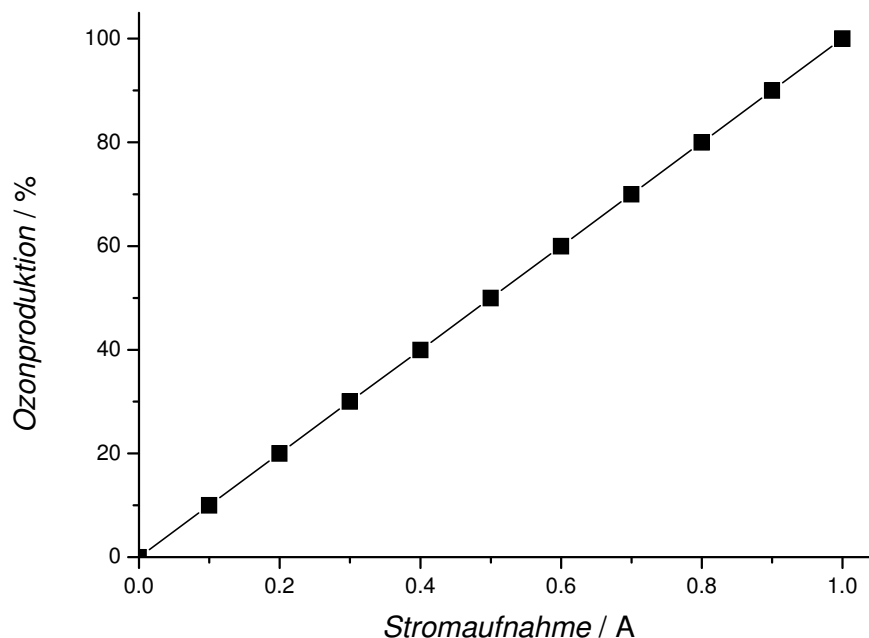


Abb. 54: Beziehung zwischen der Stromaufnahme des Ozonisators und der Ozonproduktion.

Wurde bei gleichem Sauerstoffstrom die Konzentration der Peroxidgruppen auf der Oberfläche der Silicone bei verschiedenen Leistungen des Ozonisators bestimmt, so zeigte sich, dass mit steigender Leistung auch die Konzentration der Peroxidgruppen zunahm (Abb. 55).

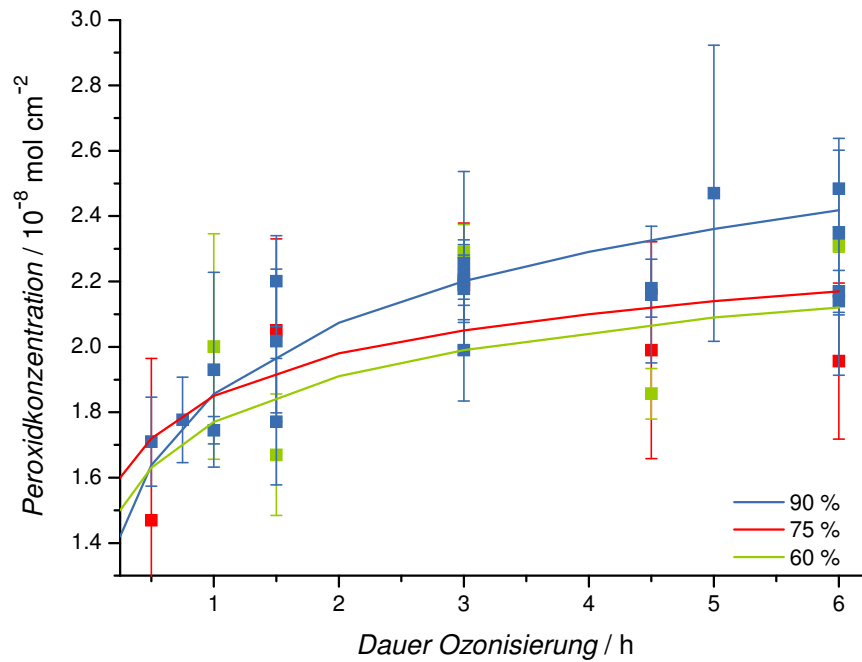


Abb. 55: Peroxidkonzentration auf der Siliconoberfläche in Abhängigkeit der Ozonator-Leistung.

Daraus folgt, dass die Anzahl der reaktiven Peroxidgruppen auf der Siliconoberfläche mit steigender Ozonator-Leistung zunimmt und so auch die Menge an immobilisierter PolySia ansteigen sollte. Es besteht außerdem ein Zusammenhang zwischen der produzierten Ozonmenge bzw. der Ozonkonzentration und der Stärke des gewählten Sauerstoffstroms (Abb. 56).

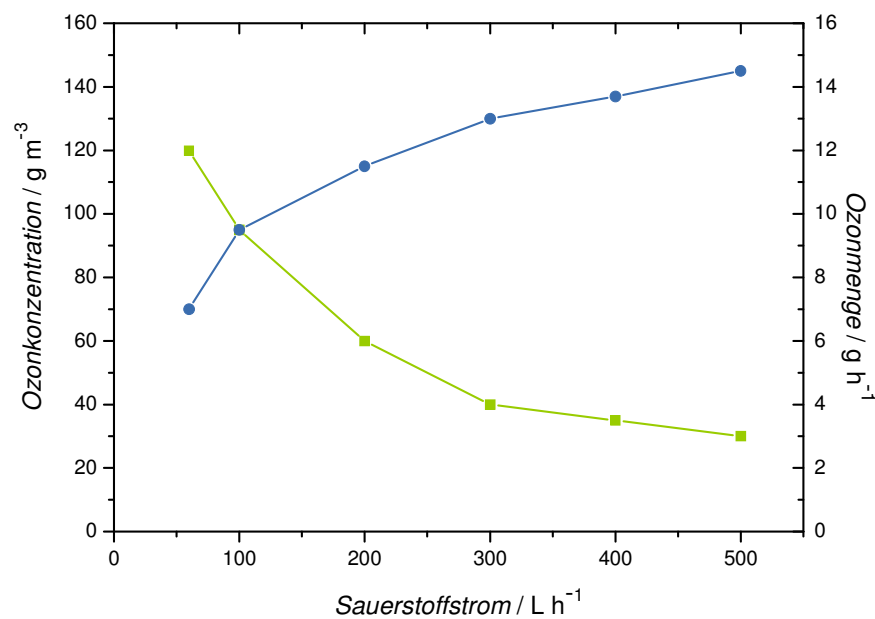


Abb. 56: Abhängigkeit der Ozonkonzentration und der produzierten Ozonmenge vom Sauerstoffstrom.

Je mehr Sauerstoff durch den Ozonisor strömt, desto mehr Ozon wird erzeugt, gleichzeitig verringert sich aber auch die im Reaktionsraum vorherrschende Ozonkonzentration. Die tatsächlichen Auswirkungen dieses Zusammenhangs zwischen Sauerstoffstrom und Ozonmenge bzw. Konzentration auf die Aktivierung der Siliconoberflächen wird in Abschnitt 5.2.2 näher untersucht.

5.2.2 Anbindung von Polysialinsäure über 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan

Um erste Anhaltspunkte für eine erfolgreiche Anbindung von Polysialinsäure an Silicone zu gewinnen, wurden statische Kontaktwinkelmessungen auf mit Ozon behandelten Siliconplatten durchgeführt. Die Bestimmung von Kontaktwinkeln auf Siliconschläuchen führte aufgrund der Krümmung der Schläuche zu erheblichen Messungenauigkeiten, so dass diese Werte hier nicht dargestellt werden. Tab. 15 zeigt eine Übersicht über die gemessenen Kontaktwinkel auf Siliconplatten, an die Polysialinsäure über GOPTMS nach vorheriger Behandlung mit Ozon angebunden wurde.

Tab. 15: Übersicht über die gemessenen Kontaktwinkel auf Siliconplatten nach Beschichtung mit GOPTMS (10 Massen-%) und/oder PolySia (0.1 M) nach Ozon-Behandlung (2 h, 90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h), Werte ohne vorherige Ozon-Behandlung zum Vergleich.

Nr.	Ozon	GOPTMS	PolySia	Kontaktwinkel /°
I	-	-	-	124 ± 2
II	-	+	+	112 ± 1
III	+	-	-	115 ± 2
IV	+	+	-	107 ± 7
V	+	-	+	111 ± 7
VI	+	+	+	110 ± 6

Eine unbehandelte Siliconoberfläche besitzt einen Kontaktwinkel von 124°, die Werte der modifizierten Oberflächen sind alle niedriger, unabhängig davon, ob diese einer Ozon-Behandlung unterzogen wurden. Auffällig ist, dass der direkt im Anschluss an eine Ozon-Behandlung bestimmte Kontaktwinkel auf der Siliconoberfläche 115° betrug, was in Übereinstimmung damit steht, dass durch das Ozon hydrophile Gruppen auf der Oberfläche entstehen sollten, die zu einer Erniedrigung des Kontaktwinkels führen würden. Anhand der auf den modifizierten Siliconoberflächen gemessenen Kontaktwinkel lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob Polysialinsäure tatsächlich an die Silicone angebunden werden konnte, da einerseits die gemessenen Standardabweichungen relativ groß sind und sich andererseits die Kontakt-

winkel der Silicone, auf denen nur GOPTMS vorhanden ist, und denen, wo PolySia über das GOPTMS angebunden wurde, nur geringfügig unterscheiden. Es muss aber davon ausgegangen werden, dass eine chemische Veränderung der Siliconoberfläche nur partiell und keinesfalls homogen stattgefunden hat. Trotzdem wurden Kontaktwinkel auf Siliconoberflächen bestimmt, die jeweils für eine unterschiedliche Zeit einer Ozon-Atmosphäre ausgesetzt waren (Tab. 16).

Tab. 16: Übersicht über die gemessenen Kontaktwinkel (in °) auf Siliconplatten, die mit GOPTMS (10 Massen-%) und PolySia (0.1 M) modifiziert wurden, in Abhängigkeit von der Dauer der Ozon-Behandlung (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) und vom verwendeten Lösungsmittel (LM) für das GOPTMS (Wasser bzw. Toluol). Außerdem wurde teilweise in der Nachbehandlung auf das Abspülen des GOPTMS mit Aceton vor der Anbindung von PolySia verzichtet.

Nr.	LM	Aceton	10 s	2 min	30 min	2 h	5 h
I	H ₂ O	+	111 ± 1	111 ± 4	111 ± 9	111 ± 8	111 ± 3
II	H ₂ O	-	78 ± 7	84 ± 4	81 ± 8	84 ± 5	85 ± 6
III	Toluol	-	97 ± 3	105 ± 8	105 ± 9	104 ± 14	107 ± 8

Beim Vergleich der gemessenen Kontaktwinkel innerhalb der einzelnen Ansatzreihen fällt für alle drei verschiedenen Vorgehensweisen auf, dass sich die Kontaktwinkel in Abhängigkeit von der Dauer der Ozon-Behandlung nur geringfügig unterscheiden. Wurde beispielsweise Wasser als Lösungsmittel für das GOPTMS verwendet und die mit GOPTMS beschichteten Siliconplatten vor der Anbindung mit PolySia mit Aceton gespült, so betrug der Kontaktwinkel konstant 111°. Da auch bei den anderen beiden Vorgehensweisen die Änderungen des Kontaktwinkels nur im Bereich der Standardabweichung liegen, ist davon auszugehen, dass die Dauer der Ozon-Behandlung keinen Einfluss auf den Kontaktwinkel besitzt. Vergleicht man die Reihen I und II so fällt auf, dass der Verzicht auf die Anwendung von Aceton nach der Anbindung von GOPTMS zu einer Erniedrigung der Kontaktwinkel um 25 bis 30° führt. Dieses deutet darauf hin, dass das Aceton möglicherweise nicht nur überschüssiges GOPTMS entfernt, sondern auch GOPTMS, das nur physikalisch an der Siliconoberfläche gebunden ist. Wurde Toluol als Lösungsmittel für das GOPTMS verwendet, so werden mit ungefähr 105° größere Kontaktwinkel gemessen als unter Verwendung wässriger Lösungen von GOPTMS, d.h. es werden wahrscheinlich geringere Mengen an GOPTMS angebunden.

Der Einfluss der Konzentration der verwendeten Polysialinsäure-Lösung auf den Kontaktwinkel der Siliconoberfläche ist ebenfalls experimentell untersucht worden, die gemessenen Werte sind Tab. 17 zu entnehmen.

Tab. 17: Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (in °) auf Siliconplatten in Abhängigkeit von der Konzentration der verwendeten PolySia-Lösung und der Dauer der Ozon-Behandlung (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h).

PolySia / mol L ⁻¹	0 s	10 s	1 min	30 min	2.5 h
0.1	109 ± 2	113 ± 7	118 ± 2	112 ± 5	116 ± 1
0.01	113 ± 8	110 ± 5	112 ± 7	114 ± 3	114 ± 7
0.001	116 ± 6	116 ± 3	117 ± 1	114 ± 6	115 ± 3

Da die gemessenen Kontaktwinkel unabhängig von der Dauer der Ozon-Behandlung und der Konzentration der verwendeten PolySia-Lösung immer einen Wert von etwa 115° besitzen, muss davon ausgegangen werden, dass beide variierten Parameter keinen Einfluss auf die Anbindung von GOPTMS und PolySia auf die Siliconoberfläche ausüben. Daher ist es auch nicht weiter überraschend, dass in einer weiteren Untersuchung gezeigt werden konnte, dass auch die Konzentration der verwendeten Silanlösung keine signifikanten Änderungen des Kontaktwinkels hervorruft (Tab. 18).

Tab. 18: Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (in °) auf Siliconplatten in Abhängigkeit von der Konzentration von GOPTMS bei zwei unterschiedlichen Durchflussraten von Sauerstoff bei der Ozon-Behandlung (2 h, 90 % Leistung).

Massen-% GOPTMS	40 L h ⁻¹	60 L h ⁻¹
0	107 ± 10	107 ± 3
0.1	114 ± 5	111 ± 5
1	107 ± 8	106 ± 3
10	108 ± 1	108 ± 5
20	97 ± 10	104 ± 2

Unabhängig von der verwendeten Konzentration von GOPTMS liegen die Kontaktwinkel bei etwa 110°, dabei ähneln sich die Werte für beide verwendeten Sauerstoffströme im Rahmen der beobachteten Messungenauigkeiten.

Wurde ein Stickstoff-Plasma zur Aktivierung der Silicone verwendet, so konnten bei statischen Kontaktwinkelmessungen geringe Änderungen nach den einzelnen Modifizierungsschritten festgestellt werden (Tab. 19).

Tab. 19: Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen auf Siliconschläuchen mit unterschiedlichen Modifizierungen im Anschluss an eine Plasma-Aktivierung (Reaktionsparameter: 10 Massen-% GOPTMS, PolySia-Lösung 0.1 M).

Nr.	Silicon	Plasma	GOPTMS	PolySia	Kontaktwinkel / °
I	+	-	-	-	118 ± 4
II	+	+	-	-	104 ± 5
III	+	+	+	-	91 ± 14
IV	+	+	+	+	100 ± 11

Es ist erkennbar, dass der Kontaktwinkel der reinen Siliconoberfläche nach einer Plasma-Aktivierung bzw. sich daran anschließenden weiteren Modifizierungen von 118° auf etwa 100° abnimmt. Der kleinste Kontaktwinkel mit 91° wird für die Silicone gemessen, die mit GOPTMS funktionalisiert wurden. Allerdings sind diese Werte nicht unbedingt so aussagekräftig, da zum einen die Messwerte mitunter stark voneinander abwichen und zum anderen im Vergleich zu den auf Glassubstraten gemessenen Kontaktwinkeln keine Abnahme bei der Anbindung von PolySia an GOPTMS zu beobachten war. Dort (Tab. 2) lagen die Kontaktwinkel einer reinen Silanoberfläche zwischen 50 und 70°, während er bei Anwesenheit von PolySia auf der Oberfläche nur um die 35° betrug. Dieses könnte darauf hindeuten, dass die Siliconoberfläche nur an wenigen Stellen mit GOPTMS belegt werden konnte, was dann auch die Anbindung der PolySia erschweren würde.

Zur genaueren Charakterisierung der modifizierten Silicone wurden IR-Spektren aufgenommen. Abb. 57 zeigt den Vergleich zwischen unbehandelten und mit Ozon behandelten Siliconschläuchen.

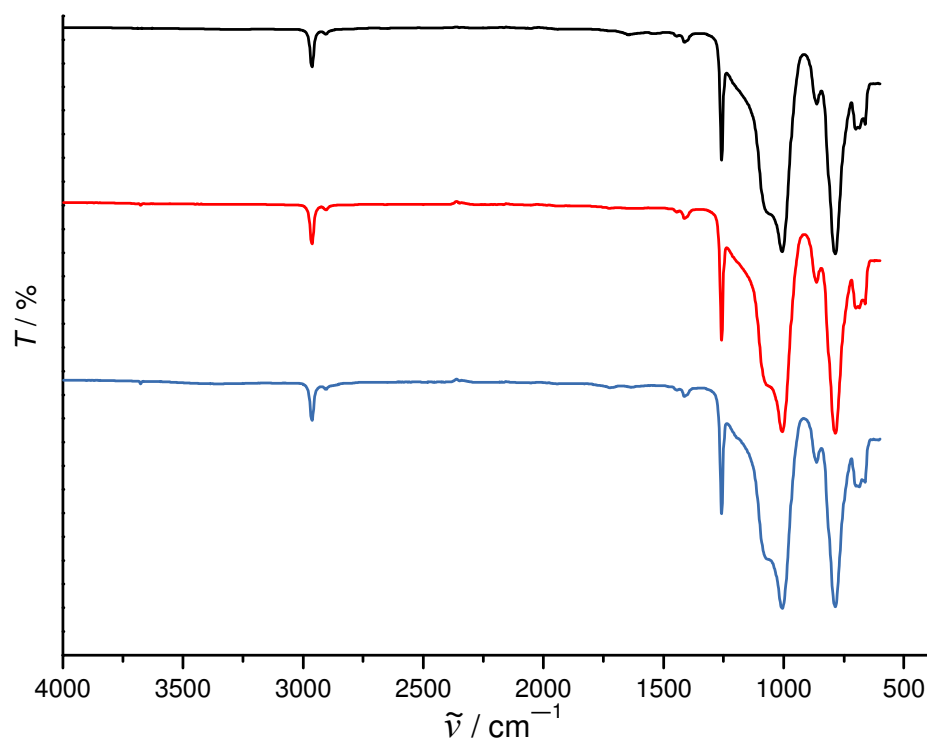


Abb. 57: IR-Spektren von Siliconschläuchen vor (oben) und nach (Mitte) der Ozon-Behandlung sowie der anschließenden Modifizierung mit GOPTMS (10 Massen-%) und PolySia (PolySia-Lösung 0.1 M) (unten).

Es wird deutlich, dass die IR-Spektren sich sehr ähnlich sehen und sowohl nach der Ozon-Behandlung bzw. der anschließenden Anbindung von Polysialinsäure über das GOPTMS keine zusätzlichen Banden, nicht einmal die des Epoxysilans, zu erkennen sind. Eine Auflistung der zu beobachtenden Banden kann Tab. 20 entnommen werden.

Tab. 20: Zuordnung der Banden in den IR-Spektren von Siliconschläuchen vor und nach der Behandlung mit Ozon sowie nach der Anbindung von PolySia (PolySia-Lösung 0.1 M) über GOPTMS (10 Massen-%) (Wellenzahlen $\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$) [145, 146].

Banden	Zuordnung	Quelle
3675	(O–H)-Valenzschwingung	Silicon
2962	(C–H)-Valenzschwingung	Silicon
2905	(C–H)-Valenzschwingung	Silicon
1412	(C–H)-Deformationsschwingung	Silicon
1258	(C–H)-Deformationsschwingung	Silicon
1074	(Si–O)-Valenzschwingung	Silicon
1000	(C–H)- <i>in plane</i> -Schwingung	Silicon
863	(Si–O)-Valenzschwingung	Silicon
786	(C–H)-rocking-Schwingung	Silicon
786	(Si–C)-Valenzschwingung	Silicon

Nur in einigen wenigen Fällen kann das Auftreten von zusätzlichen Banden nach der Anbindung von Polysialinsäure über GOPTMS beobachtet werden (Abb. 58).

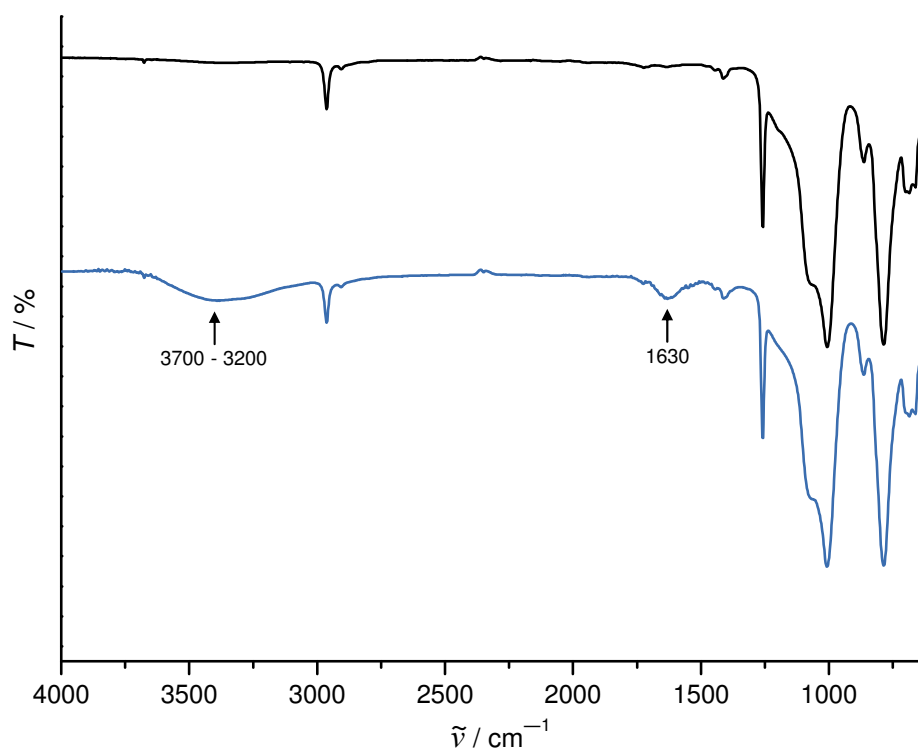


Abb. 58: IR-Spektren von Siliconschläuchen, auf denen PolySia (PolySia-Lösung 0.1 M) über GOPTMS (10 Massen-%) angebonden wurde, typisches (oben) und gelegentlich auftretendes IR-Spektrum (unten).

Bei diesen handelt es sich um die für (O–H)-Valenzschwingungen typische Bande bei 3700–3200 cm^{-1} sowie die für (O–H)-Deformationsschwingungen charakteristische Bande bei 1630 cm^{-1} . Diese beiden Banden deuten auf das Vorhandensein von Wasser auf den Schläuchen hin, obwohl diese zuvor getrocknet worden sind. Daher könnte die Präsenz der Wasserbanden ein indirektes Indiz für das Vorhandensein von Polysialinsäure auf der Siliconoberfläche sein, da diese eine große Wasseraffinität aufweist. Die Ergebnisse der IR-spektroskopischen Untersuchungen an Siliconplatten unterschieden sich nicht von denen an Siliconschläuchen, so dass hier auf eine separate Darstellung verzichtet wird.

Die mit Hilfe eines Plasmas aktivierten Siliconschläuche wurden ebenfalls mittels IR-Spektroskopie untersucht, Abb. 59 zeigt die Gegenüberstellung eines unbehandelten Siliconschlauchs mit einem plasma-aktivierten.

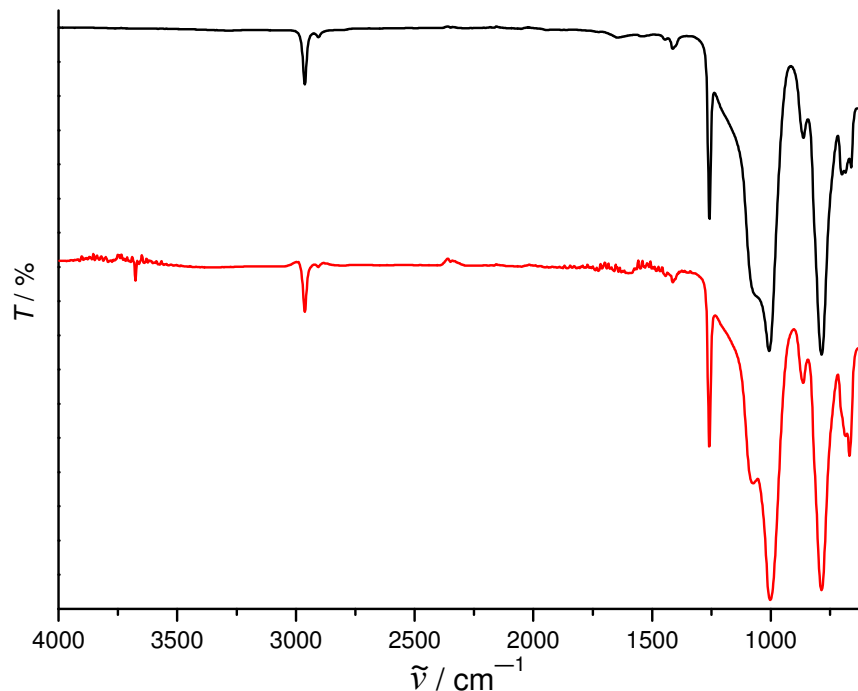


Abb. 59: IR-Spektren eines Siliconschlauchs vor (oben) und nach der Plasma-Aktivierung (unten).

Es lässt sich kein Unterschied in den Spektren vor und nach der Plasma-Aktivierung erkennen. Ein Grund hierfür könnte darin liegen, dass die durch die Oberflächenaktivierung erzeugten reaktiven Spezies auf der Siliconoberfläche nur für eine geringe Zeitspanne reaktiv sind und anschließend mit Molekülen aus der Umgebungsluft wie z.B. Sauerstoff oder Wasser reagieren. Außerdem kommt es zum so genannten „hydrophobic recovery“, infolge dessen die Hydrophobizität der Siliconoberfläche durch Diffusion kleiner Moleküle aus dem Inneren der

Silicone an die Oberfläche wieder zunimmt [147], wodurch die reaktiven Gruppen an der Oberfläche durch inerte Gruppen ersetzt werden.

Abb. 60 zeigt die IR-Spektren von Siliconschläuchen, die nach der Plasma-Aktivierung mit GOPTMS bzw. mit GOPTMS und PolySia beschichtet wurden.

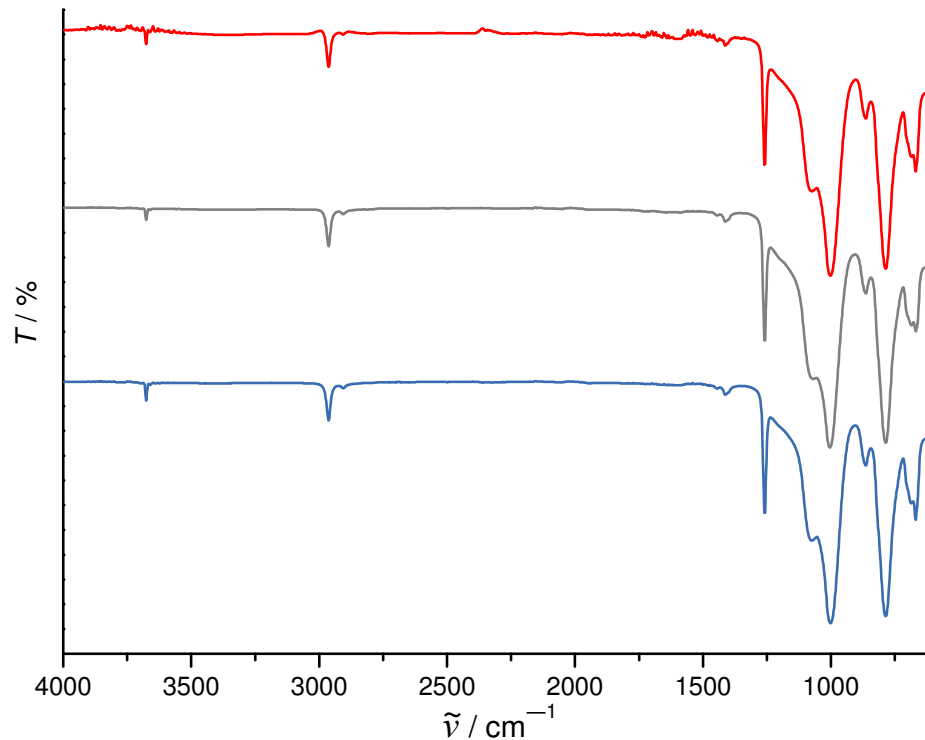


Abb. 60: IR-Spektren von Siliconschläuchen nach der Plasma-Aktivierung (oben) und funktionalisiert mit GOPTMS (10 Massen-%, Mitte) bzw. GOPTMS und PolySia (PolySia-Lösung 0.1 M) (unten).

Auch hier ist erkennbar, dass die IR-Spektren unabhängig von der Beschichtung sehr ähnlich aussehen. Alle Spektren werden ausschließlich von den für das Silicon charakteristischen Banden dominiert, deren Zuordnung identisch zu derjenigen aus Tab. 20 ist.

Um die modifizierten Silicone spezifisch auf Polysialinsäure zu untersuchen, wurde der TBA-Test verwendet. Es wurde zunächst experimentell erprobt, ob eine Immobilisierung von Polysialinsäure auf Siliconen nach Ozonisierung erfolgreich ist (Abb. 61).

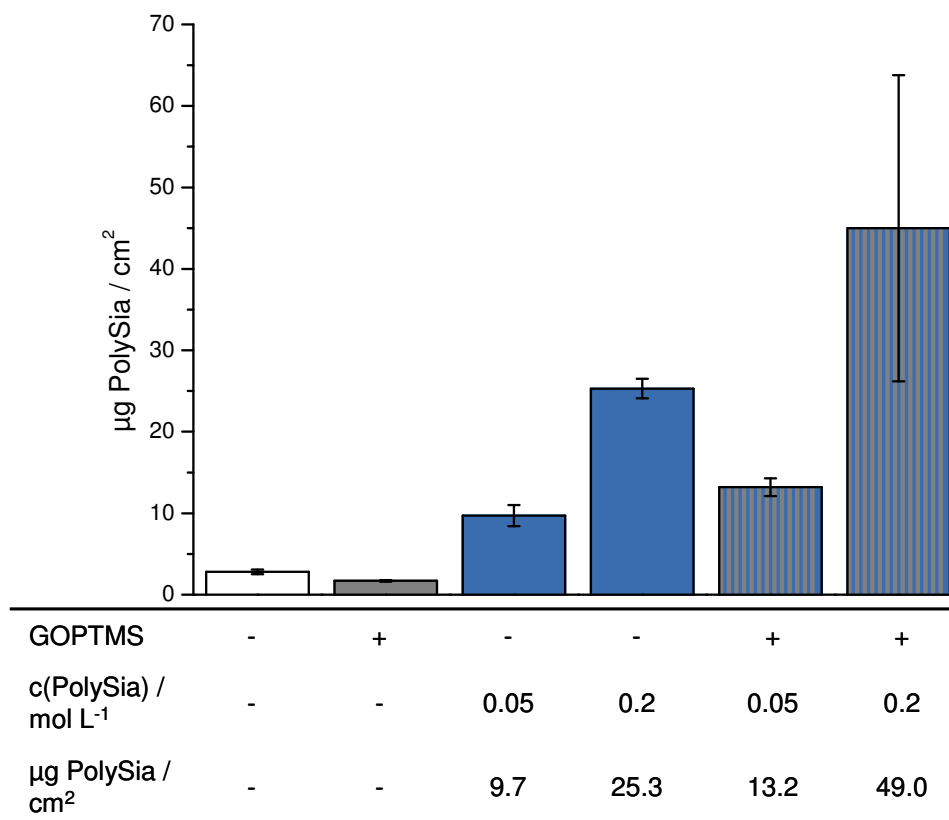


Abb. 61: Ergebnisse des TBA-Tests auf Siliconschläuchen, Immobilisierung von PolySia über GOPTMS (10 Massen-%) oder direkte Adsorption im Anschluss an eine Ozon-Behandlung (5 h, 70 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h).

Es zeigte sich, dass sowohl die direkte Adsorption von Polysialinsäure als auch die Anbindung von Polysialinsäure via GOPTMS zur Immobilisierung von PolySia auf den Siliconschläuchen führte. Bei beiden Konzentrationen (0.05 bzw. 0.2 M) der verwendeten wässrigen PolySia-Lösungen stellte sich die Immobilisierung über das GOPTMS als effektiver für die Anbindung dar. Während durch Adsorption einer 0.2 M PolySia-Lösung nur etwa 25 µg PolySia/cm² angebonden werden konnten, war dieser Wert nach Anbindung über GOPTMS mit 49 µg/cm² fast doppelt so groß. Für die niedriger konzentrierte PolySia-Lösung lässt sich die gleiche Tendenz beobachten, allerdings ist die zu beobachtende Differenz deutlich geringer (9.7 bzw. 13.2 µg/cm²). Aus der Abbildung wird ebenfalls deutlich, dass eine Erhöhung der Konzentration der PolySia zu einer vermehrten Anbindung derselben an die Silicone führt. Wird die Anbindung an die GOPTMS-modifizierten Silicone aus der 0.2 M PolySia-Lösung heraus vorgenommen, so wird mit 49 µg/cm² fast viermal so viel PolySia angebonden wie aus

einer 0.05 M Lösung. Wird unter der Annahme, dass Polysialinsäure eine Dichte von eins besitzt, die resultierende Schichtdicke von PolySia auf den Siliconschläuchen berechnet, so ergibt sich eine Schichtdicke für die PolySia von 490 nm.

Anschließend wurde untersucht, inwieweit die Konzentration des GOPTMS Einfluss auf die angebundene Menge an Polysialinsäure besitzt (Abb. 62).

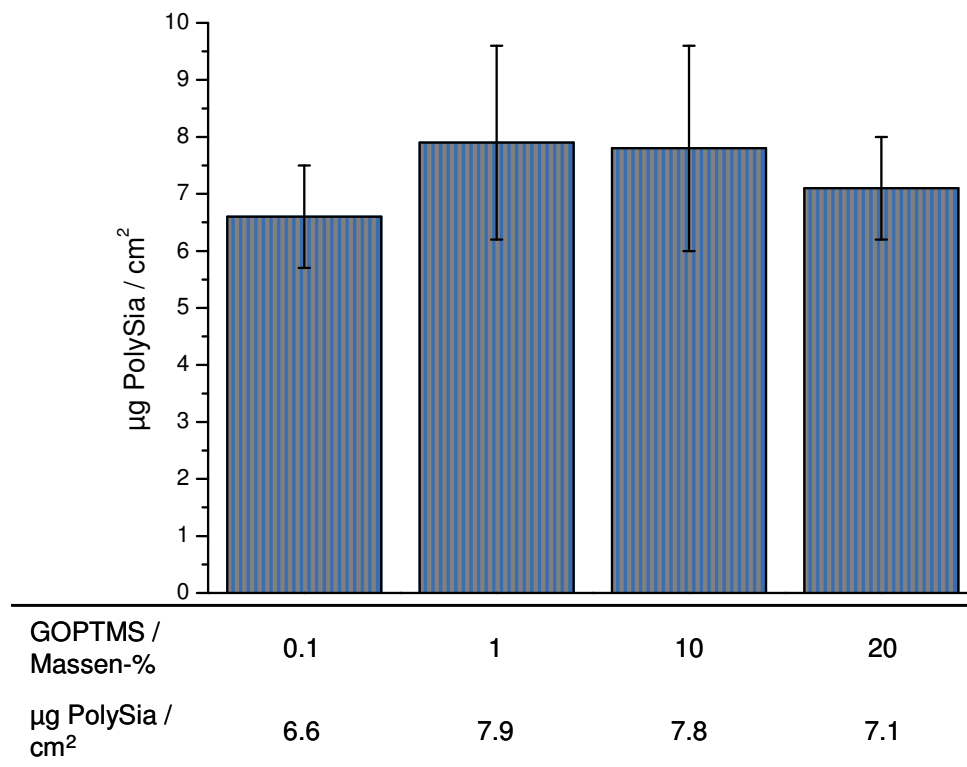


Abb. 62: Ergebnisse des TBA-Tests auf Siliconschläuchen, Anbindung von PolySia (PolySia-Lösung 0.3 M) über verschiedene Konzentrationen von GOPTMS nach Ozon-Behandlung (6 h, 90 % Leistung, Sauerstoffstrom 60 L/h) .

Unabhängig von der verwendeten Konzentration an GOPTMS lag die Menge an immobilisierter Polysialinsäure zwischen 6.6 und 7.9 µg/cm², wobei die zu beobachtenden Abweichungen innerhalb der Standardabweichungen liegen. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die Konzentration des GOPTMS die Anbindung der PolySia wahrscheinlich nur geringfügig beeinflusst. Möglicherweise wird die Siliconoberfläche schon durch geringe Konzentrationen des Epoxysilans vollständig bedeckt, so dass eine Erhöhung der Konzentration keine neuen Anbindungsstellen für die Polysialinsäure schafft.

Es wurde ebenfalls untersucht, welchen Einfluss die bei der Ozon-Behandlung einstellbaren Parameter wie Ozonisierungsdauer, Sauerstoffstrom und Ozonisor-Leistung auf die Menge an immobilisierter Polysialinsäure haben. Abb. 63 zeigt die Menge an gebundener Polysialinsäure, die nach der Behandlung der Silicone bei zwei unterschiedlichen Ozonisor-Leistungen angebunden wurde.

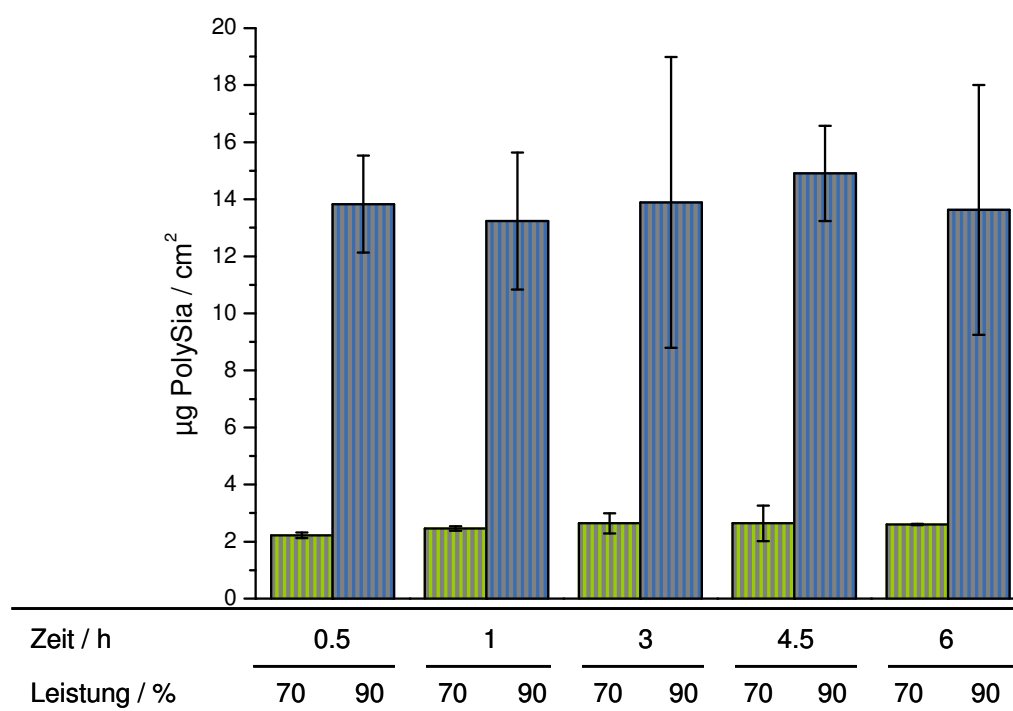


Abb. 63: Ergebnisse des TBA-Tests für die Anbindung von PolySia (PolySia-Lösung 0.034 M) auf Siliconschläuchen in Abhängigkeit von der Ozonisor-Leistung (Sauerstoffstrom 40 L/h) und der Dauer der Ozon-Behandlung.

Es konnte beobachtet werden, dass die Menge an immobilisierter PolySia zunahm, wenn eine höhere Leistung des Ozonisators für die Ozon-Behandlung gewählt wurde. Betrug die Ozonisor-Leistung nur 70 %, so konnten lediglich etwa 2 µg PolySia/cm² gebunden werden, während es bei einer Leistung von 90 % rund 13 µg/cm² waren. Für beide gewählten Ozonisor-Leistungen lässt sich aber erkennen, dass die Dauer der Ozonisierung keinen Einfluss auf die Menge an immobilisierter PolySia ausübt. Dies allerdings ist verwunderlich, da die Konzentration der Peroxidgruppen auf der Oberfläche zumindest bis zu einer Dauer von sechs Stunden ansteigt (Abb. 55). Wenn tatsächlich die Zahl der reaktiven Gruppen auf der Siliconoberfläche einen Einfluss auf die Menge an über das GOPTMS gebundene PolySia hat, so sollte diese mit der Ozonisierungsdauer weiter ansteigen

Wurden unterschiedliche Durchflussraten von Sauerstoff bei der Ozonisierung verwendet, so verringerte sich die Menge an immobilisierter PolySia auf den Siliconen mit steigendem Durchfluss (Abb. 64).

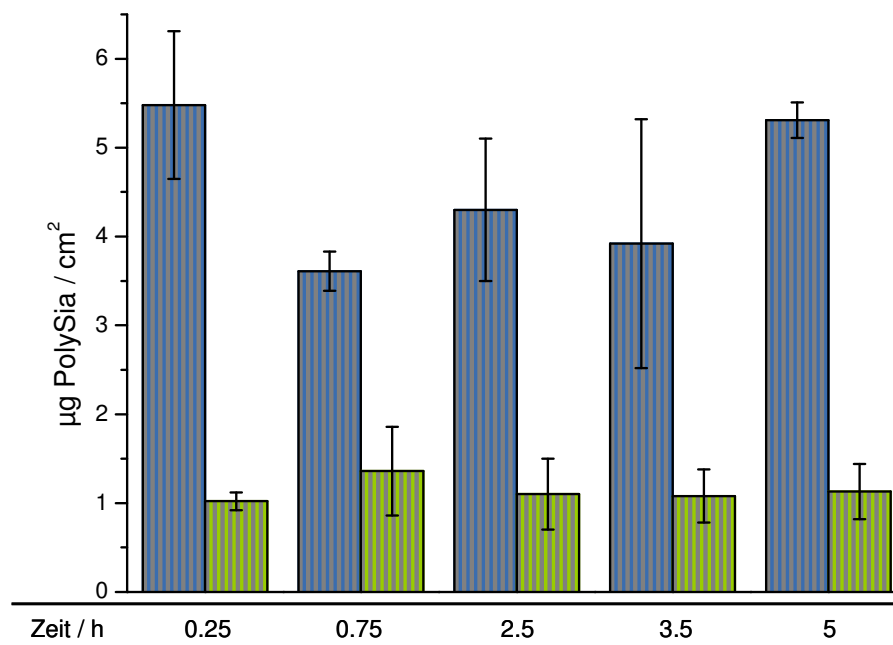


Abb. 64: Ergebnisse des TBA-Tests auf Siliconplatten, Menge an über GOPTMS (10 Massen-%) immobilisierte PolySia (PolySia-Lösung 0.1 M) in Abhängigkeit von der Dauer der Ozonisierung (60 % Leistung) bei einem Sauerstoffstrom von 40 (blau) bzw. 100 (grün) L/h.

Diese Tatsache ist insofern verständlich, da die Ozonkonzentration mit steigendem Sauerstoffstrom abnimmt (Abb. 56). Je mehr Sauerstoff durch den Ozonisator strömt, desto mehr Ozon wird erzeugt, gleichzeitig verringert sich aber auch die im Reaktionsraum vorherrschende Ozonkonzentration. Nimmt nun, wie in Abb. 64 gezeigt, die Menge an immobilisierter Polysialinsäure mit steigendem Sauerstoffstrom ab, so scheint die Ozonkonzentration für die Reaktivität der Silicone wichtiger als die Menge des produzierten Ozons zu sein, da andernfalls eine Anstieg der Menge an gebundener PolySia zu beobachten wäre.

Es wurde ebenfalls untersucht, inwiefern eine Vorbehandlung der Silicone mit Toluol vor der Ozonisierung einen Einfluss auf die Menge an immobilisierter PolySia ausübt (Abb. 65).

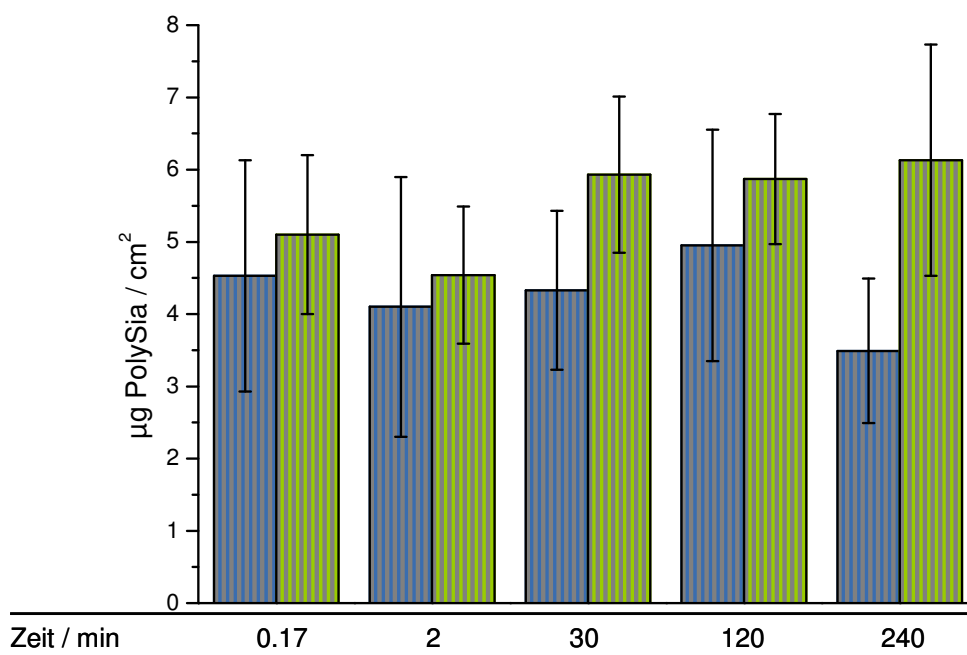


Abb. 65: Ergebnisse des TBA-Tests auf Siliconplatten; Menge an über GOPTMS (10 Massen-%) immobilisierte PolySia (PolySia-Lösung 0.1 M) nach Ozon-Behandlung (85 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) ohne (blau) und mit (grün) Vorbehandlung mit Toluol.

Toluol wurde deshalb gewählt, weil zum einen die Siliconmaterialien in Toluol aufquellen und zum anderen Ozon in Toluol löslich ist. Es zeigt sich, dass durch das Aufquellen in Toluol etwas mehr Polysialinsäure auf den Siliconen gebunden werden konnte. Ohne Toluol konnte etwa $4 \mu\text{g PolySia}/\text{cm}^2$ immobilisiert werden, während es nach der Behandlung mit Toluol zwischen 5 und $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ waren. Trotz der relativ großen Standardabweichungen lässt sich eine Tendenz erkennen, dass mit steigender Ozonisierungsdauer die Differenz der gebundenen Menge an PolySia auf behandelten und unbehandelten Siliconen zunimmt. Das könnte zum einen daran liegen, dass durch das Aufquellen die Oberfläche der Silicone zunimmt und so eine größere Angriffsfläche für das Ozon vorliegt. Außerdem kann das im Toluol gelöste Ozon, das erst langsam wieder aus dem Siliconschlauch heraus diffundiert, eine längere Zeit auf das Siliconmaterial einwirken und so zu einer Erhöhung der Menge an immobilisierter PolySia beitragen.

Auch zur weiteren Charakterisierung der durch Plasma-Aktivierung modifizierten Siliconschläuche wurde der TBA-Test verwendet (Abb. 66).

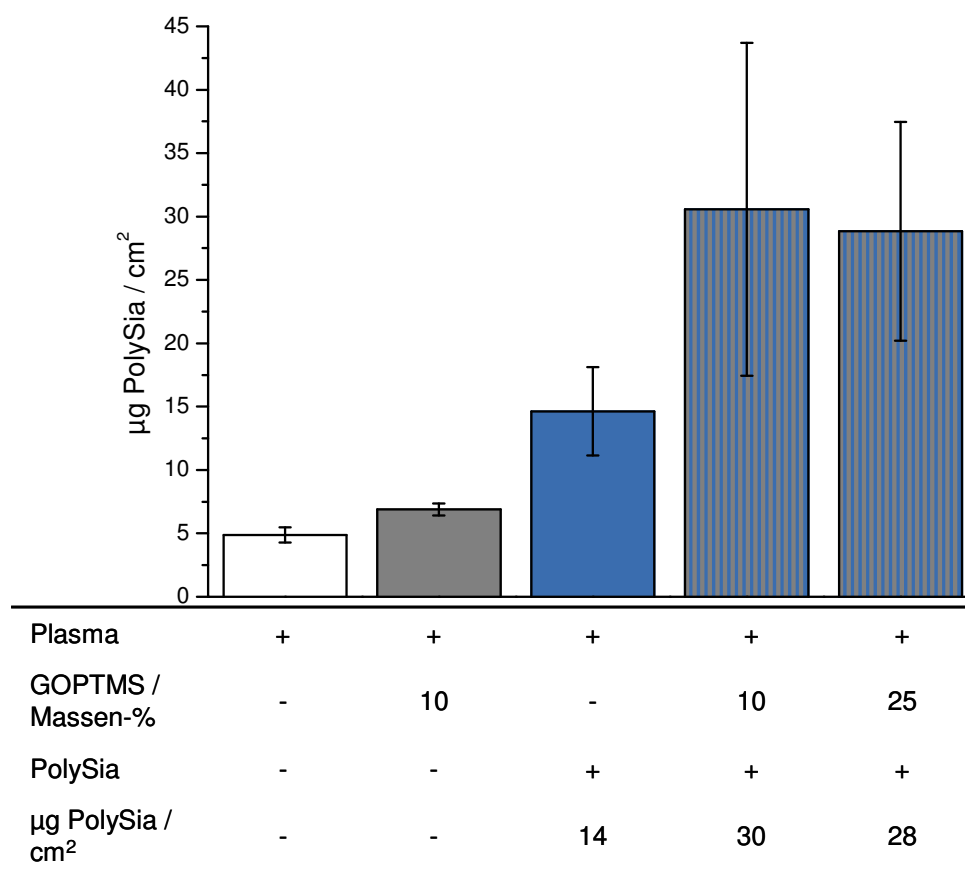


Abb. 66: Ergebnisse des TBA-Tests an plasma-aktivierten Siliconschläuchen, die mit GOPTMS und/oder PolySia (PolySia-Lösung 0.1 M) modifiziert wurden.

Das Ergebnis des TBA-Tests macht deutlich, dass eine Immobilisierung von PolySia auf Siliconschläuchen nach einer Plasma-Aktivierung möglich ist. Bei der direkten Adsorption können 14 µg/cm² immobilisiert werden, während durch Anwendung von GOPTMS als Linker die doppelte Menge PolySia angebunden werden kann. Die Konzentration des GOPTMS scheint darauf kaum Einfluss zu haben, da die Werte für 10 und 25 Massen-% GOPTMS nahezu gleich sind.

Um zu untersuchen, inwieweit sich die auf den Siliconen angebundene Polysialinsäure durch das für den Abbau spezifische Enzym endoNF abbauen lässt, wurde ein so genannter endoNF-Verdau durchgeführt. Dieser ist besonders interessant, da für die Anbindung stets die deacetylierte Form der PolySia verwendet wurde und somit auch untersucht werden kann, ob diese ebenfalls von dem Enzym erkannt und abgebaut wird. Zusätzlich zu den Siliconschläuchen und Glasfritten, auf denen die PolySia über das GOPTMS immobilisiert wurde, wurden

Lösungen der acetylierten und deacetylierten Polysialinsäure einmal mit endoNF und einmal mit dem reinen Puffer (pH 7.4) versetzt. Die zu bestimmten Zeitpunkten genommen Proben ließen sich über die im TBA-Test bestimmte Absorption vergleichen, das Ergebnis ist in Abb. 67 gezeigt.

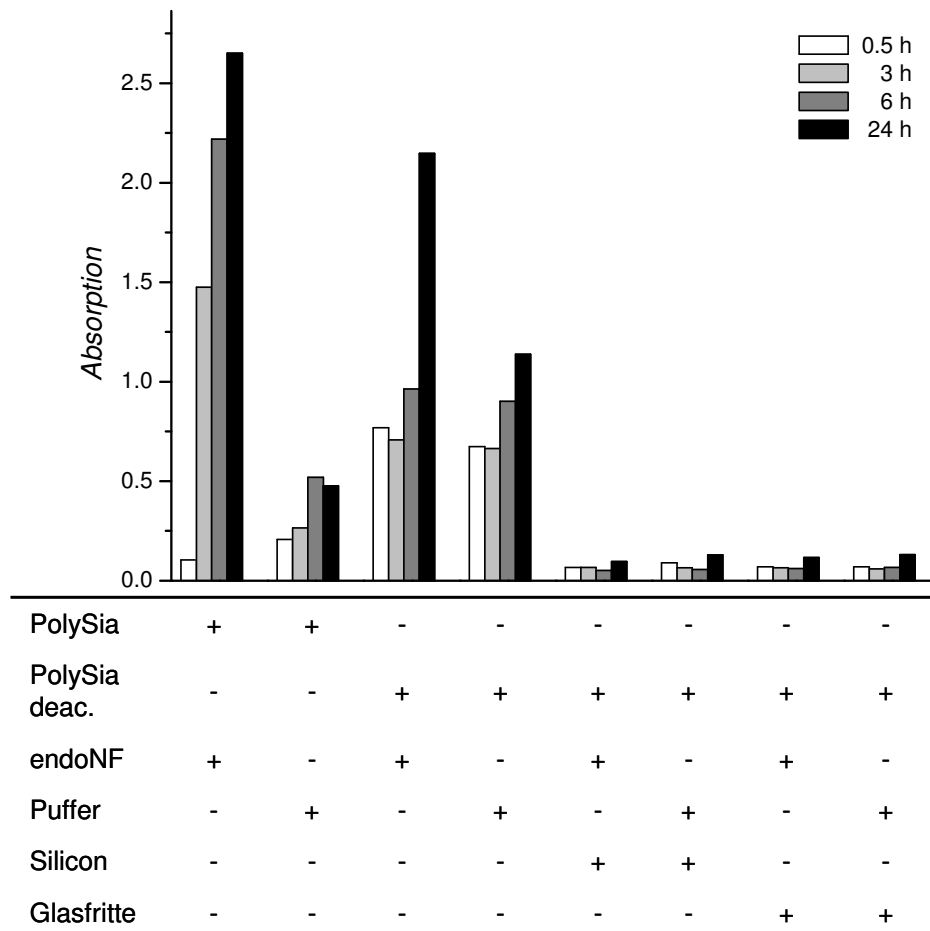


Abb. 67: Mit Hilfe des TBA-Tests ermittelte Ergebnisse des endoNF-Verdaus von Polysialinsäure in der acetylierten und deacetylierten Variante zu bestimmten Zeitpunkten. Neben den Lösungen der PolySia wurden auch den Siliconplatten bzw. Glasfritten, auf denen PolySia immobilisiert war, die endoNF zugesetzt, für die Referenzmessungen wurden das Enzym durch die reine Pufferlösung (pH 7.4) ersetzt.

Wird nur der Abbau der acetylierten Polysialinsäure betrachtet, so kann ein Anstieg der Absorption von 0.2 auf 2.6 mit zunehmender Verdau-Dauer festgestellt werden. Wurde der reine Puffer anstatt des Enzyms verwendet, so konnten nur geringfügige Absorptionen gemessen werden, die auf eine Hydrolyse der Polysialinsäure zurückzuführen sind. Die für die deacetylierte PolySia in reiner Pufferlösung gemessenen Absorptionen sind wesentlich größer als bei der acetylierten Form der PolySia. Dieses deutet daraufhin, dass die deacetylierte Form wesentlich weniger hydrolysestabil ist. Außerdem kann man erkennen, dass die Absorption mit Ausnahme der Werte nach einer halben und 24 Stunden immer deutlich geringer als die der

acetylierten Polysialinsäure ist. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die Endosialidase die deacetylierte PolySia nicht in dem Maße wie die acetylierte PolySia erkennt. Damit wird auch deutlich, wie wichtig die *N*-Acetylgruppe für die Bindung der Polysialinsäure und somit auch für die Spezifität der endoNF ist. Hiermit lassen sich dann auch die äußerst geringen Werte der Absorption (0.06-0.12) auf den mit PolySia modifizierten Siliconschläuchen und Glasfritten erklären, da die endoNF aufgrund der fehlenden Spezifität nicht in der Lage ist, die immobilisierte PolySia in kleinere Einheiten zu zerlegen, die dann im TBA-Test gemessen werden könnten. Inwiefern dieses Ergebnis einer Anwendung der mit Polysialinsäure modifizierten Siliconschläuche als Implantatmaterial im Wege steht, müsste durch weitere Experimente wie z.B. *in-vivo*-Testung untersucht werden. Wenn das spezifische Enzym die deacetylierte Variante der PolySia nicht erkennt, ist es natürlich auch fraglich, ob die angebundene PolySia in der Lage ist, dieselbe Wirkung z.B. in der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten wie die acetylierte Variante auszuüben und somit die Nervenregeneration überhaupt positiv beeinflussen kann.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die modifizierten Siliconschläuche mittels der Thermogravimetrie untersucht. Abb. 68 zeigt einen Vergleich zwischen unbehandelten Siliconen und solchen, die mit GOPTMS bzw. mit GOPTMS und Polysialinsäure modifiziert wurden.

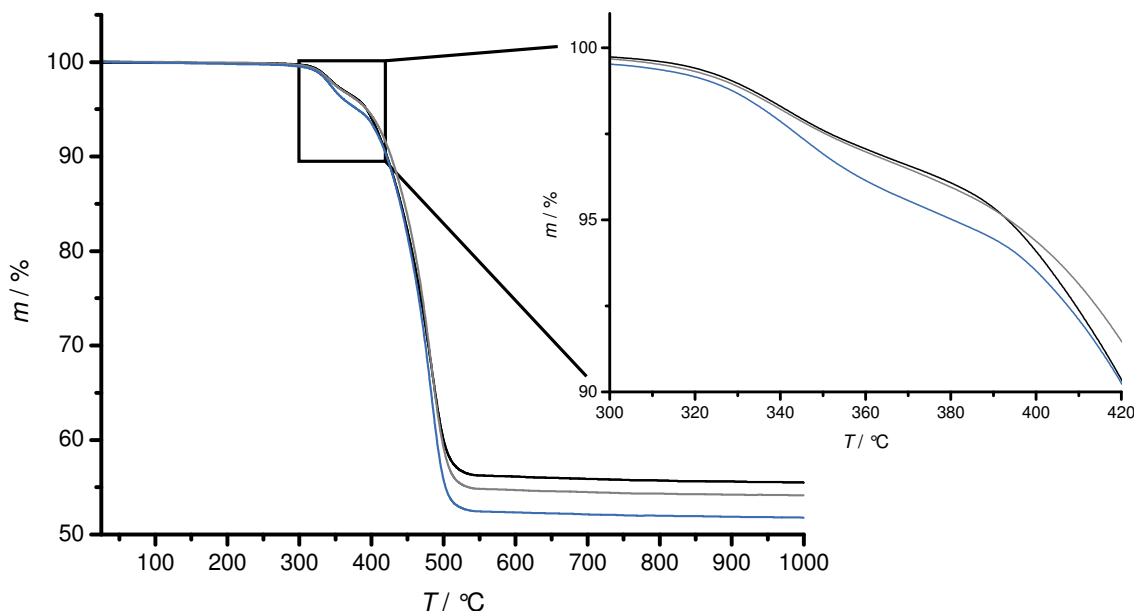


Abb. 68: Ergebnisse der TG von Siliconschläuchen, die entweder unmodifiziert (schwarz) sind oder nach einer Ozon-Behandlung (5 h, 70 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) mit GOPTMS (10 Massen-%) (grau) sowie mit GOPTMS und PolySia (PolySia-Lösung 0.05 M) (blau) beschichtet wurden. Die Vergrößerung zeigt den Bereich zwischen 300 und 420 °C.

Aus den TG-Kurven lässt sich erkennen, dass der Verlauf bei allen drei untersuchten Proben nahezu identisch ist, einzig im Bereich zwischen 340 und 400 °C unterscheidet sich der Verlauf der Kurve des mit PolySia modifizierten Siliconschlauchs deutlich von den anderen beiden Proben. Da das nur mit GOPTMS modifizierte Silicon in diesem Bereich einen zu dem reinen Siliconmaterial identischen Massenverlust (3.39 vs. 3.45 %) aufweist, kann der stärker auftretende Massenverlust der mit PolySia modifizierten Probe (4.23 %) allein der Anwesenheit von PolySia zugerechnet werden. Setzt man nun diesen zusätzlichen Massenverlust (ca. 0.8 %) mit der Einwaage des Schlauchmaterials und der errechneten Oberfläche in Relation, so erhält man eine Belegung von etwa 1 mg Polysia/cm². Im Vergleich zu den mit Hilfe des TBA-Tests bestimmten Mengen an immobilisierter PolySia ist dieser Wert allerdings deutlich zu groß (Faktor 40). Allerdings konnte man an anderen Proben, auf denen weit weniger PolySia gebunden war (laut TBA-Test), auch das Auftreten eines deutlich geringeren Massenverlusts zwischen 340 und 400 °C feststellen. Tab. 21 zeigt die registrierten Massenverluste aus Abb. 72.

Tab. 21: Zu beobachtende Massenverluste (MV) aus dem TG-Kurven von Siliconen, die unbehandelt waren oder mit GOPTMS (10 Massen-%) bzw. mit GOPTMS und PolySia (PolySia-Lösung 0.05 M) nach Ozon-Behandlung (5 h, 70 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) modifiziert wurden. Die Stufen wurden wie folgt festgelegt: 1. Stufe: 25-300 °C; 2. Stufe: 300-380 °C; 3. Stufe: 380-1000 °C.

	MV 1. Stufe / %	MV 2. Stufe / %	MV 3. Stufe / %	Restmasse / %
Silicon	0.27	3.39	40.85	55.49
Silicon + GOPTMS	0.42	3.45	42.08	54.14
Silicon + GOPTMS + PolySia	0.49	4.23	43.54	51.57

Der Massenverlust der ersten Stufe bis 300 °C lässt sich dem Verlust von adsorbiertem Lösungsmittel (Wasser) zuordnen und ist für alle drei Proben sehr ähnlich. Ab 300 °C kommt es zur Verbrennung der organischen Komponenten, also sowohl der PolySia als auch dem GOPTMS und organischen Bestandteilen der Silicone. Beim Betrachten der Restmassen fällt auf, dass diese mit steigender Modifizierung abnimmt, was darauf hindeuten könnte, dass mehr organische Bestandteile wie z.B. PolySia angebonden worden sind. Allerdings kam es hier auch alleine bei der Betrachtung der Restmassen von unmodifizierten Siliconen zum Teil zu größeren Abweichungen, so dass anhand der beobachteten Restmasse kein Bezug zur Menge an immobilisierten Molekülen gezogen werden darf. Im Gegensatz dazu aber konnte der in der zweiten Stufe größere Massenverlust der mit PolySia modifizierten Materialien immer, wenn

auch in unterschiedlicher Stärke, beobachtet werden, so dass dieser als indirektes Indiz für die erfolgreiche Anbindung der Polysialinsäure an die Silicone gelten darf.

Um die Zellverträglichkeit der mit PolySia modifizierten Silicone zu untersuchen, wurden sowohl der MTT-Test wie auch die DAPI-Färbung durchgeführt. Ein Vergleich hinsichtlich der Zellviabilität von unmodifizierten und mit Ozon behandelten und anschließend modifizierten Siliconplatten ist in Abb. 69 dargestellt.

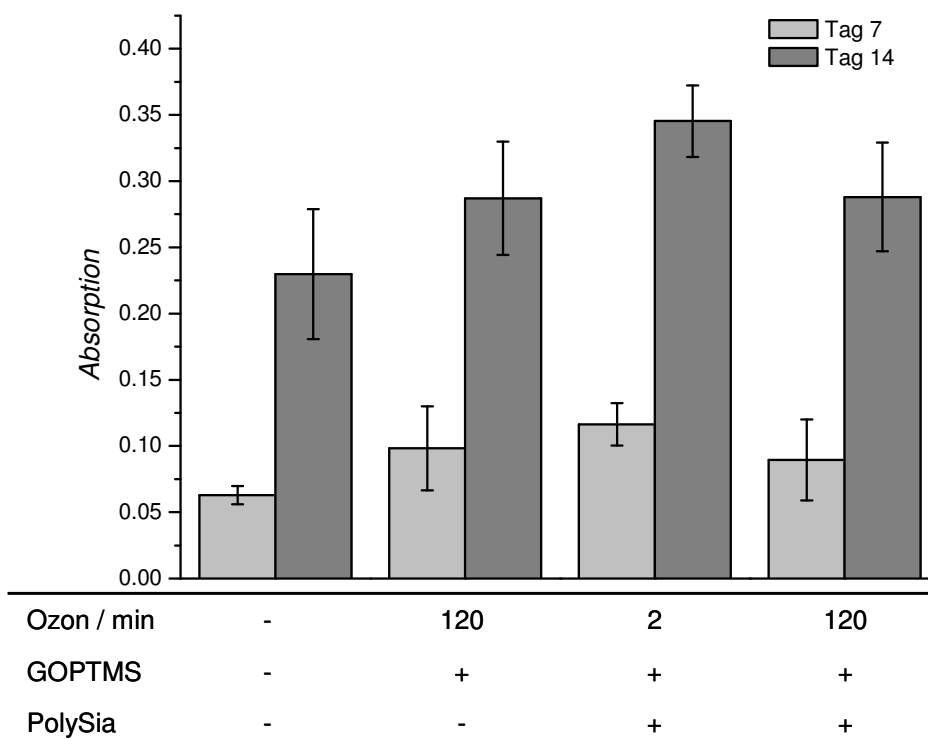


Abb. 69: Ergebnisse des MTT-Tests mit Hep-G2-Zellen auf unbehandelten und im Anschluss an eine Ozon-Behandlung (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) mit GOPTMS (10 Massen-%) bzw. GOPTMS und PolySia-Lösung (0.1 M) modifizierten Siliconplatten.

Auf allen untersuchten Siliconplatten kann unabhängig von einer Modifizierung eine Zunahme der Zellviabilität von Tag 7 nach Tag 14 festgestellt werden, so dass ebenfalls von einer Zunahme der Anzahl der Zellen ausgegangen werden kann. Nach 14 Tagen lässt sich eine größere Zellviabilität auf den modifizierten als auf den unbehandelten Siliconplatten feststellen. Außerdem lässt sich eine leichte Tendenz beobachten, dass eine längere Ozonisierungszeit einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität zu besitzen scheint, da bei einer Ozonisierungsdauer von 120 Minuten die Absorption 0.28 und nach 2 Minuten Ozon-Behandlung 0.34 beträgt. Dabei ist die zu beobachtende Zellviabilität auf mit GOPTMS behandelten und auf solchen Siliconplatten, die zusätzlich mit Polysialinsäure modifiziert wurden, nahezu identisch, so

dass die Polysialinsäure wohl keinen Einfluss auf die Zellviabilität besitzt. Möglicherweise stört die durch eine längere Ozonisierungszeit hervorgerufene größere Anzahl an reaktiven Peroxid- oder Carboxylgruppen das Leben der Zellen, so dass die Viabilität geringer ist. Trotzdem sollte eine Verwendung von Siliconen, auf denen Polysialinsäure über das GOPTMS angebunden wurde, als Implantatmaterial grundsätzlich möglich sein. Die DAPI-Färbung der mit Hep-G2-Zellen besiedelten Siliconplatten ist in Abb. 70 gezeigt.

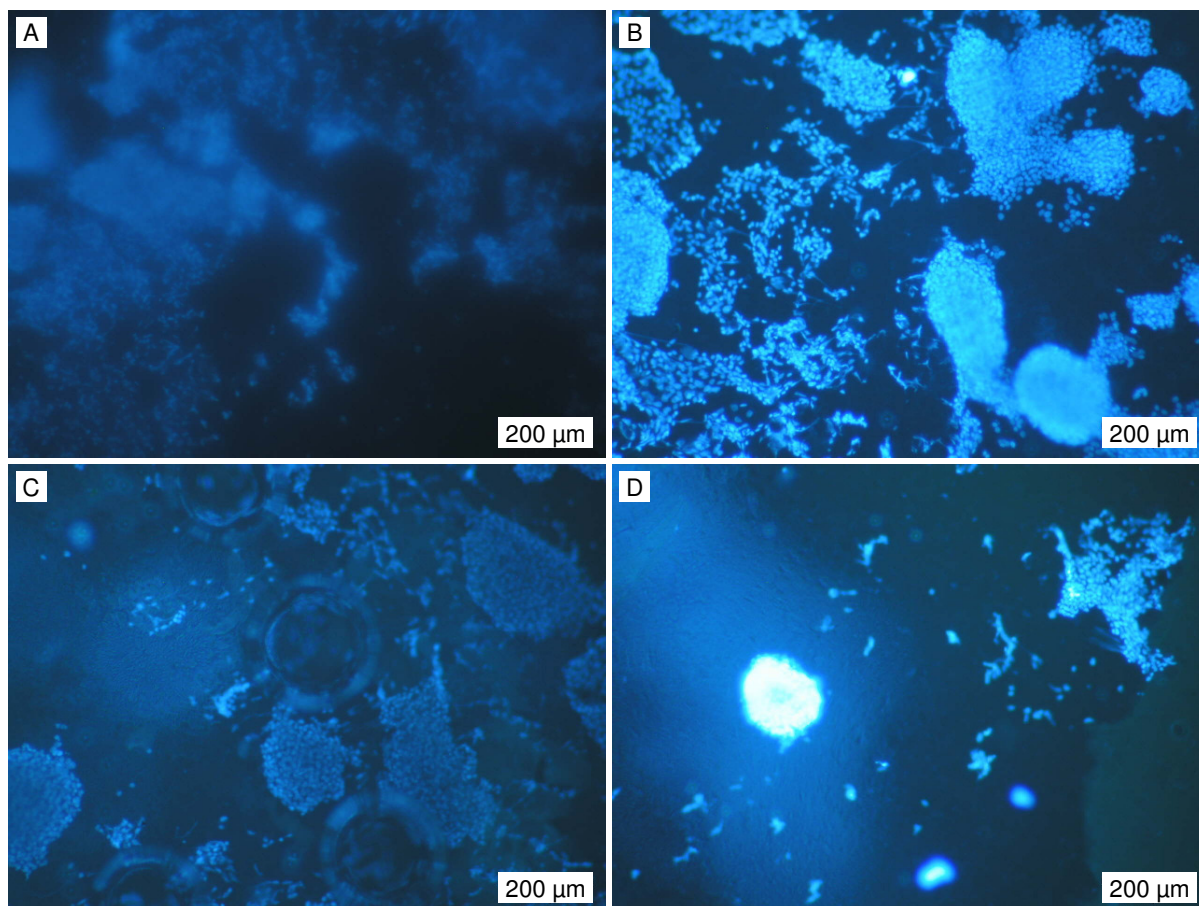


Abb. 70: DAPI-Färbung an Tag 14 auf mit Hep-G2-Zellen besiedelten unbehandelten und im Anschluss an eine Ozon-Behandlung (85 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) mit GOPTMS (10 Massen-%) bzw. GOPTMS und PolySia-Lösung (0.2 M) modifizierten Siliconplatten (A: unbehandelt, B: 120 min Ozon + GOPTMS, C: 2 min Ozon + GOPTMS + PolySia, D: 120 min Ozon + GOPTMS + PolySia).

Vor allem auf den Siliconplatten in den Bildern A bis C lässt sich eine dichte Besiedelung der Siliconplatten mit Zellen erkennen, einzig in Bild D ist die Zahl der Zellen deutlich verringert. Aufgrund des MTT-Tests aus Abb. 69, der eine in etwa genauso große Viabilität der Zellen auf den Materialien B und D aufzeigt, kann dennoch davon ausgegangen werden, dass keine negativen Effekte der Modifizierungen auf die Zellen vorliegen.

Um den Einfluss von mit Polysialinsäure modifizierten Siliconschläuchen auf die Nervenregeneration zu untersuchen, wurden *in vivo*-Experimente durchgeführt. Dabei wurden Siliconschläuche, auf denen $3 \mu\text{g PolySia}/\text{cm}^2$ unter Verwendung von GOPTMS als Linker angebunden waren, zur Überbrückung eines 10 mm-Nervendefekts des *N. ischiadicus* in adulten Sprague Dawley-Ratten von Kirsten Haastert (Institut für Neuroanatomie, MHH) eingesetzt, als Referenzmaterial wurden unbehandelte Siliconschläuche verwendet. Diese Länge wurde gewählt, weil bei dieser Defektlänge gerade noch spontane Regeneration auftreten kann. Bei der Explantation nach drei Wochen konnten in beiden Versuchsgruppen Regenerate beobachtet werden (Abb. 71).

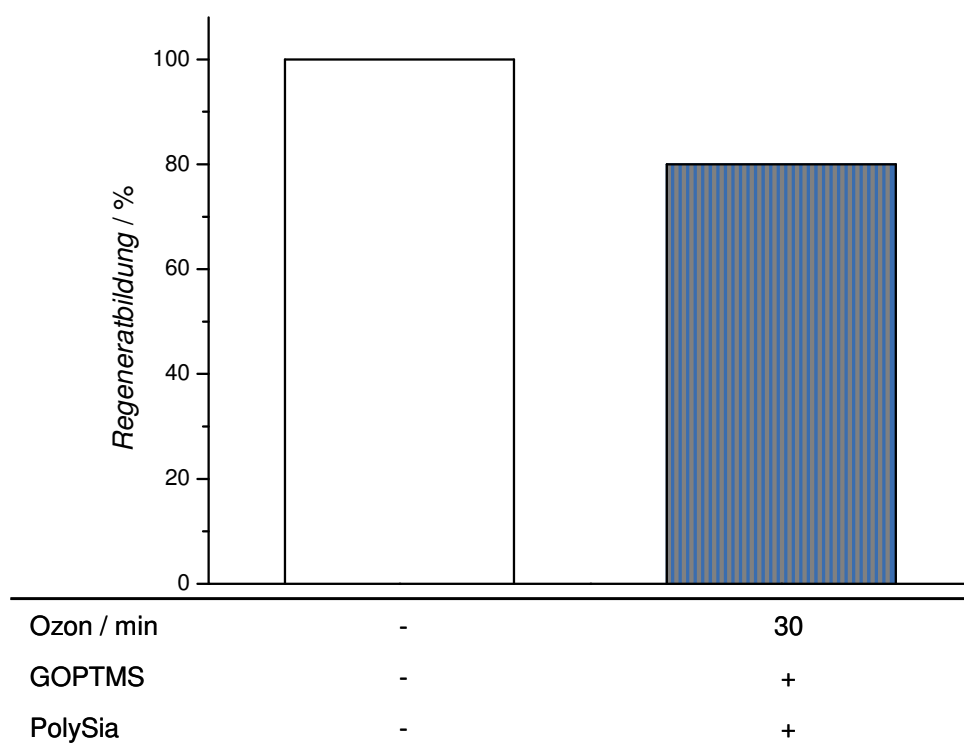


Abb. 71: Ergebnisse der *in vivo*-Implantation von unbehandelten und mit PolySia modifizierten Siliconschläuchen zur Überbrückung von 10 mm Defekten des *N. ischiadicus* in adulten Sprague Dawley-Ratten. In jeder Versuchsgruppe wurden fünf Schläuche implantiert. Die Anbindung der PolySia (PolySia-Lösung 0.2 M) an die Siliconschläuche erfolgte über GOPTMS (10 Massen-%) im Anschluss an eine Ozon-Behandlung (30 min, 85 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h).

Während in der Vergleichsgruppe mit unbehandelten Siliconschläuchen in allen Fällen ein Regenerat beobachtet werden konnte, so waren es in der Gruppe, die die mit Polysialinsäure beschichteten Schläuche erhalten hatte, immerhin vier von fünf Tieren, bei denen eine Nervenregeneration stattfand. Bei dem fünften Tier hatte sich nur eine sehr dünne Struktur ausgebildet, die bei der Explantation riss. Die Auswertung der histomorphometrischen Untersuchung

wie das Auszählen der gebildeten Axone dauert zu Zeit noch an, so dass diese Ergebnisse hier noch nicht präsentiert werden können. Es bleibt aber festzuhalten, dass die Verwendung von Polysialinsäure-modifizierten Siliconschläuchen in den meisten Fällen zu einer Nervenregeneration geführt hat. Da allerdings auch in den unbehandelten Siliconschläuchen Regenerate gefunden werden konnten, lässt sich anhand der Anzahl der gefundenen Regenerate keine Aussage treffen, ob die PolySia-modifizierten Materialien wirklich in der Lage sind, die Nervenregeneration zu fördern. Eine bessere Aussage lässt erst dann treffen, wenn die weiteren Untersuchungen abgeschlossen sind. Bis zu diesem Zeitpunkt lässt sich aber eine negative Wirkung der modifizierten Silicone auf die Nervenregeneration ausschließen. Auffällig bei der Explantation war, dass die Siliconschläuche relativ rau erschienen, was möglicherweise an der durchgeführten Sterilisation mit Isopropanol gelegen haben könnte. Unter Umständen fanden chemische Veränderungen an der Siliconoberfläche statt, die dann zum Entstehen der Unebenheiten geführt haben.

Nach der Explantation erfolgte ein TBA-Test auf den Siliconschläuchen, um zu überprüfen, inwieweit dort noch Polysialinsäure nachweisbar ist. Vor der Implantation waren auf den Siliconschläuchen $3 \mu\text{g PolySia}/\text{cm}^2$ angebunden, als Referenzmaterial waren unbehandelte Schläuche verwendet worden. Nach der Explantation konnten auf den mit PolySia modifizierten Siliconschläuchen noch $0.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ nachgewiesen werden, während es in der Vergleichsgruppe der unbehandelten Schläuche $0.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ waren. Dieses Ergebnis spricht zum einen dafür, dass die Beschichtung mit Polysialinsäure nicht stabil ist, sondern innerhalb von drei Wochen im Körper abgebaut bzw. von den Schläuchen abgelöst wird. Dabei ist es möglich, dass beispielsweise die PolySia in kleinere Einheiten gespalten wird oder dass die Bindung zwischen dem als Linker verwendeten GOPTMS und dem Siliconschlauch gespalten wird. Unerklärlich ist der relativ große Wert für die angebundene Menge an PolySia auf den unbehandelten Siliconschläuchen, da dort eigentlich gar keine Polysialinsäure vorhanden sein dürfte und dieser Wert mit $0.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auch deutlich über anderen, an unbehandelten Siliconschläuchen erhaltenen Werten liegt, die nicht im Tierversuch eingesetzt worden waren. Möglicherweise hat sich die im Körper gebildete Polysialinsäure, die bei dem Wachstum von Motoneuronen über Defektstellen hinweg exprimiert wird [110], an die Siliconschläuche angelagert. Bei genauerer Betrachtung der Nervenregenerate konnte eine leichte Tendenz dahingehend beobachtet werden, dass die Versorgung des Regenerats mit Blutgefäßen in den mit PolySia-modifizierten Schläuchen besser war. Die Blutversorgung ist wichtig für die Nervenregeneration und unter Verwendung von Siliconen normalerweise ein Problem, da Siliconschläuche in der Regel für Blutgefäße impermeabel sind.

5.2.3 Anbindung von Polysialinsäure über 3-Aminopropyltriethoxysilan und Bernstein-säureanhydrid

Analog zu den Untersuchungen der mit GOPTMS modifizierten Silicone wurden auch für die Anbindung von Polysialinsäure über APTES und BSAH statische Kontaktwinkelmessungen durchgeführt. Die gemessenen Kontaktwinkel fasst Tab. 22 zusammen.

Tab. 22: Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (in °) auf Siliconplatten nach Anbindung von PolySia (0.1 g) über APTES (125 µL) und BSAH (1 g) sowie Aktivierung mit DCC (0.08 g) mit Wasser (I) bzw. Toluol (II) als Lösungsmittel für die Anbindung von APTES sowie die Anbindung von PolySia ausschließlich über BSAH (III) nach unterschiedlichen Zeiten für die Behandlung mit Ozon (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h).

	10 s	1 min	10 min	1 h	3 h
I (H ₂ O)	118 ± 4	116 ± 4	118 ± 4	114 ± 4	117 ± 4
II (Toluol)	115 ± 3	114 ± 5	113 ± 3	119 ± 3	118 ± 3
III kein APTES	112 ± 1	115 ± 1	114 ± 0	113 ± 1	115 ± 3

Anhand der aufgenommenen Messwerte wird deutlich, dass weder die Dauer der Behandlung der Siliconplatten mit Ozon noch das für die Anbindung des APTES verwendete Lösungsmittel (Wasser bzw. Toluol) einen Einfluss auf den Kontaktwinkel hat, da dieser bei allen Messungen bei etwa 115° liegt. Wird die Anbindung der PolySia ausschließlich über das Bernsteinsäureanhydrid vorgenommen, so können keinerlei Unterschiede zu den anderen beiden Messreihen festgestellt werden, auch hier liegt der Kontaktwinkel etwa bei 115°.

Zur besseren Charakterisierung der modifizierten Siliconsubstrate wurde die IR-Spektroskopie verwendet. Im Vergleich zwischen unbehandelten Siliconschläuchen bzw. -Platten und solchen, auf denen PolySia über das Linkersystem APTES/BSAH immobilisiert werden sollte, zeigt sich, dass keinerlei Unterschiede erkannt werden können (Abb. 72).

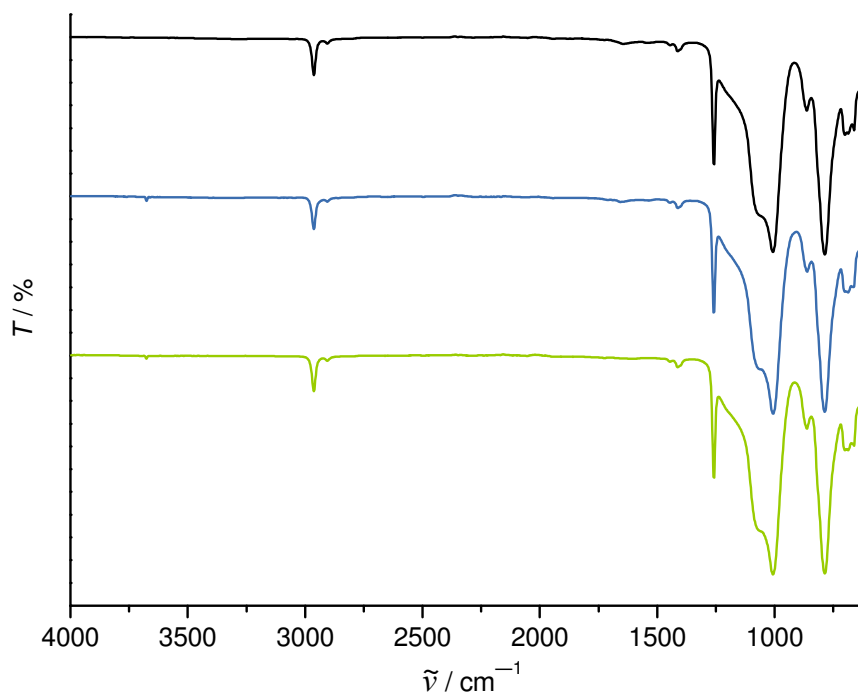


Abb. 72: IR-Spektren von unbehandelten Siliconplatten (oben) und nach der Immobilisierung von PolySia über APTES + BSAH (+ DCC) (Mitte) bzw. nur BSAH (+ DCC) (unten) im Anschluss an eine Ozon-Behandlung.

Alle IR-Spektren werden von den für die Silicone charakteristischen Banden bei 1073, 1006 bzw. 863 cm^{-1} dominiert, wobei die Bande bei 1006 cm^{-1} durch (C–H)-Deformationsschwingungen ausgelöst wird, während die anderen beiden durch (Si–O)-Valenzschwingungen verursacht werden. Eine Auflistung der zu beobachtenden Banden gibt Tab. 23.

Tab. 23: Zuordnung der zu beobachtenden Banden von unbehandelten Siliconplatten und Siliconplatten, auf denen PolySia nach einer Ozon-Behandlung über das Linkersystem APTES/BSAH (+DCC) angebunden wurde (Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ / cm^{-1}) (APTES auf Silicon: ASil; BSAH an ASil: BASil; PolySia an BASil: PBASil) [145, 146].

Siicon	mit APTES + BSAH + PolySia	mit BSAH + PolySia	Zuordnung	Quelle
3675	3675	3676	(O–H)-Valenzschwingung	Silicon, ASil, BASil, PBASil
2962	2962	2962	(C–H)-Valenzschwingung	Silicon, ASil, BASil, PBASil
-	2904	2905	(C–H)-Valenzschwingung	ASil, BASil, PBASil
1647	1657	-	(O–H)-Deformationsschwingung	Wasser
1412	1412	1412	(C–H)-Deformationsschwingung	Silicon, ASil, BASil, PBASil
1258	1258	1258	(C–H)-Deformationsschwingung	Silicon, ASil, BASil, PBASil
1073	-	-	(Si–O)-Valenzschwingung	Silicon
1003	1006	1006	(C–H)-Deformationsschwingung	Silicon, ASil, BASil, PBASil
863	861	862	(Si–O)-Valenzschwingung	Silicon, ASil, BASil, PBASil
786	786	785	(C–H)-, „rocking“-Schwingung	Silicon, ASil, BASil, PBASil
786	786	785	(Si–C)-Valenzschwingung	Silicon

In einigen Fällen, wenn die über den TBA-Test nachgewiesene Menge an immobilisierter PolySia bei mindestens $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ lag, konnte das Auftreten zusätzlicher Banden registriert werden (Abb. 73).

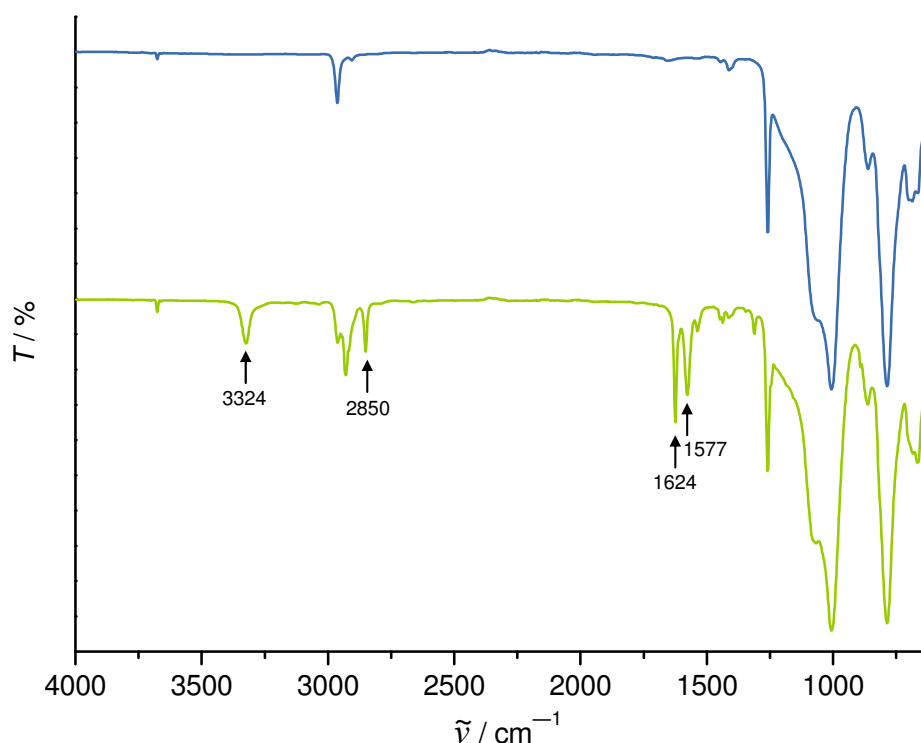


Abb. 73: IR-Spektren von Siliconplatten, auf denen nach einer Ozon-Behandlung PolySia über APTES und BSAH (+ DCC) angebunden wurde. Zusätzliches Auftreten von für das Linkersystem APTES/BSAH charakteristischen Banden in einer Probe, bei der mit $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (unten) im TBA-Test doppelt so viel PolySia angebunden wurde wie in der Vergleichsprobe ($3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, oben).

In den IR-Spektren erkennt man deutlich die scharfen Banden bei 3324, 1624 und 1577cm^{-1} , die charakteristisch für eine Amidbindung sind. Außerdem ist eine für die (C-H)-Valenzschwingung charakteristische Bande bei 2850cm^{-1} hinzugekommen (s.a.Tab. 24). Da keine für das Vorhandensein von Polysialinsäure kennzeichnenden Banden zu erkennen sind, ist der Nachweis der PolySia über die IR-Spektroskopie nicht möglich. Immerhin kann aufgrund des Vorliegens der für eine Amidbindung typischen Banden zumindest von der Anwesenheit des Linkersystems APTES/BSAH ausgegangen werden, da sich das Amid bildet, wenn das Bernsteinsäureanhydrid durch das APTES geöffnet wird. Ob an die dann freie Carboxylfunktion die Polysialinsäure gebunden ist, kann anhand der vorliegenden Spektren nicht festgestellt werden.

Tab. 24: Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 73, bei denen in einem Fall zusätzliche, auf die Anwesenheit des Linkersystems APTES/BSAH (+ DCC) hindeutende Banden auftreten (Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ / cm^{-1}) (APTES auf Silicon: ASil; BSAH an ASil: BASil; PolySia an BASil: PBASil) [145, 146].

mit APTES + BSAH + PolySia (+ DCC)	mit BSAH + PolySia (+ DCC)	Zuordnung	Quelle
-	3324	(N–H)-Valenzschwingung (Amid)	BASil (PBASil)
-	2850	(C–H)-Valenzschwingung	ASil, BASil, PBASil
-	1624	(C=O)-Deformationsschwingung (Amid)	BASil (PBASil)
-	1577	(N–H)-Deformationsschwingung (Amid)	BASil (PBASil)
-	1537	(N–H)-Deformationsschwingung (Amid)	BASil (PBASil)
-	1436	(C–H)-Deformationsschwingung	ASil, BASil, PBASil
-	1311	(C–H)-Deformationsschwingung	ASil, BASil, PBASil

Um einen Nachweis von Polysialinsäure auf der Oberfläche der Silicone nach der Anbindung über das Linkersystem APTES/BSAH zu erhalten, wurde der TBA-Test durchgeführt. Abb. 74 zeigt einen Vergleich der Ergebnisse, die bei der Verwendung von Wasser und Toluol als zwei verschiedenen Lösungsmitteln für das APTES gewonnen werden konnten.

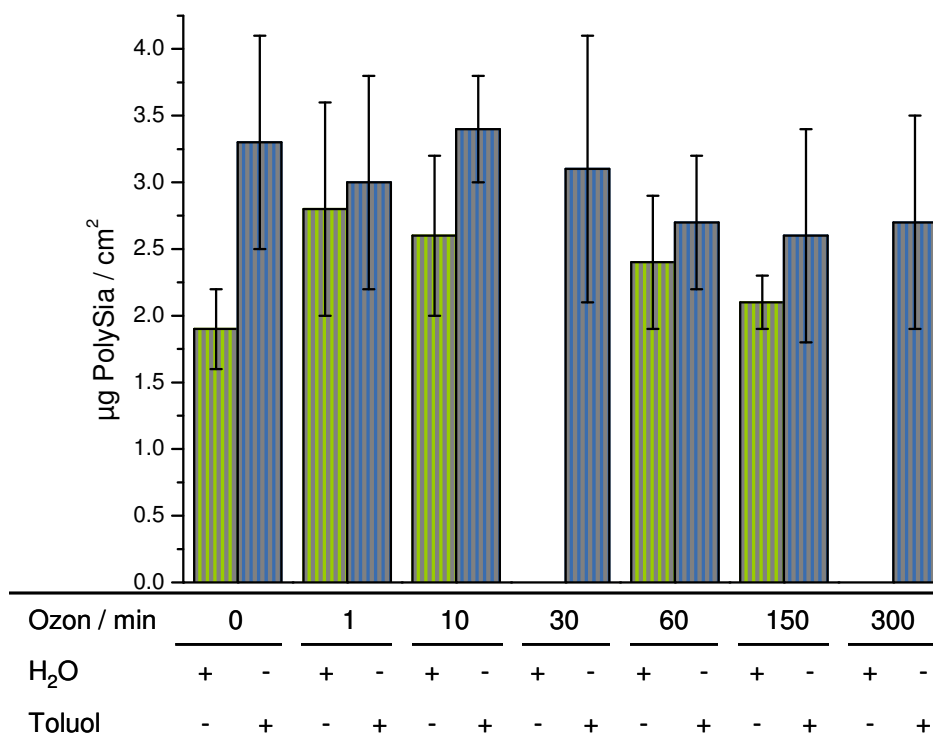


Abb. 74: Ergebnisse des TBA-Tests auf Siliconplatten nach Ozon-Behandlung (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) mit Wasser (grün) bzw. Toluol (blau) als Lösungsmittel für APTES für die Anbindung von PolySia (0.1 g) über APTES (125 µL) und BSAH (1 g) (sowie 0.08 g DCC).

Bei Betrachtung der Mengen an immobilisierter Polysialinsäure unter Verwendung von Toluol als Lösungsmittel für den Anbindungsschritt des APTES fällt auf, dass die Dauer der Ozonisierung scheinbar keinen Einfluss auf die Menge an angebundener PolySia besitzt, da der Wert bei allen Zeiten zwischen 2.7 und 3.5 µg PolySia/cm² liegt. Erstaunlich ist vor allem der Wert bei null Minuten Ozon-Behandlung (es wurde kein Ozon zur Aktivierung der Oberfläche verwendet), denn dieser scheint auch unter Berücksichtigung der großen Standardabweichung mit 3.25 µg/cm² höher zu sein als nach einer mehrstündigen Ozon-Behandlung (ca. 2.7 µg/cm²). Möglicherweise ist die Fähigkeit des APTES, an Peroxidfunktionen auf Oberflächen zu binden, gestört; allerdings wird von DIAZ-QUIJADA die erfolgreiche Anbindung von APTES auf ozon-behandelten Siliconen berichtet [130]. Problematisch ist ebenfalls, dass sich die Mengen an nachgewiesener PolySia an der unteren Nachweisgrenze bewegen, so dass Aus-

sagen zur Menge an gebundener Polysialinsäure nur unter Vorbehalt getroffen werden können. Wurde Wasser als Lösungsmittel für das APTES verwendet, so sind die Mengen an immobilisierter Polysialinsäure immer etwas geringer als bei Verwendung von Toluol als Lösungsmittel. Auch hier ist keine Abhängigkeit von der Dauer der Ozon-Behandlung zu erkennen, allerdings ist hier vor allem der erste Wert (keine Ozon-Behandlung) wesentlich geringer (etwa $1.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Dieses könnte auch damit zu tun haben, dass die Siliconmaterialien in Toluol selbst in der für die Anbindung des APTES gewählten Zeitspanne von nur zwei Stunden stark aufquellen, sich somit die Oberfläche vergrößert und sich so möglicherweise auch kleine Kanäle bilden, durch die APTES ins Innere der Silicone diffundieren kann.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Anbindung von Polysialinsäure auch ohne APTES, d.h. nur über BSA, funktioniert (Abb. 75).

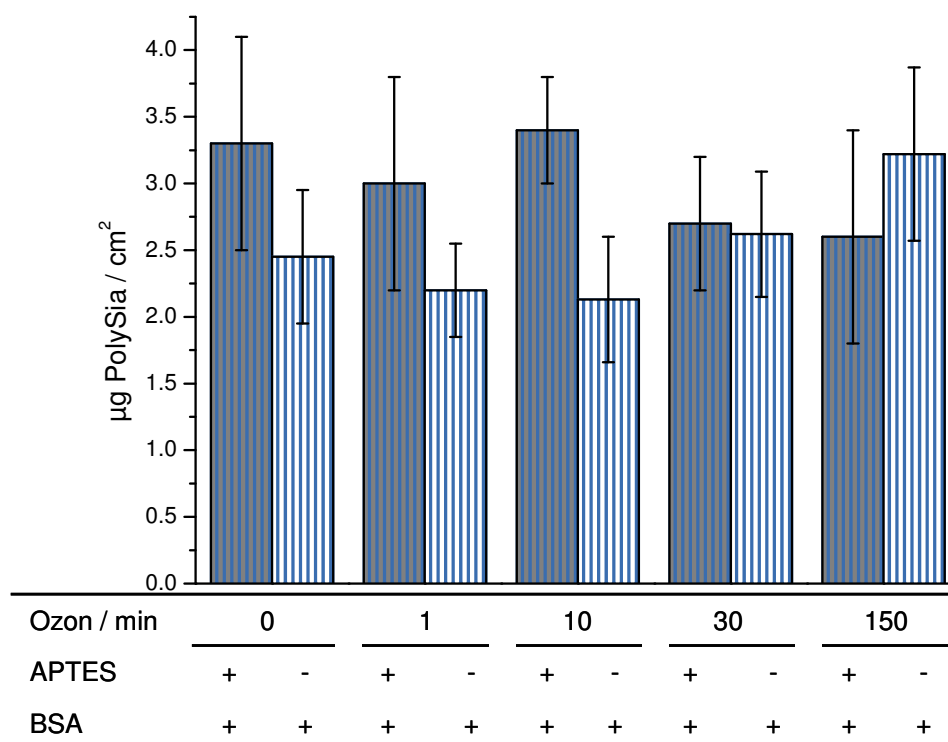


Abb. 75: Ergebnisse des TBA-Tests auf Siliconplatten nach Ozon-Behandlung (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 Lh), Anbindung von PolySia (0.1 g) über APTES (125 μL) + BSAH (1 g) (sowie 0.08 g DCC) bzw. BSAH (sowie DCC).

Es wird deutlich, dass auch bei der alleinigen Verwendung von BSAH als Linker für die Polysialinsäure keine Abhängigkeit der Menge an immobilisierter PolySia von der Dauer der Ozon-Behandlung besteht. Die Werte sind relativ konstant zwischen 2.1 und $2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, allein für eine Ozonisierungsdauer von 150 Minuten steigt der Wert auf $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ an. Dies könnte

darauf hindeuten, dass das Bernsteinsäureanhydrid im Gegensatz zum APTES mehr auf das Vorhandensein von Peroxidgruppen auf der Oberfläche zur Anbindung angewiesen ist.

Um einen möglichen negativen Einfluss auf die Zellviabilität zu erkennen, wurden die modifizierten Silicone im MTT-Test mit Hep-G2- und PC-12-Zellen getestet. Je größer die gemessene Absorption, desto größer ist auch die Viabilität der Zellen, d.h. desto „wohler“ fühlen sie sich auf den getesteten Materialien. Unter Verwendung von Hep-G2-Zellen auf Siliconen, auf denen Polysialinsäure über das Linkersystem APTES/BSAH angebunden wurde, ergaben sich die in Abb. 76 gezeigten Ergebnisse.

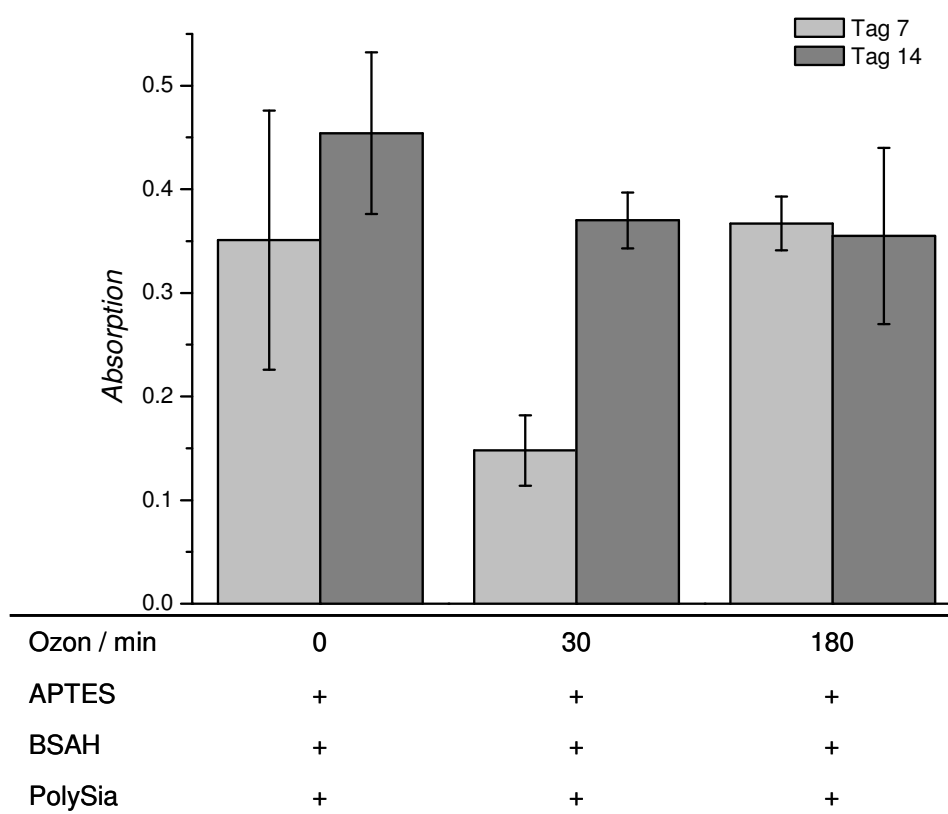


Abb. 76: Ergebnisse der MTT-Tests mit Hep-G2-Zellen auf Siliconplatten, auf denen Polysia (0.1 g) über APTES (125 μ L) und BSAH (1 g) (sowie 0.08 g DCC) nach einer Behandlung mit Ozon (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) für eine bestimmte Zeit immobilisiert wurde.

Es ist erkennbar, dass die Viabilität der Hep-G2-Zellen prinzipiell unabhängig von der gewählten Ozonisierungszeit gleich groß ist. Ein Anstieg der Viabilität von Tag 7 nach Tag 14 kann nur auf den Materialien beobachtet werden, die für 30 Minuten einer Ozon-Behandlung unterzogen wurden, ansonsten ist die Absorption, im Rahmen der Standardabweichung, nach sieben bzw. 14 Tagen konstant. Dies deutet allerdings auch darauf hin, dass keine Vermehrung der Zellen zwischen der ersten und der zweiten Woche stattfindet. Wurden dieselben Materia-

lien mit PC-12-Zellen besiedelt, so konnte in allen Fällen eine im Vergleich zu Tag 7 vermehrte Absorption nach 14 Tagen beobachtet werden (Abb. 77).

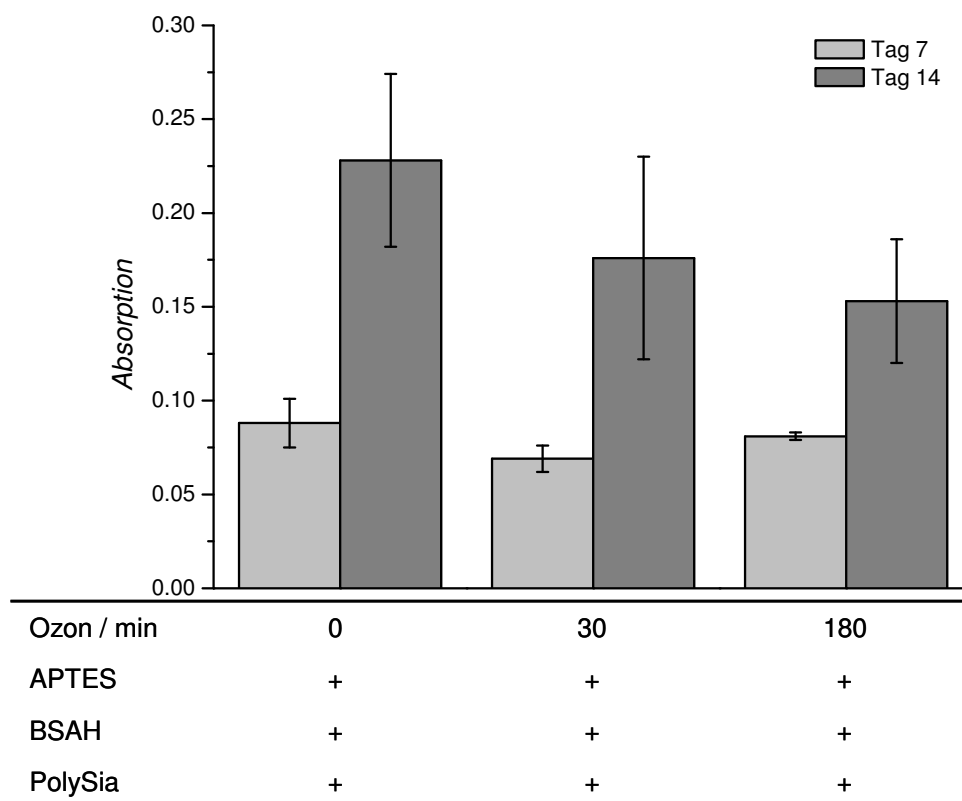


Abb. 77: Ergebnisse der MTT-Tests mit PC-12-Zellen auf Siliconplatten, auf denen Polysia (0.1 g) über APTES (125 μ L) und BSAH (1 g) (sowie 0.08 g DCC) nach einer Behandlung mit Ozon (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) für eine bestimmte Zeit immobilisiert wurde.

Da die Viabilität der Zellen zunimmt, kann auch davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der Zellen in der zweiten Woche zunimmt, was ein positives Ergebnis für eine mögliche Verwendung als Implantatmaterial aufzeigt. Genau wie in Abb. 76 gibt es eine leichte Tendenz dafür, dass mit längerer Ozonisierungsdauer die Materialien möglicherweise die Viabilität der Zellen negativ beeinflussen, da die Absorption von etwa 0.22 auf 0.15 abnimmt. Allerdings ist dieses nicht so leicht zu erklären, da sich das durch die Ozon-Behandlung hervorgerufene Auftreten von reaktiven Gruppen wie Peroxid- und Carbonylfunktionen schon zu Beginn der Viabilitätsmessungen auswirken sollte, weil nach einer gewissen Zeit diese Gruppen chemische Reaktionen z.B. mit Wasser eingehen. Es könnten sich dadurch natürlich andere chemische Gruppen auf der Oberfläche bilden, die das Leben der Zellen stören, jedoch wäre es merkwürdig, dass dieses erst nach einer Woche auftritt, so dass die Erniedrigung der Absorption vielleicht zufällig ist.

Wurde die Anbindung der PolySia ausschließlich über das Bernsteinsäureanhydrid im Anschluss an die Ozon-Behandlung vorgenommen, so konnte ein Anstieg der gemessenen Absorption sowohl unter Verwendung von Hep-G2- (Abb. 78) als auch von PC-12-Zellen (Abb. 79) registriert werden.

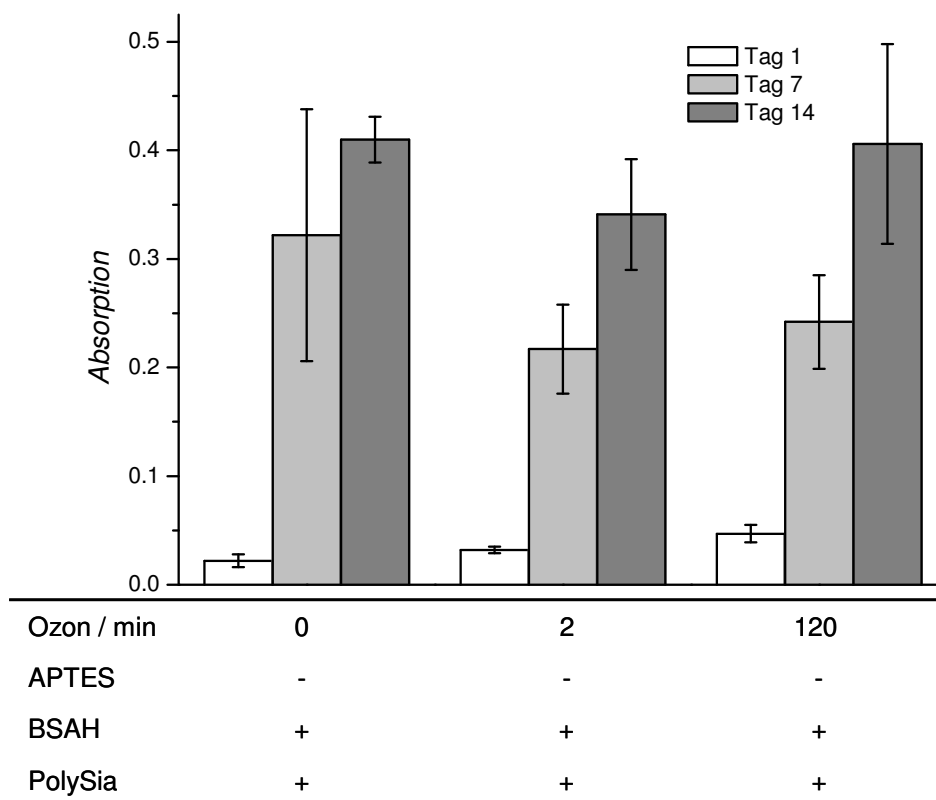


Abb. 78: Ergebnisse der MTT-Tests mit Hep-G2-Zellen auf Siliconplatten, auf denen PolySia (0.1 g) nach unterschiedlich langen Behandlungszeiten mit Ozon (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) über BSAH (1 g) nach Aktivierung mit DCC (0.08 g) angebunden wurde.

Für alle drei Materialien lassen sich ein Anstieg der Absorption und somit auch der Viabilität der ausplattierten Zellen feststellen. Während die Absorption nach einem Tag zwischen 0.02 und 0.04 liegt, sind es nach sieben Tagen zwischen 0.22 und 0.32 sowie nach zwei Wochen zwischen 0.34 und 0.46. Dabei unterscheiden sich die Absorptionen der unterschiedlich lange im Ozonisator behandelten Materialien nur innerhalb der Standardabweichung, ein leichter Abfall der Absorption bei längeren Ozonisierungszeiten wie in Abb. 76 und Abb. 77 kann nicht festgestellt werden. Wurde der MTT-Test mit PC-12-Zellen durchgeführt, so sah das Ergebnis ähnlich aus (Abb. 79).

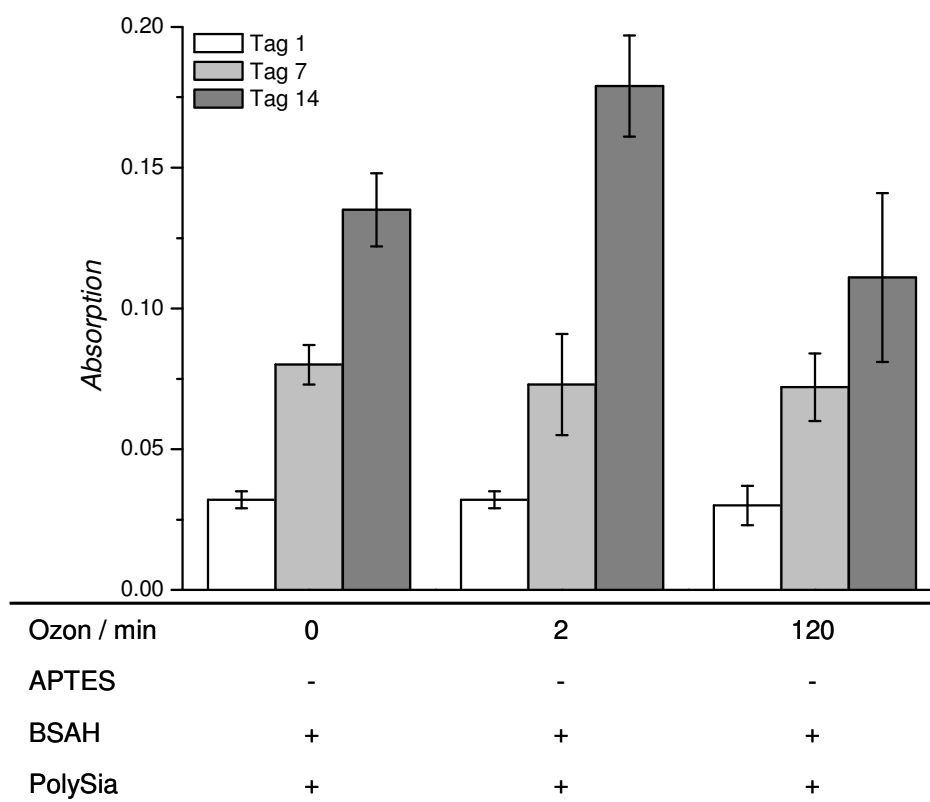


Abb. 79: Ergebnisse der MTT-Tests mit PC-12-Zellen auf Siliconplatten, auf denen PolySia (0.1 g) nach unterschiedlich langen Behandlungszeiten mit Ozon (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) über BSAH (1 g) nach Aktivierung mit DCC (0.08 g) angebunden wurde.

Auch hier kann ein Anstieg der Absorption und somit auch der Viabilität von Tag 1 nach Tag 14 gemessen werden. Nach einem Tag betrug die Absorption bei allen getesteten Materialien 0.03, nach sieben Tagen war ein Anstieg auf 0.7 bis 0.8 zu verzeichnen, nur nach 14 Tagen weichen die Werte etwas voneinander ab. Aber auch hier lässt sich kein negativer Einfluss der verwendeten Materialien auf die Viabilität der PC-12-Zellen feststellen.

Auf den mit Hep-G2-Zellen besiedelten Siliconschläuchen, auf denen Polysialinsäure über Bernsteinsäureanhydrid angebunden wurde, wurde an Tag 14 eine DAPI-Färbung vorgenommen, um die Zelladhäsion zu untersuchen (Abb. 80).

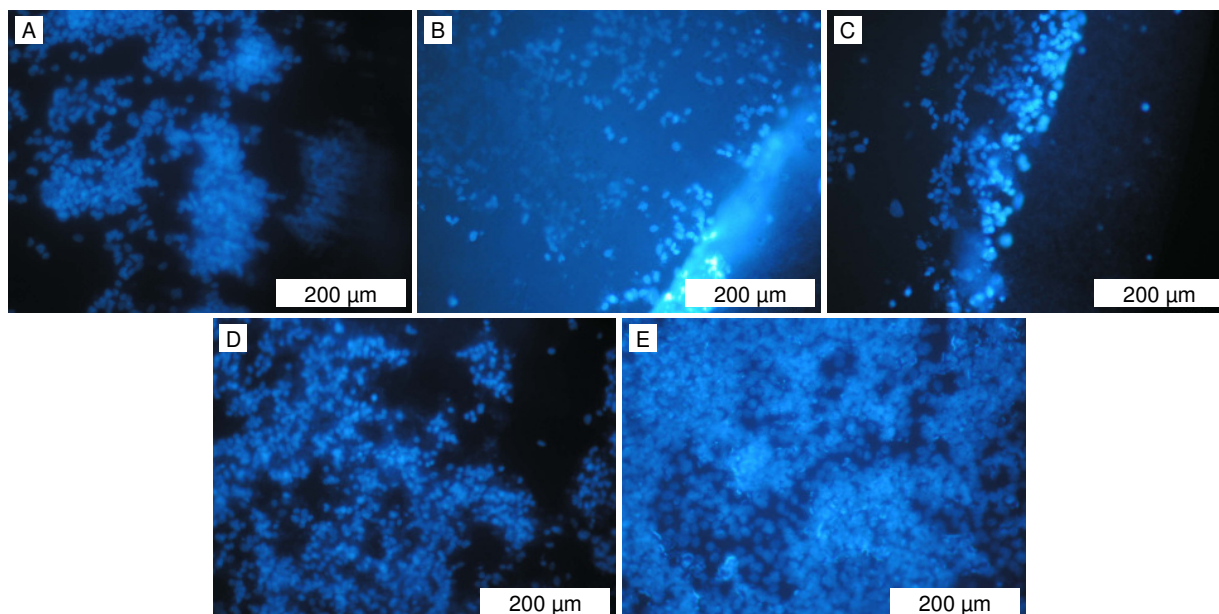


Abb. 80: DAPI-Färbung an Tag 14 auf mit Hep-G2-Zellen besiedelten Siliconplatten, auf denen PolySia (0.1 g) über BSAH (1 g) nach Aktivierung mit DCC (0.08 g) im Anschluss an eine unterschiedlich lange Ozon-Behandlung (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) angebunden wurde (A: kein Ozon, B + C: zwei Minuten Ozon, D + E: zwei Stunden Ozon).

Auf allen Siliconplatten lässt sich unabhängig von der Dauer der Ozonbehandlung eine dichte Besiedelung mit Zellen erkennen. In Übereinstimmung mit Abb. 78 scheint die Anzahl der Zellen bei einer zweiminütigen Ozon-Behandlung (Bilder B und C) im Gegensatz zu den anderen Bildern etwas erniedrigt zu sein, allerdings bleibt festzuhalten, dass keine negativen Effekte der modifizierten Siliconmaterialien auf die Zellen zu beobachten sind.

Eine analoge Untersuchung wurde ebenfalls mit PC-12-Zellen durchgeführt, die aufgenommenen Fluoreszenzbilder sind in Abb. 81 zu sehen.

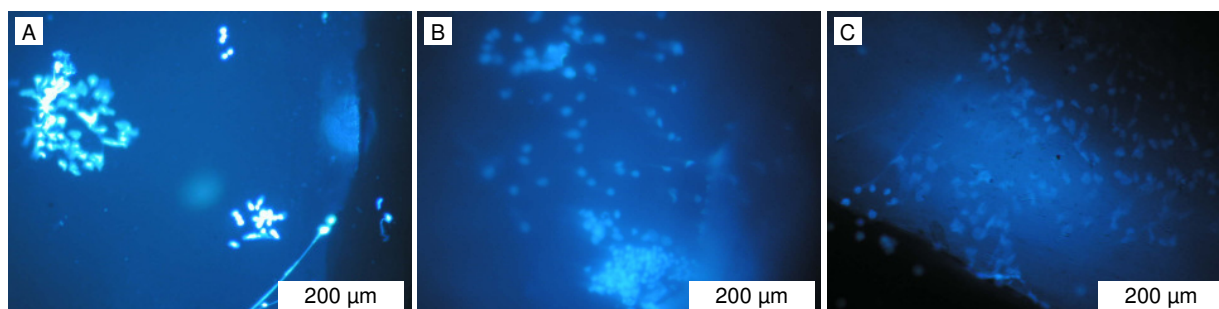


Abb. 81: DAPI-Färbung an Tag 14 auf mit PC-12-Zellen besiedelten Siliconplatten, die im Anschluss an eine unterschiedlich lange Ozonbehandlung (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) mit BSAH (1 g) und PolySia (0.1 g + 0.08 g DCC) modifiziert wurden (A: kein Ozon, B: zwei Minuten Ozon, C: zwei Stunden Ozon).

Auch hier kann eine Adhäsion von Zellen erkannt werden, allerdings ist diese weniger dicht als unter Verwendung der Hep-G2-Zellen aus Abb. 80, was aber vor allem an der geringeren Anzahl der ausplattierten Zellen (5000 Hep-G2-Zellen vs. 1500 PC-12-Zellen) liegen dürfte. Eine toxische Wirkung ausgehend von den mit Polysialinsäure modifizierten Siliconplatten kann nicht erkannt werden, so dass eine Anwendung als biokompatibles Material möglich ist.

5.2.4 Vergleichende Diskussion für die Anbindung von Polysialinsäure auf Siliconen

Die Anbindung von Polysialinsäure auf Silicon-Oberflächen ist sowohl über GOPTMS als Linker genauso wie über das Linkersystem APTES/BSAH möglich, der Nachweis gestaltet sich in beiden Fällen jedoch nicht immer eindeutig. In beiden Anbindungssystemen ist der Nachweis über Kontaktwinkel- oder IR-spektroskopische Messungen alleine nicht möglich. Wird GOPTMS zur Anbindung der PolySia verwendet, so werden die Kontaktwinkel der Siliconoberfläche im Vergleich zur reinen Silicon-Oberfläche zwar kleiner, eine Unterscheidung zwischen GOPTMS und PolySia auf der Oberfläche analog zu den beschichteten Glasmaterialien ist jedoch nicht möglich. Überdies scheint die Modifizierung der Oberfläche sehr inhomogen zu sein, da es große Unterschiede in den gemessenen Kontaktwinkeln auf ein und derselben Probe gibt. Ein Einfluss der Dauer der Ozon-Behandlung zur Aktivierung der Oberfläche kann aus den Kontaktwinkelmessungen nicht erkannt werden. Die Plasma-Aktivierung sorgt in etwa für die gleichen Änderungen wie eine Aktivierung durch Ozon. Für die Anbindung über APTES und das Bernsteinsäureanhydrid gilt prinzipiell das gleiche, auch hier können nur geringfügige Abweichungen des Kontaktwinkels auf den modifizierten Siliconen in Bezug auf die reinen Silicone festgestellt werden. Für die Anbindung reiner Silane wurde auch von PATEL nur eine geringe Änderung des gemessenen Kontaktwinkels auf mit Octadecyltrichlorsilan (OTS) und Fluoralkylsilan (FAS) modifizierten Siliconen beobachtet [148]. Während er für die unbehandelte Siliconoberfläche einen Kontaktwinkel von 107° registrierte, lagen die Kontaktwinkel einer OTS- bzw. FAS-Oberfläche bei 102° bzw. 112° . Somit liegen die in dieser Arbeit auf mit GOPTMS und APTES modifizierten Siliconen bestimmten Kontaktwinkel von etwa 110° im gleichen Bereich. Allerdings konnte PATEL nach Immobilisierung von Heparin und Hyaluronsäure eine deutliche Erniedrigung des Kontaktwinkels auf jeweils 55° feststellen. Dieses wäre auch in etwa jener Bereich gewesen, den man für eine mit Polysialinsäure modifizierte Siliconoberfläche erwarten könnte, da der Kontaktwinkel auf Glasoberflächen bei ungefähr 35° lag.

Die gemessenen IR-Spektren zeigen für beide Anbindungssysteme zumeist nur die für die Silicone charakteristischen Banden, nur in Ausnahmefällen kann im Falle von GOPTMS das Auftreten von Wasserspuren auf den trockenen Proben beobachtet werden, während die Proben, bei denen eine größere Menge an PolySia (mindestens $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) über APTES und BSAH immobilisiert wurde, zuweilen auf die Anwesenheit einer Amidbindung schließen lassen.

Mit Hilfe des TBA-Tests konnte Polysialinsäure auf der Oberfläche zumindest im Falle der Anbindung über GOPTMS einwandfrei nachgewiesen werden, bei Verwendung von APTES und BSAH zur Immobilisierung sind die angebondenen Mengen doch in den meisten Fällen nur sehr gering. Unabhängig von der Art des verwendeten Linkers scheint die Dauer der Aktivierung durch Ozon keinen Einfluss auf die Menge an immobilisierter PolySia zu haben. Dieses Ergebnis ist einigermaßen überraschend, da anhand der Bestimmung der Peroxidkonzentration auf der Siliconoberfläche eine Zunahme an reaktiven Gruppen mit zunehmender Dauer der Ozon-Behandlung registriert werden konnte. Man könnte eventuell davon ausgehen, dass das Vorhandensein einer größeren Anzahl reaktiver Gruppen auch zur vermehrten Anbindung des Linkers und somit zur vermehrten Immobilisierung von Polysialinsäure führt, was in dieser Arbeit nicht der Fall war. Dieses ist aber teilweise erklärbar, da das Ozon auch ins Innere der Silicone eindringen und dort Peroxidgruppen generieren kann [117], die möglicherweise für die verwendeten Linker oder die Polysialinsäure nicht zugänglich sind. Eventuell aber sind auch nur wenige Silanmoleküle an die sich auf der Siliconoberfläche befindlichen Peroxidgruppen gebunden, so dass die Menge der Peroxidgruppen keinen Einfluss auf die Menge an gebundenem Silan hat. Die Menge an immobilisierter Polysialinsäure wäre dann davon abhängig, wie groß die Kondensation der Silanmoleküle untereinander ist und wie viele reaktive Gruppen für die Anbindung der PolySia bzw. des Bernsteinsäureanhydrids zur Verfügung stehen. Ebenfalls auffällig war, dass die Standardabweichungen nicht nur bei den Kontaktwinkelmessungen, sondern auch im TBA-Test teilweise sehr groß waren, was für eine inhomogene Anbindung von PolySia bzw. GOPTMS und somit wohl auch für eine ungleichmäßige Aktivierung der Siliconoberfläche spricht. Allerdings berichtet XU davon, dass durch die Ozonisierung Peroxidgruppen homogen auf der Siliconoberfläche eingeführt werden [132]. Die von ihm ermittelte Konzentration an Peroxiden auf den Siliconen lag – wie in dieser Arbeit – bei etwa $2 \cdot 10^{-8} \text{ mol}/\text{cm}^2$, allerdings erreichte XU diese Werte bereits nach einer Ozonisierungsdauer von 20 Minuten und nicht erst nach zwei oder drei Stunden (abhängig von der gewählten Leistung des Ozonisators). Dies könnte vor allem durch einen sehr viel langsameren Sauerstoffstrom zu Stande kommen, der nur 12 L/h betrug, während in dieser Arbeit in den meisten Fällen ein Sauerstoffstrom von 40 L/h verwendet wurde, da noch geringere Durchflüsse apparativ nicht

zu realisieren waren. Es ist daher wahrscheinlich, dass im Falle von XU eine höhere Ozonkonzentration zu einer erhöhten Anzahl an Peroxidgruppen auf der Siliconoberfläche geführt hat. Da aber KO bei einem Sauerstoffstrom von 50 L/h nach ungefähr einer Stunde einen Sättigungswert von etwa $50 \cdot 10^{-8} \text{ mol/cm}^2$ erreicht, muss ebenfalls davon ausgegangen werden, dass auch die Zusammensetzung des zu aktivierenden Silicons einen großen Einfluss auf die generierte Menge an Peroxiden besitzt [117].

Viele der untersuchten Parameter wie Konzentration des GOPTMS, Dauer der Ozonbehandlung oder die Nachbehandlung (z.B. Abspülen mit Aceton) scheinen keinen messbaren Einfluss auf die Menge an immobilisierter PolySia zu haben, daher muss davon ausgegangen werden, dass möglicherweise andere Faktoren wie die Luftfeuchtigkeit oder die Umgebungstemperatur in das Reaktionsgeschehen eingreifen. Einige Autoren wie FERGUSON und KO führen die Anbindung von Alkyltrichlorsilanen bzw. Polyethylenglycol-Derivaten auf aktivierten Siliconen in einer Schutzgas-Atmosphäre, teilweise sogar unter vermindertem Druck, durch [117, 149], während DIAZ-QUIJADA die Funktionalisierung von PDMS mit APTES aus einem Ethanol-Wasser-Gemisch heraus vornimmt [130]. Über die vorhandenen Aminogruppen gelang ihm die Immobilisierung eines einsträngigen Oligonucleotids durch die Reaktion der endständigen Carboxylgruppen des Oligonucleotids mit den Aminofunktionen des APTES. Anhand von UV-spektroskopischen Messungen konnte DIAZ-QUIJADA zeigen, dass nur etwa die Hälfte der vorhandenen Aminofunktionen für das Oligonucleotid zugänglich war. Unter der Annahme, dass die Polysialinsäure einen zu dem Oligonucleotid vergleichbaren sterischen Anspruch aufweist, lässt sich die Tatsache erklären, dass mit einer Erhöhung der Menge an GOPTMS nicht zwangsläufig mehr PolySia immobilisiert werden konnte.

Ein weiterer potentieller Faktor, der die Menge an immobilisierter PolySia beeinflusst, kann ebenfalls in den kleineren Schwankungen der Ozonisator-Leistung während der Ozonbehandlung begründet sein, was allerdings nicht die abweichenden Messwerte innerhalb einer Gruppe von exakt gleich behandelten Siliconschläuchen erklären kann. Eventuell sind auch die verwendeten Siliconmaterialien bezüglich ihrer chemischen Beschaffenheit nicht homogen, so dass bestimmte Siliconabschnitte anders reagieren als andere. Ein Indiz hierfür könnten die TG-Messungen der unbehandelten Siliconschläuche sein, die beispielsweise nach der Verbrennung bei 1000 °C unterschiedliche Restmassen aufwiesen. Anhand der thermogravimetrischen Messungen ließ sich die Immobilisierung der PolySia ebenfalls durch das Auftreten eines wesentlich größeren Massenverlusts im Vergleich zu PolySia-freien Materialien nachweisen. Die hieraus bestimmten Mengen an gebundener PolySia weichen zwar stark von den über den TBA-Test ermittelten Werten ab, sie liegen jedoch in etwa in der gleichen Größenordnung.

Außerdem konnten die gleichen Relationen zwischen unterschiedlichen Mengen an gebundener Polysialinsäure in der TG im Vergleich zum TBA-Test erkannt werden.

Unabhängig von der Art des verwendeten Linkers (GOPTMS vs. APTES/BSAH) für die Anbindung der Polysialinsäure konnten in Zellkulturexperimenten weder hinsichtlich der Zellviabilität noch der Zelladhäsion negative Einflüsse auf die Zellen festgestellt werden. Bei der Anbindung von PolySia über APTES und Bernsteinsäureanhydrid konnte in den meisten Fällen eine Zunahme der Viabilität, was ebenfalls gleichbedeutend mit einer Vermehrung der Zellen ist, von Tag 7 nach Tag 14 beobachtet werden. Auch die Materialien, auf denen GOPTMS zur Immobilisierung der Polysialinsäure verwendet wurde, zeigten eine hervorragende Biokompatibilität, so dass aus dieser Sicht nichts gegen eine Anwendung von mit Polysialinsäure modifizierten Siliconschläuchen als Nervenleitschienen spricht.

Einzig die Tatsache, dass die für den spezifischen Abbau von PolySia verantwortliche Endosialidase (endoNF) die deacetylierte Form nicht zu erkennen und somit nicht zu spalten scheint, stimmt nachdenklich. Möglicherweise ist die deacetylierte Form der Polysialinsäure somit auch nicht in der Lage, die an sie gestellten Aufgaben bei der Nervenregeneration wie das Schaffen eines permissiven Mediums durch Regulierung von Zell-Zell-Kontakten zu erfüllen. Hinzu kommt, dass der gewünschte gezielte Abbau der deacetylierten PolySia durch die endoNF nicht möglich zu sein scheint, wodurch die Polysialinsäure nur durch einen unspezifischen Abbau entfernt werden könnte. Dies würde zum einen deutlich länger dauern als der spezifische Abbau, außerdem entfällt der Vorteil des auf einen engen zeitlichen Rahmen begrenzten Abbaus durch externe Gabe von endoNF, da im menschlichen Körper kein die Polysialinsäure abbauendes Enzym existiert. Die genauen Auswirkungen müssen daher in *in-vitro*- und in *in-vivo*-Experimenten genauer untersucht werden. Die Reacetylierung der Polysialinsäure war nach ersten, wenig erfolgreichen Versuchen nicht weiter probiert worden, da es zunächst vor allem um die Immobilisierung möglichst großer Mengen an PolySia ging. Möglicherweise müssen für eine erfolgreiche Reacetylierung von immobilisierter Polysialinsäure andere Vorschriften als die für sich in Lösung befindende PolySia verwendet werden.

Das Ergebnis des ersten *in vivo*-Experiments zeigt ebenso wie die Zellkulturexperimente eine ausgezeichnete Biokompatibilität der mit PolySia-modifizierten Silicone, da in 80 % der untersuchten Tiere eine Nervenregeneration beobachtet werden konnte. Die Auswertung der histomorphometrischen Daten, anhand derer eine bessere Aussage hinsichtlich des Einflusses von mit PolySia-modifizierten Siliconschläuchen auf die Zahl der Axone und das Ausmaß der Nervenregeneration steht noch aus. Problematisch ist hierbei sicherlich, dass nach der Explantation keine Polysialinsäure mehr auf den Siliconschläuchen nachweisbar ist, was ein Hinweis

darauf ist, dass die Anbindung von PolySia über GOPTMS nicht beliebig stabil ist und schon nach drei Wochen im Körper aufgelöst wird. Möglich ist sowohl eine Spaltung der Polysialinsäure-Ketten als auch eine Ablösung des gesamten Komplexes aus Polysialinsäure und GOPTMS genauso wie der hydrolytische Abbau der Silica-ähnlichen Schicht auf der Siliconoberfläche, wobei im letzten Fall alles, was über diese Silica-Schicht an die Oberfläche gebunden ist, verschwindet. Erschwert wird die Anbindung zusätzlich aufgrund der Problematik beim Aktivieren der Siliconoberfläche. Auch wenn es möglich ist diese zu aktivieren und Polysialinsäure dort über einen Linker – z.B. GOPTMS – anzubinden, gelingt dies oftmals nicht homogen und ist nicht immer reproduzierbar. Zusätzlich zu der schwierigen Anbindungschemie auf Siliconen wird ohnehin aus verschiedenen Gründen der Einsatz von Siliconen in der Nervenregeneration zunehmend eingeschränkt, da Siliconschläuche in der Regel impermeabel für Blutgefäße und somit den Nährstofftransport sind und darüber hinaus auch häufig zur Kompression des regenerierten Nervs führen, so dass eine Revisionsoperation mit Entfernung des Siliconschlauchs erforderlich ist. Der Trend geht immer mehr dahin, biodegradierbare und poröse Nervenleitschienen z.B. aus Poly-Lactid mit einer strukturierten inneren Oberfläche, die sich in ihren Abmessungen als optimal für die Orientierung von Schwann-Zellen und Neuriten herausgestellt hat, zu verwenden [74]. Laut BELLAMKONDA besteht das ideale Substrat aus der Anordnung von zweidimensionalen Oberflächen in einem dreidimensionalen Raum, also z.B. der Einbettung von dünnen Fasern oder Filmen in ein Agarose-Gel, um die neu aussprossenden Axone in die richtige Richtung zu leiten, sie aber auf dem Weg dorthin möglichst wenig zu behindern [150].

5.3 Anbindung von Polysialinsäure auf Sipernat®

Um PolySia auf Sipernat® zu immobilisieren wurde ausschließlich der von BREMER verwendete Syntheseweg über APTES und Bernsteinsäureanhydrid verwendet [142]. Ausgehend von den Standardbedingungen des ersten Reaktionsschritts (125 µL APTES, Reaktionsdauer 2 Stunden) wurden sowohl die verwendete APTES-Menge als auch die Zeit variiert. Außerdem wurden ebenfalls Versuche durchgeführt, in denen jeweils ein Reaktionsschritt weggelassen wurde, um einen tieferen Einblick in die Reaktion zu gewinnen.

Zunächst wurden auf den mit APTES funktionalisierten Partikeln die SEARS-Zahlen bestimmt, um zu erkennen, inwiefern diese von unterschiedlichen Mengen an APTES beeinflusst werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 25 zusammengefasst.

Tab. 25: SEARS-Zahlen und Verbrauch von HCl für APTES-modifizierte Sipernat®-Partikel.

V (APTES) / µL	SEARS-Zahl / mL	Verbrauch HCl / mL	pH-Wert zu Beginn der Titration
-	10.6	1.69	6.00
16.7	9.5	10.27	6.02
83.3	9.5	14.52	6.43
141.7	10.2	19.86	6.45
250	9.0	21.93	6.52

Es lässt sich die geringe Tendenz erkennen, dass eine Modifizierung mit APTES zu einer Erhöhung der Hydrophobizität führt, da die SEARS-Zahlen mit zunehmenden APTES-Mengen geringer werden. Während der experimentellen Durchführung zeigte sich, dass der Verbrauch an Salzsäure für die Einstellung des pH-Wertes von 6 mit steigender Menge an APTES stark anstieg (Tab. 25). Dieses lässt sich sehr gut mit einer größeren Anzahl von basisch reagierenden Aminogruppen und somit einer vermehrten Anbindung von APTES an die Silica-Partikel in Zusammenhang bringen. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die für die Einstellung des pH-Wertes benötigte Zeit immer mehr zunahm. Während der Titration von pH 6 nach pH 9 mit Natronlauge trat das Problem auf, dass der pH-Wert zu Beginn bei allen APTES-funktionalisierten Silica-Proben bei Einhaltung des Messprotokolls schon auf Werte über pH 6 angestiegen war, so dass der gemessene Verbrauch geringer war als er sein müsste. Dabei nahm der pH-Wert, wie in Tab. 25 gezeigt, mit größeren Mengen an APTES zu. Dies könnte möglicherweise darin begründet liegen, dass sich bei Verwendung größerer Mengen an APTES Multilayer ausbilden, so dass einige Silanolgruppen schwer zugänglich sind und der ansonsten

sehr schnelle Protonenübertrag etwas langsamer abläuft. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass auch das APTES nach Hydrolyse der Ethoxygruppen Silanolgruppen aufweist, die ebenfalls deprotoniert werden können. Trotzdem kann davon ausgegangen werden, dass eine Erhöhung der zugesetzten APTES-Menge zu einer vermehrten Anbindung von APTES und somit zu einer Abnahme der freien Silanolgruppen des Sipernats[®] führt.

Um den Erfolg der Anbindung von APTES und BSAH sowie der PolySia zu begutachten, wurden die Partikel mittels IR-Spektroskopie untersucht. Abb. 82 zeigt einen Vergleich zwischen reinem Sipernat[®] und Sipernat[®], das zuvor mit APTES funktionalisiert wurde.

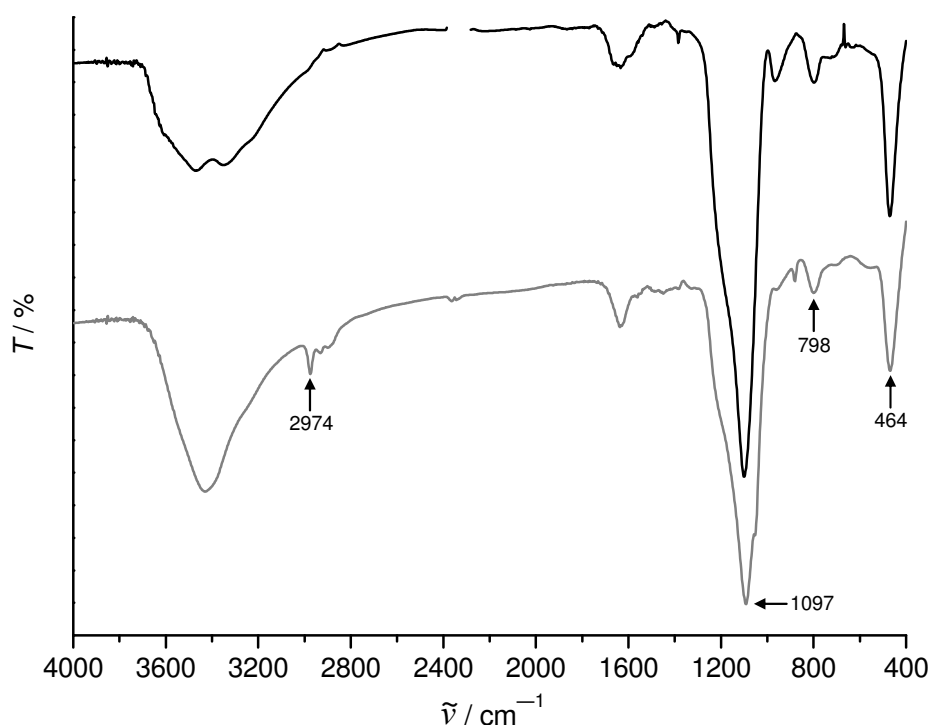


Abb. 82: IR-Spektren von reinem Sipernat[®] (oben) bzw. von mit APTES modifiziertem Sipernat[®] (unten).

In beiden IR-Spektren sind deutlich die vom Silica-Gerüst verursachten Schwingungen zu erkennen. Während die sehr intensive Bande bei 1097 cm^{-1} charakteristisch für die symmetrische (Si-O-Si)-Valenzschwingung ist, sind die Banden bei 798 bzw. 464 cm^{-1} auf (O-Si-O)- bzw. (Si-O)-Deformationsschwingungen zurückzuführen. Auf die Anwesenheit von APTES auf der Partikeloberfläche deuten sowohl die breite Bande der (N-H)-Valenzschwingungen bei 3427 cm^{-1} sowohl die für (C-H)-Valenzschwingungen charakteristischen Banden im Bereich zwischen $2974 - 2881 \text{ cm}^{-1}$ hin. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Anbindung des APTES auf die Sipernat[®]-Partikel erfolgreich war. Eine genaue Auflistung der beobachteten Banden kann Tab. 26 entnommen werden.

Tab. 26: Zuordnung der Banden in IR-Spektren mit APTES-modifiziertem Sipernat® (Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ / cm^{-1}) (APTES auf Sipernat®: ASip) [145].

Sipernat	APTES auf Sipernat	Zuordnung	Quelle
3700 - 3200	3700 - 3200	(O–H)-Valenzschwingung	Wasser
-	3427	(N–H)-Valenzschwingung	ASip
-	2979	(C–H)-Valenzschwingung	ASip
-	2924	(C–H)-Valenzschwingung	ASip
-	2880	(C–H)-Valenzschwingung	ASip
1635	1635	(O–H)-Deformationsschwingung	Wasser
1097	1097	(Si–O–Si)-Valenzschwingung	Silica
964	-	(Si–OH)-Deformationsschwingung	Silica
798	794	(Si–O)-Deformationsschwingung	Silica
464	470	(O–Si–O)-Deformationsschwingung	Silica

Die mit APTES funktionalisierten Partikel wurden anschließend, wie in Abschnitt 4.4 beschrieben, zunächst mit BSAH und dann mit PolySia modifiziert. Die IR-Spektren aller drei Reaktionsschritte sind in Abb. 83 gezeigt.

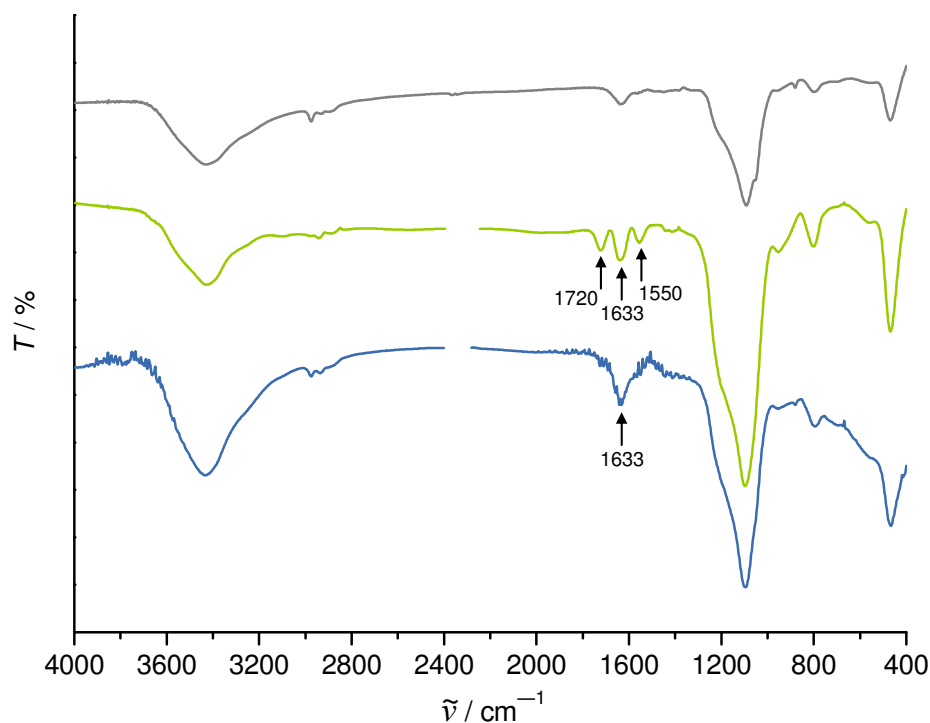


Abb. 83: IR-Spektren von Sipernat® mit APTES (oben), APTES + BSAH (Mitte) und APTES + BSAH + PolySia (+ DCC) (unten).

Die deutlichste Veränderung innerhalb der IR-Spektren ist im Bereich zwischen 1750 und 1500 cm^{-1} zu erkennen, dort finden sich die typischen Banden von Carbonyl-, Carboxyl- und Amidgruppen. Während der Reaktion des APTES mit dem Bernsteinsäureanhydrid wird das Anhydrid durch die Aminofunktion des Silans geöffnet, so dass zum einen eine Amidbindung gebildet und zum anderen eine Carbonsäurefunktion freigesetzt wird. Die beiden nach der BSAH-Zugabe auftretenden Banden bei 1633 cm^{-1} und 1550 cm^{-1} lassen sich der (C=O)-Valenzschwingung bzw. der (N-H)-bending-Schwingung einer Amidbindung zuordnen. Die dritte neu auftretende Bande bei 1720 cm^{-1} wird durch die (C=O)-Valenzschwingung der Carbonsäurefunktion verursacht. Aufgrund der beobachteten Banden kann also von einer erfolgreichen Anbindung des BSAH an die mit APTES funktionalisierten Sipernat[®]-Partikel ausgegangen werden.

Die freie Carbonsäure wurde dann in einem weiteren Reaktionsschritt unter Zuhilfenahme von DCC als Aktivierungsreagenz mit PolySia umgesetzt. Im IR-Spektrum ist nun die Bande der Carbonsäure bei 1720 cm^{-1} nicht mehr erkennbar, was darauf hindeutet, dass diese infolge der Reaktion mit der PolySia im Molekül nicht mehr vorhanden ist, sondern stattdessen eine weitere Amidbindung bildet. Während die typische Amidbande bei 1633 cm^{-1} deutlich zu erkennen ist, kann die zweite Amidbande bei etwa 1550 cm^{-1} nur als schwache Schulter wahrgenommen werden. Daher kann trotz des Fehlens von für die PolySia typischer Banden von einer erfolgreichen Immobilisierung der Polysialinsäure über das Linkersystem APTES/Bernsteinsäureanhydrid ausgegangen werden. Eine vergleichende Übersicht über die beobachteten Banden der IR-Spektren der einzelnen Reaktionsschritte ist in Tab. 27 aufgeführt.

Tab. 27: Zuordnung der in den IR-Spektren von APTES-modifizierten Sipernat[®]-Partikeln nach Umsetzung mit BSAH und PolySia (+ DCC) zu beobachtenden Banden (Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ / cm^{-1}) (APTES auf Sipernat: ASip; BSAH an ASip: BASip; PolySia an BASip: PBASip) [145].

mit APTES	mit APTES + BSAH + BSAH	mit APTES + BSAH + PolySia (+ DCC)	Zuordnung	Quelle
3700 - 3200	3700 - 3140	3700 - 3020	(O–H)-Valenzschwingung	Wasser
3427	3421	3425	(N–H)-Valenzschwingung	ASip
2979	2972	2972	(C–H)-Valenzschwingung	ASip
2924	2933	2929	(C–H)-Valenzschwingung	ASip, BASip, PBASip
2880	2885	2875	(C–H)-Valenzschwingung	ASip, BASip, PBASip
-	1720	-	(C=O)-Valenzschwingung	BASip
1635	1635	1635	(O–H)-Deformationsschwingung	Wasser
-	1633	1631	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	BASip (PBASip)
-	1550	(1550)	(N–H)-Deformationsschwingung (Amid)	BASip (PBASip)
1417	1417	1417	(C–H)-Deformationsschwingung	Asip, BASip, PBASip
1097	1091	1091	(Si–O–Si)-Valenzschwingung	Silica
-	950	-	(Si–OH)-Deformationsschwingung	Silica
794	798	800	(Si–O)-Deformationsschwingung	Silica
470	464	464	(O–Si–O)-Deformationsschwingung	Silica

Um festzustellen, ob Polysialinsäure tatsächlich auf der Oberfläche der Sipernat[®]-Partikel immobilisiert werden konnte, wurde der Thiobarbitursäure-Assay (TBA-Test) durchgeführt. Dieser Test ist spezifisch für Sialinsäuren, so dass mit Hilfe von Kalibrationsmessungen auch eine quantitative Bestimmung der gebundenen PolySia-Menge möglich ist. Ausgehend von den Standardreaktionsbedingungen (125 μL APTES, zwei Stunden) wurde zunächst die Reaktionszeit variiert (Abb. 84).

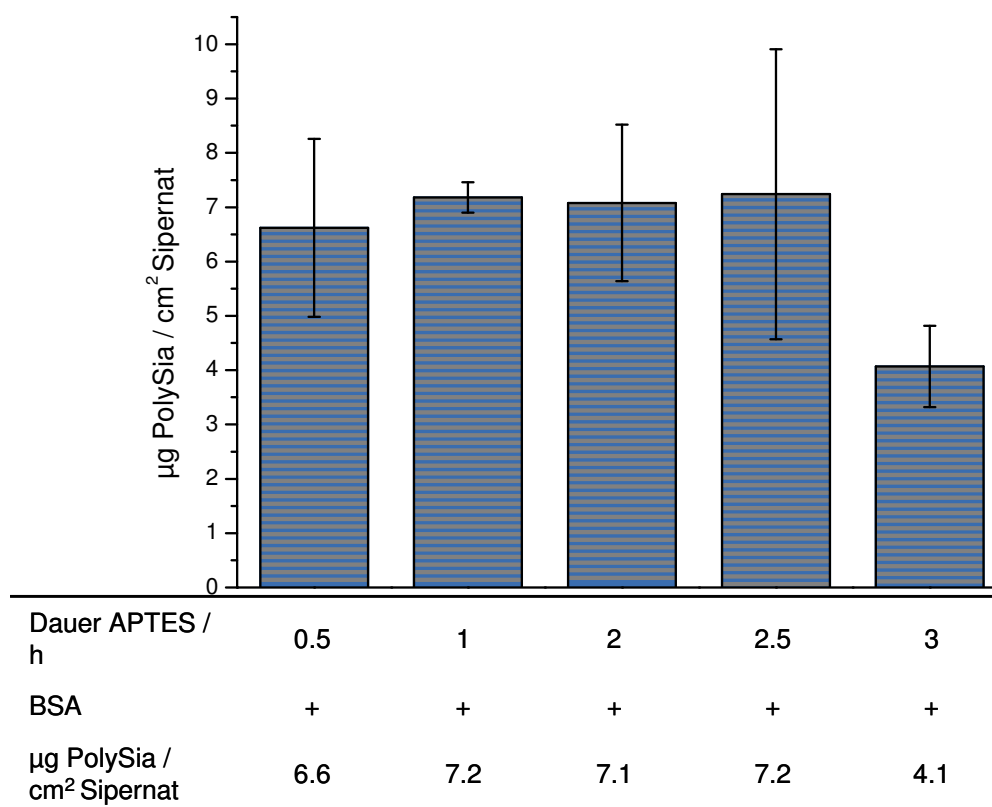


Abb. 84: Ergebnisse des TBA-Tests nach Variierung der Reaktionszeit für die Anbindung des APTES an Sipernat[®] (Reaktionsbedingungen: 125 μL APTES, 75 μL DBU; 2 g BSAH; 0.08 g DCC, 0.1 g PolySia).

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Reaktionszeit im Bereich zwischen 30 Minuten und zweieinhalb Stunden keinerlei Einfluss auf die Menge an immobilisierter PolySia hat, d.h. auch bei einer geringen Reaktionszeit von einer halben Stunden läuft die Anbindung des APTES an die Sipernat[®]-Partikel hinreichend weit ab. Die Menge an PolySia, die mit den hier gewählten Reaktionszeiten angebonden werden kann, beträgt etwa $7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, wenn man für das Sipernat[®] eine Oberfläche von $475 \text{ cm}^2/\text{g}$ annimmt.

Anschließend wurde das Volumen an APTES variiert, um feststellen zu können, ob eine größere Anzahl von Aminogruppen zu einer vermehrten Anbindung von BSAH und im nächsten Reaktionsschritt von PolySia führt. Das Ergebnis des TBA-Tests ist in Abb. 85 gezeigt.

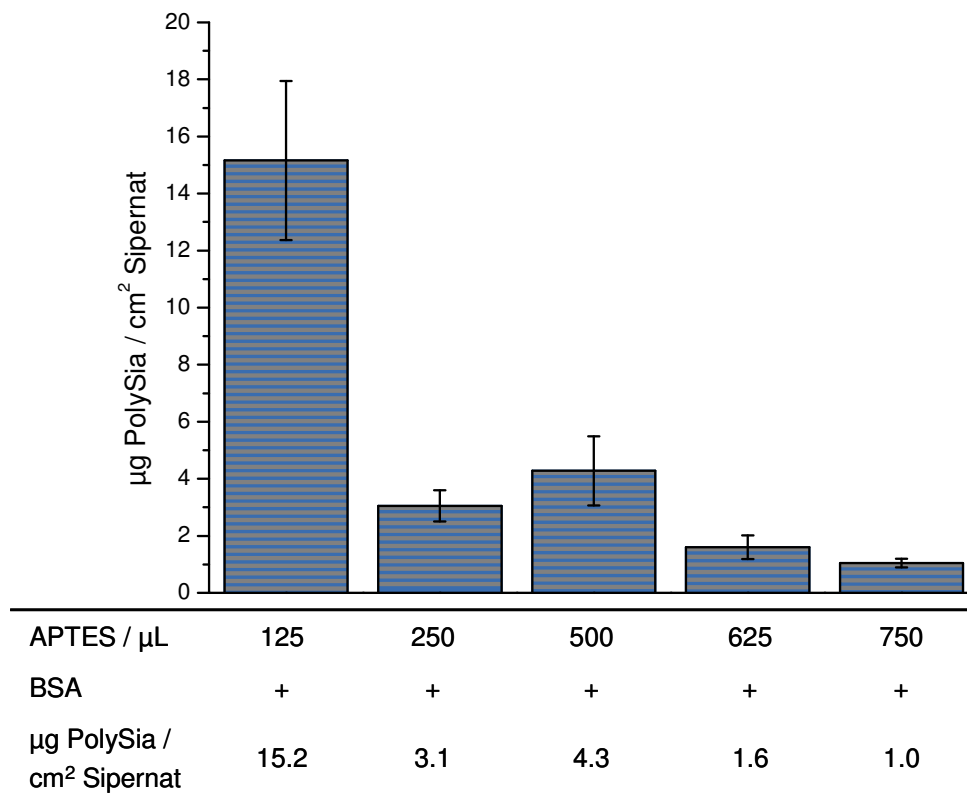


Abb. 85: Ergebnisse des TBA-Tests nach Variierung des eingesetzten Volumens an APTES für die Anbindung auf Sipernat[®]-Partikeln (Reaktionsbedingungen: 75 μL DBU, 2 h; 2 g BSAH; 0.08 g DCC, 0.1 g PolySia).

Aus dieser Abbildung lässt sich eindeutig die Tendenz zu erkennen, dass durch einen vermehrten Einsatz von APTES im ersten Reaktionsschritt die Menge an immobilisierter Poly-sialinsäure deutlich abnimmt. Während bei Zugabe von 125 μL APTES etwa 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ gebunden werden können, ist es bei Verwendung des sechsfachen Volumens an APTES nur noch 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Wird noch weniger APTES als die 125 μL der Standardreaktion der Reaktionslösung zugesetzt, kann das gleiche Ergebnis registriert werden (Abb. 86).

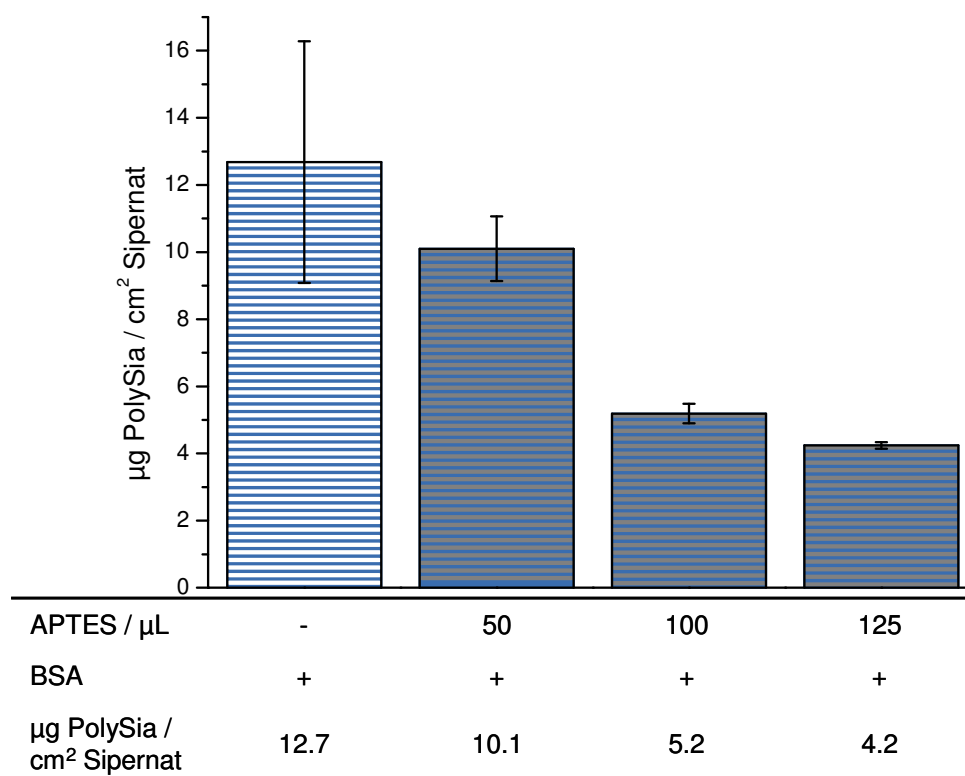


Abb. 86: Ergebnisse des TBA-Tests nach Variierung des eingesetzten Volumens an APTES für die Anbindung auf Sipernat[®]-Partikeln (Reaktionsbedingungen: 75 μL DBU, 2 h; 2 g BSAH; 0.08 g DCC, 0.1 g PolySia).

Erstaunlich ist hierbei, dass die Menge an gebundener PolySia genau dann mit in diesem Fall $12.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ den größten Wert aufweist, wenn überhaupt kein APTES verwendet wird. Ansonsten ist genau die gleiche Tendenz wie in Abb. 85 erkennbar, je geringer die eingesetzte Menge an APTES, umso größer ist die Menge an immobilisierter Polysialinsäure auf den Sipernat[®]-Partikeln. An dieser Stelle muss allerdings angefügt werden, dass die Menge an immobilisierter PolySia in Abb. 86 mit $4.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Sipernat[®] deutlich geringer ist als die $15.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Sipernat[®] aus Abb. 85, obwohl beide Proben unter exakt den gleichen Reaktionsbedingungen (125 μL APTES, 75 μL DBU, 2 h; 2 g BSAH, 0.08 g DCC, 0.1 g PolySia) hergestellt wurden. Eine Ursache hierfür konnte nicht ermittelt werden.

Um genauer zu überprüfen, welchen Einfluss ein jedes Reagens auf die Immobilisierung der Polysialinsäure besitzt, wurden Versuche durchgeführt, in denen jeweils eines der Reagenzien weggelassen wurde. Das Ergebnis ist in Abb. 87 dargestellt.

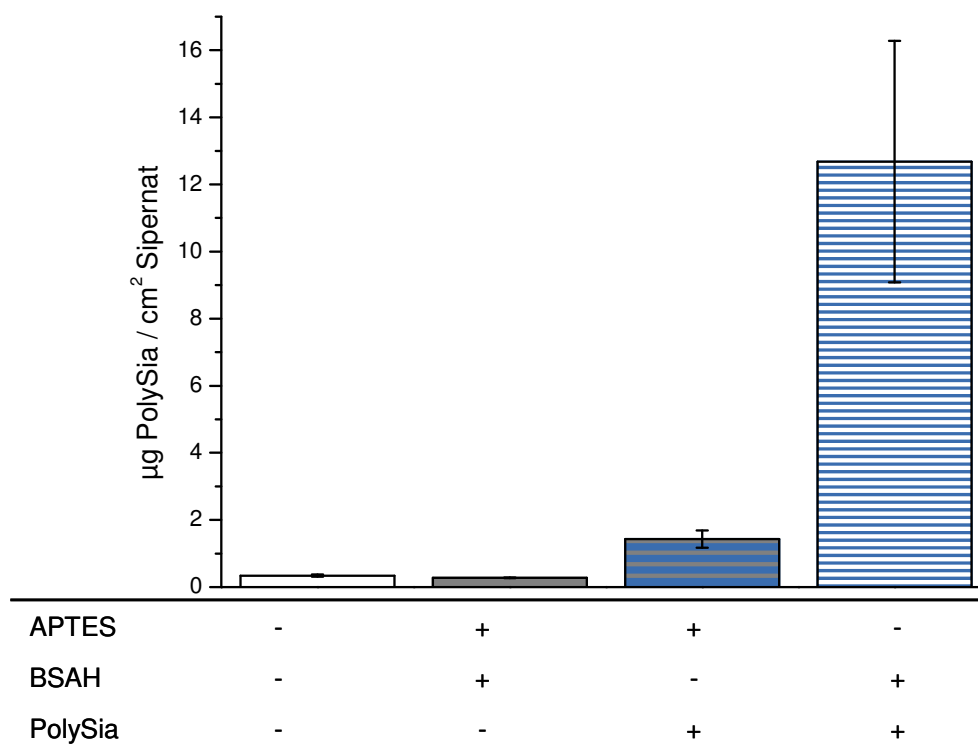


Abb. 87: Ergebnisse des TBA-Tests auf Sipernat[®]-Partikeln nach Weglassen jeweils eine Komponente (Reaktionsbedingungen: 125 µL APTES, 75 µL DBU, 2 h; 2 g BSAH; 0.08 g DCC, 0.1 g PolySia).

Wurde auf Applikation der Polysialinsäure verzichtet, so ist verständlicherweise keine Polysialinsäure nachweisbar. Bei Verzicht auf das Bernsteinsäureanhydrid können immerhin $1.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ angebunden werden, während es nach dem Weglassen von APTES zur Anbindung von $12.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ kommt. Der letzte Wert stimmt sehr gut mit den Ergebnissen aus Abb. 85 und Abb. 86 überein, da dort ebenfalls gezeigt werden konnte, dass die Verwendung kleinerer Mengen an APTES zu einer vermehrten Anbindung von PolySia führt. Dieses deutet daraufhin, dass APTES möglicherweise die Anbindung des Bernsteinsäureanhydrids stört und die Anbindung des BSAH über die Silanolgruppen des Sipernat[®] besser als über die Aminogruppen des APTES funktioniert. Somit erhält man hier genau das gleiche Ergebnis wie bei der Anbindung von Polysialinsäure auf Glasfritten (Abb. 46-48). Eine mögliche Erklärung hierfür ist in dem in Abb. 49 gezeigten Schema gezeigt.

Dass es ohne die Verwendung des BSAH trotzdem zu einer Anbindung von PolySia kommt, lässt sich durch eine geringen Maßstab ablaufende Reaktion zwischen den Aminofunktionen des APTES und den Carboxylatgruppen der PolySia, die durch das DCC aktiviert wurden, erklären. Prinzipiell läuft damit genau die gleiche Reaktion zwischen einer Carboxylatgruppe und einer Aminofunktion ab, als wenn die Carboxylatfunktion des BSAH durch das DCC aktiviert wird und mit der Aminofunktion der PolySia reagiert.

Um die modifizierten Sipernat[®]-Partikel näher zu charakterisieren, wurden thermogravimetrische Messungen durchgeführt. Das Thermogramm des reinen Sipernat[®] ist in Abb. 88 gezeigt.

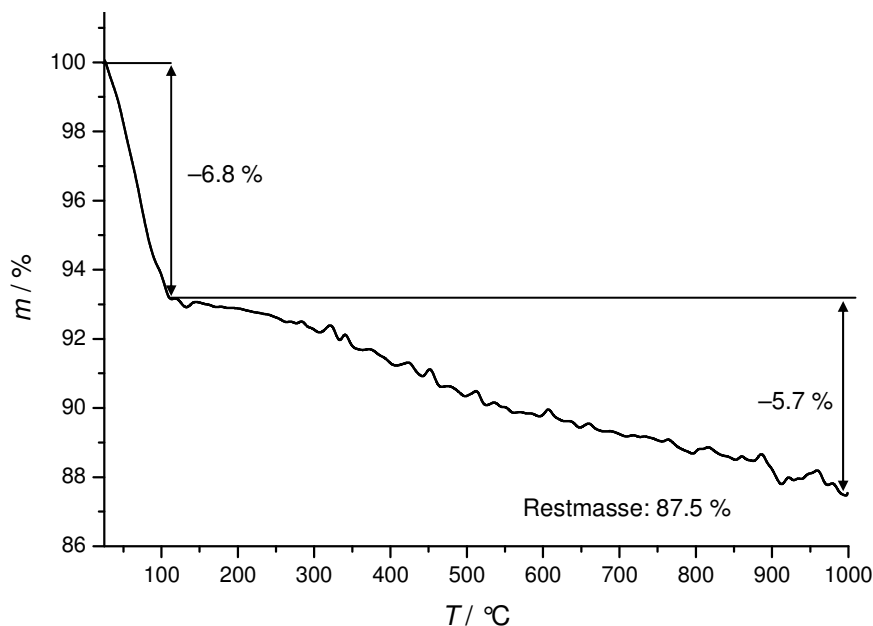


Abb. 88: Ergebnisse der TG von reinem Sipernat[®].

Der Massenverlust von 6.8 % bis 118 °C kann dem Verlust von adsorbiertem Wasser zugeordnet werden, während der restliche Massenverlust von 5.7 % auf eine langsame Dehydroxylierung der Silica-Oberfläche zurückzuführen ist.

Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde zusätzlich ein Thermogramm der reinen Polysialinsäure (deacetyliert) aufgenommen (Abb. 89).

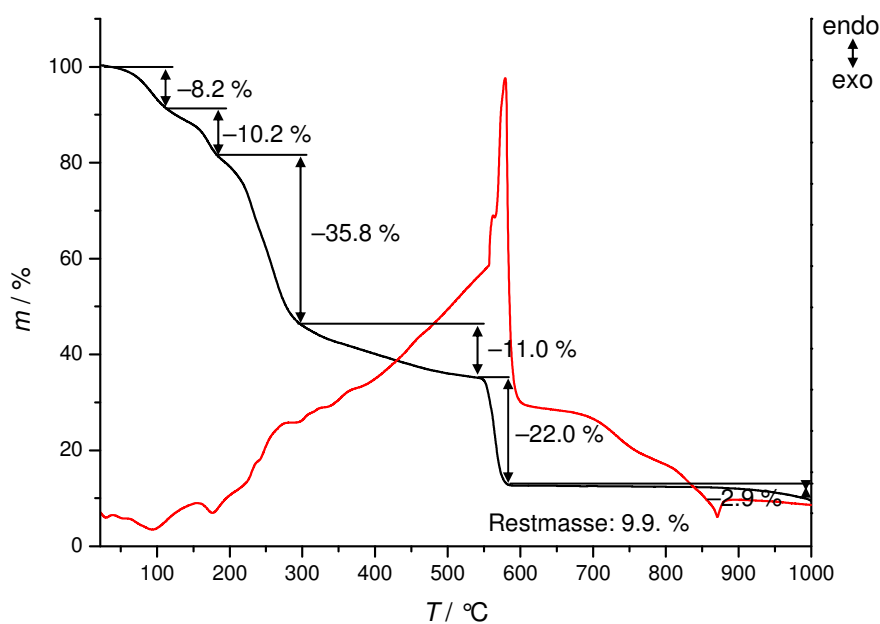


Abb. 89: Ergebnisse der TG von deacetylierter Polysialinsäure.

Der Massenverlust von 8.2 % bis zu einer Temperatur von 108 °C kann dem Verlust von Wasser zugeordnet werden, in den sich daran anschließenden Stufen von 108 bis 182 °C, 182 bis 300 °C sowie 300 bis 547 °C konnten Massenverluste von 10.2 %, 35.8 % bzw. 11.0 % registriert werden, die auf eine schrittweise Verbrennung der organischen Komponenten zurückzuführen sind. Der sich daran anschließende abrupte Massenverlust von 22 % zwischen 547 und 584 °C könnte auf die thermische Zersetzung von gebildetem Natriumcarbonat zurückzuführen sein.

Das Thermogramm einer mit APTES funktionalisierten Probe ist in Abb. 90 zu sehen.

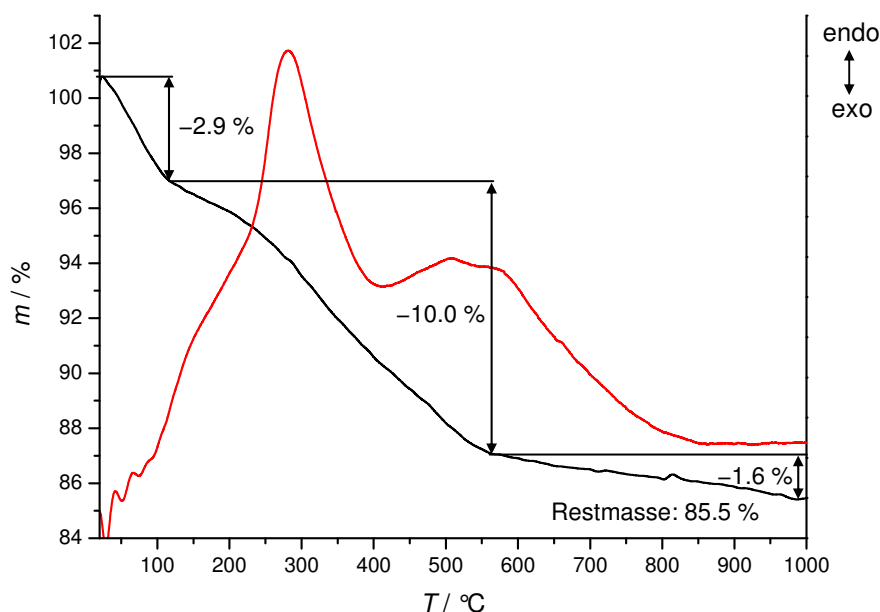


Abb. 90: Ergebnisse der TG einer mit APTES (125 μ L) funktionalisierten Silica-Probe.

Der anfängliche Massenverlust von 2.9 % bis zu einer Temperatur von etwa 113 °C ist auf den Verlust von adsorbiertem Wasser auf den Sipernat[®]-Partikeln zurückzuführen. Die nächste Stufe, die zwischen 113 und etwa 555 °C auftritt, kann durch die Verbrennung der organischen Komponenten des Silans erklärt werden, während der Verlust von weiteren 1.6 % bis 1000 °C vermutlich auf eine Dehydroxylierung der Silica-Oberfläche zurückgeht. Die Thermogramme, die nach den Anbindungsschritten von Bernsteinsäureanhydrid und PolySia erhalten wurden, sind in Abb. 91 und Abb. 92 gezeigt.

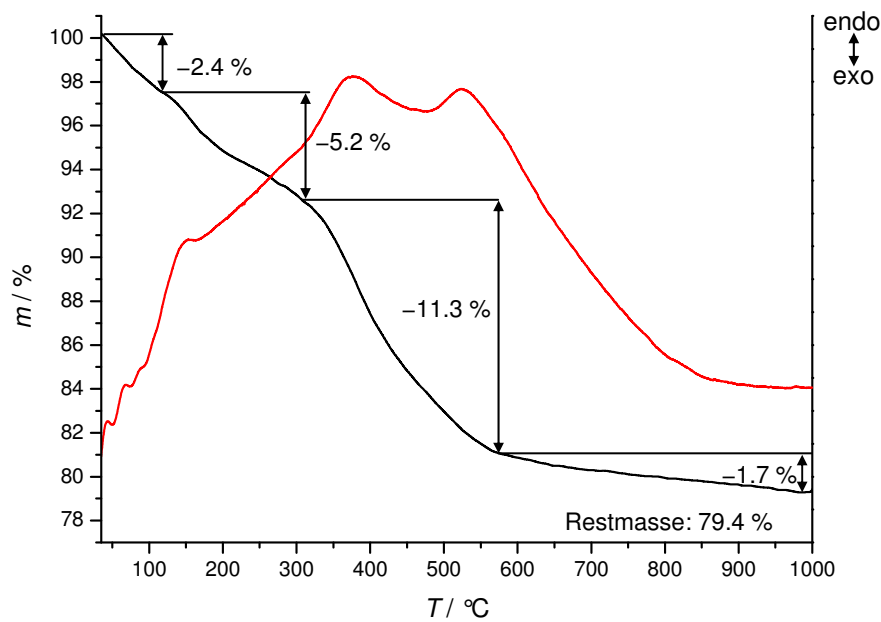


Abb. 91: Ergebnisse der TG einer mit APTES (125 µL) + BSAH (2 g) funktionalisierten Sipernat[®]-Probe.

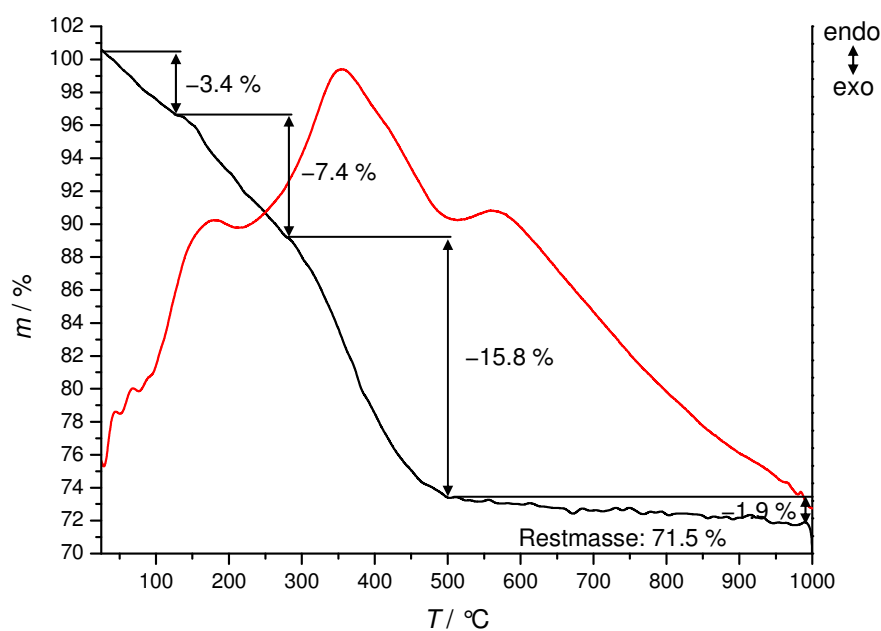


Abb. 92: Ergebnisse der TG einer mit APTES (125 µL) + BSAH (2 g) + PolySia (0.1 g) (sowie 0.08 g DCC) funktionalisierten Sipernat[®]-Probe.

Die zu beobachtenden Massenverluste im ersten Schritt bis 112 bzw. 129 °C von 2.4 bzw. 3.4 % deuten auf den Verlust von adsorbiertem Wasser wie auch von eventuell noch anhaftendem Lösungsmittel hin. Die nächsten Stufen mit einem Massenverlust von 5.2 bzw. 11.3 % finden sich in der mit APTES und BSAH funktionalisierten Probe (Abb. 91) zwischen 112 und 317 °C bzw. zwischen 317 und 570 °C, wohingegen die Probe, in der zusätzlich noch PolySia

gebunden ist (Abb. 92), einen Massenverlust von 7.4 % zwischen 129 und 278 °C sowie einen weiteren von 15.8 % zwischen 278 und 500 °C aufweist. Dieser Massenverlust kann in allen Fällen der Verbrennung der organischen Komponenten zugeordnet werden. Der Dehydroxylierungsschritt auf der Silica-Oberfläche verursacht einen Massenverlust von 1.7 bzw. 1.9 %.

Ein direkter Zusammenhang zwischen der angebondenen PolySia-Menge und dem zu beobachtenden Massenverlust gerade im Bereich zwischen 550 und 580 °C, in dem die reine PolySia einen signifikanten Massenverlust erleidet, kann aus den aufgenommenen Thermogrammen nicht festgestellt werden, da dort keine signifikante Stufe in dem entsprechenden Temperaturbereich erkennbar ist. Daher ist anzunehmen, dass die Menge der angebondenen PolySia zu gering ist, um diesen Massenverlust zu verursachen. Auffällig aber ist, dass der erste Funktionalisierungsschritt mit APTES eine entscheidende Bedeutung für die weiteren Anbindungen zu besitzen scheint. Die in Abb. 93 gezeigten Thermogravimetrie-Kurven für den Anbindungsschritt des APTES ähneln sich vom Verlauf, unterscheiden sich aber deutlich im Massenverlust in der ersten Stufe bis etwa 165 °C sowie in Bezug auf die Restmasse.

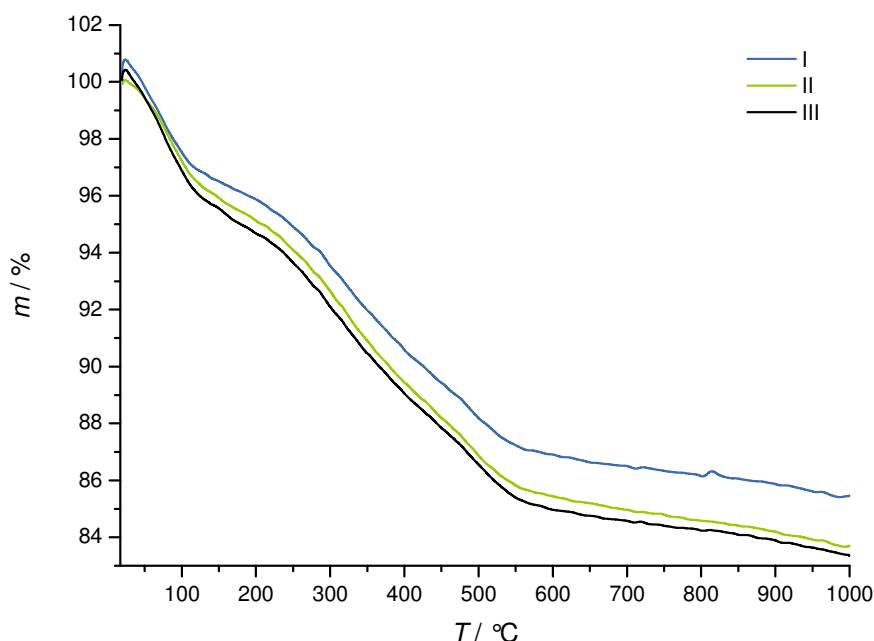


Abb. 93: Verlauf der TG-Kurven von Sipernat[®]-Proben nach der Funktionalisierung mit APTES. Alle Proben wurden mit 125 µL APTES unter identischen Reaktionsbedingungen (75 µL DBU, 2 h) hergestellt.

In Kombination der Betrachtung von Abb. 93 und Tab. 28 ist auffällig, dass mit steigender Restmasse auch die über den TBA-Test nachgewiesenen PolySia-Mengen auf den Sipernat[®]-Partikeln größer waren. Während beispielsweise für Probe I 12.3 µg PolySia/cm² über den TBA-Test bei einer Restmasse von 85.5 % nach dem ersten Reaktionsschritt zu detektieren

waren, konnten bei der unter identischen Bedingungen hergestellten Probe III nur 1.8 $\mu\text{g PolySia}/\text{cm}^2$ und eine Restmasse von 83.4 % nachgewiesen werden. Im Vergleich der mit APTES hergestellten Proben fällt auf, dass sich der Massenverlust in allen drei Stufen deutlich unterscheidet. Eine Abstufung, die den Ergebnissen des TBA-Tests entspricht, findet sich im Massenverlust der ersten (20-113 °C) und zweiten Stufe (113-377 °C) wieder. Probe I, die im TBA-Test die größte Menge an PolySia aufwies, hat in allen Stufen den kleinsten Massenverlust der drei miteinander verglichenen Proben. Unter der Voraussetzung, dass ein höherer Massenverlust eine größere Menge an angebindenem APTES repräsentiert, korreliert dieses Ergebnis exzellent mit den in Abb. 85 und Abb. 86 gezeigten Resultaten, wo die Verwendung von größeren Mengen an APTES ebenfalls zu weniger gebundener PolySia führte. Merkwürdig ist nur, dass die Unterschiede zwischen den einzelnen Proben so enorm groß sind, da sowohl die gleichen Mengen an APTES für die Funktionalisierung eingesetzt als auch alle Proben zumindest während der Synthese einer exakt gleichen Behandlung unterzogen wurden. Ein Grund für die zu beobachtenden Unterschiede könnte daher in einem unterschiedlichen Gehalt an adsorbiertem Wasser und Lösungsmittel liegen, der durch unterschiedlich lange Trocknungszeiten zustande kommt und sich insbesondere im Massenverlust der ersten Stufe bemerkbar macht. Diese Lösungsmittel- oder Wasserrückstände könnten dann im nächsten Schritt die Anbindung des Bernsteinsäureanhydrids stören, indem dieses nicht durch das APTES, sondern schon durch Wasser geöffnet wird und somit für den Anbindungsschritt der PolySia nicht mehr zur Verfügung steht.

Tab. 28: Ergebnisse der TG für den ersten Reaktionsschritt mit APTES (125 μL). Vergleich der Massenverluste (MV) für die zu beobachtenden Stufen (1. Stufe: 20-113 °C, 2. Stufe: 113-377 °C, 3. Stufe: 377-555 °C, 4. Stufe: 555-1000 °C) mit über den TBA-Test nachgewiesenen Mengen an PolySia.

Nr.	MV 1. Stufe / %	MV 2. Stufe / %	MV 3. Stufe / %	MV 4. Stufe / %	Restmasse / %	$\mu\text{g PolySia}$ / cm^2
I	2.9	6.0	4.0	1.6	85.5	12.3
II	3.6	6.3	4.4	2.0	83.7	8.0
III	3.8	6.6	4.3	1.8	83.5	1.8

Abschließend lässt sich feststellen, dass eine Anbindung von Polysialinsäure über das Linkersystem APTES/Bernsteinsäureanhydrid an Sipernat[®]-Partikel mit bis zu 12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ möglich ist. Dabei ist der Nachweis der PolySia über die thermogravimetrische Messungen gar nicht und mit Hilfe der IR-Spektroskopie allenfalls indirekt möglich. Durch Anwendung des TBA-Tests ließen sich die Proben besser charakterisieren. Dabei konnte beobachtet werden,

Tests ließen sich die Proben besser charakterisieren. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Menge an angebundenem Silan im ersten Reaktionsschritt den entscheidenden Faktor für die Anbindung der Polysialinsäure darstellt. Je geringer die verwendeten Mengen an APTES waren, desto größer war die Menge an immobilisierter PolySia. Als problematisch sind die Schwankungen in den Messergebnissen zu beurteilen, insbesondere wenn exakt gleiche Reaktionsbedingungen gewählt wurden. Eine mögliche Ursache wäre die Beeinflussung der Eigenschaften von Sipernat[®] gegenüber der Luftfeuchtigkeit, die MÜNNEKHOFF in seiner Diplomarbeit untersucht hat [151]. Ein weiterer Grund für das Schwanken der Messwerte könnte im letzten Anbindungsschritt – der Anbindung der Polysialinsäure – liegen, da dort DCM als Lösungsmittel verwendet wird, in welchem die PolySia nahezu unlöslich ist. Allerdings sollte es durch eine Modifizierung der PolySia-Seitenketten z.B. durch Tertiärbutylammoniumgruppen möglich sein, PolySia-Derivate herzustellen, die auch in organischen Lösungsmitteln eine ausreichende Löslichkeit besitzen, was in dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen unterbleiben musste.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit ist es gewesen, die für die Neurogenese und Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten eminent wichtige Polysialinsäure an festen Trägermaterialien zu immobilisieren, um diese Materialien als künstliche Nervenleitschienen in der Überbrückung von Nervendefekten nach Läsionen im peripheren Nervensystem einzusetzen. Als Trägermaterialien wurden in dieser Arbeit sowohl Glassubstrate als auch Siliconschläuche und -Platten sowie Sipernat[®]-Partikel verwendet. Die Anbindung fand dabei über zwei verschiedene Anbindungssysteme statt: zum einen wurde 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan (GOPTMS) verwendet, um die PolySia anzubinden, zum anderen 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES), das nach Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid (BSAH) in der Lage war, die Polysialinsäure zu immobilisieren.

Die Immobilisierung von Polysialinsäure über GOPTMS war sowohl auf Glasoberflächen als auch auf den Siliconen erfolgreich. Während ein Nachweis von PolySia auf den Glasmaterialien schon durch die Messungen des Kontaktwinkels möglich war, da dieser in Anwesenheit der Polysialinsäure im Vergleich zu dem einer reinen Silanoberfläche deutlich erniedrigt war, musste insbesondere im Fall der Silicone auf den für Sialinsäuren spezifischen Thiobarbitursäure-Test (TBA-Test) zurück gegriffen werden. Mit Hilfe des TBA-Tests konnte gezeigt werden, dass eine Anbindung der Polysialinsäure sowohl auf Glas als auch auf den Siliconen möglich ist. Für die Immobilisierung war insbesondere die Konzentration der verwendeten Polysialinsäure von großer Bedeutung, da bei einer höheren Konzentration mehr PolySia angebunden werden konnte. Des Weiteren wurde festgestellt, dass eine Anbindung auch durch direkte Adsorption der PolySia möglich ist, allerdings ist die so erhaltene Menge an immobilisierter PolySia geringer als unter Verwendung des GOPTMS. Sowohl über den TBA-Test als auch unter Verwendung des PolySia-spezifischen Antikörpers konnten Hinweise dafür erhalten werden, dass eine kovalente Anbindung der Polysialinsäure an das GOPTMS vorliegt. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ein höherer pH-Wert die Anbindung der PolySia fördert. Im Gegensatz dazu wurde festgestellt, dass die Menge an immobilisierter Polysialinsäure unabhängig von der verwendeten GOPTMS-Konzentration war.

Für die Anbindung von Polysialinsäure über APTES und Bernsteinsäureanhydrid hingegen wurde eine deutliche Abhängigkeit von der gewählten Silan-Konzentration festgestellt, da mit steigender Konzentration des APTES sowohl auf den Sipernat[®]-Partikeln wie auch auf den Glasmaterialien eine Erniedrigung der Menge an immobilisierter PolySia zu verzeichnen war. Die Immobilisierung von Polysialinsäure über das Bernsteinsäureanhydrid alleine war ebenfalls erfolgreich, auf dem Sipernat[®] konnte so sogar mehr PolySia als unter Verwendung des APTES und der BSAH gebunden werden. Welchen Einfluss die verwendete Menge an

Bernsteinsäureanhydrid auf die Immobilisierung der Polysialinsäure ausübt, konnte nicht geklärt werden, da keine eindeutige Tendenz zu erkennen war.

In Bezug auf die verschiedenen Methoden zu Aktivierung der Silicon-Oberflächen konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung sowohl mit einem Stickstoff-Plasma wie auch unter Verwendung von Ozon möglich ist, da in beiden Fällen Polysialinsäure an die aktivierten Silicone angebonden werden konnte. Als problematisch erwies sich hier allerdings, dass die Ozon-Behandlung wohl nur zu einer inhomogenen Aktivierung und somit zu einer ungleichmäßig reaktiven Siliconoberfläche geführt hat, so dass größere Schwankungen in Bezug auf die angebundene PolySia-Menge auftraten. In Folge dessen musste registriert werden, dass die Dauer der Ozon-Behandlung in allen Fällen keinen Einfluss auf die Anbindung der Polysialinsäure zu haben scheint, was allerdings nicht mit der Tatsache übereinstimmt, dass eine Zunahme der reaktiven Gruppen auf der Siliconoberfläche mit zunehmender Ozonisierungsdauer zu verzeichnen war. Welche Parameter die Menge an immobilisierter Polysialinsäure neben dem verwendeten Sauerstoffstrom oder der Ozonisor-Leistung tatsächlich maßgeblich beeinflussen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht herausgefunden werden, so dass die Notwendigkeit besteht, diese unter Konstanthaltung aller anderen Parameter erneut gründlich zu überprüfen. Vor allem die auftretenden Schwankungen hinsichtlich der Menge an immobilisierter PolySia innerhalb von exakt gleich behandelten Proben und somit einer nicht immer gegebene Reproduzierbarkeit bedürfen einer genaueren Untersuchung. Im Falle der Anbindung über das Linkersystem APTES/BSAH sollte hier insbesondere der letzte Reaktionsschritt, bei der feste Polysialinsäure in einem organischen Lösungsmittel suspendiert wird, derartig modifiziert werden, dass ein in solchen Lösungsmitteln lösliches Derivat der PolySia verwendet wird.

Mit Hilfe von Zellviabilitäts- und Zelladhäsionsexperimenten konnte eine von den mit PolySia-modifizierten Materialien ausgehende zelltoxische Wirkung auf verschiedene Zell-Linien (immortalisierte Schwann-Zellen, Hep-G2- und PC-12-Zellen) ausgeschlossen werden, die Viabilität der Zellen war auf den modifizierten Glas- und Siliconoberflächen in allen Fällen mindestens ebenso gut wie auf unbehandelten Referenzmaterialien. Aufgrund der hier gezeigten Biokompatibilität der mit Polysialinsäure modifizierten Materialien ist eine Verwendung als Implantatmaterial für eine verbesserte Nervenregeneration durchaus denkbar. Aufgrund der Ergebnisse der ersten *in vivo*-Anwendung von mit Polysialinsäure modifizierten Siliconschläuchen in der Ratte, bei denen in 80 % der Tiere eine Nervenregeneration beobachtet werden konnte, lässt sich eine toxische Wirkung ausschließen. Allerdings zeigte sich hier, dass die Beschichtung der Siliconschläuche mit GOPTMS und Polysialinsäure nicht über einen Zeitraum von drei Wochen im Körper stabil ist, sondern wahrscheinlich abgelöst wird, da nur noch ge-

ringe Mengen an PolySia nachweisbar waren. Da neben der komplizierten Oberflächenchemie der Silicone auch die häufige Notwendigkeit der Explantation von Nervenleitschienen aus Silicon besteht, wird die Entwicklung eher in Richtung von biodegradierbaren Nervenleitschienen aus beispielsweise Poly-Lactid, Polyphosphazenen oder aus Polysialinsäure bestehenden Gerüsten gehen.

Problematisch hinsichtlich einer weiteren Verwendung von immobilisierter Polysialinsäure könnte sich in diesem Zusammenhang die Tatsache erweisen, dass sowohl der PolySia-spezifische Antikörper wie auch das für den Abbau von PolySia spezifische Enzym Endosialidase (endoNF) die für die Anbindung verwendete deacetylierte Polysialinsäure nicht oder nur teilweise zu erkennen scheint, wie im ELISA-Test und dem versuchten Abbau der Polysialinsäure mit der endoNF zu sehen war. Dieses spricht für die Wichtigkeit der *N*-Acetylgruppe für die Wirkung der Polysialinsäure und könnte somit fatale Folgen für die Anwendung als Material für die Nervenregeneration haben, wenn die PolySia möglicherweise von den Zellen nicht mehr als solche erkannt oder ihre Aufgabe zur Schaffung eines permissiven Mediums für eine verbesserte Nervenregeneration nicht wahrnehmen kann. Daher besteht in der Zukunft definitiv die Notwendigkeit, hier weitere Untersuchungen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* vorzunehmen und parallel dazu die in dieser Arbeit nur vereinzelt durchgeführte Reacetylierung der immobilisierten Polysialinsäure zu verbessern, um die *N*-Acetylgruppe wieder einzuführen.

7 Literaturverzeichnis

- [1] A. Burkart, A.B. Imhoff, E. Roscher, *Arthroscopy* **16** (2000) 91.
- [2] J.S. Belkas, M.S. Shoichet, R. Midha, *Neurol. Res.* **26** (2004) 151.
- [3] H. Lippert, *Lehrbuch Anatomie*, 7. Auflage, Elsevier, München/Jena 2006.
- [4] P. Kugler, *Zelle Organ Mensch*, 1. Auflage, Elsevier, München/Jena 2006.
- [5] <http://www.sinnesphysiologie.de/gruv03/rmark/index.htm> (Stand: 11.02.2009).
- [6] <http://www.razzysmom.blogspot.com/2008/11/compendium-review-chapters-13-14.html> (Stand: 13.2.2009).
- [7] A. Huber, Dissertation, Medizinische Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, 2002.
- [8] <http://www.handerkrankungen.de/de/nervenverletzung/index.htm> (Stand: 11.02.2009).
- [9] http://www.neurochirurgie-tuebingen.de/website/index.php?article_id=20&clang=0 (Stand: 11.02.2009).
- [10] H. Fansa, G. Keilhof, G. Wolf, W. Schneider, *Magdeburger Wissenschaftsjournal* **2** (2002) 25.
- [11] A. Waller, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **140** (1850) 423.
- [12] A.T. Dailey, A.M. Avellino, L. Benthem, J. Silver, M. Kliot, *J. Neurosci.* **18** (1998) 6713.
- [13] G. Stoll, J.W. Griffin, C.Y. Li, B.D. Trapp, *J. Neurocytol.* **18** (1989) 671.
- [14] V. Chaundhry, J.D. Glass, J.W. Griffin, *Neurol. Clin.* **10** (1992) 613.
- [15] S.Y. Fu, T. Gordon, *Mol. Neurobiol.* **14** (1997) 67.
- [16] C.E. Schmidt, J. Baier Leach, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **5** (2003) 293.
- [17] G.N. Li, D. Hoffman-Kim, *Tissue Eng.* **14** (2008) 33.
- [18] B. Grimpe, J. Silver, *Prog. Brain Res.* **137** (2002) 333.
- [19] V. Sahni, Y. Qi, S. Frostick, *Eur. Surg.* **37** (2005) 187.
- [20] O.V. Büngner, *Beitr. Pathol. Anal.* **10** (1891) 321.
- [21] J.W. Fawcett, R.J. Keynes, *Annu. Rev. Neurosci.* **13** (1990) 43.
- [22] G. Lundborg, L. Dahlin, N. Danielsen, Q. Zhao, *J. Reconstr. Microsurg.* **10** (1994) 345.
- [23] J. Wu, D.T. Chiu, *Ann. Plast. Surg.* **43** (1999) 661.
- [24] S.E. MacKinnon, Y. Nakao, *J. Orthop. Sci.* **2** (1997) 357.
- [25] J. Lohmeyer, S. Zimmermann, B. Sommer, H.-G. Machens, T. Lange, P. Mailänder, *Chirurg* **78** (2007) 142.

- [26] G. Lundborg, *J. Hand Surg.* **25A** (2000) 391.
- [27] Y. Miyamoto, *Plast. Reconstr. Surg.* **64** (1979) 540.
- [28] H. Millesi, *Surg. Clin. North Am.* **61** (1981) 321.
- [29] M. Sparmann, *Orthopäde* **27** (1998) 433.
- [30] G.D. Evans, *Anat. Rec.* **263** (2001) 396.
- [31] http://www.handerkrankungen.de/nervenverletzung/nerv_sekundaer-wiederherstellung.htm (Stand : 11.02.2009).
- [32] P.J. Evans, R. Midha, S.E. MacKinnon, *Prog. Neurobiol.* **43** (1994) 187.
- [33] A.D. Ansselin, T. Fink, D.F. Davey, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **23** (1997) 387.
- [34] T. Glück, *Arch. Klein. Chir.* (1880) 606.
- [35] T.E. Trumble, F.G. Shon, *Hand Clin.* **16** (2000) 105.
- [36] C. Vanlair, *Arch. Biol. Paris* **3** (1882) 379.
- [37] T.B. Ducker, G.J. Hayes, *J. Neurosurg.* **28** (1968) 582.
- [38] R. Midha, C.A. Munro, P.D. Dalton, C.H. Tator, M.S. Shoichet, *J. Neurosurg.* **99** (2003) 555.
- [39] Y.-C. Huang, Y.-Y. Huang, *Artif. Organs* **30** (2006) 514.
- [40] K.N. Malizos, Z.H. Dailiana, E.A. Anastasiou, I. Sarmas, P.N. Soucacos, *Am J. Orthop.* **26** (1997) 481.
- [41] J.-B. Tang, *J. Reconstruct. Surg.* **11** (1995) 21.
- [42] M.A. Glasby, S.E. Gschmeisser, C.L. Huang, B.A. de Souza, *J. Hand Surg. (Br.)* **11** (1986) 347.
- [43] J. Brandt, L.B. Dahlin, G. Lundborg, *J. Hand Surg. (Br.)* **24B** (1999) 284.
- [44] S.J. Archibald, J. Shefner, C. Krarup, R.D. Madison, *J. Neurosci.* **15** (1995) 4109.
- [45] Y.-S. Chen, C.-L. Hsieh, C.-C. Tsai, T.-H. Chen, W.-C. Cheng, C.-L. Hu, C.-H. Yao, *Biomaterials* **21** (2000) 1541.
- [46] I.H. Whitworth, R.A. Brown, C. Dore, C.J. Green, G. Terenghi, *J. Hand Surg. (Br.)* **20** (1995) 429.
- [47] S. Yoshii, M. Oka, M. Shima, A. Taniguchi, M. Akagi, *Brain Res.* **949** (2002) 202.
- [48] C.A. Heath, G.E. Rutkowski, *Trends Biotechnol.* **16** (1998) 163.
- [49] L.A. Pfister, M. Papaloizos, H.P. Merkle, B. Gander, *J. Peripher. Nerv. Sys.* **12** (2007) 65.

- [50] G. Lundborg, L.B. Dahlin, N. Danielsen, R.H. Gelberman, F.M. Longo, H.C. Powell, S. Varon, *Exp. Neurol.* **76** (1982) 361.
- [51] L.B. Dahlin, G. Lundborg, *Neurosurg. Clin. North Am.* **12** (2001) 341.
- [52] P.C. Francel, T.J. Francel, S.E. MacKinnon, C. Hertl, *J. Neurosurg.* **87** (1992) 887.
- [53] M. Merle, A.L. Dellon, J.N. Campbell, P.S. Chang, *Microsurg.* **10** (1989) 130.
- [54] J. Braga-Silva, *J. Hand Surg. (Br.)* **24B** (1999) 703.
- [55] G. Lundborg, B. Rosen, L. Dahlin, J. Holmberg, I. Rosen, *J. Hand Surg. (Br.)* **29** (2004) 100.
- [56] L.B. Dahlin, L. Anagnostaki, G. Lundborg, *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* **35** (2001) 29.
- [57] S. Stanec, Z. Stanec, *Br. J. Plast. Surg.* **51** (1998) 637.
- [58] F.J. Rodriguez, N. Gomez, G. Perego, X. Navarro, *Biomaterials* **20** (1999) 1489.
- [59] S.E. MacKinnon, A.L. Dellon, *Plast. Reconstr. Surg.* **85** (1990) 419.
- [60] A.L. Dellon, S.E. MacKinnon, *Plast. Reconstr. Surg.* **82** (1988) 849.
- [61] H. Molander, O. Engkvist, J. Hägglund, Y. Olsson, E. Torebjörk, *Biomaterials* **4** (1993) 276.
- [62] G. Soldani, G. Varelli, A. Minnocci, P. Dario, *Biomaterials* **19** (1998) 1919.
- [63] N. Nicoli Aldini, M. Fini, M. Rocca, G. Giavaresi, R. Giardino, *Int. Orthop.* **24** (2000) 121.
- [64] A. Valero-Cabré, K. Tsironis, E. Skouras, G. Perego, X. Navarro, W.F. Neiss, *J. Neurosci. Res.* **63** (2001) 214.
- [65] X. Navarro, F.J. Rodriguez, R.O. Labrador, M. Buti, D. Ceballos, N. Gomez, J. Cuadras, G. Perego, *J. Peripher. Nerv. Sys.* **1** (1996) 53.
- [66] R.C. Young, M. Wiberg, G. Terenghi, *Br. J. Plast. Surg.* **55** (2002) 235.
- [67] Y.-Z. Bian, Y. Wang, G. Aibaidoula, G.-Q. Chen, Q. Wu, *Biomaterials* **30** (2009) 217.
- [68] P.D. Dalton, L. Flynn, M.S. Shoichet, *Biomaterials* **23** (2002) 3843.
- [69] R.O. Labrador, M. Buti, X. Navarro, *Exp. Neurol.* **149** (1998) 243.
- [70] E. Verdu, R.O. Labrador, F.J. Rodriguez, D. Ceballos, J. Fores, X. Navarro, *Restor. Neuro. Neurosci.* **20** (2002) 169.
- [71] M.C. Dodla, R.V. Bellamkonda, *Biomaterials* **29** (2008) 33.
- [72] K. Torigoe, H.-F. Tanaka, A. Takahashi, A. Awaya, K. Hashimoto, *Exp. Neurol.* **137** (1996) 301.

- [73] G.E. Rutkowski, C.A. Miller, S. Jeftinija, S.K. Mallapragada, *J. Neural. Eng.* **1** (2004) 151.
- [74] C.A. Miller, G. Rutkowski, H. Shanks, A. Witt, S.K. Mallapragada, *Biomaterials* **22** (2001) 1263.
- [75] A. Bozkurt, R. Deumens, C. Beckmann, L.O. Damink, F. Schügner, I. Heschel, B. Sellhaus, J. Weis, W. Jahnen-Dechent, G.A. Brook, N. Pallua, *Biomaterials* **30** (2009) 169.
- [76] K. Haastert, C. Grothe, *Curr. Gene Ther.* **7** (2007) 221.
- [77] K. Haastert, E. Lipokatic, M. Fischer, M. Timmer, C. Grothe, *Neurobiol. Dis.* **21** (2006) 138.
- [78] M. Timmer, S. Robben, F. Müller-Ostermeyer, G. Nikkhah, C. Grothe, *Cell Transplant.* **12** (2003) 265.
- [79] A.I. Gravvanis, A. Lavdas, A.E. Papalois, D.A. Tsoutsos, P.N. Panayotou, D.C.-C. Chuang, I. Franceschini, M. Dubois-Dalcq, R. Matsas, *Eur. Surg.* **37** (2005) 204.
- [80] J. Finne, *J. Biol. Chem.* **257** (1982) 11966.
- [81] B. Rode, C. Endres, C. Ran, F. Stahl, S. Beutel, C. Kasper, S. Galuska, R. Geyer, M. Mühlenhoff, R. Gerardy-Schahn, T. Scheper, *J. Biotechnol.* **135** (2008) 202.
- [82] M. Mühlenhoff, M. Eckhardt, R. Gerardy-Schahn, *Curr. Op. Struct. Biol.* **8** (1998) 588.
- [83] S. Pelkonen, J. Hayrinen, J. Finne, *J. Bacteriol.* **170** (1988) 2646.
- [84] J.M. Bliss, R.P. Silver, *Mol. Microbiol.* **21** (1996) 221.
- [85] J. Colino, I. Outschoorn, *Infect. Immun.* **66** (1998) 505.
- [86] K. Stummeyer, A. Dickmanns, M. Mühlenhoff, R. Gerardy-Schahn, R. Ficner, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12** (2005) 90.
- [87] H. Tomasiewicz, K. Ono, D. Yee, C. Thompson, C. Goidis, U. Rutishauser, T. Magnuson, *Neuron* **11** (1993) 1163.
- [88] H. Cremer, R. Lange, A. Christoph, M. Plomann, G. Vopper, J. Roes, R. Brown, S. Baldwin, P. Kraemer, S. Scheff, D. Barthels, K. Rajewsky, W. Wille, *Nature* **367** (1994) 455.
- [89] A. Acheson, J.L. Sunshine, U. Rutishauser, *J. Cell Biol.* **114** (1991) 143.
- [90] E. Persohn, M. Schachner, *J. Cell. Biol.* **105** (1987) 569.
- [91] U. Rutishauser, L. Landmesser, *Trends Neurosci.* **19** (1996) 422.

-
- [92] T. Seki, Y. Arai, *Neurosci. Res.* **17** (1993) 265.
- [93] H. Hildebrandt, C. Becker, M. Müräu, R. Gerardy-Schahn, H. Rahmann, J. *Neurochem.* **71** (1998) 2339.
- [94] E. Ong, J. Nakayama, K. Angata, L. Reyes, T. Katsuyama, Y. Arai, M. Fukuda, *Glycobiol.* **8** (1998) 415.
- [95] K. Ono, H. Tomaszewicz, T. Magnuson, U. Rutishauser, *Neuron* **13** (1994) 595.
- [96] K. Yoshida, U. Rutishauser, J.E. Crandall, G.A. Schwarting, *J. Neurosci.* **19** (1999) 794.
- [97] J.Z. Kiss, G. Rougon, *Curr. Op. Neurobiol.* **7** (1997) 640.
- [98] A. Diyatev, G. Diyateva, V. Sytnyk, M. Delling, N. Toni, I. Nikonenko, D. Müller, M. Schachner, *J. Neurosci.* **24** (2004) 9372.
- [99] D. Müller, C. Wang, G. Skibo, N. Toni, H. Cremer, V. Calaora, G. Rougon, J.Z. Kiss, *Neuron* **17** (1996) 413.
- [100] C.G. Becker, A. Artola, R. Gerardy-Schahn, T. Becker, H. Welzl, M. Schachner, *J. Neurosci. Res.* **45** (1996) 143.
- [101] J. Tang, U. Rutishauser, L. Landmesser, *Neuron* **13** (1994) 405.
- [102] M.M. Daston, M. Bastmeyer, U. Rutishauser, D.D.M. O'Leary, *J. Neurosci.* **16** (1996) 5488.
- [103] B. Weinhold, R. Seidenfaden, I. Röckle, M. Mühlenhoff, F. Schertzinger, S. Conzelmann, J.D. Marth, R. Gerardy-Schahn, H. Hildebrandt, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 42971.
- [104] G. Gregoriadis, A. Fernandes, M. Mital, B. McCormack, *Cell. Mol. Life Sci.* **57** (2000) 1964.
- [105] S. Glüer, C. Schelp, N. Madry, D. von Schweinitz, M. Eckhardt, R. Gerardy-Schahn, *Br. J. Canc.* **78** (1998) 106.
- [106] D. Bitter-Suermann, J. Roth, *Immun. Res.* **6** (1987) 225.
- [107] Y. Haile, K. Haastert, K. Cesnulevicius, K. Stummeyer, M. Timmer, S. Berski, G. Dräger, R. Gerardy-Schahn, C. Grothe, *Biomaterials* **28** (2007) 1163.
- [108] D. Müller, L. Stoppini, C. Wang, J.Z. Kiss, *Neurosci.* **61** (1994) 441.
- [109] A.A. Lavdas, I. Franceschini, M. Dubois-Dalcq, R. Matsas, *Glia* **53** (2006) 868.
- [110] C.K. Franz, U. Rutishauser, V.F. Rafuse, *J. Neurosci.* **25** (2005) 2081.
- [111] P. Hron, *Polym. Int.* **52** (2003) 1531.
- [112] F.H. Lahey, *Ann. Surg.* **124** (1946) 1027.
- [113] R.R. DeNicola, *J. Urol.* **63** (1950) 168.

- [114] A.B. Swanson, *Surg. Clin. North Am.* **48** (1968) 1113.
- [115] S. Rehart, H. Effenberger, *Akt. Rheumatol.* **29** (2004) 324.
- [116] F.B. Mazas, GUEPAR, *Clin. Orthop. Rel. Res.* **94** (1973) 211.
- [117] Y.G. Ko, Y.H. Kim, K.D. Park, H.J. Lee, W.K. Lee, H.D. Park, S.H. Kim, G.S. Lee, DJ. Ahn, *Biomaterials* **22** (2001) 2115.
- [118] E.W. Merrill, E.W. Salzman, *Am. Soc. Artif. Intern. Organ.* **6** (1983) 60.
- [119] N.P. Desai, A. Hubbell, *J. Biomed. Mater. Res.* **25** (1991) 829.
- [120] C.H. Bamford, A.D. Jenkins, J.C. Ward, *Nature* **186** (1960) 712.
- [121] M. Suzuki, A. Kishida, H. Iwata, Y. Ikada, *Macromolecules* **19** (1986) 1804.
- [122] G. Ellinghorst, J. Fuehrer, D.O. Hummel, *Radiat. Phys. Chem.* **18** (1981) 889.
- [123] Y. Uyama, Y. Ikada, *J. Appl. Polym. Sci.* **36** (1988) 1067.
- [124] H. Iwata, A. Kishida, M. Suzuki, Y. Hata, Y. Ikada, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* **26** (1988) 3309.
- [125] M.J. Owen, P.J. Smith, *J. Adhesion Sci. Technol.* **8** (1994) 1063.
- [126] H. Makamba, J.H. Kim, K. Lim, N. Park, J.H. Hahn, *Electrophoresis* **24** (2003) 3607.
- [127] R.L. Williams, D.J. Wilson, N.P. Rhodes, *Biomaterials* **25** (2004) 4659.
- [128] A. Michel, E. Castaneda, A. Guyot, *J. Macromol. Sci. Chem.* **A12** (1978) 227.
- [129] J.J. Robin, *Adv. Polym. Sci.* **167** (2004) 35.
- [130] G.A. Diaz-Quijada, D.D.M. Wayner, *Langmuir* **20** (2004) 9607.
- [131] T.S. Phely-Bobin, R.J. Muisener, J.T. Koberstein, F. Papadimitrakopoulos, *Adv. Mater.* **12** (2000) 812.
- [132] J. Xu, Y. Yuan, B. Shan, J. Shen, S. Lin, *Colloids Surf. B* **30** (2003) 215.
- [133] G.W. Sears, *Anal. Chem.* **28** (1956), 1981.
- [134] F. Heinroth, R. Munnkhoff, C. Panz, R. Schmoll, J. Behnisch, P. Behrens, *Microporous Mesoporous Mater.* **116** (2008) 95.
- [135] K. Morikawa, M. Yanagida, *J. Biochem.* **89** (1981) 693.
- [136] T.F. Slater, B. Sawyer, U. Sträuli, *Biochim. Biophys. Acta* **77** (1963) 383.
- [137] T. Mosmann, *J. Immunol. Meth.* **65** (1983) 55.
- [138] M.V. Berridge, A.S. Tan, *Archiv. Biochem. Biophys.* **303** (1993) 474.
- [139] L. Warren, *J. Biol. Chem.* **234** (1959) 1971.
- [140] D. Aminoff, *Biochem. J.* **81** (1961) 384.
- [141] G.B. Paerels, J. Schut, *Biochem. J.* **96** (1965) 787.
- [142] I. Bremer, Diplomarbeit, Leibniz Universität Hannover, 2008.

-
- [143] T. Yamada, H. Zhou, H. Uchida, I. Honma, T. Katsube, *J. Phys. Chem. B* **108** (2004) 13341.
- [144] Produktinformation Sipernat® 500 LS, Evonic Industries.
- [145] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 6. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart 2002, S.31f.
- [146] K. Efimenko, W.E. Wallace, J. Genzer, *J. Colloid Interface Sci.* **254** (2002) 306.
- [147] D. Bodas, J.-Y. Rauch, C. Khan-Malek, *Eur. Polym. J.* **44** (2008) 2130.
- [148] K.R. Patel, H. Tang, W.E. Grever, K.Y.S. Ng, J. Xiang, R.F. Keep, T. Cao, J.P. McAllister II, *Biomaterials* **27** (2006) 1519.
- [149] G.S. Ferguson, M.K. Chaudhury, H.A. Biebuyck, G.M. Whitesides, *Macromolecules* **26** (1993) 5870.
- [150] R.V. Bellamkonda, *Biomaterials* **27** (2006) 3515.
- [151] R. Münnekhoff, Diplomarbeit, Leibniz Universität Hannover, 2006.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Struktur der DFG-Forschergruppe 548 „Polysialinsäure“, daran beteiligte Institute: Technische Chemie (TC), Organische Chemie (OC), Anorganische Chemie (AC) (alle Leibniz Universität Hannover); Zelluläre Chemie (ZC), Neuroanatomie (NA) (beide Medizinische Hochschule Hannover); Deutsches Institut für Kautschuktechnologie (DIK).	3
Abb. 2	Wichtigste Strukturen des Nervensystems [5].	5
Abb. 3	Aufbau einer Nervenzelle [6].	6
Abb. 4	Myelinisierte (links) und nicht-myelinisierte (rechts) Nervenfasern im PNS. Es gilt: 1 = Ranvier-Knoten, 2 = Zellkern der Schwann-Zelle, 3 = Axon, 4 = Zellmembran der Schwann-Zelle, 5 = Cytoplasma der Schwann-Zelle. Nach [3] und [4].	7
Abb. 5	Struktur eines Nervs, modifiziert nach [7].	8
Abb. 6	Schnittverletzung, die zu einer Nervenläsion geführt hat (links); Ansicht eines durchtrennten Nervs (rechts), die Pfeile markieren die beiden Nervenstümpfe [8, 9].	8
Abb. 7	Schema der Nervenregeneration, entnommen aus [10]. A: kompletter Nerv, B: Nervendurchtrennung, Abbau der Myelinscheide durch Makrophagen im distalen Stumpf, C: Neuaussprossung des Axons im proximalen Stumpf und Bildung des BÜNGNERSCHEN Bandes durch Schwann-Zellen im distalen Stumpf, D: regenerierter Nerv.	10
Abb. 8	Nervennaht, entnommen aus [26].	11
Abb. 9	Entnahme des <i>N. suralis</i> (links) und vier Stränge des <i>N. suralis</i> als autologes Transplantat (rechts); entnommen aus [30] und [31].	12
Abb. 10	Regenerierter Nerv in Siliconröhrchen (links), leeres Siliconröhrchen (rechts, Mitte) und entferntes überschüssiges Bindegewebe: aus dem Siliconschlauch (rechts, oben) und externes Bindegewebe (rechts, unten). Entnommen aus [54] und [53].	15
Abb. 11	Beispiel für die Struktur der Polysialinsäure aus α -2,8-verknüpften 5-N-Acetyl-Neuraminsäureeinheiten.	18
Abb. 12	Strukturen der häufigsten Baueinheiten der Polysialinsäure: 5-N-Acetyl-Neuraminsäure (links), 5-N-Glycol-Neuraminsäure (Mitte) und 5-Deamino-3,5-Dideoxy-Neuraminsäure (rechts).	18
Abb. 13	Verringerung der Zell-Zell-Kontakte durch sterischen Einfluss der Polysialinsäure [91].	19
Abb. 14	Neu aussprossende Axone in Anwesenheit (links) und in Abwesenheit (rechts) von PolySia. Deutlich zu erkennen ist die vermehrte Bündelung der Axone nach Entfernung der PolySia durch endoNF, dadurch geringe Innervationsrate am Zielorgan; nach [101].	20
Abb. 15	Allgemeine Struktur von Siliconen (links) und Struktur von PDMS (rechts).	22
Abb. 16	Kontaktwinkelbildung auf einer Festkörperoberfläche nach YOUNG.	27
Abb. 17	Bildung des Pre-Chromogens (1) aus Neu5Ac durch Periodat-Oxidation.	33
Abb. 18	Aldol-Spaltung zum Chromogen β -Formylpyruvinsäure (2).	33

Abb. 19	Bildung des Chromophors (3) aus β -Formylpyruvinsäure und Thiobarbitursäure.	34
Abb. 20	Einsatz von unbehandelten bzw. mit PolySia modifizierten Siliconschläuchen als Nervenleitschienen zur Überbrückung eines 10 mm-Defekts des <i>N. ischiadicus</i> in adulten Sprague Dawley-Ratten. In jeder Versuchsgruppe wurden fünf Schläuche für drei Wochen implantiert.	35
Abb. 21	Oberflächenfunktionalisierung mit GOPTMS als Linker für die Anbindung von PolySia.	37
Abb. 22	Oberflächenfunktionalisierung mit APTES und BSAH und anschließende Anbindung von PolySia nach Aktivierung mit DCC.	37
Abb. 23	Schematische Darstellung der Plasma-Behandlung.	41
Abb. 24	Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen auf mit GOPTMS beschichteten Objektträgern in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration von GOPTMS.	43
Abb. 25	Röntgen-Pulverdiffraktogramme eines Objektträgers mit mesoporöser Beschichtung vor (schwarz) und nach (rot) der Anbindung von Polysialinsäure via GOPTMS.	48
Abb. 26	IR-Spektren von reinem GOPTMS (oben) bzw. von mit GOPTMS beschichteten Objektträgern (unten).	51
Abb. 27	IR-Spektren von PolySia (oben), PolySia angebunden über GOPTMS (Mitte) bzw. von mit GOPTMS beschichteten Glassubstraten (unten).	53
Abb. 28	Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten mit unterschiedlicher Modifizierung (GOPTMS 10 Massen-%, PolySia-Lösung 0.02 M).	55
Abb. 29	Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten, auf denen PolySia (PolySia-Lösung 0.034 M) über GOPTMS angebunden wurde, in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration von GOPTMS.	56
Abb. 30	Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten zur Untersuchung des Einflusses der Konzentration von GOPTES auf die Menge an immobilisierter PolySia (PolySia-Lösung 0.02 M).	57
Abb. 31	Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten mit adsorbierter bzw. über GOPTMS (10 Massen-%) angebundener PolySia (PolySia-Lösung 0.026 M) bei zwei verschiedenen pH-Werten.	58
Abb. 32	Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten; Einfluss der Inkubationszeit auf die Menge an über GOPTMS (10 Massen-%) immobilisierter PolySia (PolySia-Lösung 0.026 M).	59
Abb. 33	Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten, bei denen die Anbindung der PolySia über GOPTMS (10 Massen-%) aus Stammlösungen mit unterschiedlicher Konzentration stattfand.	60
Abb. 34	PolySia-spezifischer ELISA auf Zellkulturplatten und Deckgläschen (A: käufliche Colominsäure und B: deacetylierte PolySia, Adsorption jeweils direkt in Zellkulturplatten durchgeführt; C: Adsorption von deacetylierter PolySia auf Deckgläschen, D: Immobilisierung von deacetylierter PolySia über GOPTMS (10 Massen-%) auf Deckgläschen, Inkubationszeit jeweils ein Tag.	61
Abb. 35	Ergebnisse des PolySia-spezifischen ELISA-Tests auf Deckgläschen nach Adsorption bzw. Immobilisierung von PolySia (PolySia-Lösung 0.02 M) via GOPTMS (10 Massen-%).	62
Abb. 36	Ergebnisse des PolySia-spezifischen ELISA-Tests auf Glasfritten, auf denen PolySia (PolySia-Lösung 0.02 M) über Adsorption bzw. über GOPTMS (10 Massen-%) angebunden wurde. Die Reacetylierung wurde mit Acetanhydrid in wässriger Lösung durchgeführt.	63

- Abb. 37 MTT-Test nach 14 Tagen von immortalisierten Schwann-Zellen auf mit GOPTMS (10 Massen-%) und/oder PolySia (PolySia-Lösung 0.025 M) modifizierten Glasfritten, unbehandelte Glasfritten als Vergleichsmaterial. 64
- Abb. 38 Bilder vom MTT-Test nach 14 Tagen mit immortalisierten Schwann-Zellen auf mit GOPTMS (10 Massen-%) und/oder PolySia (PolySia-Lösung 0.025 M) modifizierten Glasfritten, unbehandelte Glasfritten als Vergleichsmaterial (A) (B: GOPTMS, C: PolySia, D: GOPTMS + PolySia). 65
- Abb. 39 DAPI-Färbung nach 14 Tagen an mit immortalisierten Schwann-Zellen besiedelten Glasfritten nach deren Modifizierung mit GOPTMS (10 Massen-%) und/oder PolySia (PolySia-Lösung 0.025 M) (A: unbehandelt, B: GOPTMS, C: PolySia, D: GOPTMS + PolySia). 66
- Abb. 40 MTT-Test nach 14 Tagen mit immortalisierten Schwann-Zellen auf Glasfritten, auf denen PolySia (PolySia-Lösung 0.02 M) über GOPTMS angebunden wurde; Einfluss der Konzentration der GOPTMS-Lösung. 67
- Abb. 41 Ergebnisse des MTT-Tests nach 14 Tagen mit immortalisierten Schwann-Zellen auf mit PolySia bzw. mit GOPTMS (10 Massen-%) und PolySia (PolySia-Lösung 0.026 M) beschichteten Glasfritten. Der pH-Wert der wässrigen PolySia-Lösungen betrug 7 bzw. 10. 68
- Abb. 42 Ergebnisse des MTT-Tests nach 14 Tagen mit immortalisierten Schwann-Zellen auf mit GOPTMS (10 Massen-%) und/oder PolySia (PolySia-Lösung 0.026 M) modifizierten Glasfritten mit unterschiedlichen Porositäten bzw. Porengrößen (Porosität 3: 16-40 μm , Porosität 4: 10-16 μm , Porosität 5: 1-1.6 μm). 69
- Abb. 43 Bilder des MTT-Tests nach 14 Tagen mit immortalisierten Schwann-Zellen auf mit GOPTMS (10 Massen-%) und/oder PolySia (PolySia-Lösung 0.026 M) beschichteten Glasfritten mit den Porositäten 4 (links) und 5 (rechts) (A: unbehandelt, B: GOPTMS, C: PolySia, D: GOPTMS + PolySia). 70
- Abb. 44 Darstellung der Kontaktwinkelmessungen auf Deckgläschen in Abhängigkeit von der gewählten Menge an APTES nach den einzelnen Reaktionsschritten mit APTES, mit APTES + BSAH (1 g) und mit APTES + BSAH + PolySia (0.1 g). Dabei wurde die PolySia sowohl in DCM (mit 0.08 g DCC) wie auch in wässriger Lösung aufgebracht. 72
- Abb. 45 IR-Spektren von Objektträgern nach der Reaktion mit APTES (oben), mit APTES + BSA (Mitte) sowie mit APTES + BSAH + PolySia (+ DCC) (unten). 73
- Abb. 46 Ergebnisse des TBA-Tests für die Anbindung von PolySia (0.1 g, sowie 0.08 g DCC) auf Glasfritten über APTES (125 μL) und BSAH (1 g) in Abhängigkeit von der Dauer der APTES-Anbindung. 75
- Abb. 47 Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten für die Menge an immobilisierter PolySia (0.1 g) in Abhängigkeit vom eingesetzten Volumen an APTES (sonstige Reaktionsbedingungen: 1 g BSAH, 0.08 g DCC). 76
- Abb. 48 Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten nach Weglassen von APTES bzw. BSAH im Vergleich zur vollständigen Anbindung über APTES (125 μL) und BSAH (1 g) sowie zur Immobilisierung von PolySia (0.1 g mit 0.08 g DCC) bzw. (0.1 M) über GOPTMS (10 Massen-%). 77
- Abb. 49 Schema zur möglichen Hinderung der Anbindung von BSAH bzw. PolySia an mit APTES modifizierte Silica-Materialien (A: ohne APTES, B: wenig APTES, C: viel APTES). In C kann es während der Anbindung von PolySia zur teilweisen Ablösung der äußeren APTES-Schichten z.B. durch Scherung kommen. Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten, Einfluss der gewählten BSA-Menge auf die Immobilisierung von PolySia (0.1 g sowie 0.08 g DCC) über APTES (125 μL) und BSAH. 78

Abb. 50	Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten, Einfluss der gewählten BSA-Menge auf die Immobilisierung von PolySia (0.1 g sowie 0.08 g DCC) über APTES (125 μ L) und BSAH.	79
Abb. 51	Ergebnisse des TBA-Tests auf Glasfritten, Menge an immobilisierter PolySia (0.1 g sowie 0.08 g DCC) in Abhängigkeit der verwendeten Menge an BSAH ohne vorherige Modifizierung der Glassubstrate mit APTES.	80
Abb. 52	Ergebnisse des MTT-Tests mit Hep-G2-Zellen auf Glasfritten nach 7 und 14 Tagen. Die Anbindung der PolySia erfolgte sowohl über das Linkersystem APTES/BSAH (125 μ L bzw. 1 g sowie 0.08 g DCC) als auch über GOPTMS (10 Massen-%).	81
Abb. 53	DAPI-Färbung von Hep-G2-Zellen auf mit PolySia modifizierten Glasfritten nach 14 Tagen. Immobilisierung von PolySia über APTES/BSAH (125 μ L bzw. 1 g sowie 0.08 g DCC) (A), BSAH (1 g sowie 0.08 g DCC) (B) und GOPTMS (10 Massen-%) (C).	82
Abb. 54	Beziehung zwischen der Stromaufnahme des Ozonisators und der Ozonproduktion.	84
Abb. 55	Peroxidkonzentration auf der Siliconoberfläche in Abhängigkeit der Ozonisatorleistung.	85
Abb. 56	Abhängigkeit der Ozonkonzentration und der produzierten Ozonmenge vom Sauerstoffstrom.	85
Abb. 57	IR-Spektren von Siliconschläuchen vor (oben) und nach (Mitte) der Ozon-Behandlung sowie der anschließenden Modifizierung mit GOPTMS (10 Massen-%) und PolySia (PolySia-Lösung 0.1 M) (unten).	90
Abb. 58	IR-Spektren von Siliconschläuchen, auf denen PolySia (PolySia-Lösung 0.1 M) über GOPTMS (10 Massen-%) angebunden wurde, typisches (oben) und gelegentlich auftretendes IR-Spektrum (unten).	91
Abb. 59	IR-Spektren eines Siliconschlauchs vor (oben) und nach der Plasma-Aktivierung (unten).	92
Abb. 60	IR-Spektren von Siliconschläuchen nach der Plasma-Aktivierung (oben) und funktionalisiert mit GOPTMS (10 Massen-%, Mitte) bzw. GOPTMS und PolySia (PolySia-Lösung 0.1 M) (unten).	93
Abb. 61	Ergebnisse des TBA-Tests auf Siliconschläuchen, Immobilisierung von PolySia über GOPTMS (10 Massen-%) oder direkte Adsorption im Anschluss an eine Ozon-Behandlung (5 h, 70 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h).	94
Abb. 62	Ergebnisse des TBA-Tests auf Siliconschläuchen, Anbindung von PolySia (PolySia-Lösung 0.3 M) über verschiedene Konzentrationen von GOPTMS nach Ozon-Behandlung (6 h, 90 % Leistung, Sauerstoffstrom 60 L/h) .	95
Abb. 63	Ergebnisse des TBA-Tests für die Anbindung von PolySia (PolySia-Lösung 0.034 M) auf Siliconschläuchen in Abhängigkeit von der Ozonisatorleistung (Sauerstoffstrom 40 L/h) und der Dauer der Ozon-Behandlung.	96
Abb. 64	Ergebnisse des TBA-Tests auf Siliconplatten, Menge an über GOPTMS (10 Massen-%) immobilisierte PolySia (PolySia-Lösung 0.1 M) in Abhängigkeit von der Dauer der Ozonisierung (60 % Leistung) bei einem Sauerstoffstrom von 40 (blau) bzw. 100 (grün) L/h.	97
Abb. 65	Ergebnisse des TBA-Tests auf Siliconplatten; Menge an über GOPTMS (10 Massen-%) immobilisierte PolySia (PolySia-Lösung 0.1 M) nach Ozon-Behandlung (85 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) ohne (blau) und mit (grün) Vorbehandlung mit Toluol.	98
Abb. 66	Ergebnisse des TBA-Tests an plasma-aktivierten Siliconschläuchen, die mit GOPTMS und/oder PolySia (PolySia-Lösung 0.1 M) modifiziert wurden.	99

- Abb. 67 Mit Hilfe des TBA-Tests ermittelte Ergebnisse des endoNF-Verdau von Poly-sialinsäure in der acetylierten und deacetylierten Variante zu bestimmten Zeitpunkten. Neben den Lösungen der PolySia wurden auch den Siliconplatten bzw. Glasfritten, auf denen PolySia immobilisiert war, die endoNF zugesetzt, für die Referenzmessungen wurden das Enzym durch die reine Pufferlösung (pH 7.4) ersetzt. 100
- Abb. 68 Ergebnisse der TG von Siliconschläuchen, die entweder unmodifiziert (schwarz) sind oder nach einer Ozon-Behandlung (5 h, 70 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) mit GOPTMS (10 Massen-%) (grau) sowie mit GOPTMS und PolySia (PolySia-Lösung 0.05 M) (blau) beschichtet wurden. Die Vergrößerung zeigt den Bereich zwischen 300 und 420 °C. 101
- Abb. 69 Ergebnisse des MTT-Tests mit Hep-G2-Zellen auf unbehandelten und im Anschluss an eine Ozon-Behandlung (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) mit GOPTMS (10 Massen-%) bzw. GOPTMS und PolySia-Lösung (0.1 M) modifizierten Siliconplatten. 103
- Abb. 70 DAPI-Färbung an Tag 14 auf mit Hep-G2-Zellen besiedelten unbehandelten und im Anschluss an eine Ozon-Behandlung (85 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) mit GOPTMS (10 Massen-%) bzw. GOPTMS und PolySia-Lösung (0.2 M) modifizierten Siliconplatten (A: unbehandelt, B: 120 min Ozon + GOPTMS, C: 2 min Ozon + GOPTMS + PolySia, D: 120 min Ozon + GOPTMS + PolySia). 104
- Abb. 71 Ergebnisse der *in vivo-Implantation* von unbehandelten und mit PolySia modifizierten Siliconschläuchen zur Überbrückung von 10 mm Defekten des *N. ischiadicus* in adulten Sprague Dawley-Ratten. In jeder Versuchsgruppe wurden fünf Schläuche implantiert. Die Anbindung der PolySia (PolySia-Lösung 0.2 M) an die Siliconschläuche erfolgte über GOPTMS (10 Massen-%) im Anschluss an eine Ozon-Behandlung (30 min, 85 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h). 105
- Abb. 72 IR-Spektren von unbehandelten Siliconplatten (oben) und nach der Immobilisierung von PolySia über APTES + BSAH (+ DCC) (Mitte) bzw. nur BSAH (+ DCC) (unten) im Anschluss an eine Ozon-Behandlung. 108
- Abb. 73 IR-Spektren von Siliconplatten, auf denen nach einer Ozon-Behandlung PolySia über APTES und BSAH (+ DCC) angebunden wurde. Zusätzliches Auftreten von für das Linkersystem APTES/BSAH charakteristischen Banden in einer Probe, bei der mit 6 µg/cm² (unten) im TBA-Test doppelt so viel PolySia angebunden wurde wie in der Vergleichsprobe (3 µg/cm², oben). 110
- Abb. 74 Ergebnisse des TBA-Tests auf Siliconplatten nach Ozon-Behandlung (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) mit Wasser (grün) bzw. Toluol (blau) als Lösungsmittel für APTES für die Anbindung von PolySia (0.1 g) über APTES (125 µL) und BSAH (1 g) (sowie 0.08 g DCC). 112
- Abb. 75 Ergebnisse des TBA-Tests auf Siliconplatten nach Ozon-Behandlung (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h), Anbindung von PolySia (0.1 g) über APTES (125 µL) + BSAH (1 g) (sowie 0.08 g DCC) bzw. BSAH (sowie DCC). 113
- Abb. 76 Ergebnisse der MTT-Tests mit Hep-G2-Zellen auf Siliconplatten, auf denen Polysia (0.1 g) über APTES (125 µL) und BSAH (1 g) (sowie 0.08 g DCC) nach einer Behandlung mit Ozon (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) für eine bestimmte Zeit immobilisiert wurde. 114
- Abb. 77 Ergebnisse der MTT-Tests mit PC-12-Zellen auf Siliconplatten, auf denen Polysia (0.1 g) über APTES (125 µL) und BSAH (1 g) (sowie 0.08 g DCC) nach einer Behandlung mit Ozon (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) für eine bestimmte Zeit immobilisiert wurde. 115
- Abb. 78 Ergebnisse der MTT-Tests mit Hep-G2-Zellen auf Siliconplatten, auf denen Polysia (0.1 g) nach unterschiedlich langen Behandlungszeiten mit Ozon (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) über BSAH (1 g) nach Aktivierung mit DCC (0.08 g) angebunden wurde. 116

Abb. 79	Ergebnisse der MTT-Tests mit PC-12-Zellen auf Siliconplatten, auf denen PolySia (0.1 g) nach unterschiedlich langen Behandlungszeiten mit Ozon (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) über BSAH (1 g) nach Aktivierung mit DCC (0.08 g) angebunden wurde.	117
Abb. 80	DAPI-Färbung an Tag 14 auf mit Hep-G2-Zellen besiedelten Siliconplatten, auf denen PolySia (0.1 g) über BSAH (1 g) nach Aktivierung mit DCC (0.08 g) im Anschluss an eine unterschiedlich lange Ozon-Behandlung (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) angebunden wurde (A: kein Ozon, B + C: zwei Minuten Ozon, D + E: zwei Stunden Ozon).	118
Abb. 81	DAPI-Färbung an Tag 14 auf mit PC-12-Zellen besiedelten Siliconplatten, die im Anschluss an eine unterschiedlich lange Ozonbehandlung (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) mit BSAH (1 g) und PolySia (0.1 g + 0.08 g DCC) modifiziert wurden (A: kein Ozon, B: zwei Minuten Ozon, C: zwei Stunden Ozon).	118
Abb. 82	IR-Spektren von reinem Sipernat® (oben) bzw. von mit APTES modifiziertem Sipernat® (unten).	125
Abb. 83	IR-Spektren von Sipernat® mit APTES (oben), APTES + BSAH (Mitte) und APTES + BSAH + PolySia (+ DCC) (unten).	126
Abb. 84	Ergebnisse des TBA-Tests nach Variierung der Reaktionszeit für die Anbindung des APTES an Sipernat® (Reaktionsbedingungen: 125 µL APTES, 75 µL DBU; 2 g BSAH; 0.08 g DCC, 0.1 g PolySia).	129
Abb. 85	Ergebnisse des TBA-Tests nach Variierung des eingesetzten Volumens an APTES für die Anbindung auf Sipernat®-Partikeln (Reaktionsbedingungen: 75 µL DBU, 2 h; 2 g BSAH; 0.08 g DCC, 0.1 g PolySia).	130
Abb. 86	Ergebnisse des TBA-Tests nach Variierung des eingesetzten Volumens an APTES für die Anbindung auf Sipernat®-Partikeln (Reaktionsbedingungen: 75 µL DBU, 2 h; 2 g BSAH; 0.08 g DCC, 0.1 g PolySia).	131
Abb. 87	Ergebnisse des TBA-Tests auf Sipernat®-Partikeln nach Weglassen jeweils eine Komponente (Reaktionsbedingungen: 125 µL APTES, 75 µL DBU, 2 h; 2 g BSAH; 0.08 g DCC, 0.1 g PolySia).	132
Abb. 88	Ergebnisse der TG von reinem Sipernat®.	133
Abb. 89	Ergebnisse der TG von deacetylierter Polysialinsäure.	133
Abb. 90	Ergebnisse der TG einer mit APTES (125 µL) funktionalisierten Silica-Probe.	134
Abb. 91	Ergebnisse der TG einer mit APTES (125 µL) + BSAH (2 g) funktionalisierten Sipernat®-Probe.	134
Abb. 92	Ergebnisse der TG einer mit APTES (125 µL) + BSAH (2 g) + PolySia (0.1 g) (sowie 0.08 g DCC) funktionalisierten Sipernat®-Probe.	134
Abb. 93	Verlauf der TG-Kurven von Sipernat®-Proben nach der Funktionalisierung mit APTES. Alle Proben wurden mit 125 µL APTES unter identischen Reaktionsbedingungen (75 µL DBU, 2 h) hergestellt.	134

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht über die gemessenen Kontaktwinkel (in °) vor und nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden in Wasser.	44
Tab. 2	Übersicht über die gemessenen Kontaktwinkel (in °) nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden in Wasser bzw. PolySia-Lösung (0.02 M) in Abhängigkeit von der Konzentration der GOPTMS-Lösung.	45
Tab. 3	Kontaktwinkelmessungen (in °) nach verschiedenen Inkubationszeiten in PolySia-Lösung (0.02 M).	45
Tab. 4	Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (in °) nach einer Inkubationszeit von vier Stunden in unterschiedlich konzentrierten PolySia-Lösungen.	46
Tab. 5	Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen in Abhängigkeit der verstrichenen Zeit nach Hydrolyse von GOPTMS (10 Massen-%).	46
Tab. 6	Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen in Abhängigkeit von der Eintauchzeit der Objektträger in die GOPTMS-Lösung (10 Massen-%) während des Dip-Coating-Prozesses. Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (in °) in Abhängigkeit von der Nachbehandlung nach der Silanisierung und nach einem Tag Lagerung in Wasser (I: eine Stunde 60 °C, Aceton; II: Trocknung an Luft).	47
Tab. 7	Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (in °) in Abhängigkeit von der Nachbehandlung nach der Silanisierung und nach einem Tag Lagerung in Wasser (I: eine Stunde 60 °C, Aceton; II: Trocknung an Luft).	47
Tab. 8	Vergleich der gemessenen Kontaktwinkel (in °) in Abhängigkeit von der Nachbehandlung nach der Silanisierung und nach einem Tag Lagerung in Wasser (I: eine Stunde 60 °C, Aceton; II: Trocknung an Luft, Aceton).	47
Tab. 9	Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (in °) auf Objektträgern, die mit einer mesoporösen Struktur vor der Beschichtung mit GOPTMS modifiziert wurden. Es wurden die Kontaktwinkel nach der mesoporösen Strukturierung (-), nach Behandlung mit Piranha-Säure und der Anbindung von GOPTMS bestimmt. Die mit GOPTMS beschichteten Substrate wurden für einen Tag sowohl in Wasser (neutral und pH 10) als auch in PolySia-Lösung (0.02 M) gelagert.	49
Tab. 10	Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (in °) an mit GOPTES modifizierten Objektträgern vor und nach einer eintägigen Inkubation in PolySia-Lösung (0.02 M).	50
Tab. 11	Zuordnung der Banden in den IR-Spektren von GOPTMS und von mit GOPTMS beschichteten Glassubstraten (Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ / cm ⁻¹ , v: versteckt) (GOPTMS auf Glasoberfläche: GPSX) [145].	52
Tab. 12	Zuordnung der Banden in den IR-Spektren von PolySia und von Glassubstraten, die mit GOPTMS sowie mit GOPTMS und PolySia modifiziert wurden (Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ / cm ⁻¹) (GOPTMS auf Glas angebunden: GPSX) [145].	54
Tab. 13	Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (in °) auf Deckgläschen, die zunächst mit APTES, dann mit BSAH (1 g) und abschließend mit PolySia (0.1 g) modifiziert wurden. Die PolySia-Anbindung wurde zum einen mit DCC (0.08 g) als Aktivierungsreagenz in DCM und zum anderen mit wässriger PolySia-Lösung durchgeführt.	71
Tab. 14	Zuordnung der IR-Banden in den Spektren von Objektträgern, die mit APTES, mit APTES + BSAH sowie mit APTES + BSAH + PolySia (+ DCC) behandelt wurden (Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ / cm ⁻¹) (APTES auf Glas: AAG; BSAH an AAG: BAAG; PolySia an BAAG: PBAAG) [145].	74
Tab. 15	Übersicht über die gemessenen Kontaktwinkel auf Siliconplatten nach Beschichtung mit GOPTMS (10 Massen-%) und/oder PolySia (0.1 M) nach Ozon-Behandlung (2 h, 90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h), Werte ohne vorherige Ozon-Behandlung zum Vergleich.	86

Tab. 16	Übersicht über die gemessenen Kontaktwinkel (in °) auf Siliconplatten, die mit GOPTMS (10 Massen-%) und PolySia (0.1 M) modifiziert wurden, in Abhängigkeit von der Dauer der Ozon-Behandlung (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) und vom verwendeten Lösungsmittel (LM) für das GOPTMS (Wasser bzw. Toluol). Außerdem wurde teilweise in der Nachbehandlung auf das Abspülen des GOPTMS mit Aceton vor der Anbindung von PolySia verzichtet.	87
Tab. 17	Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (in °) auf Siliconplatten in Abhängigkeit von der Konzentration der verwendeten PolySia-Lösung und der Dauer der Ozon-Behandlung (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h).	88
Tab. 18	Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (in °) auf Siliconplatten in Abhängigkeit von der Konzentration von GOPTMS bei zwei unterschiedlichen Durchflussraten von Sauerstoff bei der Ozon-Behandlung (2 h, 90 % Leistung).	88
Tab. 19	Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen auf Siliconschläuchen mit unterschiedlichen Modifizierungen im Anschluss an eine Plasma-Aktivierung (Reaktionsparameter: 10 Massen-% GOPTMS, PolySia-Lösung 0.1 M).	89
Tab. 20	Zuordnung der Banden in den IR-Spektren von Siliconschläuchen vor und nach der Behandlung mit Ozon sowie nach der Anbindung von PolySia (PolySia-Lösung 0.1 M) über GOPTMS (10 Massen-%) (Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ / cm ⁻¹) [145, 146].	91
Tab. 21	Zu beobachtende Massenverluste (MV) aus dem TG-Kurven von Siliconen, die unbehandelt waren oder mit GOPTMS (10 Massen-%) bzw. mit GOPTMS und PolySia (PolySia-Lösung 0.05 M) nach Ozon-Behandlung (5 h, 70 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h) modifiziert wurden. Die Stufen wurden wie folgt festgelegt: 1. Stufe: 25-300 °C; 2. Stufe: 300-380 °C; 3. Stufe: 380-1000 °C.	102
Tab. 22	Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (in °) auf Siliconplatten nach Anbindung von PolySia (0.1 g) über APTES (125 µL) und BSAH (1 g) sowie Aktivierung mit DCC (0.08 g) mit Wasser (I) bzw. Toluol (II) als Lösungsmittel für die Anbindung von APTES sowie die Anbindung von PolySia ausschließlich über BSAH (III) nach unterschiedlichen Zeiten für die Behandlung mit Ozon (90 % Leistung, Sauerstoffstrom 40 L/h).	107
Tab. 23	Zuordnung der zu beobachtenden Banden von unbehandelten Siliconplatten und Siliconplatten, auf denen PolySia nach einer Ozon-Behandlung über das Linkersystem APTES/BSAH (+DCC) angebunden wurde (Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ / cm ⁻¹) (APTES auf Silicon: ASil; BSAH an ASil: BASil; PolySia an BASil: PBASil) [145, 146].	109
Tab. 24	Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 73, bei denen in einem Fall zusätzliche, auf die Anwesenheit des Linkersystems APTES/BSAH (+ DCC) hindeutende Banden auftreten (Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ / cm ⁻¹) (APTES auf Silicon: ASil; BSAH an ASil: BASil; PolySia an BASil: PBASil) [145, 146].	111
Tab. 25	SEARS-ZAHLEN und Verbrauch von HCl für APTES-modifizierte Sipernat®-Partikel.	124
Tab. 26	Zuordnung der in den IR-Spektren von APTES-modifizierten Sipernat®-Partikeln nach Umsetzung mit BSAH und PolySia (+ DCC) zu beobachtenden Banden (Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ / cm ⁻¹) (APTES auf Sipernat: ASip; BSAH an ASip: BASip; PolySia an BASip: PBASip) [145].	126
Tab. 27	Zuordnung der in den IR-Spektren von APTES-modifizierten Sipernat®-Partikeln nach Umsetzung mit BSAH und PolySia (+ DCC) zu beobachtenden Banden (Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ / cm ⁻¹) (APTES auf Sipernat: ASip; BSAH an ASip: BASip; PolySia an BASip: PBASip) [145].	128
Tab. 28	Ergebnisse der TG für den ersten Reaktionsschritt mit APTES (125 µL). Vergleich der Massenverluste (MV) für die zu beobachtenden Stufen (1. Stufe: 20-113 °C, 2. Stufe: 113-377 °C, 3. Stufe: 377-555 °C, 4. Stufe: 555-1000 °C) mit über den TBA-Test nachgewiesenen Mengen an PolySia.	134

Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle	Reinheit
2-Propanol	Fluka	puriss, p.a.
2-Thiobarbitursäure	Fluka	> 99 %
3-Aminopropyltriethoxysilan	Aldrich	99 %
3-Glycidyloxypropyltriethoxysilan	Fluka	> 97 %
3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan	Fluka	> 97 %
Aceton	Fluka	≥ 99.5 %
AL43	Aldrich	-
Ammoniummolybdat-tetrahydrat	Fluka	> 99 %
Bernsteinsäureanhydrid	Sigma-Aldrich	purum
Colominsäure (Natriumsalz)	Gerbu Biotechnik GmbH	-
Cyclohexanon	Fluka	> 99.5 %
Dichlormethan	Fluka	puriss, p.a.
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	-
Essigsäure	Riedel-de-Haën	99-100 %
Essigsäureanhydrid	Fluka	> 99 %
Ethanol	Merck	absolut
Kaliumiodid	Fluka	> 99 %
<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid	Fluka	99 %
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	Aldrich	99 %
Natrium(meta)arsenit	Fluka	> 99 %
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	-
Natriumhydroxid	Acros	purum
Natriumsulfat	Riedel-de-Haën	-
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich	0.1 N
Periodsäure	Fluka	purum
Phosphorsäure	Sigma-Aldrich	85 %
Salzsäure	Riedel-de-Haën	≥ 37 %
Schwefelsäure	Fluka	95-97 %
Sipernat® 500 LS	Evonic Industries	-
Toluol	Sigma	≥ 99.5 %
Wasserstoffperoxid	Fluka	35 %

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stephanie Steinhaus
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 12.02.1981
Geburtsort: Hannover

Schulbildung

1987-1991 Theodor-Heuss-Grundschule Empelde
1991-1993 Orientierungsstufe Ronnenberg
1993-2000 Gymnasium Humboldtschule Hannover
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

10/2000-11/2005 Studium der Chemie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Vordiplom 2002
Diplom 2005
12/2005-6/2009 Promotionsstudium am Institut für Anorganische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover (Arbeitskreis Prof. Dr. Peter Behrens)

Beschäftigungsverhältnisse

8/2002 - 11/2002 studentische Hilfskraft am Institut für Anorganische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
3/2004 - 7/2004 studentische Hilfskraft am Institut für Anorganische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
seit 12/2005 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anorganische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Veröffentlichungen

Artikel

S. Steinhaus, C. Menneking, S. Bruns, Y. Stark, T. Scheper, P. Behrens, Immobilisierung von Polysialinsäure auf silan-modifizierten Glasoberflächen, *Biomaterialien* 8 (2007) 195.

S. Steinhaus, M. Lückmann, R.H. Schuster, P. Behrens, Immobilisierung von Polysialinsäure auf aktivierten Siliconoberflächen, *Biomaterialien* 9 (2008) 197.

The Chemical Ghostbusters - Science Meets Drama, P. Behrens, S. Steinhaus et. al., *Praxis Naturwiss. Chem. Schule* 57 (2008) 12.

S. Steinhaus, Y. Stark, S. Bruns, Y. Haile, T. Scheper, C. Grothe, P. Behrens, Polysialic acid immobilized on silanized glass surfaces: A test case for its use as a biomaterial for nerve regeneration, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, eingereicht.

Tagungsbeiträge

S. Steinhaus, S. Bruns, Y. Stark, J. Tschirch, P. Behrens, Immobilization of polysialic acid in silanized glass surfaces, Posterbeitrag zum 3rd PolySia Meeting, Bad Lauterberg, 10.-13. März 2007.

S. Steinhaus, S. Bruns, Y. Stark, T. Scheper, Y. Haile, C. Grothe, P. Behrens, Immobilization of polysialic acid on silanized surfaces, Posterbeitrag zur Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Hannover, 22.-24. November 2007.

S. Steinhaus, M. Lückmann, S. Röker, R.H. Schuster, C. Kasper, P. Behrens, Immobilization of polysialic acid on activated silicone surfaces, Posterbeitrag zur Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Hamburg, 20.-22. November 2008.