Abschlussbericht

Zuwendungsempfänger: Förderkennzeichen:

Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V. 03X1503C

(in Kooperation mit Membrana GmbH, Wuppertal

EXcorLab GmbH, Obernburg und

Charité – Universitätsmedizin Berlin - Campus Benjamin Franklin, Berlin)

Vorhabensbezeichnung:

Molekulare Steuerung von Trenneigenschaften und Biokompatibilität an Polymermembranen für medizinische Anwendungen (MOST)

Laufzeit des Vorhabens:

01.03. 2007 - 30.06.2010

Berichtszeitraum:

01.03. 2007 - 30.06. 2010

MOST Abschlussbericht Projektpartner IPF

I. Kurze Darstellung

Ziel des Projektes war es, neuartige molekular-biomimetische Funktionalisierungstechnologien auf klinisch etablierte, vom Projektpartner Membrana GmbH hergestellte Polymermembranen aus Poly(ether)sulfon (PES) und Polyvinylpyrrolidon (PVP) zu übertragen und damit durch eine geringere Gerinnungsaktivierung an der Membranoberfläche eine Dialysebehandlung mit geringerer systemischer Gerinnungshemmung zu ermöglichen. Weiterhin sollte die Entfernung von Urämietoxinen durch geeignete Membraneigenschaften realisiert werden. Hierzu wurden Moleküle vom Projektpartner Charité an chromatographischen Säulenmaterialien erprobt und an den Membranen immobilisiert, um ihre Wirkung im komplexen Vollblutsystem zu untersuchen.

Das Arbeitsprogramm bestand zunächst aus Herstellung von Dünnschichten der Membrankomponenten, die charakterisiert und mit Hilfe von Niederdruck-Plasma für die Anbindung der niedermolekularen Wirkstoffe funktionalisiert wurden. An sie wurden die Inhibitormoleküle angebunden. Die Bindung wurde physikalischchemisch verifiziert und die Wirksamkeit in Bezug auf die Zielmoleküle mittels immun- und radiochemischen Methoden überprüft.

Als alternative Methode, funktionalisierbare Gruppen auf Membranen zur Verfügung zu stellen, integrierte der Projektpartner Membrana GmbH Additive mit funktionalisierbaren Komponenten in die Membranen unter Beibehaltung ihrer Trenneigenschaften. Diese, von der Membrana GmbH geschützte Methode, wurde im Projekt als zentrale Modifizierungstechnologie weiter verfolgt. Die Funktionalisierbarkeit der Membranen durch Additive wurde an Dünnschichten Von Membrana GmbH wurden unterschiedliche Additive verifiziert. in verschiedenen Konzentrationen bei verschiedenen Prozessparametern in Flachmembranen integriert. Hier musste ein Screening-Verfahren entwickelt werden, um die Verfügbarkeit der Gruppen für die Konjugation mit bioaktiven Wirkstoffen zu testen und eine Abhängigkeit von den Prozessparametern herauszuarbeiten.

Ausgewählte Membranen wurden darauf mit verschiedenen Benzamidin- und Arginin-basierten Gerinnungshemmern funktionalisiert. Ihre Wirkung auf das

2

isolierte Zielenzym Thrombin wurde in chromogenen und radiochemischen Tests untersucht, und es wurde gezeigt, dass die Membranen – bedingt durch ihre Struktur – deutlich mehr als eine Monolage (der makroskopischen Oberfläche) Thrombin binden und inaktivieren können. In einem komplexen System mit Plasma wurde die Hemmwirkung auf die gesamte Gerinnungskaskade getestet. An den Inhibitor-funktionalisierten Membranen war die Gerinnung deutlich verlangsamt und die Trends entsprachen den Vorhersagen aus den vorherigen Screening-Untersuchungen.

Die Membranen mit immobilisierten bioaktiven Substanzen wurden darauf einem im IPF etablierten Vollblut-Inkubationsversuch unterzogen. Die immobilisierten Gerinnungshemmer führten in diesem komplexen Vollblut-System nur zu einer begrenzten Reduktion der Gerinnungsaktivierung, aber zu einer deutlich erhöhten Entzündungsreaktion, was jedoch durch Modifikation des Funktionalisierungsprotokolls weitgehend kontrolliert werden konnte. Eine immobilisierte Substanz zur Entfernung von Urämietoxinen führte zu starker Gerinnungs- und Entzündungsaktivierung.

Aus dem Projektteil werden insgesamt folgende Schlussfolgerungen gezogen:

- Eine Biofunktionalisierung von VP/AA/LMA oder VP/AA substituierten PVP/PES-Membranen mittels EDC/NHS-Chemie ist technisch möglich.
- Diese Funktionalisierung kann bei Erhalt der Bioaktivität der immobilisierten Substanzen auch ohne zwischengeschaltete Spacer-Moleküle im Einschritt-Verfahren durchgeführt werden.
- Im Rahmen der Funktionalisierung entstehen entzündungsaktivierende Gruppen in der Membran. Eine Anwendung am Menschen ist dadurch in der bisherigen Form nicht möglich. Die Methode der Funktionalisierung ist aber weiter z. B. für Zellkultur-Anwendungen von hohem Interesse.
- Die Immobilisierung an in dieser Weise funktionalisierten Membranmaterialien mit Thrombin-Inhibitoren ergab in der Vollblut-Inkubation keine signifikanten Vorteile.
- N-acetyl-Cystein, das Urämie-Toxine binden kann (Projektpartner Charité) ist nicht inert bzgl. Entzündung und Hämostase.

II. Eingehende Darstellung

1. Präparation von Membranproben

1.2 Präparation von Modellschichten und Referenzmembranen mit abgestuften Eigenschaften (3.1.1.2)

Modellschichten der Membranpolymere Polyethersulfon (PES) und Polyvinylpyrrolidon (PVP K90) sowie der Additive Vinylpyrrolidone/Acrylsäure/Laurylmethacrylat (VP/AA/LMA), Vinylpyrrolidon/Acrylsäure (VP/AA) Copolymer und sulfoniertem Polyethersulfon (SPES) (siehe Tabelle 1) wurden zur Durchführung spezieller analytischer Experimente, insbesondere für die mechanistische Aufklärung der Oberflächenfunktionalisierung und für die Bewertung der Verfügbarkeit immobilisierter bioaktiver Moleküle, auf planaren anorganischen Trägern (Si-Wafer und Glasträger) unter Anwendung von optimierten Spin-Coating- und Plasmaprozessen hergestellt.

	Polyethersulfon (PES)
	Polyvinylpyrrolidon (PVP K90)
$\begin{array}{c c} \hline & \begin{array}{c} CH_2 - CH \\ \hline \\ \hline \\ \hline \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ $	Vinylpyrrolidone/Acrylsäure/Lauryl- methacrylat (VP/AA/LMA) Copolymer
$ \begin{array}{c} -\left(CH_2-CH\right)_n - \left(CH_2-CH\right)_m \\ \downarrow \\ & \swarrow \\ & \swarrow \\ & \swarrow \\ & \square \\ & \square$	Vinylpyrrolidon/Acrylsäure (VP/AA) Copolymer (75/25)
	Sulfoniertes Polyethersulfon (SPES)

Tabelle 1: Übersicht zu den im Projekt schwerpunktmäßig eingesetzten Polymeren

Referenzmembranen wurden vom Projektpartner Membrana GmbH aus den gleichen Polymeren unter verschieden Prozessbedingungen hergestellt.

1.3 Durchführung von definierten Nachbehandlungsprozessen (Sterilisationsverfahren, Spülprozesse, Alterung) an den Referenzmembranen (3.1.1.2)

Projektpartner Membrana Vom GmbH wurden unmittelbar nach dem verschiedene Nachbehandlungsschritte Herstellungsprozess durchgeführt. Insbesondere wurden die Membranen mit unterschiedlichen Zeiten in einem Dampfbad nachbehandelt. Die Verweildauer im Dampfbad wurde in Kombination mit den Verweilzeiten im Koagulations- und Extraktionsbad variiert. Aus den für diese Membranen erhobenen Daten wurden die besten Prozessparameter für den Einbau der Additive und die nachfolgende Inhibitorkopplung identifiziert. Zudem wurden im IPF vom Projektpartner Membrana GmbH zur Verfügung gestellte Membranen autoklaviert (sterilisiert) und einer physiko-chemischen Charakterisierung (analog zu den unbehandelten Membranen) unterzogen.

1.4 Chemische Funktionalisierung von Modellschichten und Membranen auf verschiedenen Wegen (Plasmabehandlung, Zusatz von Polymerkomponenten oder Additiven mit reaktiven Gruppen (3.1.1.3)

Modellschichten aus dem Membranpolymer PES wurden mit dem Ziel der Erzeugung von funktionellen Gruppen durch Niederdruck-Plasmabehandlungen modifiziert. Hierzu wurde einerseits ein Sauerstoffplasma zur Erzeugung von Säuregruppen (-COOH) und anderseits ein Ammoniakplasma zur Erzeugung von basischen Oberflächengruppen (-NH₂) angewendet. Die Prozessparameter wurden auf Basis einer physiko-chemischen Charakterisierung (Kontaktwinkelmessungen, Röntgen-Photoelektronenspektroskopie und elektrokinetische Messungen) optimiert und konnten erfolgreich auf Flachmembranen aus PES übertragen werden. Die Ergebnisse der physiko-chemischen Charakterisierung sind unter dem Punkt 3 (Charakterisierung der Membraneigenschaften durch physikalisch-chemische Analysenmethoden) zusammengefasst.

5

Als zweite Strategie zur Funktionalisierung der Membranen wurde die Substitution von PVP durch VP-Copolymere mit funktionellen Gruppen (COOH, siehe Tabelle 1) gewählt. Zu Optimierung der Kopplungsprozesse für Gerinnungsinhibitoren wurden zunächst dünne Filme der Polymere über Spin-Coating- und Plasmaprozesse hergestellt und einer physiko-chemischen Charakterisierung unterzogen. Nach dem Vorliegen positiver Ergebnisse aus Arbeiten zur Biofunktionlalisierung der Schichten wurden die Copolymere vom Projektpartner Membrana unter verschiedenen Prozessbedingungen und Nachbehandlungsschritten in Flachmembranen einbaut.

Da die Immobilisierung von Inhibitormolekülen über die mit einem Sauerstoffplasma erzeugten Säuregruppen nicht erfolgreich war, wurde der Schwerpunkt der weiteren Arbeiten auf deren Kopplung über Additive mit reaktiven Gruppen gelegt.

1.5 Synthese von Blutgerinnungsinhibitoren (Benzamidin- bzw. Guanidinderivaten als Thrombininhibitoren) und Kopplung an primär funktionalisierte Membranen (3.1.1.4)

Durch die Kopplung von Gerinnungsinhibitoren mit unterschiedlicher Struktur und damit unterschiedlicher Spezifität soll die Membran mit aktiv antithrombogenen Eigenschaften ausgestattet werden. Hierzu wurde der niedermolekulare Inhibitor *p*-amino Benzamidin, der keine Selektivität zwischen den Serinproteasen der Gerinnungskaskade zeigt, immobilisiert. Darauf aufbauend wurde für die Vollblut-Inkubationsversuche ein längerer Inhibitor, der mehr Wechselwirkung mit der Bindungstasche von Thrombin zeigt und dadurch eine höhere Affinität und Spezifität für Thrombin aufweist, synthetisiert (TI2). Im Rahmen der Membranentwicklung wurde ein Arginin-basierter, peptidischer irreversibler Inhibitor von Gerinnungsfaktoren, D-Phe-Pro-Arg-CK (PPACK), immobilisiert. Die Arbeiten dazu sind im Folgenden aufgeführt.

An die präparierten PVP-Modelloberflächen auf SiO₂ Trägern wurde nach Ammoniakplasma-Aktivierung mittels Carbodiimid/N-Hydroxysulfosuccinimid (EDC/Sulfo-NHS) Chemie ein Polyethylenglycol Spacer-Molekül immobilisiert, an das wieder über EDC/NHS-Chemie der direkte Thrombin-Inhibitor Benzamidin immobilisiert wurde. Ein etabliertes Kontrollsystem aus Polypropylen-Maleinsäure-Anhydrid Copolymer (PP-MA) diente als Referenz. Die Anbindung des Spacer-

6

Moleküls und des Inhibitors an PP-MA wurden mit Ellipsometrie verifiziert. Mittels indirekter Immunchemie wurde die Affinität des angebundenen Inhibitors zum Zielmolekül Thrombin geprüft (Abbildung 1).



Abbildung 1: Affinität der Modelloberflächen nach unterschiedlichen Schritten der Immobilisierungsreaktion für Thrombin.

Die erhöhte Thrombin-Affinität der modifizierten Oberfläche im Vergleich zu den Zwischenschritten bewies, dass der Inhibitor erfolgreich immobilisiert wurde und dabei in aktiver Form vorlag. Die vergleichbare Thrombin-Affinität der PVP-Schicht und des etablierten PP-MA Referenzsystems ist ein Hinweis auf vergleichbare Ausbeute.

Wegen der geringen Affinität von Benzamidin zu Thrombin wurden weitere Versuche mit dem irreversiblen Inhibitor D-Phe-Pro-Arg-CK (PPACK) durchgeführt.

In der Regel ist eine Spacer-gekoppelte Immobilisierung von Inhibitormolekülen nötig, um dem Inhibitor ausreichend Flexibilität zur Interaktion mit dem reaktiven Zentrum des Enzyms zu bieten (Abbildung 2). Dem Projektpartner Membrana gelang es, die Integration der Copolymere Vinylpyrrolidon/Acrylat/Lauryl Methacrylat (VP/AA/LMA) und Vinylpyrrolidon/Acrylat (VP/AA) als Träger funktionalisierbarer Carboxylgruppen in die Membran zu integrieren (Tabelle 1). Wegen der hohen Flexibilität der Additive wurde hier auch eine direkte, Spacer-freie Immobilisierung getestet.

Auf beiden Copolymer-Dünnschichten zeigte der PEG-vermittelt immobilisierte Inhibitor PPACK sehr gute Thrombin-hemmende Wirkung. Die Thrombin-Bindung erreichte das theoretische Maximum von ca. 1 Monolage auf der Oberfläche (Abbildung 2B). Diese Thrombin-Bindung wurde annähernd auch bei direkter Immobilisierung von PPACK erreicht (nachgewiesen bei VP/AA) (Abbildung 2B). Die Ergebnisse wurden auch durch direkten Bindungsnachweis von ¹²⁵I konjugiertem Thrombin bestätigt.



Abbildung 2: Immobilisierung von PPACK als Modell-Inhibitor an VP/AA und an VP/AA/LMA Dünnschichten mit und ohne zwischengeschalteten PEG-Spacer. (A): Modellgraphik, (B) Thrombin-Oberflächen-Konzentration errechnet aus dem Abfall der Thrombinaktivität im Medium.

Quantifizierung des immobilisierten PPACK mittels HPLC zeigte bei Immobilisierung an VP/AA ohne PEG eine höhere Oberflächen-Dichte als PPACK bei der Immobilisierung mit PEG (Abbildung 3).



Abbildung 3: Quantifizierung des Oberflächen-immobilisierten PPACK mittels HPLC.

Für die Synthese des langkettigen reversiblen Inhibitors TI2 wurde eine Lösung aus p-amino Benzamidin, 12-(Boc-amino)-dodecanoic acid und DCC in dimethylformamide/pyridine (v/v) gerührt. Der freigesetzte Harnstoff wurde durch Filtration entfernt. Das Boc-geschützte Intermediat wurde in Chloroform/Methanol/Eisessig chromatographisch gereinigt. Es wurde mit HCI in Ethylacetat entschützt, wobei der Inhibitor präzipitierte. Das Produkt hemmt Thrombin (K_i = 101.5 ± 10.3 μ M) und den Gerinnungsfaktor FXa (K_i = 28 ± 5.7 μ M). Es wurde an Membranen zur Testung mit Vollblut (4.1) immobilisiert.

In diesem Projektteil wurde sowohl ein tragfähiges Konzept für die Immobilisierung biologisch aktiver Substanzen aufgezeigt, als auch die Immobilisierung eines biologisch aktiven Moleküls nachgewiesen. Durch den Verzicht auf Spacer-Moleküle ist außerdem eine effiziente Einschritt-Immobilisierung möglich.

1.6 Herstellung von Membranen, die neben den traditionellen Membraneigenschaften speziell aromatische Urämietoxine entfernen können (3.1.1.6)

Die Projektgruppe Charité zeigte durch Verschiebung der Osmolarität während der Dialyse einen sehr effektiven alternativen Weg auf, Urämietoxine aus der Albuminbindung zu lösen und leicht abzudialysieren. Dies wurde für das Endprodukt als effizienter gesehen, so dass auf diese Änderung der Membraneigenschaften verzichtet wurde.

1.7 Immobilisierung von Acetylcystein auf Membranstrukturen (3.1.1.7)

Protokolle zur Immobilisierung von N-Acetylcystein an Sepharose-Gele wurden vom Projektpartner Charité entwickelt. Die Kopplungschemie wurde zur Anbindung an Flachmembranen mit 1% Additiv VP/AA/LMA geringfügig modifiziert: Carboxylgruppen in der Membran wurden mit 50 mM EDC/25 mM NHS aktiviert und Diaminobutan zur Ausbildung einer Amin-funktionalisierten Membran angebunden. Nicht reagierte Bindungsstellen wurden mit 50 mM Glycin-Puffer abgesättigt. Die weitere Anbindung erfolgte nach dem vorgegebenen Kopplungsprotokoll: die Membranen wurden im Kopplungspuffer aus 250 mM KH₂PO₄, pH 5 äquilibriert und 60mM N-Acetyl Cystein mit 50mM EDC im

9

Kopplungspuffer über Nacht an die Membran binden lassen. Die Untersuchung erfolgte im Vollblut-Inkubationstest (4.1).

1.8 Immobilisierung von Leptin auf Membranstrukturen (3.1.1.8)

Die Arbeitsgruppe Charité hat Leptin an Sepharose-Gele immobilisiert und die Wirksamkeit getestet. Die Methodik ist prinzipiell direkt auf die Flachmembranen übertragbar. Wegen der hohen Kosten der Substanz ist jedoch eine klinische Anwendung unrealistisch und wurde auch nicht im Vollblut-Inkubationstest untersucht.

2. Adaption von neuen analytischen Verfahren zur Membrancharakterisierung

Auf Basis der Funktionalisierbarkeit der Copolymer-Schichten wurden beim Projektpartner Membrana die Additive VP/AA/LMA und VP/AA (außerdem Polyacrylsäure und andere) bei unterschiedlichen Prozess-Bedingungen in Flachmembranen integriert. So wurden etwa 150 Flachmembranen mit unterschiedlichen Parametern hergestellt, die hinsichtlich physiko-chemischer Eigenschaften und Konjugierbarkeit zu charakterisieren waren.

Aufgrund der komplexen Membranzusammensetzung und der geringen Zusätze an Additiv (zur Vermeidung von Strukturänderungen wurden max. 1% Additiv zugegeben) waren diese über Röntgen-Photoelektronenspektroskopie nur schwer nachweisbar. Über elektrokinetische Messungen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Additive erfolgreich in die Flachmembranen eingebaut wurden.

Die Verfügbarkeit reaktiver Carboxyl-Gruppen der Additive an der Membranoberfläche ist für die chemische Modifizierung der Membran wichtig. Ihre Oberflächendichte war daher für die verschiedenen Membranen zu quantifizieren. Da sich direkte spektroskopische Methoden aufgrund der komplexen Membranzusammensetzung und der geringen Änderung in der Zusammensetzung durch Zugabe der Additive als ungeeignet erwiesen, wurde versucht, die Carboxylgruppen aus der Gasphase mit Trimethylsilyl Imidazol zu derivatisieren und das eingebrachte Silizium als Fremdatom mittels Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS) nachzuweisen. Die Reproduzierbarkeit der Methode erwies sich jedoch als ungenügend.

Schließlich wurde eine Quantifizierungsmethode entwickelt, in der 5-Aminofluorescein mit der gleichen Kopplungschemie wie die Thrombin-Inhibitoren an die Hydroxysuccinimid-aktivierten Carboxylgruppen des Additivs angebunden werden. Der gebundene Farbstoff wurde auf einem Fluoreszenz-Scanner quantifiziert. Da die gleiche Bindungschemie wie für die relevanten Inhibitormoleküle eingesetzt wurde und das Fluoreszenz-Farbstoff Molekül eine vergleichbare Größe wie die Inhibitoren hat (Aminofluorescein M_r = 347 Da, PPACK M_r = 524 Da), versprechen die Werte der Fluoreszenz-Kopplung eine gute Übertragbarkeit auf die Inhibitor-Kopplung. Die Methodik wurde besonders bezüglich des Auswaschens unspezifisch adsorbierter Farbstoffmoleküle bei verschiedenen Folientypen optimiert.

Der Farbstoff wurde an ein Set Purema H Folien mit dem Additiv VP/AA/LMA gebunden, bei dem die Parameter wie in Tabelle 2 systematisch variiert waren.

Tabelle 2: Folienset mit systematisch variierten Additiv-Konzentrationen und Herstellungsparametern. Alle Folien hatten als Grundpolymer 19% PES, 13,3% PVP; Lösungsmittel NMP

Parameter	Werte
Additiv-Konzentration	0,18% - 0,5% - 1%
Zeit im Dampf-Bad	0 – 30 – 60 s
Zeit im Koagulationsbad	1 – 2 – 3 min
Zeit im Extraktionsbad	1 – 2 – 3 min

Hierbei wurde eine positive Korrelation der Funktionalisierbarkeit mit der Additiv-Konzentration (VP/AA/LMA) und eine nicht signifikante negative Korrelation mit der Zeit in der Dampf-Phase gefunden. Die positive Korrelation von Funktionalisierbarkeit und Additiv-Konzentration bestand für VP/AA/LMA auch bei den übrigen Modifikationen im Herstellungsprozess (Substitution gegen NMP oder gegen PVP), und auch für das Additiv VP/AA. Die Membran mit 1% des Additivs PAA war mechanisch wenig stabil und band weniger Aminofluorescein als die Vergleichsmembran mit 0,5% PAA. Herausragend hohe Immobilisierungsergebnisse wiesen die Membranen mit 1% VP/AA (gegen NMP/H₂O) und 0,5% PAA (gegen PVP) auf (Abbildung 4). Die Additiv-Konzentration war nie im Sättigungsbereich bzgl. der Funktionalisierbarkeit.



Abbildung 4: Funktionalisierbarkeit verschiedener Membranen gemessen über Aminofluorescein-Bindung



Abbildung 5: Thrombin-Hemmung durch PPACK-funktionalisierte Membranen mit unterschiedlichen Additiven und Additiv-Konzentrationen nach 30 min Inkubation in der Thrombin-Lösung.

Ausgewählte Membranen wurden darauf mit PPACK funktionalisiert und ihre Inhibitor-Wirkung bei Inkubation in einer Thrombin-Lösung getestet (Abbildung 4). Nach 30 min Inkubation fand sich eine Graduierung der Inhibitor-Wirkung von der Additiv-Konzentration in der Membran; nach 60 min war in allen Fällen sämtliches Thrombin gehemmt (doppelte Monolagen-Konzentration). 0,5% PAA hatte nur geringe Wirkung, verglichen mit dem Aminofluorescein-Modell.

Die Ergebnisse zeigen, dass Membranen mit den Copolymer-Additiven biologisch aktiv funktionalisierbar sind. Über die Additivkonzentration lässt sich der Grad der Funktionalisierung kontrollieren.

2.1 Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie zur in situ Untersuchung der Ausbildung von Protein-(Trenn-)Schichten an Membranoberflächen (3.1.2.3)

Die konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie wurde am IPF zur in situ Untersuchung der Ausbildung von Protein-(Trenn-)Schichten an Membranoberflächen etabliert. Dabei wurden fluoreszenzkonjugierte Proteine eingesetzt. Die Methode erwies sich als effektiv zur vergleichenden Bewertung der Membranstruktur bzw. Permeierbarkeit verschiedener Membranmaterialien. Routinemessungen wurden über den Projektpartner Membrana von der Firma ZetaSCIENCE durchgeführt.

2.2 Anwendung der konfokalen Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie zur Bestimmung der Endotoxinadsorption und –verteilung in der Membranwand (3.1.2.4)

Grenzflächenphänomene an den Poren von Dialysemembranen verhindern einen Durchtritt von Endotoxinen aus dem Dialysat ins Blut, obwohl ihr Molekulargewicht unter dem Cut-off der Membran liegt. Die Toleranzgrenze für die Endotoxinbelastung des Dialysats in der klinischen Dialyse beträgt 2 EU/mL (CDC 2003). Es war zu prüfen, ob diese Eigenschaft auch bei Verwendung der Additive noch erhalten ist.

Membranen wurden einseitig mit Fluoreszein konjugiertem Endotoxin (bis 1000 EU/mL) in PBS inkubiert. Danach wurde versucht, die Gesamtbeladung mittels eines Fluoreszenz-Scanners oder ein Fluoreszenz-Profil im confokalen Laser-Raster-Mikroskop zu bestimmen. Wegen der Eigenfluoreszenz der

13

Membran war eine Quantifizierung auch bei dieser unrealistisch hohen Endotoxinkonzentration nicht möglich.

Es wurde ein anderes Testsystem entwickelt, um die Endotoxin-Resistenz der Flachmembranen einschätzen zu können: Blutproben durch Flachmembranen von einer 1000 EU/ml Endotoxinlösung in PBS getrennt für 2 Stunden inkubiert und danach die CD11b Expression auf Granulozyten als sensitiver Marker für Endotoxine bestimmt und die Zahl adhärenter Zellen auf der Oberfläche bestimmt. Im Vergleich zur Purema H Membran ohne Additive reduzierten die Additive die Endotoxin-Durchlässigkeit der Membran. Es fand auch keine Akkumulation und Migration der Endotoxine statt, was zu einer erhöhten Zelladhäsion an der



Oberfläche geführt hätte (Abbildung 6).

Abbildung 6: Leukozyten-Aktivierung und Zelladhäsion bei Dialyse-Flachmembranen nach 2 Stunden Inkubation mit 1000 EU/ml bzw. PBS auf der nicht Blut-kontaktierenden Seite.

2.3 Etablierung von in vitro Hämokompatibilitätstests für gerinnungsneutrale Polymermembranen (3.1.2.5)

Beim Projektpartner IPF ist ein Hämokompatibilitäts-Testansatz etabliert, der sich auch zur Testung der funktionalisierten Membranen eignet.¹ Nach der Vollblut-Inkubation wurde jedoch unerwartet eine stark erhöhte Entzündungsaktivierung durch die Membranen beobachtet (s. 4.1), was von den gleichen Substanzen auf

¹ Streller U., Sperling C., Hübner J., Hanke R., Werner C. Design and evaluation of novel blood incubation systems for in vitro hemocompatibility assessment of planar solid surfaces, J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 2003, 66B, 379-390.

Modellschichten nicht bekannt war. Es wurde vermutet, dass dies im Zusammenhang mit der Carbodiimid-Kopplungschemie steht. Durch Vergleich verschiedener Kopplungsmethoden wurde der Einfluss der EDC/NHS-Kopplung auf die Entzündung untersucht. Da vermutet wurde, dass reaktive Substanzen und Zwischenprodukte von der EDC/NHS Aktivierung in der porösen Flachmembran verblieben, wurden Spülschritte mit verschiedenen Inaktivierungslösungen durchgeführt.

Carboxylgruppen auf Modellschichten (hydrolysierte Poly(Propylen-*alt*-Maleinsäure) Copolymer) wurden mit EDC/NHS aktiviert und ein Dummy-Peptid (Lys-Gly-Cys, KCG) angebunden. Vergleichsproben hatten das gleiche Peptid direkt angebunden über den Maleinsäure-Anhydridring (MSA). Die Proben wurden zwei Stunden mit Vollblut inkubiert und die Expression des Aktivierungsmarkers CD11b auf Granulozyten wurde als Entzündungsmarker bestimmt (Abbildung 7). Bei beiden Probenarten war die Entzündungsreaktion im Vergleich zur Positivkontrolle Endotoxin gering. Kopplung mittels EDC/NHS-Chemie führte zu keiner höheren Entzündungsreaktion als die direkte Bindung an den Maleinsäure-Anhydridring. Eine Entzündungsreaktion als prinzipielles Problem der EDC-NHS-Kopplung ist damit ausgeschlossen.



Abbildung 7: Granulozyten-Aktivierung bei 2 Stunden Vollblut-Inkubation mit dem Dummy-Peptid KGC nach Immobilisierung an hydrolysierte Poly(Propylen-alt-Maleinsäure)-Copolymer-Schichten mittels EDC-NHS Chemie oder über den Maleinsäure-Anhydrid-Ring.

Zum Inaktivieren von Reagenzien und zum Blockieren verbleibender reaktiver Gruppen in der Membran wurden folgende Strategien der Nachbehandlungen geprüft:

- 20 mM 2-Mercaptoethanol
- 1 mol/L Ethanolamin, 1h pH 8.5
- 500 mmol/L Glycin pH 8.5



Abbildung 8: Membranen wurden über EDC/NHS Chemie mit BSA (A) oder mit p-amino Benzamidin (B, C) konjugiert und mit PBS oder mit den angegebenen Waschpuffern gespült. Nach zwei Stunden Inkubation der Proben mit Vollblut wurde die adhärente Zellzahl oder Zellaktivierung als Entzündungsparameter bestimmt.

Durch Spülen mit einem Glycin-Puffer konnte die Entzündungsreaktion weitgehend, aber nicht vollständig unterdrückt werden (Abbildung 8). Die Strategie wurde bei der Probenpräparation für die weiteren Vollblut-Inkubationsversuche angewandt.

3. Charakterisierung der Membraneigenschaften durch physikalischchemische Analysenmethoden

Grundcharakterisierung von Modellschichten aus den Membranpolymeren PES und PVP

Die Basis für die Arbeiten zur Biofunktionalisierung der Dialysemembranen war die Präparation und Charakterisierung Modellschichten aus den Membranpolymeren PES und PVP. Hierzu wurden dünne Filme des Membranpolymers PES durch Spin-Coating hergestellt. Für die Schichten wurde ellipsometrisch eine Dicke von ca. 5 nm bestimmt. PVP wurde mit über einen Plasmaprozess auf dünnen Zwischenschichten aus Teflon[®] AF immobilisiert. Für diese Schichten wurde im trockenen Zustand eine Dicke ca. 10 nm ermittelt. Die Schichten wurden in einer Grundcharakterisierung hinsichtlich der Benetzbarkeit (statische und dynamische Kontaktwinkelmessungen), der Elementzusammensetzung (Röntgen-Photoelektronenspektroskopie) und der Ladungsbildung bei Kontakt mit wässrigen Elektrolytlösungen (Strömungspotential- und Strömungsstrommessungen) unterzogen (Tabelle 3).

		Γ
	PES	PVP K90
statischer Kontaktwinkel	(81,4 ± 0,9)°	(63,2 ± 0,9)°
Fortschreitwinkel	(82,2 ± 0,8)°	(72,8 ± 0,8)°
Rückzugswinkel	$(58,8\pm0,9)^\circ$	<22°
Elementzusammen- setzung	100 80 60 40 20 0 C O S N Element	100 100 100 100 100 100 100 100
Isoelektrischer Punkt	3,3	5,2

Tabelle 3: Statische und dynamische Kontaktwinkel, Elementzusammensetzung und isoelektrische Punkte von Modellschichten aus Polyethersulfon (PES) und Polyvinylpyrrolidon (PVP K90)

Hierbei hat sich gezeigt, dass die PES-Schichten eine hydrophobe Charakteristik haben und die Ladungsbildung bei Kontakt der Schichten mit wässrigen Medien aus der Dissoziation einer geringen Anzahl von Säuregruppen und unsymmetrischer Ionenadsorption $(OH^- \gg H_3O^+)^2$ resultiert. Die Röngten-Photoelektronenspektroskopie hat für die PES-Schichten ein gegenüber der theoretischen Elementzusammensetzung deutlich abweichendes Verhältnis der Elemente Kohlenstoff, Sauerstoff, Schwefel und Stickstoff ergeben.

Die PVP-Modellschichten weisen im Gegensatz zu den PES-Schichten eine hydrophilere Charakteristik auf. Über die elektrokinetischen Messungen wurde eine geringe Anzahl an Aminogruppen in der Schicht detektiert. Die Elementzusammensetzung hat eine gute Übereinstimmung mit der für das Polymer erwarteten Zusammensetzung aufgewiesen. Der geringe Fluranteil kann den für die Immobilisierung verwendeten Zwischenschichten aus Teflon[®] AF zugeordnet werden (die Detektionstiefe der Röntgen-Photoelektronenspektroskopie liegt im Bereich der Trockenschichtdicke der immobilisierten PVP-Filme).

Zusammenfassend lässt sich zur Charakterisierung der Modellschichten aus den Membranpolymeren PES und PVP festhalten, dass diese keine ausreichende Anzahl von funktionellen Gruppen für die für Anbindung von Gerinnungsinhibitoren besitzen.

Chemisch funktionalisierte Modellschichten aus PES

Nach der Grundcharakterisierung wurden die PES-Modellschichten mit dem Ziel der Erzeugung von funktionellen Gruppen durch Niederdruck-Plasmabehandlungen modifiziert. Hierzu wurde einerseits ein Sauerstoffplasma zur Erzeugung von Säuregruppen und anderseits ein Ammoniakplasma zur Erzeugung von basischen Oberflächengruppen angewendet. Die modifizierten Schichten wurden analog zu den Ausgangsschichten charakterisiert. Die Kontaktwinkelmessungen haben hierbei eine deutliche Zunahme der Benetzbarkeit (Hydrophilie) ergeben (Tabelle 3). Über die elektrokinetischen Messungen (Strömungspotential und Strömungsstrom) konnte gezeigt werden, dass nach der Behandlung der Filme mit einem Sauerstoffplasma eine deutliche Zunahme der Anzahl an Säuregruppen (Carboxyl- und Sulfonatgruppen) an der Schicht

² Zimmermann R., Freudenberg U., Schweiß R., Küttner D., Werner C. Hydroxide and hydronium ion adsorption – A survey, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2010,15, 196-202.

vorhanden ist. Umgekehrt hat die Behandlung mit dem Ammoniakplasma die Einführung von basischen Oberflächengruppen (Amminogruppen) zu Folge.

Tabelle 4: Statische und dynamische Kontaktwinkel und isoelektrischer Punkt von Modellschichten aus Polyethersulfon nach der Behandlung der Schichten mit einem Ammoniakplasma und einem Sauerstoffplasma

	Ammoniakplasma	Sauerstoffplasma
statischer Kontaktwinkel	(37,5 ± 0,5)°	(31,1 ± 0,7)°
Fortschreitwinkel	(39,7 ± 1,1)°	(33,9 ± 1,3)°
Rückzugswinkel	(17,0 ± 1,0)°	(15,0 ± 0,5)°
Isoelektrischer Punkt (PES unbehandelt: IEP = 3,3)	6,7	~1,6



Abbildung 9: Elementzusammensetzung von dünnen Modellschichten aus Polyethersulfon nach der Schichtpräparation (grün) sowie nach der Behandlung der Schichten mit einem Ammoniakplasma (blau) und einem Sauerstoffplasma (rot)

Dieser Befund wurde auch durch Ergebnisse der Röntgen-Photoelektronenspektroskopie bestätigt. Die Zunahme des Anteils an Stickstoff bzw. Sauerstoff nach der Behandlung mit einem Ammoniak- bzw. Sauerstoffplasma korreliert sehr gut mit der gegenüber den Ausgangsschichten gefundenen Verschiebung des isoelektrischen Punkts. Damit wurde der Nachweis für die erfolgreiche Anwendung der Plasmaprozesse für die Funktionalisierung der Schichten aus dem Membranpolymer PES erbracht.

Schichten aus Vinylpyrrolidon-Copolymeren

Die über Plasma- und Spin-Coatingprozesse hergestellten Schichten der Copolymere VP/AA/LMA und VP/AA wurden analog zu den Schichten aus den Membranpolymeren PES und PVP charakterisiert (Tabelle 5).

Tabelle 5: Statische und dynamische Kontaktwinkel, Elementzusammensetzung (Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff) und isoelektrischer Punkt von Modellschichten aus VP/AA/LMA und VP/AA

	VP/AA/LMA	VP/AA
	(80,5 ± 1,8)°	(61,9 ± 4,7)°
statischer		
Kontaktwinkel		
Fortschreitwinkel	(83,6 ± 1,3)°	(72,6 ± 2,7)°
Rückzugswinkel	<26°	<22°
Elementzusammen-	[C : N] _{theor.} = 11	[C : N] _{theor.} = 7
setzung	[C : N] _{exp.} = 11,9	[C : N] _{exp.} = 9,4
Isoelektrischer Punkt	3,8	3,6

Ellipsometrisch wurde für die Schichten eine Trockenschichtdicke von ca. 10 nm bestimmt. Über statische und dynamische Kontaktwinkelmessungen wurde festgestellt, dass VP/AA/LMA eine gegenüber PVP und VP/AA eine hydrophobere Charakteristik hat (vgl. Tabelle 2 und Tabelle 5). Die Röntgen-

Photoelektronenspektroskopie hat für die Schichten aus VP/AA ein gegenüber der theoretischen Elementzusammensetzung deutlich abweichendes Verhältnis der Elemente Kohlenstoff, Sauerstoff, Schwefel und Stickstoff ergeben. Die Ursachen hierfür konnten nicht eindeutig geklärt werden. Er wird angenommen, dass diese aus dem Herstellungsprozess resultieren. Die über die elektrokinetischen Messungen bestimmten niedrigen isoelektrischen Punkte beider Schichten (Tabelle 5) können eindeutig den Carbonsäuren der Copolymere zugeordnet werden. Damit erfüllen diese Schichten ebenfalls die Voraussetzung für die kovalente Ankopplung von Gerinnungsinhibitoren.

Schichten aus sulfoniertem Polyethersulfon

SPES wird für spezielle Anwendungen zur Hydrophilierung der Membranen eingesetzt. Aus diesem Grund wurden dünnen Schichten des Polymers (ca. 5 nm dick) durch Spin-Coating auf Siliziumträgern hergestellt und analog zu den anderen Schichten charakterisiert. Die Filme weisen eine hydrophile Charakteristik auf (statischer Kontaktwinkel: $(53,1 \pm 4,9)^{\circ}$, Fortschreitwinkel: $(66,3 \pm 3,0)^{\circ}$, Rückzugswinkel: < 22°). Der isoelektrische Punkt der Schichten wurde bei pH 1.4 gefunden und resultiert aus einer hohen Anzahl von Sulfonatgruppen an der Polymeroberfläche. Über die Röntgen-Photoelektronenspektroskopie wurde festgestellt, dass weniger als jede zweite Wiederholeinheit des Polymers sulfoniert ist.

3.1 Chemische Funktionalisierung der Membranen auf verschiedenen Wegen (3.1.1.4)

Funktionalisierung durch Plasmabehandlung

PES-Flachmembranen wurden mit Hilfe des auf Basis der Modellschichten etablierten Plasmaprozesses funktionalisiert. Der über Röntgen-Photoelektronenspektroskopie für beide Membranseiten nachgewiesene Eintrag von Sauerstoff bzw. Stickstoff deutet auf die erfolgreiche Modifizierung der Membranoberfläche hin (vgl. Abbildung 10). Aufgrund negativer Befunde bei der Immobilisierung von Gerinnungsinhibitoren wurde diese Strategie nicht weiter

21

verfolgt. Stattdessen wurde der Scherpunkt der Arbeiten zur Funktionalisierung der Membranen auf den Einbau der Vinylpyrrolidon-Colylymere gelegt (Tabelle 1).



Abbildung 10: Elementzusammensetzung einer PES-Flachmembran vor und nach der Behandlung der Membran mit einem Ammoniakplasma (blau) und einem Sauerstoffplasma (rot)

Funktionalisierung durch Einbau von Additiven mit funktionellen Gruppen

Auf Basis der nachgewiesenen Funktionalisierbarkeit der Copolymer-Schichten wurden beim Projektpartner Membrana die Additive VP/AA/LMA und VP/AA Polyacrylsäure bei unterschiedlichen (außerdem und andere) Prozess-Bedingungen und Nachbehandlungsschritten in Flachmembranen integriert. Die Membranen wurden hinsichtlich der Elementzusammensetzung (Röntgen-Photoelektronenspektroskopie) und der Ladungsbildung bei Kontakt mit wässrigen Elektrolytlösungen (Strömungspotential-Strömungsstrommessungen) und charakterisiert. Diese Ergebnisse der an zahlreichen Probenserien durchgeführten Messungen bildeten die Grundlage für die Festlegung von optimalen Bedingungen für Funktionalisierung der Membranen. Nachfolgend werden exemplarisch einige Ergebnisse dargestellt und diskutiert.

Zur Vermeidung von Strukturänderungen wurden in den Membranen max. 1% PVP durch das entsprechende Additiv ersetzt. Hierdurch konnten die Änderungen in der Membranzusammensetzung nur sehr schwer über Röntgen-Photoelektronenspektroskopie nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 11). Dennoch waren Trends aus den erhobenen Daten ablesbar.



Abbildung 11: Elementzusammensetzung von unterschiedlich modifizierten PUREMA H Flachmembranen, Additive: VP/AA/LMA und SPES, Zugabe der Additive in die Polymerlösung

Mit Hilfe der elektrokinetischen Messungen konnte gezeigt werden, dass die Copolymere erfolgreich in die Flachmembranen eingebaut wurden. Für die Referenzmembran wurde eine für Oberflächen mit dissoziationsfähigen sauren Gruppen typische Charakteristik gefunden, die auf die Anwesenheit von Sulfonatgruppen an der Membranoberfläche hindeutet. Dieser Befund wurde mittels hochauflösender Röntgen-Photoelektronenspektroskopie an gefriergetrockneten Membranen bestätigt. Der Einbau von VP/AA/LMA und VP/AA in die Membran bewirkte im Bereich zwischen pH 4 und 6 einen deutlichen Anstieg des Zeta-Potentials, der auf die Ionisierung der Carboxylgruppen des Additivs zurückgeführt werden kann. Damit wurde nachgewiesen, dass die Membranen durch den Einbau von Copolymeren erfolgreich für die nachfolgende Ankopplung von Gerinnungsinhibitoren funktionalisiert werden können. Während des Optimierungsprozesses hat sich herausgestellt, dass die beste Funktionalisierung der Membranen bei Zugabe der Copolymere in die Polymerlösung erzielt wird (gegenüber Zugabe ins Koagulationsbad).

4. Bewertung der Membraneigenschaften im Kontakt mit Biofluids: Proteinadsorption in vitro, Blutkompatibilitätsparameter und zellbiochemischer Analytik

Nach den Untersuchungen mit Thrombin Modell-Lösungen (s. 1.7) wurde ein Plasma-Gerinnungstest durchgeführt. Dieser Test erlaubt es, gleichzeitig die Aktivierung von Gerinnungsprozessen an den Oberflächen, sowie das inhibitorische Thrombinbindungspotential in einem anwendungsnahen Test zu bestimmen. Die verwendeten Proben wurden 5 min lang mit humanem Blutplasma inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Aktivität des Blutgerinnungsenzyms Thrombin, also indirekt die Zeitdauer bis zur Gerinnung, bestimmt.

Es wurden die folgenden, zum damaligen Zeitpunkt verfügbaren Membranen getestet: Membran 1 diente als Referenz, hier erfolgte keine Immobilisierung des Thrombininhibitors PPACK. Alle anderen Proben wurden ohne PEG-Spacer mit PPACK beschichtet.

- 1. Referenz: Purema H + 1% VP/AA/LMA ohne PPACK
- 2. Purema H + 0,18% VP/AA/LMA (in Polymerlösung)
- 3. Purema H + 0,18% VP/AA/LMA (im Fällungsbad)
- 4. Purema H + 0,5% VP/AA/LMA (in Polymerlösung)
- 5. Purema H + 1% VP/AA/LMA (in Polymerlösung)

Nach der Immobilisierung wurde entweder mit HCI (0.01 M) oder mit Trispuffer pH 7.4 gespült. Die Aktivität von Thrombin wurde nach einer Inkubationszeit von 5 min mit Blutplasma durch den Zusatz eines fluorogenen Substrates kinetisch bestimmt. Es wurde die Zeit bis zum Einsetzen der Gerinnung (Überschreitung eines vordefinierten Schwellenwertes) ausgewertet.



Abbildung 12: Gerinnungszeit von humanem Citratplasma nach der Inkubation mit Purema H modifiziert mit variablen Mengen an VP/AA/LMA (0,18; 0,5 bzw. 1%) sowie nachfolgender Immobilisierung des Thrombininhibitors PPACK, Spülung der Proben nach Immobilisierung mit Trispuffer

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse des Gerinnungstests für die Proben (Spülung mit Trispuffer) dargestellt. Die Aktivierung der Gerinnung war bei der Referenzprobe am stärksten. Bei dieser Probe lag die Gerinnungszeit bei $20,2 \pm 3,7$ min. Durch den Zusatz von 0,18% VP/AA/LMA konnte einer Verlängerung der Gerinnungszeit auf 32 min erreicht werden. Der Zeitpunkt der Zugabe von VP/AA/LMA (in der Polymerlösung oder im Fällungsbad) wirkte sich bei diesem Test nicht auf die Aktivierung der Gerinnung aus. Bei einer Erhöhung des Zusatzes von VP/AA/LMA konnte keine Verlängerung, sondern eine leichte Verringerung der Gerinnungszeit beobachtet werden. Die geringste Aktivierung der Gerinnung, also die längste Gerinnungszeit, wurde bei der Probe mit 1% Zusatz von VP/AA/LMA beobachtet werden ($36,1 \pm 3,8$ min). Die Ergebnisse für die Proben nach der Spülung mit HCI entsprechen in ihren Tendenzen denen nach der Spülung mit Trispuffer.

4.1 Hämokompatibilitätsuntersuchungen an den Membranproben, teilweise unter Nutzung der im Rahmen des Projektes adaptierten Methoden (3.1.4.2)

Auf Basis der erfolgreichen Thrombin-Hemmung der funktionalisierten Membranen wurden diese in einem im IPF etablierten Vollblut-Inkubationsversuch auf die Wirksamkeit im komplexen System untersucht. Dazu wurden Membranen mit Additiven VP/AA und VP/AA/LMA (1%) mit dem irreversiblen Inhibitor PPACK und mit dem reversiblen Inhibitor *p*-amino-Benzamidin funktionalisiert und für zwei Stunden mit heparinisiertem Vollblut (2 U/ml), 2 ml/6 cm² bei 37°C inkubiert. Danach wurden auf den Oberflächen und im Blutvolumen zelluläre und humorale Parameter der Hämostase und der Entzündung erhoben.



Abbildung 13: Humorale (Thrombin-Antithrombin-Komplex) und zelluläre (Plättchenfaktor 4 Freisetzung) Parameter der Hämostase nach zwei Stunden Inkubation der funktionalisierten Membranen mit Vollblut.

Die plasmatische Gerinnungsaktivierung (Thrombin-Antithrombin-Komplex) war in allen Fällen niedrig. Die Immobilisierung des irreversiblen Gerinnungshemmers PPACK oder des schwachen reversiblen Inhibitors Benzamidin führte dabei zu keiner konsistenten Hemmung der plasmatischen Gerinnung. Die Plättchenaktivierung (Plättchenfaktor 4 Freisetzung) war an den modifizierten Membranen höher als an den nativen Membranen (Abbildung 13).



Abbildung 14: Parameter der zellulären (links: CD11b Expression auf Granulozyten) und der humoralen (rechts: Complement-Aktivierung, C5a-Bildung) Entzündung nach 2 Stunden Vollblut-Inkubation der Membranen.

Zur Einschätzung der Entzündungsaktivierung wurde das oberflächengebundene Komplementfragment C3b und das lösliche Fragment C5a, ferner die Expression des Aktivierungsmarkers CD11b auf Monozyten und Granulozyten in der Blutphase und Rückgang der Leukozytenzahl während der Inkubation als Hinweis auf Oberflächenadhäsion bestimmt. Beispielhaft sind C5a (Abbildung 14 links) für die humorale Entzündungsreaktion und Granulozyten-CD11b (Abbildung 14 rechts) für die zelluläre Entzündungsreaktion präsentiert.

Die Inhibitor-funktionalisierten Membranen führten zu einer deutlich höheren Komplementaktivierung als die Ausgangsmembranen. Die Leukozytenaktivierung zeigte das gleiche Aktivitätsmuster wie die Komplementaktivierung, was mit der hohen Empfindlichkeit von Mono- und Granulozyten für das C5a-Fragment erklärt werden kann.



Abbildung 15: Humorale (Thrombin-Antithrombin-Komplex) und zelluläre (Plättchenfaktor 4 Freisetzung) Parameter der Hämostase nach zwei Stunden Inkubation der funktionalisierten Membranen mit Vollblut. Alle Membranen waren mit Glycinpuffer gespült. Glas und PTFE wurden als Referenzmaterialien mitgeführt.

Für einen weiteren Vollblut-Inkubationsversuch wurden 1% VP/AA/LMA-Membranen mit *p*-amino-Benzamidin, mit einem erprobten, im IPF entwickelten langkettigen Benzamidin-basierten Inhibitor (TI2) (s. 1.7) und N-acetyl-Cystein nach Entwicklungen des Projektpartners Charité funktionalisiert. Die Inkubation wurde zu den gleichen Bedingungen wie zuvor durchgeführt.

Wie im Vorversuch war die Gerinnungsaktivierung an den Membranen gering, die Immobilisierung von Inhibitoren brachte jedoch keinen Vorteil. Die Immobilisierung von N-acetyl-Cystein führte zu erhöhter Aktivierung plasmatischer und zellulärer Hämostaseprozesse (Abbildung 15).



Abbildung 16: Parameter der zellulären und der humoralen Entzündung nach 2 Stunden Vollblut-Inkubation der Membranen. Alle Membranen waren mit Glycinpuffer gespült. Glas und PTFE wurden als Referenzmaterialien mitgeführt.

Die Entzündungsreaktionen an den Membranen wiesen keinen klaren Trend für die Membranen mit den unterschiedlichen Funktionalisierungen auf, immobilisiertes N-acetyl-Cystein führte jedoch zur stärksten Entzündungsaktivierung (Abbildung 16).

Abschlussbericht zum Aufstockungsantrag zum Projekt

Molekulare Steuerung von Trenneigenschaften und Biokompatibilität an Polymermembranen für medizinische Anwendungen (MOST)

für die Beschaffung eines Transmissions-Elektronenmikroskops (TEM) am Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V. (IPF)

Verwendung des Mikroskops

Da die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) sowie eine entsprechende Probepräparation sehr aufwendig und kompliziert sind, erfolgte die Inbetriebnahme und Nutzung des Mikroskops in teilweise parallel verlaufenden Abschnitten:

1) Einweisung und Einarbeitung der Mitarbeiter in die Bedienung des Mikroskops und Grundlagen der TEM

- 2) Test- und Übungsmessungen an Modellproben
- 3) Einweisung und Einarbeitung der Mitarbeiter in fortgeschrittene Mikroskopie
- 4) Entwicklung und Optimierung der Probenpräparation
- 5) Untersuchung der realen projektbezogenen Proben

Ad 1) Ein wissenschaftlicher Mitarbeiter mit langjähriger Erfahrung im Umgang mit TEM wurde für das Projekt eingestellt. Er wies vorwiegend Kenntnisse auf im Umgang mit der Mikroskopie an festen Stoffen und mit der Bedienung von Mikroskopen anderer Hersteller, sodass eine gewisse Einarbeitungszeit notwendig war. Anstelle des beantragten Forschungsingenieurs wurde ein technischer Mitarbeiter eingestellt, der im Umgang mit dem Mikroskop sehr erfahren war. Weiterhin wurden zwei Doktoranden in die Bedienung des Mikroskops und die Grundlagen der Mikroskopie eingewiesen.

Ad 2) Abbildung der Einzelmoleküle und Proteine ist eine äußerst schwierige Aufgabe. Deswegen wurden zunächst Systeme und Modellproben untersucht, die einfach abgebildet werden können und deren Abbildungen eindeutig interpretiert werden können, z.B. (biokompatible) Polymere mit anorganischen Füllstoffen, nanostrukturierte Membranen mit großem Kontrast im Bild (Beispiele in Abb. 1). Die Leistung des Mikroskops wurde durch die Abbildung anorganischer Nanoteilchen und Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS) an Kalibrierungsstandards durchgeführt (Beispiele in Abb. 2).

Ad 3) Fortgeschrittene Mikroskopietechniken, wie z.B. energiegefilterte Abbildung, Spektroskopie, Tomographie und cryo-TEM können nicht durch Einweisung vom Hersteller des Mikroskops erlernt werden und erfordern Selbststudium und viele Versuche an geeigneten Proben. Bisher wurden diese Techniken nur an Modellproben angewendet (Beispiele in Abb. 4).

Ad 4) Reine Polymerproben, Polymerkomposite und biologische Proben wurden mittels Ultramikrotomie (schneiden ca. 50 nm bis 100 nm dünnen Schnitte mit einem Diamantmesser) hergestellt. Da die jeweiligen Proben sehr unterschiedliche mechanische Eigenschaften haben, müssen für jede Probenart und jedes Probenmaterial optimale Schneideparameter (Probentemperatur, Messertemperatur, Schneidegeschwindigkeit, Vorschub des Messers) empirisch gefunden werden.

Erfolgreich geschnittene Proben zeigen häufig trotzdem nur sehr geringen Kontrast in TEM und müssen daher mit geeigneten Chemikalien kontrastiert werden. Die Chemikalie und Dauer und Art der Kontrastierung (Lösung oder Dämpfe) müssen ebenfalls empirisch gefunden werden. (Beispiele in Abb. 4)

Ad 5) Nach ausreichender Anzahl von Testmessungen, Übungsmessungen und Optimierung der Probepräparation konnten projektbezogene Proben untersucht werden und zuverlässige Ergebnisse erzielt werden, die die wissenschaftliche Schlussfolgerungen aus anderen Messmethoden untermauern und ergänzen. Nach Ablauf der Förderperiode des Projekts wurde das TEM für zahlreiche andere BMBF-. DFG- und hausinterne Projekte verwendet. Dabei wurden mittels TEM Erkenntnisse über Proben, Materialien, Herstellungsprozesse und grundlegende physikalische und chemische Mechanismen gewonnen. Diese sind mit keiner anderen Methode erreichbar oder müssen sehr umständlich, kostspielig und in viel geringerem Ausmaß mit Hilfe von TEMs anderer Forschungseinrichtungen oder Dienstleistungsfirmen gewonnen werden.

Verlauf der Inbetriebnahme und Nutzung

04/2008 - 08/2008	Durch die Investition von ca. 500.000 Euro hat das IPF für das TEM einen speziellen Raum gebaut, der die strengen Anforderungen für den Betrieb des TEMs erfüllt
29.09.2008	Lieferung des Mikroskops
10/2008 - 11/2008	Aufbau des Mikroskops
19.11.2008 - 21.11.2008	Abnahmetest, nicht alle Tests bestanden
12/2008 - 01/2009	Nachbesserung des Mikroskops, Einweisung von 4 Mitarbeitern in die Grundlagen der
15.01.2009	Sicherheitsprüfung durch den TÜV
29.01.2009 - 30.01.2009	Abnahmetest, alle Tests bestanden
02/2009 - 03/2009	Testbetrieb
11.03.2009	Genehmigung für den Einsatz des Mikroskops durch die Landesdirektion Dresden, Abteilung Arbeitschutz
01.04.2009 - 03.04.2009	Einweisung von 4 Mitarbeitern in fortgeschrittene Bedienung des Mikroskops
04/2009 - 05/2009	Einweisung weiterer 5 Nutzer
04/2009 – 12/2010	wissenschaftliche Nutzung des Mikroskops für das MOST Projekt, teilweise auch für andere Projekte (z. B. BMBF- Projekte: ENEFEL, OPA, MoRe PTFE, SIMKON, CarboTube, CarboDis, ELAGRA, COMPOMEL, ELASTO; DFG-Projekte)

Nutzungsstatistik

Die Nutzugszeit des Mikroskops lag bei ca. 1800 Stunden im Jahr, wobei ca. 20 Tage pro Jahr das Mikroskop wegen Defekte und technischen Probleme außer Betrieb war, weitere 60 Tage pro Jahr war das Mikroskop wegen technischen Schwierigkeiten eingeschränkt nutzbar. Jährlich wurden ca. 700 Proben untersucht, Tendenz steigend. Nach dem Beenden der Förderperiode für das Projekt MOST wurden weitere 36 Mitarbeiter, Doktoranden und Diplomanden in die Bedienung des Mikroskops und die Probenpräparation eingewiesen und werden ständig betreut.



Dispersion und strukturelle Unterschiede verschiedener Rußtypen in EPDM-Matrix



Morphologie einer nanostrukturierten Dünnfilmmembrane aus PS-PVP block-copolymer (Inset zeigt Fouriertransformierte des Bildes)

Abb. 1: Beispiel der Untersuchungen an Test- und Modellproben



Abb. 2: Beispiel der Test der Leistung des Mirkoskops





Farbig dargestellte Vertilung der Elemente C, N, Ti



Abb. 3a: Beispiel der Verwendung von energiegefiterter Abbildung einer 20 Mikrometer großen Mikrokapsel.



Abb. 3b: Beispiel der Verwendung von Energieverlustspektroskopie an der Sauersoff K-Kante in Zwei verschiedenen stoffen.



Falsch gewählte Schneideparameter führen zum Zerreißen der Schnitte und zu ungleichmäßig dicken Schichten.

Richtig gewählte Schneideparameter führen zur Schnitte mit relativ kleiner Variation der Schnittdicke

Abb. 4a: Beispiel der Entwicklung und Optimierung der Probenpräparation







Kristalline bereiche in elektronenbestrahlten PE werden nur durch Kontrastieren des Probenblocks mit RuO4 sichtbar.

Abb. 4b: Beispiel der Entwicklung und Optimierung der Probenpräparation





Querschnitt und Aufsicht einer Membrane im TEM und Rasterelektronenmikroskop (REM)

Abb 5a. Beispiel einer Projektbezogener Untersuchung.



Abbildung einer Osteoblastischen Zelle und Details der Kollagenfasern und Mitochondrie. Diese Abbildung entstand mit Hilfe von Dr. Jean-Marc Verbavatz, MPI-CBG Dresden. Das energiegefilterte Bild ist der Beweis, dass die in der einfacher Abbildung dunklen Stellen mit Kalcium angereichert sind.

Abb 5b. Beispiel einer Projektbezogener Untersuchung.