



Institut für ImplantatTechnologie
und Biomaterialien e.V.

Warnemünde

A large, blue-tinted background image showing a person in a white lab coat looking through a microscope. The image is slightly blurred and has a curved, wave-like border at the top. In the bottom left corner, there is a close-up of a multi-well plate with several wells containing blue liquid.

Forschungsinfrastrukturen
Methodenspektrum
Technologieplattformen



Wissenschaftliche Erkenntnisse sind die Grundlage für technischen Fortschritt und damit auch entscheidend für den Wohlstand in unserer Gesellschaft. Die erfolgreiche Umsetzung von Wissen in wettbewerbsfähige Produkte ist in entscheidendem Maße vom Engagement und dem Können der Menschen abhängig, die in Wissenschaft und Wirtschaft tätig sind. Dabei werden sie von der Landesregierung MECKLENBURG VORPOMMERN durch solche Rahmenbedingungen unterstützt, die geeignet sind, nachhaltiges Wirtschaftswachstum zu generieren und mehr sozialversicherungspflichtige Beschäftigung im Land zu ermöglichen.

Vor diesem Hintergrund besitzt die Förderung von Forschung, Entwicklung und Innovation im Ministerium für Wirtschaft, Bau und Tourismus Priorität.

Ziel aller Bemühungen muss es sein, und davon bin ich fest überzeugt, dass es nicht bei Ideen und Konzepten bleibt. Von Ideen und Konzepten allein kann niemand leben, auch keine Volkswirtschaft. Innovation und Kreativität muss sich in Form von marktfähigen Produkten und Dienstleistungen im Alltag auch beweisen. Wir brauchen mehr innovative Wertschöpfung im eigenen Land. Wir brauchen mehr eigene wissensbasierte Arbeitsplätze.

Mit dem Ziel, Forschung und Entwicklung in den Unternehmen des Landes zu befördern, wurde in 2010 der Technologie- und Innovationskreis Wirtschaft - Wissenschaft (TIWW) gegründet. Der TIWW, in dem u.a. die Hochschulen sowie alle relevanten wirtschaftsnahen Forschungseinrichtungen des Landes vertreten sind, hat im Rahmen einer Stärken- und Schwächenanalyse sowohl der Wirtschaft als auch der Wissenschaft in unserem Land industrielle Zukunftsfelder für eine zukünftige Technologie- und Industriepolitik definiert, die nachhaltige Entwicklungschancen bieten und zielgenau weiterentwickelt werden. Der Bereich der Medizintechnik und Biotechnologie wurde als ein besonderer Schwerpunkt mit internationalem Marktpotenzial herausgearbeitet. Hier ist exzellentes wissenschaftliches und unternehmerisches Potenzial im Land vorhanden.

Gesundheit, Wissenschaft und Wirtschaft sind keine Gegensätze. Vielmehr bedingen sie einander.

Der IIB e.V. ist mit seinem auf die biomedizinische Wirtschaft ausgerichteten Profil schon heute ein anerkannter Kompetenzträger der Forschungs- und Transfertätigkeit in MECKLENBURG VORPOMMERN. Die vom Institut durchgeführten Forschungstätigkeiten auf den

Gebieten der Biomaterialtestung, Implantatentwicklung, Biomechanik und Sensorik unterstützen insbesondere kleine und mittelständische Unternehmen in der Region, denen eigene wissenschaftliche Kapazitäten fehlen oder das Vorhalten entsprechender Kapazitäten schwer fällt. So übernimmt das als selbständige Einheit am IIB e.V. vorgehaltene und unabhängige Prüflabor für Produkte aus der Kardiologie und vaskulären Medizin wissenschaftliche Prüfaufgaben im Rahmen von Dienstleistungen für die Zulassung von Medizinprodukten und Schadensgutachten.

Die im IIB e.V. tätigen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler leisten gemeinsam mit Herrn Prof. Dr. Schmitz, Vorstandsvorsitzender des IIB e.V., eine international anerkannte Arbeit bei der Initiierung und Durchführung von exzellenten Verbundforschungsvorhaben, wie z.B. REMEDIS und Thera Nova. Die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler des IIB e.V. unterstützen Unternehmen unseres Lan-

des bei Forschung und Entwicklung und sind so oftmals Auslöser für innovative und erfolgversprechende Projekte. Hier wird heute bereits mehr geleistet als aus Geld Wissen zu generieren. Hier mündet Wissen in innovative Produkte und damit in Arbeit und Wohlstand. Ein wie ich meine, nicht hoch genug zu schätzender Wert. Dies muss uns in dieser Art und Weise im Land wesentlich öfter gelingen!

Das Ihnen vorliegende Material bietet einen Einblick in die wissenschaftliche Expertise, in die Methoden und die Infrastruktur und damit in das Leistungsspektrum des IIB e.V. Es soll Ihnen Anregung zu neuen innovativen Projekten im Land Mecklenburg-Vorpommern geben.

Wenn Wissen genutzt wird, um zukunftsorientierte Arbeitsplätze in unserem Land zu schaffen und zu sichern, können Sie stets der bestmöglichen Unterstützung durch das Ministerium für Wirtschaft, Bau und Tourismus und meiner persönlichen Unterstützung sicher sein.

Dr. Stefan Rudolph

Staatssekretär im Ministerium

für Wirtschaft, Bau und Tourismus

MECKLENBURG VORPOMMERN



Inhalt

Grußwort.....	2
Inhalt	4
1 Kurzprofil IIB e.V.....	7
2 Forschungsfelder und Projekte.....	8
2.1 Implantattechnologie.....	9
2.2 Biomaterialien und Polymerchemie	17
2.3 Biologische Prüfung von Materialien und Implantaten.....	20
2.4 Entwicklung von Messverfahren und Spezialgeräten	23
2.5 Mikro- und Nanostrukturanalytik	25
3 Leistungsangebote an die regionale Wirtschaft.....	31
4 Speziallabore und Geräteausstattung.....	33
4.1 Speziallabore	33
4.2 Mess- und Analysetechnik	35
4.3 Zell- und Molekularbiologie	37
4.4 Präparationstechnik	37
4.5 Werkstoffprüfung.....	38
4.6 Implantattechnologie	39



1 Kurzprofil IIB e.V.

Im Land Mecklenburg-Vorpommern sind in den letzten Jahren auf Initiative von Universitätsprofessoren eine Reihe außeruniversitärer, hochschulnaher gemeinnütziger Forschungseinrichtungen entstanden, die insbesondere eng mit der regionalen Wirtschaft zusammenarbeiten. Das Institut für ImplantatTechnologie und Biomaterialien e.V. (IIB e.V.) wurde im Zuge dieser Entwicklung am 10. Juni 1996 als gemeinnützige, außeruniversitäre, wirtschaftsnahe Forschungseinrichtung gegründet. Im IIB e.V. sind seitdem ca. 6-8 Mitarbeiter beschäftigt. Der IIB e.V. verfügt im Forschungszentrum Biosystemtechnik und Biomaterialien der Hansestadt Rostock über modern ausgestattete Laborräume und Forschungsgeräte. Der IIB e.V. hat sich in den letzten Jahren auf dem biomedizinischen Forschungsmarkt etabliert, insbesondere durch wissenschaftliche Kooperation, Drittmittelinwerbung und Auftragsforschung für Unternehmen.

Der IIB e.V. hat sich zum Ziel gesetzt, die Forschung und Entwicklung auf dem Gebiet der biomedizinischen Technik zu fördern. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) der Universität Rostock ist der IIB e.V. Partner des BMBF-Spitzenforschungsprojektes REMEDIS sowie Kooperationspartner weiterer Drittmittelprojekte. Der IIB e.V. verfügt über langjährige Erfahrungen auf den Gebieten der Biomaterialtestung, Implantatentwicklung, Biomechanik und Sensorik. Die Forschung konzentriert sich auf die folgenden Bereiche:

- Stentsysteme für die Kardiologie, Radiologie, Urologie und Gastroenterologie
- Orthopädische Endoprothetik
- Ophthalmologische Implantate: Intraokulare Linsen, Drainagesysteme
- Elektrostimulationselektroden für die Kardiologie, HNO, Neurologie
- Biomaterialien und Implantate für die Zahnheilkunde
- Bioresorbierbare Materialien
- Biofunktionalisierte Implantatoberflächen – Drug-Delivery-Systeme

Auf dem Gebiet der Testung von Medizinprodukten, insbesondere Stent- und Kathetersystemen, werden am IIB e.V. Untersuchungsmethoden und Prüfstände entwickelt, die für das wissenschaftliche Verständnis insbesondere von biomechanischen Zusammenhängen wertvoll sind. Sie bieten damit die Grundlage für Implantatentwicklungen, aber auch für die Qualitätssicherung im Sinne des Medizinproduktegesetzes. In diesem Zusammenhang wurde am IIB e.V. das Prüflabor für Cardio+Vaskuläre Produkte aufgebaut, welches wissenschaftliche Prüfaufgaben im Rahmen von Dienstleistungen für die Zulassung von Medizinprodukten übernimmt. Die Arbeit des Prüflabors für Cardio+Vaskuläre Produkte hat dabei für Kunden aus der internationalen Medizinprodukteindustrie eine überregionale Ausstrahlungskraft. An der Universität Rostock ist das kooperierende Institut für Biomedizinische Technik erfolgreich auf dem Gebiet der Biomaterialforschung und Implantattechnologie tätig und versteht sich als Brückeninstitut zwischen Medizin, Ingenieur- und Naturwissenschaften. Forschungsschwerpunkte sind die Entwicklung von permanenten und abbaubaren Implantaten, insbesondere Stents. Ein Schwerpunkt der Forschungstätigkeit ist die Entwicklung neuer Implantatplattformen auf Basis von fluid-, strukturmechanischen und werkstofftechnischen Optimierungen der Implantatstrukturen. Weitere Expertisen bestehen auf den Gebieten der Implantatstrukturierung und Fertigung sowie der Implantatbeschichtung. Grundlage hierfür ist der etablierte Arbeitsschwerpunkt der chemischen Oberflächenmodifikation und Synthesechemie für die Material- und Oberflächengenerierung. Etabliert wurden darüber hinaus GLP-zertifizierte Labore zur *in vitro* und *in vivo* Biokompatibilitätsprüfung. Der IIB e.V. ist Partner des Kompetenzzentrums für Biomaterialien Rostock (KBR) sowie des Forschungszentrums für Biomedizintechnik (FBMT) als fakultätsübergreifende zentrale wissenschaftliche Einrichtung der Universität Rostock.



2 Forschungsfelder und Projekte

Der IIB e.V. ist integraler Bestandteil der Biomedizintechnik-Infrastruktur des Landes M-V. Gemeinsam mit dem IBMT der Universität Rostock ist er Projektpartner des TF-MV-Projektes „Grundlagenuntersuchungen zur Entwicklung neuer permanenter und abbaubarer Stentplattformen und Local-Drug-Delivery-Systeme“ und des BMBF-Verbundprojektes „REMEDIS“ im Rahmen des Programms „Spitzenforschung und Innovation in den Neuen Ländern“.

2.1 Implantattechnologie

Am IIB e.V. werden biologische, chemische und insbesondere auch ingenieurwissenschaftliche Methoden zur Entwicklung moderner Implantate angewendet. Die Biomechanik als Werkzeug zur Implantatentwicklung dient der sicheren und effektiven Auslegung von Implantaten unter besonderer Berücksichtigung der jeweiligen biologischen Zielstrukturen. Das Design, die Fertigung sowie die Werkstoff- und Prototypenprüfung stellen die wesentlichen Schwerpunkte der Implantattechnologie dar.

Arbeitsschwerpunkte:

- Implantatentwicklung
- Implantatfertigung und –beschichtung
- Werkstoffprüfung und Implantatatestung

2.1.1 Implantatentwicklung

Die Entwicklung moderner Implantate ist mit dem Einsatz von Computer-Aided-Design-Software (CAD) verbunden. Am Institut wird die 3D-CAD-Software Pro/ENGINEER Wildfire genutzt. Im Vordergrund steht dabei insbesondere die Konstruktion von Implantaten für die interventionelle Radiologie (künstliche Herzklappen, Stents), Ophthalmologie (Intraokularlinsen, Mikrostents zur Glaukomtherapie) und Orthopädie (Hüft-, Knieprothesen). Die erstellten dreidimensionalen Datenmodelle dienen

Der IIB e.V. betreibt grundlagenorientierte und wirtschaftnahe Forschung auf den Gebieten der Biomaterialtestung, Implantatentwicklung, Biomechanik und Sensorik. Die Forschung konzentriert sich derzeit auf die Bereiche: (i) Stentsysteme, (ii) Augenimplantate und (iii) Elektrostimulationselektroden.

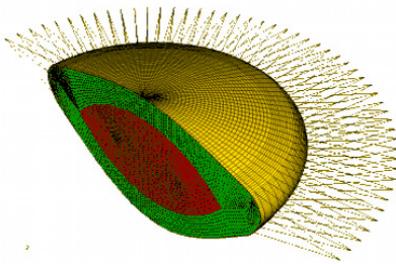
Der IIB e.V. entwickelt Untersuchungsmethoden und Prüfstände für Implantate und für die Qualitätssicherung im Sinne des Medizinproduktegesetzes.

als Grundlage für die Prototypenfertigung mittels Computer-Aided-Manufacturing (CAM) oder als Grundlage für Finite-Elemente-Analysen (FEA) zur sukzessiven Designoptimierung. Neben dem Implantatdesign erfolgt die Entwicklung und Konstruktion von Anlagen zur Implantatherstellung und –beschichtung sowie von Prüfständen für die *in vitro* Charakterisierung von Implantaten nach ISO-, EN- und DIN-Standards sowie darüber hinaus. Die Erstellung von Fertigungsunterlagen sowie technischen Dokumentationen runden das Aufgabenspektrum ab.

Untersuchungen von Implantaten in Verbindung mit biologischem Gewebe mit Hilfe der Finite-Elemente-Methode (FEM) setzen leistungsfähige Tools zur Bearbeitung der Geometrie, zur Vernetzung und zur Definition von Materialdaten, Lasten und Randbedingungen sowie zur graphischen Darstellung voraus. Am Institut stehen die FE-Systeme ABAQUS und der FE-Präprozessor PATRAN zur Verfügung. Diese Systeme werden für strukturelle Untersuchungen bei Berücksichtigung von geometrischen und Material-Nichtlinearitäten sowie von Kontaktbedingungen verwendet. Ziel ist die Untersuchung der Festigkeit von Implantaten wie auch die Erforschung von biomechanischen Vorgängen im menschlichen Körper. Dies ermöglicht ein verbessertes Verständnis dieser Vorgänge und eine Verbesserung der konstruktiven Auslegung von Implantaten.

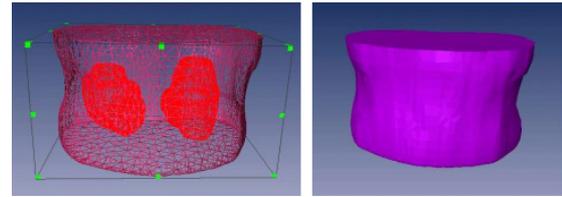
Eine Kernkompetenz des IIB e.V. besteht in der CAD-Designentwicklung und der strukturellen Berechnungen ballon- und selbstexpandierbarer Stents mit Hilfe der FEM. Hinsichtlich der Anpassung und Optimierung mechanischer Stent-Eigenschaften wie der elastischen Rückfederung (Recoil), der Vorhersage kritischer Lasten (Kollapsdruck) oder der Vorhersage kritischer Gefäßwandspannungen während der Stentimplantation sind langjährige Erfahrungen vorhanden.

Ein weiteres typisches Anwendungsgebiet der FEM ist die Modellierung von Vorgängen in der Ophthalmologie. Hier wurde die Biomechanik zur Erreichung eines besseren Verständnisses ophthalmologischer Vorgänge wie der Akkommodation (Anpassung des Auges an Nah und Fernsicht) angewandt. Dieses Verständnis ist wesentlich für die Entwicklung neuartiger Konzepte für akkommodierbare Linsen.



Finite-Elemente-Modell einer humanen Linse zur Untersuchung des Akkommodationsvorganges – Linsenkompartimente mit unterschiedlichen Materialeigenschaften: Linsenkern (rot), Linsenkortex (grün) sowie Kapselsack (gelb) und Zonulafasern

Weiterhin werden FE-Modelle zur Untersuchung der Festigkeit von Knochen, speziell der Wirbelsäule, eingesetzt. Die Osteoporose ist eine Knochenerkrankung, die vor allem bei älteren Menschen infolge eines zu starken Knochenabbaus zur Herabsetzung der Festigkeit führt. Mit Hilfe von CT-Daten kann die Knochendichte bestimmt werden, die statistisch mit den Materialeigenschaften des Knochengewebes zusammenhängt. Weiterhin lässt sich die Geometrie des Wirbelknochens mit den Methoden der Bildverarbeitung bestimmen. Damit ist ein FE-basiertes Berechnungsverfahren zur Bestimmung der Restfestigkeit von osteoporotischen Wirbelkörpern basierend auf klinischen Daten möglich.

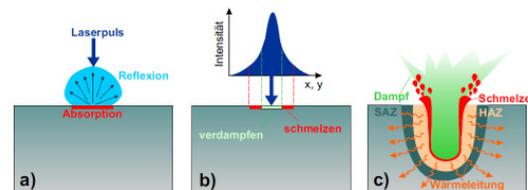


Geometrierekonstruktion humaner Wirbelkörper aus CT-Daten unter Berücksichtigung der Vertebroplastie – Untersuchung des Einflusses des Zement-Injektionsvolumens (rot) auf die Wirbelkörper-Festigkeit

2.1.2 Implantatfertigung und -beschichtung

Implantatmikrostrukturierung

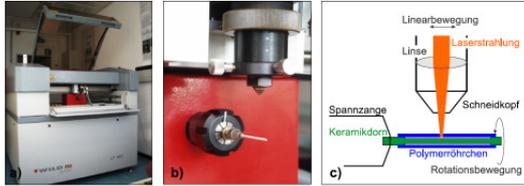
Für die Mikrostrukturierung röhrenförmiger Halbzeuge steht am IBMT eine Laser-Schneidanlage LP1007 (Wild Emco Lasertec, Hallein, Österreich) mit einem CO₂-Laser der Firma Coherent (DIAMOND™ 64 Laser) zur Verfügung. Das Lasersystem verfügt über eine mittlere Ausgangsleistung von 150 W, die mittels Strahlteiler auf 2,5 W reduziert wird. Eine Variation der mittleren Leistung über die Pulsdauer ist möglich. Der Laserstrahl wird mit einer Linse der Brennweite $f = 1,5''$ auf die Probe fokussiert. Der Strahlradius beträgt $30 \pm 2 \mu\text{m}$.



Prinzip der CO₂-Laserstrukturierung – a) Absorption und teilweise Reflexion des einfallenden Laserstrahls an der Oberfläche des bearbeiteten Festkörpers b) Schmelzen und Verdampfen des Materials c) Ablationsprozess und Ausbildung einer Wärmeinflusszone (Heat Affected Zone, HAZ) und einer mechanisch beeinflussten Zone (Shock Affected Zone, SAZ)

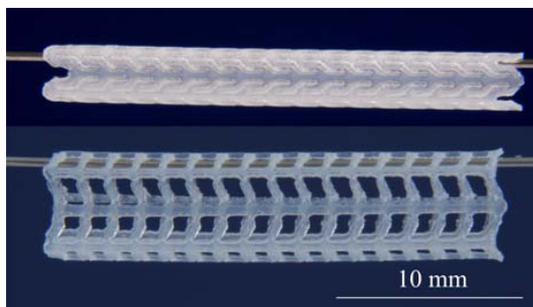
Die mittels CAD/CAM definierten Werkzeugbahnen (AlphaCAM, Schorndorf, Deutschland) werden durch eine lineare und eine Drehbewegung realisiert. Die Halterung des Werkstückes erfolgt auf einem Keramikdorn, der über ein Spannfutter mit der Rotationsachse verbunden ist. Die Positionierung des Schneidkopfes einschließlich der optischen Kompo-

nennten wird über eine Linearachse realisiert. Die Rotations- und Linearachse in Verbindung mit der beweglichen Optik garantiert eine optimale Positionierungsgenauigkeit.



CO₂-Lasermikrostrukturierung zur Herstellung von Stents – a) Laser-Schneidanlage b) Einspannvorrichtung und Laser-Schneidkopf c) Prinzip der Laserbearbeitung von Polymerröhrchen

Ein Beispiel für die Anwendung des CO₂-Laserplotters ist die Entwicklung von polymerbasierten biodegradierbaren Slotted-Tube-Stents für die periphere vaskuläre Applikation. Hierzu erfolgt am IBMT die Prototypenentwicklung, -fertigung und *in vitro* Untersuchung. Neben den *in vitro* Studien zur Charakterisierung der Stentmechanik sind tierexperimentelle Untersuchungen ein weiterer wesentlicher Bestimmungszweck der Stentprototypen.



Bioabsorbierbarer Stentprototyp für die periphere vaskuläre Applikation – unaufgeweitet (oben) und aufgeweitet auf Nenndurchmesser (unten)

Polymer-Compoundierung

Der Einsatz von Polymeren für die Implantatherstellung erfordert Werkstoffeigenschaften, die eine Polymerverbindung allein selten erfüllen kann. Durch Mischung (Compoundierung) von Polymermaterialien mit unterschiedlichen Eigenschaften lassen sich die erforderlichen Werkstoffeigenschaften für die Anwendung einstellen. Hierfür wird im Institut ein Labor-Compounder für Modellmischapplikationen, z.B. beim Compoundieren von techni-

schen Kunststoffen, dem Compoundieren von biomedizinischen Polymeren und dem Dispergieren von Nanofüllstoffen in einer Polymermatrix betrieben. In Verbindung mit einer Labor-Spritzgussmaschine (HAAKE MiniJet) lassen sich auf einfache Weise verschiedene Probenkörper aus compoundiertem Material herstellen.



HAAKE MiniLab zur Polymercompoundierung

Electrospinning zur Herstellung von Polymernanofasern

Die Generierung von bioartifiziellen Gerüststrukturen (Scaffolds) beispielsweise für die Gewebekonstruktion, das so genannte Tissue Engineering, erfordert dreidimensionale Konstrukte, die sich mit vitalen Material (z.B. patienteneigenem Zellanteil) kombinieren lassen. Nanofasern eignen sich auf Grund ihrer ähnlichen Größe zu Bestandteilen der extrazellulären Matrix besonders gut als Strukturmaterial. Eine am Institut neu konstruierte Electrospinning-Anlage ermöglicht die Herstellung von Polymerfasern mit Durchmessern im Nanometerbereich.



Electrospinning – mit Nanofasern beschichteter Stent

Dazu werden im elektrostatischen Feld Polymerlösungen aufgrund ihrer elektrischen Ladung zu dünnen Fäden versponnen. Unter den bisherigen Bedingungen entstehen dabei Vliese aus den Fasern. Die Anlage wird weiter ausgebaut, so dass in Zukunft auch die Abscheidung gerichteter Faserstrukturen und von 3D Scaffolds möglich sein wird.

Spraycoating für aktive Implantate (RAMSES) unter Reinraumbedingungen

Die Beschichtung von Implantaten und die zugrunde liegende Beschichtungstechnologie sind wesentliche Bestandteile bei der Entwicklung moderner Medizinprodukte. Als Beschichtungsmaterialien dient eine Vielzahl z.T. biodegradierbarer Polymere mit und ohne inkorporierte Pharmaka. Am IBMT stehen zwei eigenentwickelte Beschichtungsanlagen zur Verfügung. Die Anlagen arbeiten nach dem Airbrush-Prinzip, wodurch homogene Beschichtungen mit einer sehr guten Oberflächenqualität erzielt werden. Die Arbeiten erfolgen unter Reinraumbedingungen, wodurch eine Verunreinigung der Beschichtungen durch Staubpartikel ausgeschlossen werden kann.



Beschichtungsanlage RAMSES – Beschichtung von Implantaten nach dem Airbrush-Prinzip

Insbesondere die Beschichtungstechnik von Stents wurde am Institut in der Vergangenheit erfolgreich etabliert. Das bisherige Ziel bestand dabei in einer homogenen Beschichtung des Stents mit proliferationshemmenden Pharmaka wie Sirolimus oder Paclitaxel in einer Polymermatrix z.B. PEVA oder PBMA. Hintergrund dieses Beschichtungsprinzips ist

eine Verbesserung des Langzeiterfolgs, d.h. eine Minimierung der Hauptkomplikation nach Stentapplikation, der In-Stent-Restenose. Eine aktuelle Entwicklung am Institut befasst sich mit der Herstellung von Multimode-Stentbeschichtungen. Hierzu erfolgt eine Beschichtung des Stents von innen und von außen, wobei jeweils Pharmaka mit verschiedenen Wirkprinzipien Verwendung finden. Geforscht wird an einem Multimode-Stent mit einer Außenbeschichtung die in bewährter Weise mit antiproliferativ wirkenden Pharmaka beladen ist in Kombination mit einer Innenbeschichtung, die z.B. den Wirkstoff Heparin enthält. Das Ziel dieser Innenbeschichtung besteht darin, die Bildung von Thromben an dem mit dem Blutstrom in Kontakt stehenden Stent-Innenlumen zu vermeiden.

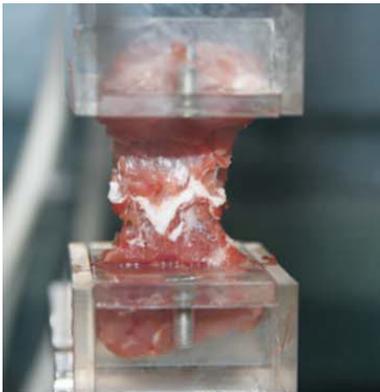
2.1.3 Werkstoffprüfung und Implantattestung

Uniaxiale Werkstoffprüfung

Für quasistatische uniaxiale Untersuchungen steht die Universalprüfmaschine Zwick/Roell BZ 2.5/TN1S (Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland) mit einer Prüfraumhöhe von 1150 mm zur Verfügung. In Abhängigkeit vom Prüfobjekt können 10 N, 50 N, 500 N und 2500 N Kraftmessdosen verwendet werden. Verschiedene Vorrichtungen zur Zug-, Druck- oder Biegeprüfung erlauben die Abdeckung eines breiten Spektrums gängiger Untersuchungsmethoden. Die Ermittlung von Werkstoffkennwerten, wie beispielsweise E-Modul, Zugfestigkeit, Bruchdehnung ist möglich. Für Untersuchungen bei 37°C steht zusätzlich eine Klimakammer zur Verfügung.

Typische Anwendungen der Universalprüfmaschine sind die Bestimmung von Werkstoffkennwerten z.B. als Eingabegrößen für Finite-Elemente-Analysen von Stents und Untersuchungen zur Qualitätssicherung bzw. zum Benchmarking z.B. zur Stentabzugskraft vom Ballonkatheter oder zur Haftkraft von Gewebekleber. Gewebekleber stellen eine Alternative zu konventionellen Fixierungen mittels Nähten oder Klammern dar. Insbesondere wenn eine Gewebsschädigung vermieden werden soll

oder ein einfacher und schneller Wundverschluss gefragt ist, sind Gewebekleber das Mittel der Wahl. Eine aktuelle Arbeit am IBMT befasst sich mit der Entwicklung eines 1,2-Ethylenglycol basierten biodegradierbaren Gewebeklebers. In Zugversuchen wird die Klebkraft der Eigenentwicklung im Vergleich zu Fibrinkleber untersucht. Die vielversprechenden Ergebnisse zeigen eine Klebkraft, die signifikant größer als die konventioneller Fibrinkleber ist.



Gewebekleberentwicklung – Festigkeitsprüfung unter Zugbeanspruchung an einer muskulären Weichgewebeklebung mit Universal-Prüfmaschine Zwick. Gefördert aus Mitteln des Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) und des Europäischen Sozialfonds (ESF) im Rahmen der Verbundforschung zwischen Wirtschaft und Wissenschaft des Landes Mecklenburg-Vorpommern.

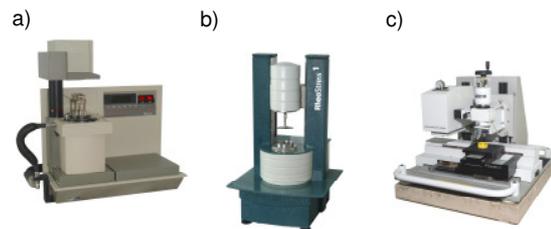


Mikrohärteprüfung

Zur registrierenden Mikrohärteprüfung nach dem Eindringverfahren steht am IBMT das Fischerscope HM2000 XYp (Helmut Fischer GmbH, Sindelfingen, Deutschland) mit einem Vickers-Eindringkörper zur Verfügung. Das Verfahren der registrierenden Härteprüfung bietet gegenüber konventionellen Härteprüfverfahren den Vorteil, dass viskoelastisches Materialverhalten (Relaxation, Retardation) Berücksichtigung findet.

Das vorhandene Messgerät erlaubt einen automatisierten Betrieb durch Programmierung des XY-Messtisches. Beliebige Messpositionen können definiert werden, oder die Mes-

sung erfolgt mit einem definierten Raster. Ein aktuelles Anwendungsbeispiel für die registrierende Mikrohärteprüfung ist die Ermittlung des Eindringmoduls und der Eindringhärte verschiedener Zahnkompartimente. Die so gewonnenen Werkstoffkennwerte stellen eine Grundlage für die Entwicklung von Füllungskompositen mit optimierter Strukturkompatibilität oder für Finite-Elemente-Analysen z.B. zur Entwicklung von Endodontiestiften dar.



a) Dynamisch-Mechanische-Analyse, b) Rheometer und c) automatisierte Mikrohärteprüfung

Dynamisch-Mechanische-Analyse

Dynamisch-mechanische Untersuchungen zählen wegen ihres hohen Informationsgehaltes zu den wichtigsten Analysemethoden der Kunststofftechnik. Sie gestatten auf relativ einfache Weise die Bestimmung des komplexen Elastizitätsmoduls über weite Bereiche von Temperatur und Beanspruchungsgeschwindigkeit. Mit der Durchführung der dynamischen Analyse werden im Wesentlichen zwei Zielstellungen verfolgt:

1. Ermittlung von Kennwerten für die konstruktive Auslegung von insbesondere dynamisch beanspruchten Bauteilen, z.B. in der Fahrzeugindustrie oder in der Schall- und Schwingungsdämpfung.
2. Strukturaufklärung, insbesondere die Bestimmung von Glastemperaturen und Relaxationsspektren sowie Charakterisierung von Kristallinitätsgrad, molekularer Orientierung, Vernetzungsdichte, Phasentrennung bzw. -wechselwirkung sowie der chemischen Zusammensetzung von Polymerwerkstoffen.

Für die Dynamisch-Mechanische-Analyse (DMA) stehen am IBMT der Dynamic Mechanical Analyzer DMA 2980 (TA-Instruments,

New Castle, USA) in Verbindung mit der Stickstoff-Gaskühleinheit TA-Instruments GCA (TA-Instruments, New Castle, USA) zur Verfügung. Schub-, Druck-, Zug-, Biege-, Faden- und Filmaufnehmer erlauben die Abdeckung eines breiten Spektrums relevanter Beanspruchungsformen.

Rheometrie

Zur Untersuchung des rheologischen Verhaltens von Flüssigkeiten steht ein Haake Rheo Stress 1 in Verbindung mit einem Kältethermostat DC30-K10 (Thermo Fischer Scientific GmbH, Deutschland) zur Verfügung. Daneben sind eine Vielzahl von Original Haake-Messeinrichtungen sowie diverse Normfluide zur Kalibrierung vorhanden.

Das Rheometer erlaubt die beiden Betriebsformen Controlled Stress (CS) und Controlled Rate (CR). CS-Rheometer halten die Schubspannung konstant, während in Abhängigkeit der Viskosität der Probe das resultierende Geschwindigkeitsgefälle bestimmt wird. CR-Rheometer arbeiten nach dem umgekehrten Prinzip: bei Vorgabe eines definierten Geschwindigkeitsgefälles wird die Schubspannung registriert.

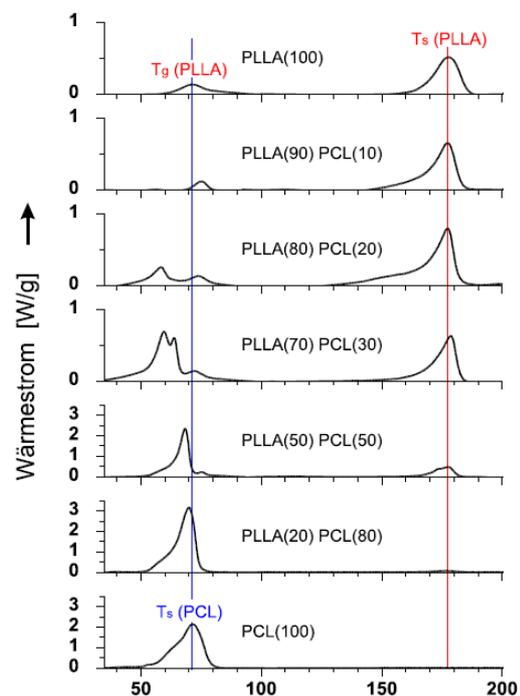
Das Haupt-Einsatzgebiet von Rheometern besteht in der Messung der dynamischen Viskosität oder in der Bestimmung von Fließgrenzen.

Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Die Dynamische Differenzkalorimetrie (engl.: Differential Scanning Calorimetry, DSC) ist ein Verfahren, welches insbesondere in der Kunststofftechnik Anwendung findet. Während der Erwärmung bzw. Abkühlung einer Probe wird deren abgegebene bzw. aufgenommene Wärmeenergie im Vergleich zu einer internen Referenzprobe registriert. Die aufgenommenen Messwerte erlauben z.B. Rückschlüsse hinsichtlich der Schmelz- und Glasübergangstemperatur sowie von Kristallisationsprozessen oder Zersetzungsreaktionen einer Kunststoffprobe.

Für DSC-Untersuchungen stehen am IBMT das Mettler-Toledo Thermosystem FP900 mit dem Sensor FP84 sowie eine Durchlichteinheit (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Schweiz) zur Verfügung. Es werden 40 µl Aluminium- oder wahlweise durchsichtige Tiegel aus Glas oder Saphir-Einkristallen verwendet wenn eine Probenbeobachtung im Durchlicht gewünscht wird.

Ein Anwendungsbeispiel der DSC aus der Materialanalyse ist die Untersuchung von Phasenumwandlungstemperaturen von Polymeren, die Rückschlüsse bzgl. deren Mischbarkeit zulassen. Größen wie die Schmelz- oder Glasübergangstemperatur (T_s bzw. T_g) reagieren sensibel auf das Mischungsverhältnis der untersuchten Polymere PLLA und PCL. So bewirkt z.B. ein PLLA-Blendanteil von 80 % (w) die Verringerung der Schmelztemperatur des Blends auf 58°C im Vergleich zu 72°C des Homopolymers PCL.



Untersuchung thermischer Werkstoffparameter – Glas- und Schmelzpunktbestimmung bei Polymerblends durch Auswertung des Wärmestromes in W/g in Abhängigkeit von der Temperatur in °C

Stentprüfung

Die Prüfung von Stents stellt eine Kernkompetenz des IIB e.V. dar. Das Prüflabor für Kardio+Vaskuläre Produkte ist ein durch die ZLG „Anerkanntes Prüflaboratorium für Medizinprodukte nach 93/42/EWG und DIN EN ISO/IEC 17025“. Die Akkreditierung des Prüflabors nach DIN EN ISO/IEC 17025 von mehr als 20 Prüfverfahren durch die DAKKS soll noch in 2012 abgeschlossen werden.

Für Zulassungsprüfungen entsprechend den Normen DIN EN ISO 25539-2 und DIN EN ISO 10555-4 steht ein großer Umfang verschiedener Messgeräte zur Verfügung. Die Abmessungen von Stents, d.h. der Außen- und Innendurchmesser nach der Aufweitung sowie der Durchmesser bei Maximaldruck können ebenso bestimmt werden wie die infolge der Aufweitung eintretende Längenänderung. Während der Aufweitung erfolgt eine Dokumentation der Stentprofile als Grafik oder Video. Die Bestimmung des Recoils, einem entscheidenden Qualitätsparameter, der Auskunft über die elastische Rückfederung eines Stents nach Aufweitung und Entfernung des Ballonkatheters gibt, erfolgt auf Grundlage von Durchmessermessungen.



Stentprüfung – Laseroptische Bestimmung des Durchmessers von Ballonkathetern und Stentsystemen in Abhängigkeit vom Ballondruck

Der Kollapsdruck bzw. die Radialfestigkeit von Stents kann ebenso bestimmt werden wie die Radialkraft selbstexpandierbarer Stents in Abhängigkeit des Aufweitedurchmessers. In Ermüdungsanalysen erfolgt eine beschleunigte Prüfung der Dauerfestigkeit bei einer dynami-

schen Belastung zur 10-Jahressimulation. Die Stentoberfläche nach der Aufweitung und nach der Ermüdungsanalyse wird mit Hilfe des Auflicht- oder Rasterelektronenmikroskops (ESEM und REM) untersucht. Weiterhin ist die Beurteilung des Abspreizeffektes von Stentfilamenten in Krümmungen möglich. Neueste Methoden betreffen die Charakterisierung der Schichtintegrität bei simulierter Anwendung und zyklischer Dauerbelastung. Dafür werden die für das jeweilige Produkt relevanten Applikationsschritte, wie zum Beispiel der Vorschub eines Stentsystems über Führungsdraht und Führungskatheter in ein anatomisch angepasstes Gefäßmodell definiert und unter Vermeidung störender Kontaminationen im Reinraum durchgeführt. Eine Bewertung der Schichtintegrität erfolgt durch Oberflächenanalyse. Zusätzlich wird die Partikelfreisetzung der Produkte durch Zählung und Größenklassifizierung der Partikel in den umgebenden Prüfmedien analysiert. Dafür kommt Partikelmess-technik gemäß USP788 zum Einsatz.



Stentprüfung – Ermüdungsanalyse zweier überlappt implantierter Koronarstents im gekrümmten Gefäß

Die zyklische Dauerbelastung erfolgt analog zur beschleunigten Prüfung der Dauerfestigkeit bei einer dynamischen Belastung, wobei ebenfalls Partikelanalysen integriert werden.

Neben diesen Prüfmethode können Stentprüfungen außerhalb der Normen durchgeführt werden. Hierzu zählen insbesondere die Messung der Biegesteifigkeit von Komplettsystemen (Stent gecrimpt auf Ballon) und expandierter Stents bei unterschiedlichen Aufweitedurchmessern sowie die quantitative Messung

der Pushability und Trackability zum Vergleich von Stentsystemen. Daneben können Messungen zur Röntgensichtbarkeit mit einer Anordnung nach DIN 13273 und gemäß ASTM F-640 erfolgen.

Prüfungen an PTCA-/PTA-Ballonkathetern werden u. a. nach DIN EN ISO 10555-4 durchgeführt. Die Prüfungen umfassen die Bestimmung der Durchmesser-Druck-Kennlinie, des Ballonberstdruckes, die dynamische Wechselbeanspruchung des Ballons, die optische Kontrolle der Oberfläche, die Messung der Deflationszeit und der Biegesteifigkeit im Bereich des

gefalteten Ballons, die vergleichende Messung der Pushability und der Trackability und die vergleichende Beurteilung der Stenosepassierbarkeit von PTCA-/PTA-Ballonkathetersystemen sowie die Beurteilung der Gleiteigenschaften von Führungsdrähten in vergleichenden Untersuchungen.

Neben den aufgeführten Prüfverfahren für Stents und Ballonkatheter besteht die Möglichkeit zur Bestimmung der Biegesteifigkeit an Kathetern, Drähten und Sonden, insbesondere mit mehrschichtigem Aufbau.

2.2 Biomaterialien und Polymerchemie

Die moderne Implantattechnologie stellt besondere Anforderungen an die verwendeten Materialien, die speziell für die jeweilige Anwendung maßgeschneidert werden. Teil der heutigen Implantatentwicklung ist neben dem reinen Design des Implantates die Optimierung der Implantatoberflächen, um die Biokompatibilität des Implantates aber auch die Einheilung in das Gewebe zu verbessern. In das Implantat bzw. Implantatbeschichtungen inkorporierte bzw. an die Implantatoberfläche chemisch gekoppelte Wirkstoffe, die mit einer definierten Kinetik lokal freigesetzt werden, unterstützen diese Prozesse nachhaltig.

Arbeitsschwerpunkte:

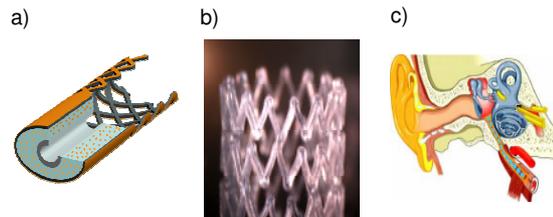
- Materialentwicklung: Polymere und Nanomaterialien
- Oberflächenmodifizierung: Nass- und plasmachemische Verfahren
- Wirkstoffanalytik und Polymercharakterisierung: Chromatographie und Spektroskopie

2.2.1 Materialentwicklung: Polymere und Nanomaterialien

Die Einsatzgebiete von Polymeren in der modernen Medizintechnik sind sehr vielfältig. Schon lange werden Kunststoffe in medizinischen Arbeitsmitteln, Hilfsmitteln und Geräten eingesetzt, neuere Anwendungsgebiete haben sich sowohl durch die Implantationstechnik als auch durch innovative Methoden der Einschleusung von Wirkstoffen an verschiedenste Zielorte innerhalb des menschlichen Körpers ergeben (Controlled Drug Delivery Systeme).

Das Anforderungsprofil an Polymere für den Einsatz im menschlichen Körper ist komplex, aber allen Anwendungszwecken ist gemeinsam die Mindestanforderung der Biokompatibilität: Die Materialien sowie ihre eventuellen Abbauprodukte müssen mit körpereigenen Zellen und Geweben verträglich sein und dürfen keine Substanzen in toxischen Konzentrationen freisetzen. Implantate aus Polymeren,

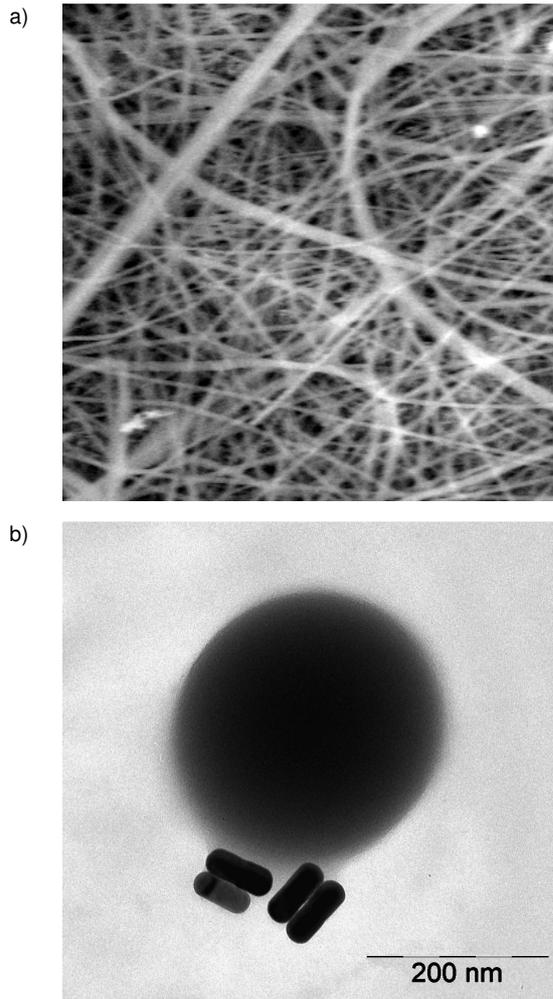
die im Körper verbleiben, können inert und langlebig sein sowie eventuell ins Gewebe eingekapselt werden. Andere Polymere können sich, nachdem sie ihre Funktion erfüllt haben, z.B. die Förderung der Regeneration von Knochen und Gewebe, in unschädliche und biologisch abbaubare Bestandteile auflösen und resorbiert werden.



Entwicklung von Stents für verschiedene medizinische Indikationen und neuartige therapeutische Konzepte – a) Mikrostants ausgestattet mit mikromechanischen oder thermoresponsiven Ventilen für die Drainage in der Glaukom-Therapie, b) mit Polymer-Wirkstoff beschichteter selbstexpandierbarer Gallengangstent für die lokale Tumorstillstandskontrolle, c) Tubenstent für die Behandlung von chronischen Entzündungen im Mittelohr

Ähnliches gilt für Polymerbeschichtungen und Drug Delivery Systeme, die durch Auflösen am Zielort Wirkstoffe freisetzen. Auch reaktive Polymere werden in der Medizintechnik eingesetzt, etwa als Knochenzement, Gewebekleber oder aushärtbares Zahnfüllungsmaterial. Hier ist darauf zu achten, dass keine toxischen Wirkungen von den Monomeren oder Präpolymeren ausgehen. An unserem Institut werden vor allem biodegradierbare Polymere wie Polylactid, Polyhydroxybuttersäure und Poly(ϵ -caprolacton) sowie reaktive Oligomere wie beispielsweise ein mit endständigen Isocyanatgruppen versehenes 1,2-Ethylenglycolbis(dimilchsäure)-Derivat bearbeitet.

Nanomaterialien spielen aufgrund ihrer faszinierenden Eigenschaften eine immer wichtigere Rolle in der Medizin. Eine Reihe von Synthesemethoden sind für die Erzeugung von verschiedenen Nanostrukturen entwickelt worden. An unserem Institut werden nasschemische Synthesewege für die Generierung von Nanopartikeln und das Electrospinning für die Herstellung von Nanofasern angewandt.



Nanomaterialien – a) PLA-Nanofasern und b) PLA-Nanopartikel mit assoziierten Gold-Nanostäbchen

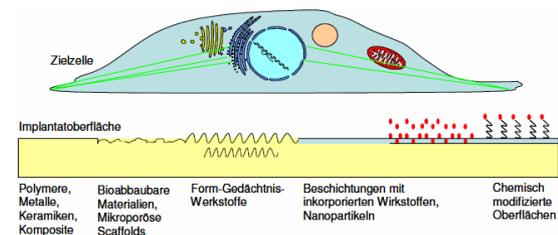
Die vielfältigen Gestaltungsmöglichkeiten von Nanopartikeln bezüglich ihrer Größe, Form, Dichte und Oberflächenbeschaffenheit machen Nanopartikel zu idealen Trägersystemen. So können beispielsweise bioaktive Wirksubstanzen entweder direkt in die Nanopartikelmatrix eingelagert oder an der Nanopartikeloberfläche absorptiv bzw. kovalent gebunden werden. Die Eigenschaften der Nanopartikel lassen sich dabei an die spezifischen Anforderungen der Wirkstoffe und die therapeutische Anwendung anpassen. Nanofasern haben darüber hinaus die Eigenschaft, dass sie dreidimensionale ineinander greifende Netzwerke ausbilden können. Auf Grund ihrer Ähnlichkeit mit der extrazellulären Matrix eignen sich Nanofaserkonstrukte hervorragend als Gerüststruktur (Scaffold) für die Gewebekonstruktion (Tissue Engineering).

Aktuelle wissenschaftliche Fragestellungen:

Für die Entwicklung eines ophthalmologischen Mikrostents wird am Institut an einer Mikrostentbeschichtung aus biodegradierbaren Polyestern (wie Polylactid, Poly(3-hydroxybuttersäure) und Poly(4-hydroxybuttersäure)), die in einem schonenden Sprühverfahren aufgebracht wird, gearbeitet. Die Untersuchung der Degradationskinetik der abbaubaren Polymere erfolgt mittels Gelpermeationschromatographie.

2.2.2 Oberflächenmodifizierung: Nass- und plasmachemische Verfahren

Um ein problemfreies Einwachsen von Implantaten in das umgebene Gewebe zu erreichen und ungewollte Körperreaktionen wie Entzündungen oder Einkapslung zu verhindern, sind zwei wesentliche Anforderungen an die Implantatoberfläche zu stellen.



Modifikation von Implantatoberflächen – Möglichkeiten der Implantatmodifizierung zur gezielten Steuerung der Zelle-Implantat-Interaktion

Zum einen müssen unspezifische und unkontrollierte Wechselwirkungen mit der Implantatumgebung minimiert werden und zum anderen sollten biologisch aktive Komponenten an diese wechselwirkungsarme Oberfläche zur gezielten Steuerung der Zelle-Implantat-Interaktion angesiedelt werden. Eine gute Möglichkeit dies zu erreichen, ist die Modifizierung der Oberfläche mit nass- und plasmachemischen Verfahren, die geeignete funktionelle Ankergruppen auf der Implantatoberfläche installieren können, die wiederum Ausgangspunkt für die Ankopplung von biologisch verträglichen Komponenten und spezifischen biologischen Wirkstrukturen sind.

Aktuelle wissenschaftliche Fragestellungen:

Am Institut für Biomedizinische Technik wird beispielsweise eine Oberflächenfunktionalisierung von mikroporösen polymeren Scaffoldmaterialien zur Generierung einer bioartifiziellen Gefäßprothese durch chemische Modifikation und Aktivierung vorgenommen, um so die auf Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen beruhenden Mechanismen der Zelladhäsion zu optimieren. Für die chemische Aktivierung der Polymeroberfläche werden nass- und plasma-chemische Verfahren angewandt und der Nachweis der Oberflächenreaktionen erfolgt mittels ATR-IR-Spektroskopie sowie Kontaktwinkelmessungen. An die so aktivierten Oberflächen erfolgt über geeignete Spacermoleküle die Ankopplung von zellspezifischen Biomolekülen, wie beispielsweise von RGD-Proteinsequenzen und Wachstumsfaktoren. Der Nachweis der Immobilisierung der Biomoleküle erfolgt über immunologische Methoden. Darüber hinaus wird die Inkorporation von Biomolekülen über den Aufbau hafter hydrophiler Matrixbeschichtungen auf Basis von Fibrin bzw. Hyaluronsäure angestrebt.

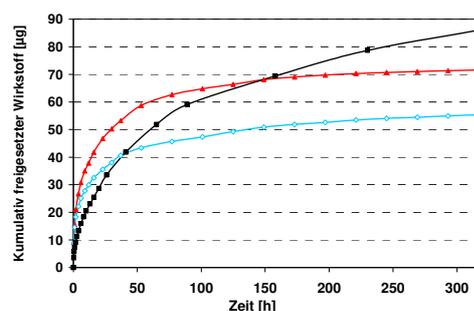
2.2.3 Wirkstoffanalytik und Polymercharakterisierung: Chromatographie und Spektroskopie

Begleitend und außerordentlich wichtig für die Bearbeitung der Projekte im Bereich Materialentwicklung, Oberflächenmodifizierung und Wirkstoffinkorporation ist die chemische Analytik. Mit IR-Spektroskopie-Methoden, Viskositätsmessungen und der Gelpermeationschromatographie (GPC) werden vor allem die eingesetzten Polymere und deren Abbauprodukte charakterisiert. Bei der GPC handelt es sich um eine Art der Flüssigchromatographie ähnlich der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Die Trennung findet hier jedoch aufgrund der unterschiedlichen Größe (genauer: dem hydrodynamischen Volumen) der Moleküle in Lösung statt. Typische Anwendungen sind jegliche Art von Makromolekülen wie die Polymerfraktionierung synthetischer Polymere, Biopolymere und Proteine. Die GPC ermittelt je nach Detektor die Molmassenmittelwerte (M_n , M_w , M_z), Polydispersität, Viskosität η , Kon-

formation und Radienverteilung (R_g , R_h) der Polymerprobe. Mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wird vor allem die Freisetzungskinetik von inkorporierten Wirkstoffen in Polymerbeschichtungen und Nanopartikeln untersucht.



Chromatographie und Spektroskopie – Gelpermeationschromatographie zur Polymerdegradationsanalyse und Infrarotspektroskopie zur Polymeranalyse



Wirkstoffanalytik – HPLC-Freisetzungsstudie von Siroliimus aus verschiedenen Polymerbeschichtungen

Aktuelle wissenschaftliche Fragestellungen:

Ein weiteres Beschäftigungsfeld am Institut für Biomedizinische Technik stellt die Modifizierung der Elektrodenränder von Cochlea-Implantaten zur Verhinderung der Fibrose und zur Stimulation von Spiralganglienzellen auf der Basis von biodegradierbaren wirkstoffbeladenen Polymeren dar. In diesem Zusammenhang werden auch die physikochemische Charakterisierung der Degradation der Beschichtungsmatrix in Abhängigkeit vom Wirkstoffzusatz und der Freisetzung der Wirkstoffe aus der Polymerbeschichtung vorgenommen. Als Wirkstoffe kommen entzündungshemmende Pharmaka wie Dexamethason und Nervenwachstumsfaktoren wie BDNF und GDNF zur Anwendung.

2.3 Biologische Prüfung von Materialien und Implantaten

Beim Einsatz moderner Biomaterialien und Implantate in Patienten haben die Vorgänge an der Schnittstelle zwischen Material und Gewebe entscheidenden Einfluss auf den Therapieerfolg. Unvermeidliche lokale Entzündungsreaktionen sollen möglichst räumlich und zeitlich begrenzt werden. Zu diesem Zwecke steht vor dem klinischen Einsatz neuentwickelter Materialien stets die Untersuchung von deren Biokompatibilität, d.h. Verträglichkeit mit lebenden Zellen. Diese Tests können am Institut in einem eigenen GLP-zertifizierten Prüflabor durchgeführt werden. Über Zellkulturstudien hinaus findet auch die präklinische Erprobung von Implantaten im Tiermodell statt.

2.3.1 Zellbiologie

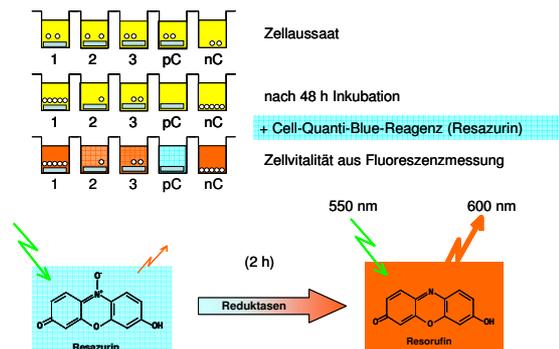
Zellbiologische Methoden sind essentiell für die Erstbestimmung der Bioverträglichkeit von medizinisch einzusetzenden Materialien. Neben Vorteilen der relativ einfachen, zeit- und kostengünstigen Durchführung sind Experimente mit Zellkulturen auch unabdingbar erforderlich vor der Aufnahme von Tierversuchen.

Arbeitsschwerpunkte:

- Bio- und Hämokompatibilitätstestung
- Zytotoxizitätstestung
- Migrationsexperimente
- Endothelzellen im Flusskammermodell

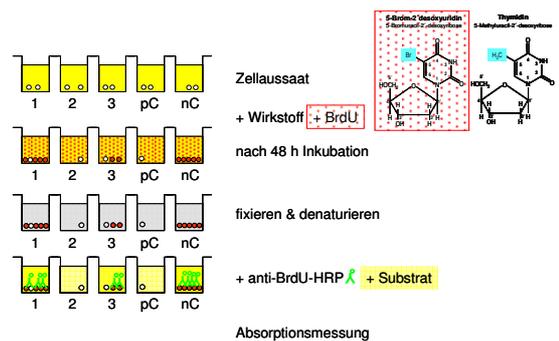
Die Biokompatibilitätstestung umfasst in erster Linie die Messung der Vitalität und Proliferation von Zellen in Kultur. Bei beiden Verfahren kommen Mikrotiterplatten zum Einsatz; nach Aussaat von jeweils 2000 Zellen adhären diese während einer 24-stündigen Inkubationsphase. Danach wird der Zellkulturüberstand ausgetauscht gegen die Testsubstanz in Zellkulturmedium. Im Vitalitätstest werden die Zellen anschließend 48 h inkubiert, bevor die Zugabe einer farbsensitiven Testsubstanz (Resazurin) erfolgt. Bei biokompatiblen Testsubstanzen sind die Zellen in der Lage, mit Hilfe von Reduktasen das Resazurin en-

zymatisch in Resorufin umzuwandeln, während dieser Stoffwechselvorgang in Anwesenheit zytotoxischer Testsubstanzen gehemmt ist. Das unterschiedliche Absorptionsverhalten von Resazurin und Resorufin erlaubt direkte Rückschlüsse auf die Zellvitalität.



Zellvitalitätstest – Fluorimetrische Bestimmung im Direktkontakt

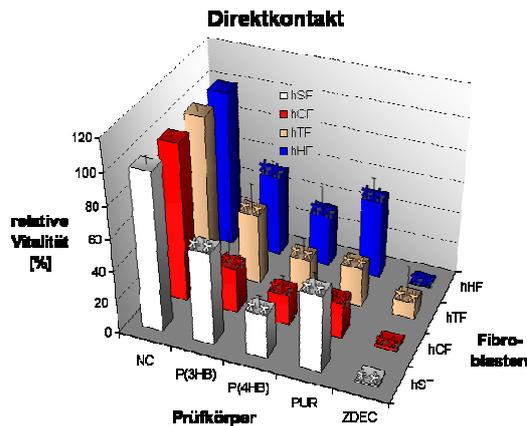
Im Proliferationstest wird das Zellkulturmedium neben der Testsubstanz mit brommarkiertem Desoxyuridin (5-Bromo-2'-desoxyuridin, BrdU) versetzt. Dieses markierte Nukleotid wird anstelle von Thymidin bevorzugt in die DNA proliferierender Zellen eingebaut.



Zellproliferationstest – Fluorimetrische Bestimmung mit Antikörpern

Nach 48 h werden die Zellen fixiert und denaturiert. In die DNA eingebautes BrdU wird mit Hilfe BrdU-spezifischer Antikörper, die enzymatisch (HRP) markiert sind, und Zugabe einer Luminol-Substratlösung durch Messung der Lumineszenz der entstandenen Immunkomplexe quantifiziert. Dabei ist die gemessene

ne Absorption direkt proportional zur Anzahl der proliferierenden Zellen in Kultur. Diese Untersuchungen werden sowohl mit aktiven Substanzen und mit Implantaten im Direktkontakt mit humanen Primärzellen durchgeführt, als auch mit Eluaten, die nach Inkubation der zu untersuchenden Polymere in Pufferlösung entstehen.



Differentielle Zellvitalität von humanen Bindegewebszellen des Auges – relative Vitalität von humanen Sklera- (hSF), Choroidea- (hCF), Tenon- (hTF) und Corneafibroblasten (hHF), die direkt auf die Prüfkörper P(3HB), P(4HB) und PUR ausgesät wurden. Die Positivkontrolle wurde mit Zinkdiethyldithiocarbamat (ZDEC) vergiftet. Alle Messwerte unterscheiden sich signifikant von der Negativkontrolle (($\star\star$) für $p < 0,01$).

In Migrationsexperimenten wird untersucht, welchen Einfluss unterschiedliche Biomaterialien auf Heilungsverläufe haben, die für den Therapieerfolg im Anschluss an eine operative Stentimplantation entscheidend sind. Hierzu wird die Migrationsgeschwindigkeit von glatten Muskelzellen unter Variierung der Wachstumsbedingungen gemessen.

Die Implantation eines Stents bringt eine komplexe Entzündungsreaktion von lokalen und aus der Zirkulation rekrutierten Blutzellen auf das körperfremde Material mit sich, die zwar unvermeidlich, in günstigen Fällen jedoch zeitlich begrenzt ist. Bei ungünstigen Verläufen führt dies schließlich zu Komplikationen in Form von Restenosen und Stentthrombosen. Im Rahmen eines Forschungsprojektes zur

Aufklärung der Ursachen solcher pathophysiologischen Vorgänge an Stentoberflächen im Patienten werden Adhäsion und Wachstum von Endothelzellen *in vitro* auf chemisch und biologisch funktionalisierten Polymeroberflächen unter Flußbedingungen untersucht, die physiologisch auftretende Scherkräfte im menschlichen Blutkreislauf simulieren.

Diese Untersuchungen beinhalten die Besiedlung der funktionalisierten Oberflächen mit relevanten/geeigneten Primärzellen mit anschließender *in vitro* Fluoreszenzmikroskopie (s. Abschnitt 3.5.1).



Temperierte Flusskammer zur Simulation physiologischer Scherkräfte

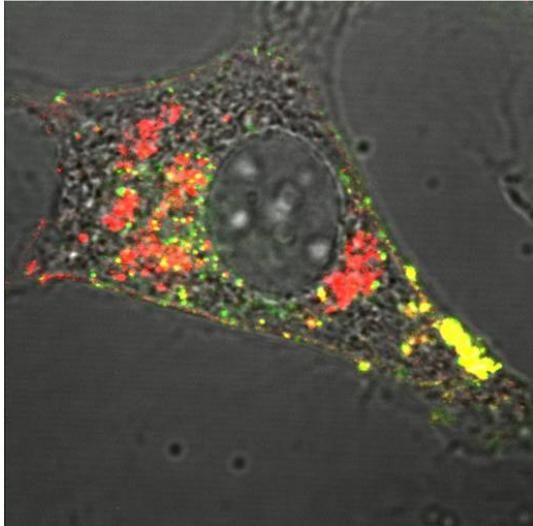
2.3.2 Molekularbiologie

Da für einige wissenschaftliche Fragestellungen die zellbiologischen Methoden nicht sensitiv genug sind bzw. spezifische Antworten gefunden werden müssen, die über die allgemeinen Parameter Zellvitalität und -proliferation hinausgehen, kommen auch molekularbiologische Arbeitstechniken zum Einsatz. So umfasst die Untersuchung von Endothelzellen im Flusskammermodell außer den genannten Aspekten auch die Expressionsanalyse von Genen, die insbesondere bei der komplexen Entzündungsreaktion auf operative Stentimplantation von Bedeutung sind.

Arbeitsschwerpunkte:

- Nukleinsäureextraktion und -analyse
- Proteinextraktion und -analyse
- nanopartikelvermittelte Drug-Delivery

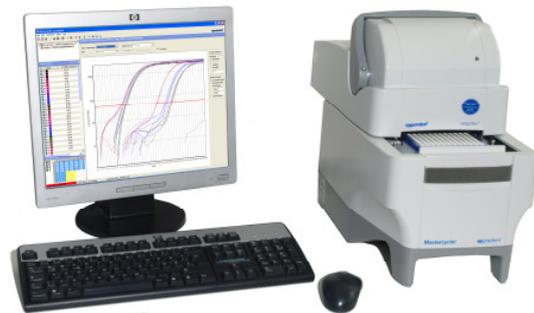
Eine wichtige Komponente für das Verhalten von Zellen in Kultur stellen Wachstumsfaktoren dar.



Gezielte Einschleusung von Nanopartikeln in die Zelle – Endosomale Lokalisation von TRITC-markierten Nanopartikeln in L929 Fibroblasten. Nanopartikel (grün fluoreszierend) befinden sich intrazellulär in Endozytosevesikeln; deren rote Fluoreszenz (durch entsprechende Markierung des endosomalen Antigens EEA1) teilweise mit der der Nanopartikel kolokalisiert (gelb).

Für Endothelzellen bedeutsam ist vor allem VEGF (vascular endothelial growth factor), das über Aktivierung und Kreuzreaktionseffekte eine Vielzahl von intrazellulären Signalwegen beeinflusst. Für Zellkulturen ist die Proliferation als Maß für die VEGF-Wirkung allerdings nur von bedingter Aussagekraft, so dass alternativ Markergene, deren Expression in Anwesenheit von VEGF aktiviert bzw. verstärkt wird, gefunden werden sollen. Hierzu werden Nukleinsäuren aus den kultivierten Zellen isoliert und mit Hilfe von quantitativer PCR (Polymerasekettenreaktion) und klassischer Gelelektrophorese untersucht. Die Proteinanalyse umfasst Western Blots und Immunohistochemie. Der

Einfluss von Wachstumsfaktoren ist ebenfalls von herausragender Bedeutung bei der Fibroseantwort auf operative Eingriffe bei Glaukomen in der Ophthalmologie. Bislang ist die postoperative Narbenbildung nicht steuerbar, weshalb sich eines unserer Forschungsprojekte dem Glaukom im Kaninchenmodell widmet. Hierbei soll insbesondere die Fibroseantwort auf die Implantation eines Mikrostroms im uveoskleralen Abflussweg bzw. Suprachoroidalraum des Auges untersucht werden.



DNA-Analytik – Thermocycler für die quantitative PCR

Ergänzende Versuche mit verschiedenen primären Fibroblasten des menschlichen Auges *in vitro* dienen der Charakterisierung von deren Expressionsprofil mit Hilfe von mRNA-Isolation und qPCR-Analyse. Diese Studien sollen am Ende neue intraokulare Zielmoleküle für die pharmakologische Intervention herausarbeiten. Die lokale Wirkstoffapplikation ist für viele Bereiche der Implantattechnologie von hoher aktueller Bedeutung. Eine besondere spezifische Wirkung wird erwartet, wenn es gelingt, Nanopartikel mit Wirkstoffen zu beladen und diese gezielt in Zellen eines gewünschten Typs zu schleusen.

2.4 Entwicklung von Messverfahren und Spezialgeräten

Aus den vielfältigen am Institut bearbeiteten Forschungsprojekten, aus Anforderungen des Prüflabors und aus der engen Zusammenarbeit mit Projektpartnern aus der Wirtschaft und medizinischen Einrichtungen ergeben sich immer wieder Fragestellungen, zu deren Untersuchung und Lösung spezielle Messverfahren, Apparaturen und Prüfstände entwickelt und realisiert werden müssen.

Arbeitsschwerpunkte:

- Entwicklung von Spezialmesstechnik
- Gerätebau
- Softwareentwicklung
- Steuerungstechnik

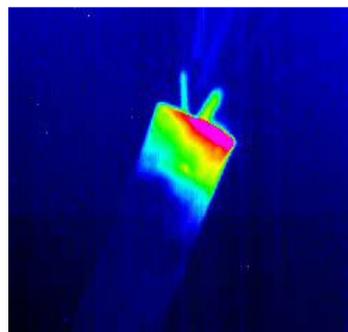
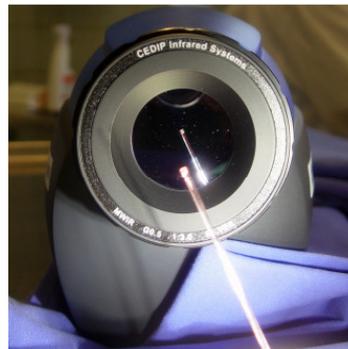
Mit diesen Aufgabenstellungen beschäftigen sich die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Elektronik-Sensorik. Die Kompetenz dieser Arbeitsgruppe unterstützt von den Kollegen der mechanischen Werkstatt umfasst neben der Entwicklung von Spezialmesstechnik, den Spezial-Gerätebau und die Elektronik- und die Software-Entwicklung für Steuer- und Regelaufgaben, für die Messgrößenregistrierung und Signalverarbeitung sowie für die Datenaufbereitung und Archivierung. In den folgenden Abschnitten werden vier aktuelle Beispiele mit den zugrunde liegenden wissenschaftlichen Fragestellungen dargestellt.

2.4.1 Thermographie bei der CO₂-Laser-Steigbügelchirurgie

Thermographische Untersuchungen besitzen in der Medizin ein breites Anwendungsspektrum. Besonderes Interesse an thermographischen Untersuchungen besteht beispielsweise in der Ophthalmologie.

Hier können Messungen der örtlichen Temperaturverteilung bei einer Laserbehandlung des Auges erfolgen, um die Laserleistung bzw. die Pulsdauer so zu wählen, dass keine Gefahr von Gewebsschädigungen besteht. Eine aktuelle Arbeit am Institut befasst sich mit einem ähnlichen Problem aus der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. Ziel der Untersuchungen ist eine Beurteilung der Wärmeverteilung bei der CO₂-

Laser-Steigbügelchirurgie bzw. ob durch den Wärmeeintrag in das Innenohr temporäre Hochtonverluste zu erklären sind.

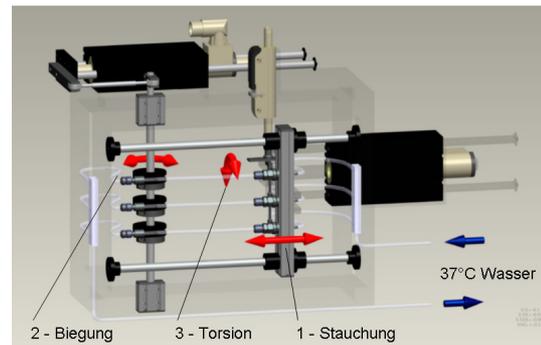


Messanordnung zur Bestimmung der Wärmeverteilung bei der CO₂-Laser-Steigbügelchirurgie – Glaskapillare vor Objektiv der Thermografiekamera, Thermogramm der wassergefüllten Kapillare bei Lasereinwirkung aus einer Videosequenz

Hierzu werden Steigbügel-Präparate auf einer mit 37 °C warmer Flüssigkeit gefüllten Glaskapillare positioniert und mit dem CO₂-Laser erhitzt. Die Untersuchungen ergeben hochdynamische inhomogene Temperaturverteilungen bis zu 100 °C an der Flüssigkeitsoberfläche in der Glaskapillare und mit zunehmender Tiefe stark abnehmende Maximaltemperaturen. In der Thermographiesequenz sind auch gut die thermischen Spuren aus der kapillare geschleuderter Wassertröpfchen zu erkennen, die gleichzeitig zur Thermographieaufnahme mit einer Hochgeschwindigkeitskamera nachgewiesen werden können. Obwohl aufgrund der guten Wärmeleitfähigkeit des Wassers die hohen Temperaturen schon etwa drei Sekunden nach dem Laserpuls abgeklungen sind, wird als Schlussfolgerung aus den Untersuchungen von einer Laserapplikation am bereits eröffneten Innenohr abgeraten.

2.4.2 Multiaxial-Stent-Prüfstand

Im Prüflabor des IIB e.V. besteht die Anforderung der Anwendung komplexer und rationeller Prüfverfahren. Die entsprechenden ISO- und ASTM-Normen schreiben die Parameter der Stentprüfungen wie auch die Anzahl der Prüfzyklen für den Nachweis der Dauerfestigkeit der Prüfobjekte vor. Diese Lastspiele können Zahlen von mehreren Millionen sein, die auch bei hohen Zyklenfrequenzen Prüfzeiten von mehreren Wochen erforderlich machen. In dieser Zeit muss der Prüfstand funktionssicher und automatisch arbeiten. Diese Prüfstände werden in enger Zusammenarbeit von der mechanischen Werkstatt und der Arbeitsgruppe Elektronik-Sensorik entwickelt und aufgebaut. Der aktuell zu realisierende Prüfstand ist ein Multiaxialtester, der bis zu 12 Stents gleichzeitig einer definierten Stauchung und Torsion und anschließend einer Biegung um einen festgelegten Radius und Winkel unterzieht. Die untenstehende Abbildung zeigt den ersten Prototypen dieses Prüfstandes.



Multiaxial-Stentprüfstand zur dynamischen Stenttestung – kombinierte dynamische Beanspruchung von bis zu 12 Stents auf Stauchung, Biegung und Torsion bei Durchströmung der Stents mit 37°C warmem Wasser.

Die Entwicklung und die Herstellung der komplexen Mechanik erfolgten durch die mechanische Werkstatt des IIB e.V. Die Konzeption der drei Linearantriebe und die Programmierung des Prüfablaufs erfolgten durch das Elektroniklabor. Nach einer kurzen Erprobungsphase konnte der Prüfstand erfolgreich validiert werden und steht nun für Routine-Prüfungen zur Verfügung.

2.5 Mikro- und Nanostrukturanalytik

Die strukturelle Charakterisierung im Rahmen der Entwicklung von Implantaten und biomedizinischen Produkten ist die Voraussetzung für die gezielte Beeinflussung ihrer Eigenschaften. Darüber hinaus ist im Rahmen der Zulassung die Überprüfung der strukturellen Unversehrtheit, z.B. nach Langzeitbelastung, erforderlich. Hierzu steht eine Reihe von mikroskopischen Techniken, deren Abbildungsmaßstäbe vom Mikrometer- bis in den Nanometerbereich reichen. Insbesondere durch die Kombination verschiedener Verfahren, wie z.B. optische konfokale Mikroskopie und Elektronenmikroskopie, kann eine umfassende strukturelle Darstellung der Biomaterialien erreicht werden.

2.5.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

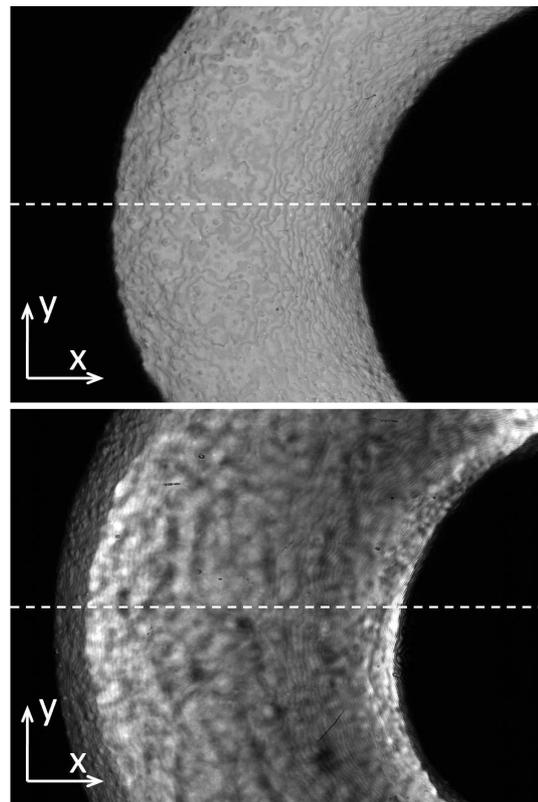
In der konfokalen Mikroskopie wird ein Laserstrahl über die Probe gerastert (x-y-Richtung) und durch eine Apertur im Strahlengang (konfokal: optisch konjugierte Position zum Fokus) nur Licht nachgewiesen, das direkt aus der Fokalebene kommt. Licht aus allen anderen Bereichen wird ausgeblendet. Aufgrund der damit verbundenen Tiefenschärfe kann das so entstehende mikroskopische Bild als optischer Schnitt in x-y-Richtung verstanden werden.



Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop – Gerät Olympus LEXT 3000

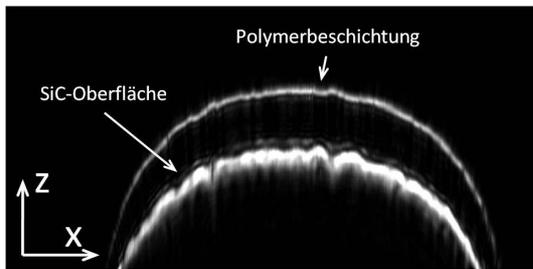
Durch digitale Überlagerung einer Vielzahl solcher Schnitte in verschiedenen Fokalebene (z-Richtung) entsteht ein „3-dimensionales“ Abbild des Objektes. Durch Überlagerung von Line-Scans in verschiedenen Fokalebene resultiert ein Tiefenprofil (x-z-Bild).

Beispielapplikation: Charakterisierung der Polymer (Poly(L-lactid), PLLA)-Beschichtung von Drug-Eluting Stents:



3-dimensionale konfokale Mikroskopie – Polymer-Beschichtung eines Koronarstents und darunter liegende Metall-SiC-Oberfläche. Entlang der gestrichelt eingezeichneten Linie wird das unten dargestellte Tiefenprofil (xz-Scan) aufgenommen.

Zur morphologischen Charakterisierung der Polymer-Beschichtung werden stichprobenartig an verteilten Messpunkten entlang der Stents 3D-Bilder der SiC-Oberfläche und der Polymer-Beschichtung sowie Tiefenprofile zur Bestimmung der Schichtdicke aufgenommen.



Tiefenprofil der Polymerbeschichtung – entlang der oben eingezeichneten Linie, das sich aus der Überlagerung von Line-Scans in verschiedenen Fokalebene ergibt. Aufgrund der unterschiedlichen Brechungsindizes ergeben sich die optischen Reflexe an den Grenzflächen. Damit kann die Schichtdicke ausgewertet werden, die in diesem Fall ($4,9 \pm 0,6$) μm beträgt.

Konfokale Mikroskopie mit im Vergleich zur konventionellen Mikroskopie erhöhter Auflösung und der hohen Tiefenschärfe ermöglicht hier neben der strukturellen Charakterisierung der Beschichtungsoberfläche auch die Abbildung der unter der transmittierenden Polymer-schicht liegenden SiC-Metall-Oberfläche sowie die Bestimmung der Schichtdicke mit einer Auflösung in z-Richtung deutlich unterhalb eines Mikrometers.

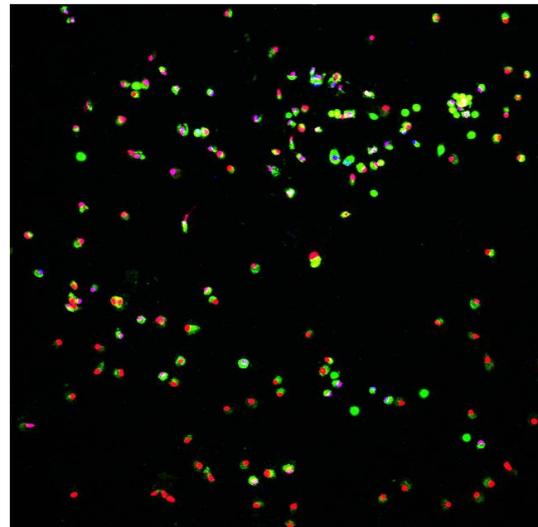
2.5.2 Konfokale Laser-Fluoreszenz-Mikroskopie

Bei dieser Technik wird die konfokale Optik für die Fluoreszenzmikroskopie genutzt. Manche Stoffe sind fluoreszent (autofluoreszent), eine Färbung ist dann nicht erforderlich. Andere können spezifisch angefärbt und mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden. Da das emittierte Licht in der Regel langwelliger als das anregende Licht ist, kann es im selben Strahlengang optisch mit dichroitischen Spiegeln (Farbteiler) getrennt werden.



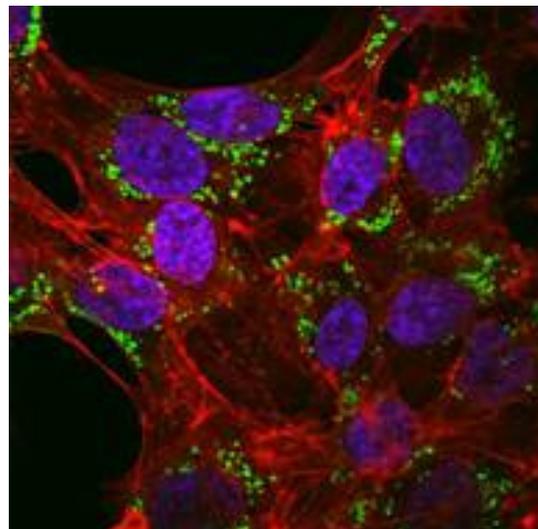
Konfokales Fluoreszenz-Mikroskop – Gerät Olympus Fluoview VF 1000

Beispielapplikationen: Biokompatibilität



Biokompatibilitätstest Live/Dead-Assay – Mausfibroblasten wurden auf einer wenig biokompatiblen Oberfläche ausgesät und mit dem Live/Dead-Assay gefärbt. Alle lebenden Zellen fluoreszieren grün, bei toten Zellen färbt sich der Zellkern dagegen rot. Die hohe Anzahl roter Zellkerne zeigt, dass die Zellen geschädigt und in ihrem Wachstum beeinträchtigt werden.

Beispielapplikation: Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln



Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln in humane Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) – die grüne Fluoreszenz der Nanopartikel (Calcein) ist in Endozytosevesikeln um den Zellkern (blau) herum sichtbar. Zur besseren Visualisierung der Zellkonturen wurde das Zellskelett mit Phalloidin gefärbt (rot).

2.5.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie basiert auf der Abstrahlung der Objektoberfläche mittels eines feingebündelten Elektronenstrahls. Der komplette Vorgang findet im Hochvakuum ($8 \cdot 10^{-5}$ Pa) statt, um Wechselwirkungen der Elektronen mit Atomen und Molekülen in der Luft zu vermeiden. Trifft der Elektronenstrahl auf die Probe, sind verschiedene Wechselwirkungen möglich, deren Nachweis (sekundäre Elektronen, rückgestreute primäre Elektronen, charakteristische Röntgenstrahlung) Informationen über die Beschaffenheit der Probe geben.



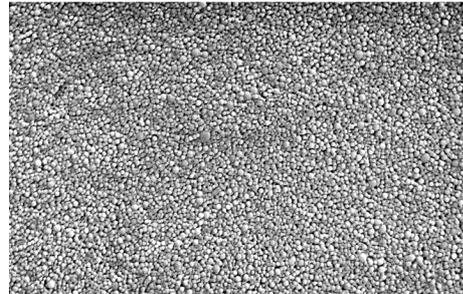
Rasterelektronenmikroskop – Gerät Aspex PSEM Express. Gefördert aus Mitteln des Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) und des Europäischen Sozialfonds (ESF) im Rahmen der Verbundforschung zwischen Wirtschaft und Wissenschaft des Landes Mecklenburg-Vorpommern.



Beim ESEM (Environmental Scanning Electron Microscopy), einer speziellen Variante der Rasterelektronenmikroskopie, befindet sich die Probenkammer nicht unter Hochvakuum, sondern unter einem Wasserdampfdruck von 1,2 mbar. Nichtvakuumstabile oder ausgasende Proben können unter erhöhtem Restgasdruck untersucht werden. Durch die Aufladungskompensation (Neutralisierung der Probenoberfläche durch Restgasionen in der Probenkammer) können nichtleitende Proben direkt, ohne vorherige Metallisierung, mikroskopiert werden. Zur Charakterisierung der Elementzusammensetzung kleiner Probenbereiche kann der Nachweis der charakteristischen Röntgenstrahlung genutzt werden (EDX: energy dispersive X-ray analysis). Schlägt ein primäres Elektron ein stark gebundenes kernnahes Elektron heraus, wird das frei gewordene Niveau durch ein energiereicheres Elektron aus einem höheren Orbital aufgefüllt. Die dabei frei

werdende Energie wird als Röntgen-Strahlung abgegeben und ist spezifisch für das Element.

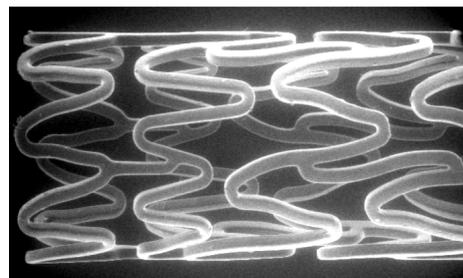
Beispielapplikationen: Abbildung von Polymer-Nanopartikeln und Darstellung von Koronarstents:



Polymer-Nanopartikel – REM-Aufnahme von Polymer-Nanopartikeln nach Gold-Beschichtung

Die Größenverteilung von Polymer-Nanopartikeln (PLLA) mit einem mittleren Durchmesser von 250 nm wurde nach Abdeckung mit einer dünnen Gold-Schicht im Rasterelektronenmikroskop untersucht.

Koronarstents mit einer nichtleitenden bioresorbierbaren Polymerbeschichtung können im ESEM-Modus (0,9 mbar Wasserdampfdruck) auch ohne Metallisierung untersucht werden.



Polymer-beschichtete Koronarstents – Strukturelle Charakterisierung der Polymerbeschichtung eines Koronarstents im ESEM-Modus

2.5.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissions-Elektronenmikroskopie als eine der Standard-Untersuchungsmethoden im Bereich der Material- sowie der Biowissenschaften und der Medizin stellt das elektronenoptische Analogon zur optischen Durchlichtmikroskopie dar.



Transmissionselektronenmikroskop – Gerät JEOL JEM-1400. Gefördert aus Mitteln des Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) und des Europäischen Sozialfonds (ESF) im Rahmen der Verbundforschung zwischen Wirtschaft und Wissenschaft des Landes Mecklenburg-Vorpommern.



Aufgrund der geringeren de-Broglie-Wellenlänge der Elektronen bei den im TEM typischen Beschleunigungsspannungen ist die erreichbare Auflösung jedoch mit unter einem Nanometer bis hin zu atomarer Auflösung um etwa einen Faktor 1000 besser. Das durch die Wechselwirkung der Elektronen mit dem Probenmaterial entstehende Bild wird über eine elektromagnetische Linsenanordnung vergrößert und auf einen Fluoreszenz-Schirm bzw. eine CCD-Kamera abgebildet. Eine Beispielapplikation zur Darstellung der Endozytose von Nanopartikeln in Mausfibroblasten ist im Abschnitt 2.2.1 dargestellt.

2.5.5 Rasterkraftmikroskopie

Bei der Rasterkraftmikroskopie (Atomic force microscopy: AFM) wird ein flexibler Hebelarm, der Cantilever, über die Oberfläche gerastert und dessen Auslenkung aufgrund der mikroskopischen Wechselwirkung mit der Probe in ein elektrisches Signal umgewandelt. Hierbei ist die langreichweitige attraktive Wechselwirkung zwischen der Probe und dem Cantilever im Wesentlichen durch die van der Waals-Wechselwirkung sowie bei *in vitro* Applikationen durch die Kapillarkräfte bestimmt. Bei sehr kurzen Abständen dominiert dann die repulsive Wechselwirkung.

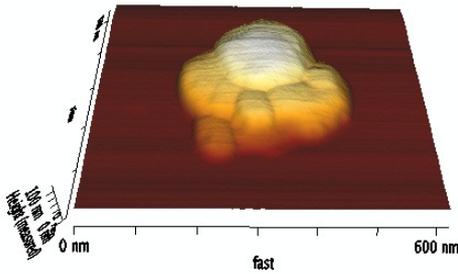


Rasterkraftmikroskopie – Rasterkraftmikroskop NanoWizard® I der Firma JPK Instruments

Durch den Einsatz geeigneter Spitzenmaterialien können jedoch z.B. auch die magnetischen oder elektrostatischen Eigenschaften der Probe untersucht werden. Die Auslenkung des Cantilevers wird über die Reflexion eines Laserstrahls und dessen Ablenkung auf einer ortsempfindlichen 4-Quadranten-Photodiode nachgewiesen. Mit dem NanoWizard I können Mikrostrukturen in einem Rasterfeld von maximal $100 \times 100 \mu\text{m}$ untersucht werden. Die hohe Auflösung des AFM im Sub-Nanometer-Bereich erlaubt auch die Untersuchung von Strukturen in der Größenordnung weniger Nanometer.

Beispielapplikation: Abbildung von Gold-Nanopartikeln

Zur Untersuchung der Größenverteilung und des Agglomerationsverhaltens von kugelförmigen Gold-Nanopartikeln eines mittleren Durchmessers von $D = 100 \text{ nm}$ wurden diese auf ein frisch gespaltenes Glimmerplättchen mittels eines Spin-Coating-Prozesses aufgebracht. Anschließend wurde die Probe unter dem AFM mit einem Standard-Cantilever im Contact-Mode untersucht. Die untenstehende Abbildung zeigt die Ergebnisse der Höhenmessungen in einer leicht nach vorn gekippten 3D-Darstellung. Es ist gut zu erkennen, dass sich mehrere kleinere Partikel um ein größeres Teilchen gruppiert haben. Mit der Auswertesoftware kann man die Höhen und Durchmesser der Partikel aus der 2D-Draufsicht bestimmen.



Agglomeration von Gold-Nanopartikeln in der Rasterkraftmikroskopie

2.5.6 Mikro-Computertomographie

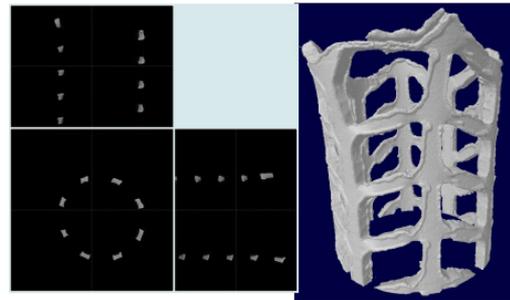
Für morphologische Untersuchungen und zur Rekonstruktion komplexer Geometrien bis in den Submillimeter-Bereich steht am IBMT das Mikro CT Skyscan 1172 (SkyScan, Kontich, Belgien) zur Verfügung. Hilfseinrichtungen wie eine Feinpositionierbühne zur optimalen Positionierung von Untersuchungsobjekten sowie verschiedene Phantome für Knochendichtemessungen sind vorhanden.



Mikro-Computertomograph – Gerät µCT SkyScan 1172

Der Mikro-Computertomograph (CT) erlaubt die zerstörungsfreie, hochauflösende und verzerrungsfreie Darstellung von Proben im Tomogramm und die nachfolgende morphologische und quantitative Auswertung bis hin zur dreidimensionalen Rekonstruktion. Der Mikro-CT ist wie der konventionelle CT besonders geeignet für Proben mit mäßiger Röntgenstrahlschwächung, also Polymere, Knochen und Metalle mit niedriger Ordnungszahl. Zur Erzielung eines hohen Weichteilkontrastes kann die Anwendung von Kontrastmitteln erforderlich sein. Prinzipiell ist der Mikro-CT eine vereinfachte Abwandlung des konventionellen CT, der die Untersuchung von kleinen Proben mit besonders hoher isotroper Auflösung erlaubt. Der Hauptunterschied zum konventionellen CT besteht in der festen Anordnung der

Röntgenquelle und des Detektors, zwischen denen ein Probenstisch rotiert. Der Grundgedanke der Computertomographie ist die Aufnahme von zahlreichen Röntgenprojektionsbildern unter verschiedenen Ansichtswinkeln, aus denen durch Anwendung mathematischer Algorithmen der Schnittbildsatz (Tomogramm) errechnet wird.



Tomographie und 3-dimensionale Rekonstruktion eines Polymerstents

Die Kantenschärfe der durch die Rückprojektion notwendigerweise verrauschten Bilder wird dabei durch die Anwendung von mathematischen Filterfunktionen erhöht. Die Darstellungsqualität im Tomogramm nimmt mit der Anzahl der Projektionsbilder zu. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe einer speziellen Software, die eine Schwellwertsegmentierung der Bilder und eine dreidimensionale Rekonstruktion ermöglicht. Die vorhandenen Phantome erlauben eine kalibrierte Bestimmung der mittleren Knochenmineraldichte in einer definierten Region of Interest. Zugänglich für Untersuchungen am Mikro-CT sind Proben mit einem maximalen Durchmesser von 80 mm und einer Länge von 100 mm. Zur Vermeidung von Bewegungsartefakten während der teilweise langen Scandauer, die je nach Auflösung, Objektgröße und Durchstrahlbarkeit bis zu mehreren Stunden betragen kann, ist eine feste Fixierung der Probe auf dem Drehtisch notwendig. Bei feuchten Proben kann das Einschweißen in Kunststoffolie oder die Untersuchung in einem durchstrahlbaren Behälter zur Vermeidung der Austrocknung und Schrumpfung erforderlich sein. Typische Anwendungen des Mikro-CT sind die morphologische Untersuchung und die Bestimmung der Mineraldichte von Knochenproben. Weiterhin wird das Gerät zur Charakterisierung von kleinen Implantaten wie z.B. vaskulären Stents genutzt.

3 Leistungsangebote an die regionale Wirtschaft

Die Institute verfügen über eine umfangreiche Geräteausstattung, die sich auf ca. 6 Mio. € Investitionsmittel gründet. Wie im vorangegangenen Abschnitt dargestellt, bestehen Geräteausstattungen insbesondere zur morphologischen Untersuchung (Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), Rasterelektronenmikroskopie (SEM/ESEM), Laserrasterelektronenmikroskopie (CLSM), Rasterkraftmikroskopie (AFM)), zur biomechanischen und physiko-chemischen Untersuchung (Dynamisch-Mechanische-Analyse (DMA), Dielektrische Analyse (DEA), Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC), Rheometrie, Infrarotspektroskopie und –mikroskopie (FTIR)) von Implantaten und Biomaterialien sowie zur funktionellen *in vitro* Prüfung von Implantaten. Darüber hinaus bestehen Anlagen zur Herstellung von Implantaten (CO₂-Laserplotter, Mini-Extrusionsanlage, Tauchroboter), Rechentechnik für CAD-Entwicklungen und die strukturmechanische Finite-Elemente-Analyse sowie Reinraum-Labore für die Entwicklung und Herstellung von aktiven Drug-Eluting-Implantatbeschichtungen.

Als selbständige Einheit besteht das Prüflabor für Kardio+Vaskuläre Produkte, welches wissenschaftliche Prüfaufgaben im Rahmen von Dienstleistungen für die Zulassung von Medizinprodukten und Schadensgutachten übernimmt. Das Leistungsangebot umfasst außerdem die *in vitro* und *in vivo* Biomaterialprüfung, die in Kooperation mit dem IBMT der Universität Rostock GLP-zertifiziert durchgeführt wird.

Die technologieorientierten Institute mit einem auf die biomedizinische Forschung und die regionale biomedizinische Wirtschaft ausgerichteten Profil stellen zum gegenwärtigen Zeitpunkt einen wesentlichen Bestandteil der Forschungs- und Transferinfrastruktur auf diesem Gebiet in Mecklenburg-Vorpommern dar. Die Arbeiten auf dem Gebiet des Technologietransfers unterstützen kleine und mittelständische Unternehmen in der Region beim Erreichen von Alleinstellungsmerkmalen und Technologieführerschaften sowie bei der Erweite-

rung des innovativen Produktportfolios und stärken somit die Wettbewerbsfähigkeit und die Innovationskraft regionaler medizintechnischer Unternehmen. Dieser Technologietransfer verbessert insgesamt die regionale Wirtschaftsstruktur und trägt zur Stärkung Mecklenburg-Vorpommerns als Forschungs- und Entwicklungsstandort bei.

Die Arbeit des Prüflabors für Kardio+Vaskuläre Produkte hat als Anerkanntes Prüflaboratorium für Medizinprodukte für Kunden aus der europäischen Medizinprodukteindustrie eine überregionale Ausstrahlungskraft. Die Strukturen der Institute und ihre interdisziplinäre Ausrichtung ermöglichen es, flexibel auf aktuelle Trends in Forschung und Entwicklung zu reagieren. Die weitere Entwicklungsstrategie sieht weiter vor, das erreichte wissenschaftlich-technische Know-how innerhalb von nachhaltigen wissenschaftlichen Personalstrukturen zu verstetigen und Struktureffekte im Interesse des Landes zu erzielen und den Strukturwandel in Mecklenburg-Vorpommern mit zu gestalten.

Dienstleistungen und Technologietransferleistungen auf folgenden Gebieten werden angeboten:

- Mess- und Analyseaufgaben
- Entwicklung und Prüfung von Implantaten
- GLP-Prüfung von Biomaterialien

Darüber hinaus werden von beiden Instituten zur Verbreitung und Förderung des Transfers der gewonnenen wissenschaftlichen Erkenntnisse regelmäßig Fachtagungen mit ca. 150 Teilnehmern aus Industrie und Forschung in Zusammenarbeit mit klinischen Partnern organisiert. Im Jahr 2010 wird die Tagung BMT2010 als 3-Länder-Tagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Fachgesellschaften für Biomedizinische Technik mit ca. 800 Teilnehmern aus Medizin, Naturwissenschaft, Technik und Industrie ausgerichtet.

4 Speziallabore und Geräteausstattung

4.1 Speziallabore

4.1.1 Prüflabor für Kardio+Vaskuläre Produkte

Aufbauend auf einer langjährigen Tradition wissenschaftlicher Arbeiten des Institutes für Biomedizinische Technik und des Instituts für Implantattechnologie und Biomaterialien e.V. (IIB e.V.) mit der Kardiologie und Herzchirurgie der Universität Rostock werden in Rostock-Warnemünde unter dem Dach des IIB e.V. Prüfverfahren für kardiovaskuläre und vaskuläre Produkte entwickelt und gerätetechnisch umgesetzt. Die Prüfverfahren konzentrieren sich dabei auf aktuelle Produkte zur minimalinvasiven, kathetergestützten Behandlung verengter Gefäße. Schwerpunkte sind vor allem geometrische und mechanische Parameter von PTCA/PTA-Ballonkathetern, ballonexpandierbare und selbstexpandierende Stents als Gefäßstützen, aber auch Führungsdrähte, Führungskatheter und weiteres in diesem Zusammenhang benötigtes Zubehör auf der Grundlage der aktuellen internationalen Produktstandards (z.B. ISO 25539-2).

Die Prüfungen werden für Produktzulassungen, Leistungsvergleiche und spezielle anwendungsbezogene Fragestellungen durchgeführt. Aus diesen Gründen wurde innerhalb des IIB e.V. in Rostock-Warnemünde eine Struktur geschaffen, die diese Prüfungen durchführen und sie standardisiert und vertraulich auch der Industrie oder den Zulassungsbehörden für Medizinprodukte anbieten kann.

Die Akkreditierung des Prüflabors gemäß DIN EN ISO/IEC 17025 und die Anerkennung als Prüflaboratorium für Medizinprodukte nach Richtlinie 93/42/EWG und DIN EN ISO/IEC 17025 sind bereits erfolgt.



4.1.2 GLP-Prüflabor für Biomaterialien

GLP (Good Laboratory Practice) ist ein weltweiter Standard für die Qualitätskontrolle, Qualitätssicherung und Dokumentation u.a. zur Zulassung von Arzneimitteln (hierfür erforderliche Tierversuche wurden bereits 1978 dem GLP-Verfahren unterworfen) und Medizinprodukten. Die Arbeitsabläufe im GLP-Prüflabor sind in SOPs (Standardarbeitsanweisungen) eindeutig festgelegt.

Unser Labor ist seit dem Jahr 1999 GLP-zertifiziert, verfügt über eine Vollausstattung im Bereich Zellkultur (einschließlich zweier steriler Werkbänke) und bietet nach ISO 10993 folgende Tests an:

Cytotoxizität in vitro

In der Regel wird die Cytotoxizität durch Messung der Zellvitalität (s. Abschnitt 3.3.1) bestimmt. Darüber hinaus kann der Effekt von Substanzen oder Materialien auf die Zellproliferation bestimmt werden.

Sowohl Implantate und Implantatextrakte als auch biologisch aktive Substanzen werden auf etwaige zytotoxische Effekte mit Zellen in Kultur getestet.

Hämokompatibilität in vitro

Um das Koagulationspotenzial von Substanzen oder Materialien zu bestimmen, wird Blutplasma bzw. -serum von humanen Spendern auf Prothrombin-Fragment F1+2 oder β -Thromboglobulin getestet.

Um die Komplementaktivierung von Substanzen oder Materialien zu bestimmen, wird Blutplasma bzw. -serum von humanen Spendern auf Komplement C3a des-Arg getestet. Das Komplementsystem ist Teil der humoralen Immunabwehr. Ein diagnostisch wichtiger Bestandteil ist das C3-Komplement, das unmittelbar nach seiner Bildung im Blut von der

Serumkarboxypeptidase N zu C3a des-Arg umgebaut wird. Diese Enzymreaktion ist ein wichtiger Kontrollmechanismus für die Wirkung von C3-Komplement, denn C3a des-Arg besitzt weniger als 1% der biologischen Aktivität des C3a-Peptids. Der Komplementtest wird unter Anwendung eines ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) vorgenommen.

Biokompatibilität in vivo

Die GLP-basierte Biomaterialprüfung umfasst auch Tierversuche. Die hierfür herangezogenen Tiermodelle sind Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) und Meerschweinchen (*Cavia cobaya*).

- Test auf Sensibilisierung von Materialextrakten (externe dermale Applikation)
- Test auf Irritation von Materialextrakten (intradermale Applikation)
- Test auf systemische und subchronische Toxizität von Implantatmaterialien
- Test auf Langzeiteffekte von Implantatmaterialien durch subkutane oder intramuskuläre Implantation

4.1.3 Reinraumlabor

Das Institut für Biomedizinische Technik verfügt seit dem Frühjahr 2009 über ein Reinraumlabor für die Entwicklung und Herstellung innovativer Implantate und Implantatbeschichtungen. Auf einer Reinraumfläche von 20 m² können Laborarbeiten bei reduzierter Partikelbelastung entsprechend ISO-Klasse 7 durchgeführt werden. Für chemische und präparative Arbeiten stehen Laborabzüge und Sterilwerkbenke zur Verfügung. Als Besonderheit verfügt das Labor über eine Ausstattung für die Sprühbeschichtung von Implantaten mit Pharmakainkorporierten Polymeren.



Reinraumlabor – Implantatherstellung und Beschichtung

4.2 Mess- und Analysetechnik

4.2.1 Mikroskopie

- **Konfokales Laserscanning-Mikroskop**
Olympus LEXT OLS 3000
Kombination konventioneller Auflichtmikroskopie mit Confocal Laser Scanning (408 nm), Polarisationsmikroskopie und Differential Interference Contrast (Nomarski DIC)
- **Konfokales Fluoreszenz-Mikroskop**
Olympus FLUOVIEW FV1000:
Kombination konventioneller Fluoreszenzmikroskopie (Epifluoreszenz) mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie und Differential Interference Contrast (Nomarski DIC)
- **Rasterelektronenmikroskop mit ESEM-Modul, EDX-Analyzer**
Philips XL30 SEM
Beschleunigungsspannung 10-25 kV
Punktauflösung 2 nm
Vergrößerung x50 – x100.000
- **Transmissionselektronenmikroskop (JEOL)**
JEOL JEM-1400
Beschleunigungsspannung 40-120 kV
Punktauflösung 0.20 nm,
Linienauflösung 0.38 nm
Vergrößerung x50 – x800.000
- **Rasterkraftmikroskop**
NanoWizard® I mit Flüssigkeitsmesszelle (JPK Instruments), Kombination mit optischem Durchlichtmikroskop Fa. Nikon
- **Ultraschallmikroskop**
SAM 100L (Krämer Scientific Instruments)

4.2.2 Bildgebung

- **Mikro-Computertomograph**
Skyscan 1172 (SkyScan, Kontich, Belgien)
Auflösung bis 2 µm (in Abhängigkeit vom Scanvolumen)
Beschleunigungsspannung max. 8 kV
Stromstärke max. 100 µA
- **Videoendoskop 1.3 mm (Olympus)**

- **Digitale Makrofotografie-Einrichtung bis 4:1**
Canon Eos 350D (Canon Inc., Japan)
55 – 200 mm Objektiv
Novoflex Umkehrherring für Makrofotographie

4.2.3 Chemische Analytik / Spektroskopie

- **FTIR/FTNIR Spektrometer**
Equinox 55 (Bruker)
Spektraler Bereich: 400-12000 cm⁻¹
Spektrale Auflösung: max. 0.20 cm⁻¹
IR-Datenbanken Defined Polymers und IChem ATR
- **FT-Raman**
FRA 106 (Bruker)
Spektraler Bereich: 0-3500 cm⁻¹
Spektrale Auflösung: max. 2 cm⁻¹
Laserpower: max 1.5 W
- **Konfokales FT-IR Mikroskop mit ATR-Einheit**
HYPERION (Bruker), ATR-Objektiv (x20), Transmission für 5-15µm dünne Proben, Objektive (x15, x20, x36)
- **Gel-Permeationschromatographie**
SECcurity GPC1200 (PSS)
Modulares GPC/SEC-System
RI- und/oder UV-Detektion, Viskosität
Probengeber Präzision (<0,5% RSD)
- **HPLC-Anlagen**
Smartline (Knauer), modulares System mit Diodenarray-Detektor (DAD), HPLC-Säulen in 7 Modifikationen unterschiedlicher Selektivität (C18, C18A, C8, PFP, Phenyl, CN, Si)
- **Ubbelohde-Viskosimeter**
Durchsicht-Thermostat CT 52 (Schott), speziell für die Messung der Viskosität von newtonschen Flüssigkeiten in Kapillarviskosimetern, zwei automatische Messstellen
- **Kontaktwinkelmessgerät**
OCA 15EC (dataphysics),
Bestimmung der statischen und dynamischen

Kontaktwinkel, der freien Oberflächenenergie und der Grenz- und Oberflächenspannung

- UV-Vis-Photometer mit Nanozelle

Thermo Scientific BioMate 3S (Thermo Fisher Scientific),
Zweistrahlg-Gerät mit Internem Referenzdetektor und Xenon-Blitzlampe, Wellenlängenbereich

190-1100 nm, Wellenlängengenauigkeit von $\pm 1,0$ nm, nanoCell Zubehör erlaubt kleine Probenolumina bis hinab zu $0,7\mu\text{l}$

- Vorprogrammierte und frei konfigurierbare Local Control Assay-Methoden wie z.B. direkte Proteinkonzentration bei 280 und 205 nm, Zellwachstum

4.3 Zell- und Molekularbiologie

- Thermocycler für quantitative PCR (Eppendorf realplex Mastercycler)
- 2D-Gelelektrophorese (BioRad)
- Mikrotiterplattenleser Fluostar Optima (BMG Labtech) mit 3 Modi: Absorption, Fluoreszenz, Lumineszenz
- Sterilwerkbänke (Heraeus Herasafe)
- CO₂-Brutschränke (Heraeus)
- Kühlzentrifuge (Heraeus Biofuge primo R)
- Ultraschallhomogenisator (Sartorius Labsonic M)

4.4 Präparationstechnik

- Automatische Schleif- und Poliereinrichtung
TegraPol-15 (Struers)
200 mm Scheibe, Stufenlose Drehzahlregelung von 40 bis 600 U/min
TegraForce-1
Gleichzeitige Bearbeitung von ein bis drei Proben bis 40 mm Durchmesser
- Schleif und Poliereinrichtung
EcoMet 3000 (Bruehler)
203 mm Scheibe, Drehzahlregelung von 10 bis 500 U/min
- Vibrationspoliergerät
VibroMet 2 (Bruehler)
Polierwanne mit 305 mm Durchmesser
- Diamantdrahtsäge
Histo-Saw DDM-P 216 (Medim GmbH, Deutschland)
- Kryomikrotom
RM 2155 Rotationsmikrotom (Leica) mit Kryoeinheit
Hubweg bis 70 mm
Schneiden in Abständen von 5, 15 oder 30 µm
Variable Schnittgeschwindigkeit
- Kritischer-Punkt-Trockner
CPD 7501 (Polaron), für die Trocknung biologischer Proben in der Elektronenmikroskopie
- Gefriertrocknungsanlage
Alpha 1-2 LD plus (Christ), Laboranlage mit einer Leistung von 2,5 kg, Eiskondensator-Temperatur - 55°C.
- Vakuumkonzentrator
RVC 2-33 IR (Christ), besonders lösungsmittelbeständige Anlage (geeignet für DMSO, ACN, TFA), Rampen-Programmierung für Druck und Temperatur, Halogen-IR-Strahler für die rasche Eindampfung
- Vakuumtrockenschrank
VO 200 (Memmert), Trocknung und Aufbewahrung von Probenmaterial unter reduzierten Druck, Temperaturbereich bis +200°C, Volumen 29l
- Inertgasanlage
Eigenkonstruktion, erlaubt Synthesen und Handhabungen unter einer Argon-Schutzatmosphäre
- Spin-Coater
KL-SCE-20 (Lot-Oriel), Leerlaufdrehzahl bis zu 12.000 U/min, passive oder aktive Vakuumsaugung, Drehzahlprogramme

4.5 Werkstoffprüfung

- **Universalfestigkeitsprüfmaschine**
Zwick/Roell BZ 2.5/TN1S (Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland), 10 N, 50 N, 500 N und 2500 N Kraftmessdosen, Klimakammer für Untersuchungen bei 37°C
- **Registrierende Mikrohärte**
Fischerscope HM2000 XYp (Helmut Fischer GmbH, Sindelfingen, Deutschland), Vickers Diamant-Eindringkörper
- **Vickers-Mikrohärteprüfgerät**
MHT 4 (ZEISS)
- **Härteprüfgerät Shore A und D (Mitutoyo)**
- **Dynamisch Mechanische Analyse**
Dynamic Mechanical Analyzer DMA 2980 (TA-Instruments, New Castle, USA), Schub-, Druck-, Zug-, Biege-, Faden- und Filmaufnehmer, GCA (TA-Instruments, New Castle, USA)
- **Mikro-DSC mit Durchlichteinheit**
Mettler-Toledo ThermoSystem FP900 (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Schweiz), Sensor FP84 (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Schweiz)
- **Rheometer mit Thermostat**
Haake Rheo Stress 1 (Thermo Fischer Scientific GmbH, Deutschland), Kältethermostat DC30-K10 (Thermo Fischer Scientific GmbH, Deutschland), Messeinrichtungen: Drehkörper C20/1 Titan; Kegel mit D60, 1° Titan; Doppelkegel DC66/1° mit Deckel; Einweg-Plattenaufnahme Keramik; Platte D60mm für Doppelkegel; Messplatten-aufsatz 20 Bajonett; Messplatten-aufsatz 60 Bajonett; Halter für MP20-E Bajonett

4.6 Implantattechnologie

4.6.1 Implantatentwicklung

- CAD/CAE-Workstations
Softwareausstattung u. a. ProEngineer Wildfire 5.0 (Parametric Technology Corporation, USA), Patran 2007 r1b (MSC Software Corporation, USA), Abaqus (Simulia, USA), Amira 3.1 (Visage Imaging GmbH, USA)

4.6.2 Implantatfertigungsverfahren

- Labor-Compounder
MiniLab (Haake), konische Doppelschnecken mit gleichlaufenden und gegenläufigen Schnecken, Compoundierungs- und Viskositätstests für kleine Probenvolumen bis 5 g oder 7 cm³ bei T_{max} = 350 °C
- Elektro-Spinning-Anlage (Eigenkonstruktion)
Hochspannung: -30 bis +30 KV, pulsationsarme Spritzenpumpe
- CO₂-Laserplotter
LP1007 (Wild Emco Lasertec, Österreich), Ausgangsleistung max. 150 W, Laserstrahldurchmesser 30 µm
- CAD/CAM-Arbeitsplatz
Software: AlphaCAM (alphacam GmbH, Deutschland)

4.6.3 Beschichtungsverfahren

- Niederdruckplasmaanlage
Femto PC (Diener), Kammer: Ø 100 mm, L 280 mm, Kammervolumen: ca. 2,8 Liter, Gaszuführung: 2 Gaskanäle über MFC
Generator: 40kHz/100W, stufenlos
- Sputteranlage
Sputter Coater B 7340 (Agar), Anlage zur Beschichtung von Proben mit Gold, Probengröße max. 100 mm Durchmesser
- Biomaterialgießverarbeitung
- Tauchroboter TAURO (Eigenkonstruktion)

Vollautomatisches Tauchen von bis zu 15 röhrenförmigen Halbzeugen

- Spraycoating für aktive Implantate
2 Beschichtungsanlagen RAMSES (Eigenkonstruktion), Beschichtung flächiger oder runder Implantate nach dem Airbrush-Prinzip

4.6.4 Implantatatestung

- Ballonkatheterprüfstände
- Stentprüfstände, 2D-Lasermesseinrichtung (LASTUS, BALTUS, PUSH, DIAMES)
Prüfung von Maßen und Funktion nach DIN EN ISO 25539-2
- Ermüdungsprüfstände für arterielle Stents (DST-Serie, Multiaxial-Prüfstände)
Prüfung der Dauerbeständigkeit bei physiologischer Beanspruchung unter worst-case-Bedingungen
- Dehnungs- und Beschleunigungsfineintechnik (z.B. HOTTINGER)
- Funktionsprüfstand bei simulierter Anwendung mit Charakterisierung von Schichtintegrität und Partikelfreisetzung
Simulierte Anwendung in angepassten Gefäßmodellen, Messung von Partikelgrößenverteilungen, Oberflächenanalyse mittels REM
- Glaukomstent-Drainage-Prüfstand (Eigenkonstruktion)
Vollautomatische Volumenstrommessung durch Mikrostensts zur Glaukomtherapie bei variabel einstellbaren Druckdifferenzen in Klimakammer bei 37 °C

Herausgeber:

Institut für ImplantatTechnologie
und Biomaterialien e.V.

Prof. Dr.-Ing. Klaus-Peter Schmitz,
Vors. des Vorstandes
Friedrich-Barnewitz-Straße 4
D-18119 Rostock-Warnemünde
Tel.: +49 381 54345 601
Fax: +49 381 54345 602
Web: www.iib-ev.de

Vorstand:

Prof. Dr.-Ing. Klaus-Peter Schmitz, Vorsitzender
Prof. Dr.-Ing. Detlef Behrend, Stellv. Vorsitzender
Gerhard Sekunde (Schatzmeister)
Prof. Dr. med. dent. Heinrich von Schwanewede

Prüflabor für Kardio+Vaskuläre Produkte:

Anerkanntes Prüflaboratorium für
Medizinprodukte
nach Richtlinien 93/42/EWG und
DIN EN ISO/IEC 17025
Dr.-Ing. Wolfram Schmidt, Leiter
Tel.: +49 381 54345 508
E-Mail: wolfram.schmidt@iib-ev.de

In Zusammenarbeit mit:

Universität Rostock
Universitätsmedizin
Institut für Biomedizinische Technik
Prof. Dr.-Ing. Klaus-Peter Schmitz, Direktor
Friedrich-Barnewitz-Straße 4
D-18119 Rostock-Warnemünde
Tel.: +49 381 54345 501
Fax: +49 381 54345 502
Web: www.ibmt.med.uni-rostock.de

Universität
Rostock  Traditio et Innovatio