

**Auf dem Weg zu neuartigen Biomaterialien:
Nanoporöse Beschichtungen und
organisch-anorganische Kompositwerkstoffe**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von Dipl.-Chem. Ilka Krueger
geboren am 09.08.1978 in Alfeld (Leine)

2006

Referent: Prof. Dr. Peter Behrens

Korreferent: Prof. Dr. Michael Binnewies

Tag der Promotion: 17. Juli 2006

Inhaltsübersicht

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese und Charakterisierung von nanostrukturierten Silica-Filmen und organisch-anorganischen Kompositwerkstoffen auf Basis von Polysacchariden und Hydroxylapatit. Im Rahmen einer Kooperation mit der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig und der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) werden diese Materialien für eine potentielle Anwendung als Knochenersatzmaterial bei der Rekonstruktion der Gehörknöchelchenkette im Mittelohr auf ihre Biokompatibilität und ihre Schalleitungseigenschaften geprüft.

Die nanostrukturierten Silica-Filme wurden durch ein Tauchbeschichtungsverfahren auf Standard-Glasobjektträgern und auf dem kommerziell erhältlichen Implantatmaterial Bioverit®II aufgebracht. Als strukturdirigierende Agenzien wurden nicht-ionische Tenside wie Octaethylenglycolmonododecylether und amphiphile Triblockcopolymerer der Pluronic®-Gruppe verwendet. Nach der strukturanalytischen Charakterisierung wurden zum einen Untersuchungen zur *in-vitro*-Bioaktivität in einer simulierten Körperflüssigkeit (*simulated body fluid*) durchgeführt, die nahezu die gleiche Ionenkonzentration und pH-Wert wie menschliches Blutplasma aufweist. Zum anderen wurde an der GBF der Einfluss der Nanostrukturen auf das Zellverhalten zellbiologisch untersucht.

Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung und strukturanalytischen Charakterisierung von organisch-anorganischen Kompositwerkstoffen auf Basis von Chitosan bzw. Hyaluronsäure und Hydroxylapatit. Die Synthese erfolgt in einem bio-inspiriertem Ansatz durch eine Co-Präzipitation aus wässriger Lösung. Die Schalleitungseigenschaften der Kompositmaterialien wurden mit audiologischen Messungen an der MHH geprüft.

Eines der Materialien, mit nanoporösem Siliciumdioxid beschichteten Bioverit®II, wurde schließlich für die Überprüfung im Tierversuch ausgewählt und lieferte dort vielversprechende Ergebnisse.

Stichworte: Nanostrukturen, Biomaterial, Siliciumdioxid, organisch-anorganische Kompositmaterialien, Implantat.

Abstract

The studies described in this thesis deal with the synthesis and the characterization of nanostructured silica films and organic-inorganic composite compounds of polysaccharides and hydroxyapatite. These compounds were analyzed with respect to their biocompatibility and their sound transmission in order to test their potential application as a material for reconstruction of the ossicular chain of the middle ear. These analyses were performed in collaboration with the Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig, and the Otolaryngology Clinic of the Hannover Medical School (MHH).

In the first part of this work nanostructured silica films were generated on glass slides as well as on the commercially available implant material Bioverit®II by using a dip-coating procedure. Non-ionic surfactants (Octaethyleneglycolmonododecylether or amphiphilic triblock copolymer from the Pluronic®-group) served as structure-directing agents. These silica films were first analyzed with respect to their structure. In addition, bioactivity was assessed both in vitro using simulated body fluid, a solution with ion concentrations nearly equal to those of human blood plasma, and, in collaboration with the GBF, in a cell culture system.

The second part of this thesis comprises the generation and characterization of organic-inorganic composite compounds based on chitosan or hyaluronic acid and hydroxyapatite. The synthesis of these compounds was performed by coprecipitation from aqueous solution in a bio-inspired approach. Materials thus synthesized were then characterized with respect to their audiological and vibrational properties in collaboration with the MHH.

Finally, one of the prepared materials, Bioverit®II coated with nanoporous silica, was selected for evaluation in an animal experiment; it showed promising properties.

Keywords: nanostructure, biomaterials, silica, organic-inorganic composite materials, implant.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Peter Behrens danke ich für die interessante Themenstellung und die gute Betreuung dieser Arbeit sowie Herrn Prof. Dr. Michael Binnewies für die Übernahme des Koreferats.

Allen Mitarbeitern des Teilprojektes D1 des Sonderforschungsbereiches 599, in dessen Rahmen diese Arbeit angefertigt wurde, danke ich für die gute Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Peter P. Müller und Frau Franziska Dimpfel für die Durchführung der zellbiologischen Untersuchungen, Herrn Dr. Martin Stieve und Herrn Dipl.-Ing. Hamidreza Mojallal für die Durchführung der audiologischen Messungen sowie Herrn Dr. Martin Stieve, Herrn Dipl.-Ing. Hamidreza Mojallal, Frau Christina Turck und Frau Dipl.-Biol. Birte Süß für die Durchführung der Tierversuche. Herrn Dr. Armin Feldhoff und Frau Dipl.-Chem. Christin Menneking danke ich für die Aufnahmen am hochauflösenden Feldemissionselektronenmikroskop.

Bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die unterstützenden Diskussionen sowie für die Anregungen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit nicht unwesentlich beigetragen haben. Birgit Beiße und Dipl.-Chem. Falk Heinroth danke ich für die Durchführung der thermogravimetrischen Messungen. Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Schwerpunktpraktikanten/-innen Benjamin Papendorf, Dipl.-Chem. Stephanie Steinhäus und Dipl.-Chem. Nina Witteck sowie den studentischen Hilfskräften Ulrike Assmann, Nina Eggers und Benjamin Papendorf.

Last but not least gilt ein großer Dank meinen Eltern und Großeltern, die mich auf meinem Weg der Ausbildung bis hin zum Abschluss dieser Dissertation stets unterstützt haben. Besonders bedanke ich mich bei Arne, der mir in dieser Zeit immer geduldig und äußerst verständnisvoll zur Seite stand.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Allgemeiner Teil	5
2.1	Biomminerale als Vorbild für Biomaterialien	5
2.1.1	Einführung	5
2.1.2	Der Aufbau von Knochen	7
2.1.3	Biomaterialien	10
2.1.4	Rekonstruktive Mittelohrchirurgie – ein Anwendungsgebiet für Biomaterialien	14
2.1.5	<i>In-vitro</i> -Untersuchungen zur Biokompatibilität	19
2.2	Nanostrukturierte Silica-Materialien	23
2.2.1	Einführung	23
2.2.2	Geordnete nanoporöse Materialien	26
2.2.3	Bildungsmechanismen für M41S-Materialien	28
2.2.4	Nanostrukturierte Silica-Filme	32
2.2.5	Modifizierung von M41S-Materialien	35
2.3	Organisch-anorganische Kompositmaterialien als Biomaterialien	37
2.3.1	Einführung	37
2.3.2	Calciumphosphate	38
2.3.2.1	Hydroxylapatit	40
2.3.3	Chitosan	43
2.3.4	Hyaluronsäure	45
3	Synthese und Charakterisierung von nanostrukturierten Silica-Filmen ...	47
3.1	Synthese von nanostrukturierten Silica-Filmen	47
3.1.1	Synthese von nanostrukturierten Silica-Filmen auf Standard- Glasobjektträgern und auf Bioverit® II	47
3.1.2	Modifizierung nanoporöser Silica-Filme mit Organoalkoxysilanen	51

3.2	Charakterisierung nanostrukturierter Silica-Filme.....	53
3.2.1	Charakterisierung der mit nanostrukturierten Silica-Filmen beschichteten Standard-Glasobjektträgern	53
3.2.2	Charakterisierung der mit nanoporösen Silica beschichteten Bioverit® II-Proben	65
3.2.3	Charakterisierung der modifizierten Silica-Filme	68
4	<i>Untersuchungen zur in-vitro-Bioaktivität von nanoporösen Silica-Filmen</i>	72
4.1	Experimentelles Vorgehen.....	72
4.2	Strukturanalytische Charakterisierung der mit nanoporösem Silica beschichteten Glasobjektträger	73
5	<i>Der Einfluss von nanostrukturierten Silica-Materialien auf die Biomaterial-Zellinteraktionen</i>	81
5.1	Untersuchungen zur Stabilität der nanoporösen Silica- Filme	82
5.2	Experimentelles Vorgehen.....	84
5.2.1	Qualitative Untersuchungen an mit Silica beschichteten Glasobjektträgern.....	84
5.2.2	Quantitative Untersuchungen an mit Silica beschichteten Glasobjektträgern.....	84
5.2.3	Semiquantitative Untersuchungen an opaken Materialien	85
5.3	Zellbiologische Untersuchungen an mit Silica-Filmen beschichteten Standard-Glasobjektträgern	85
5.4	Zellbiologische Untersuchungen an mit modifizierten Silica-Filmen beschichteten Standard-Glasobjektträgern	90
5.5	Zellbiologische Untersuchungen an mit Silica-Filmen beschichtetem Bioverit®II.....	91
5.6	Chemische und zellbiologische Untersuchungen an kommerziellen nanoporösen Gläsern (CPG®).....	93
6	<i>Synthese und Charakterisierung von organisch-anorganischen Kompositen auf Basis von Hydroxylapatit.....</i>	98
6.1	Synthese organisch-anorganischer Komposite auf Basis von Hydroxylapatit.....	98
6.1.1	Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite	98
6.1.2	Abscheidung von Hydroxylapatit in einem Chitosan-Gerüst	100
6.1.3	Quervernetzte Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite	101
6.1.4	Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposite	102

6.1.5	Hyaluronsäure-Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite.....	103
6.2	Charakterisierung der organisch-anorganischen Komposite auf Basis von Hydroxylapatit.....	104
6.2.1	Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite	104
6.2.2	Abscheidung von Hydroxylapatit in einem Chitosan-Gerüst	113
6.2.3	Quervernetzte Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite	116
6.2.4	Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposite	123
6.2.5	Hyaluronsäure-Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite.....	132
7	<i>Audiologische Untersuchungen an organisch- anorganischen Kompositmaterialien</i>	135
8	<i>In-vivo Untersuchungen im Tierversuch</i>	138
9	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	140
10	<i>Literaturverzeichnis</i>	145
11	<i>Anhang</i>	158
11.1	Synthese und Charakterisierung von Chitosan-Aluminiumhydroxid-Kompositen	158
11.1.1	Synthese der Chitosan-Aluminiumhydroxid-Komposite	158
11.1.2	Charakterisierung der Chitosan-Aluminiumhydroxid-Komposite	159
11.2	Analytische Methoden.....	165
11.2.1	Infrarot-Spektroskopie	165
11.2.2	Röntgendiffraktometrie	166
11.2.3	Thermoanalyse.....	167
11.2.4	Rasterelektronenmikroskopie.....	168
11.3	Chemikalienliste	170
11.4	Abkürzungsverzeichnis	171
11.5	Liste der Veröffentlichungen	172
11.6	Lebenslauf.....	174
11.7	Erklärung	175

1 **Einleitung**

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese und Charakterisierung von neuartigen Biomaterialien, die im Hinblick auf ihre Eignung als Knochenersatzmaterial geprüft werden. Bei diesen Materialien handelt es sich zum einen um organisch-anorganische Kompositwerkstoffe auf Basis von Polysacchariden und Hydroxylapatit. Die Herstellung dieser Materialien erfolgt nach einem bio-inspirierten Ansatz, bei dem die hierarchisch aufgebaute Kompositstruktur des Knochens als Vorbild dient. Zum anderen werden nanoporöse Materialien hergestellt. Ein potentielles Einsatzgebiet für diese Materialien ist die Rekonstruktion der Gehörknöchelchenkette im Mittelohr. Die Materialien werden daher sowohl zellbiologisch als auch funktionell im Hinblick auf ihre Schallleitungseigenschaften geprüft. Die Untersuchungen erfolgen im Rahmen eines Teilprojektes des Sonderforschungsbereiches 599 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (*„Zukunftsfähige bioresorbierbare und permanente Implantate aus metallischen und keramischen Werkstoffen“*) in Zusammenarbeit mit Forschern der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Medizinischen Hochschule Hannover und der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig.*

Knochen ist ein organisch-anorganisches Kompositmaterial, das Härte mit elastischen Eigenschaften verbindet. Bei seiner Bildung kontrollieren und beeinflussen organische Biopolymere als templatisierende Matrix den hierarchischen Aufbau der Kompositstruktur. Dieser charakteristische hierarchische Strukturaufbau verleiht dem Knochen seine außergewöhnlichen Eigenschaften. Ähnliche Strukturen führen auch bei anderen Biomineralen zu ungewöhnlichen Eigenschaften, die an die Herausforderungen und die Aufgaben in der Natur angepasst sind.

Die Biomaterialien, die gegenwärtig als Knochenersatzmaterialien eingesetzt werden, stammen aus verschiedenen, sehr unterschiedlichen Werkstoffklassen (Poly-

* TPD1-Projektgruppe: Prof. Dr. Peter Behrens¹, Franziska Dimpfel², Dipl.-Chem. Ilka Krueger¹, Prof. Dr. Thomas Lenarz³, Dipl.-Ing. Hamidreza Mojallai³, Priv.-Doz. Dr. Peter P. Müller², Dr. med. Martin Stieve³, Dipl.-Biol. Birte Süß¹, Christina Turck³, Dipl.-Chem. Nina Witteck¹.

¹Institut für Anorganische Chemie, Universität Hannover; ²Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig; ³Hals-Nasen-Ohrenklinik, Medizinische Hochschule Hannover.

mere, Keramiken oder Metalle wie Titan oder Gold). Der Aufbau dieser zum Teil sehr erfolgreich eingesetzten Biomaterialien spiegelt allerdings nicht den Aufbau natürlicher Biominerale wider. Häufig wird auch der geometrischen Oberflächenstruktur im Mikro- und Nanometermaßstab wenig Beachtung geschenkt, obwohl bekannt ist, dass die Oberflächentopologie die Adhäsion, die Proliferation und die Differenzierung von Zellen und somit die Akzeptanz des Biomaterials im Körper beeinflusst [CR01] [CV64] [TABM03] [Weis45]. Durch eine entsprechend eingestellte Oberflächenstrukturierung im Mikro- und im Nanometerbereich könnte eine Ansiedlung von bestimmten körpereigenen Zellen gefördert oder eingeschränkt und deren Aktivität gezielt beeinflusst werden, so dass die Eigenschaften der Biomaterialoberfläche eine wichtige Rolle bei der Entwicklung bzw. Optimierung von Implantatmaterialien einnimmt.

Ein spezielles Anwendungsgebiet für Knochenersatzmaterialien ist die Rekonstruktion der Gehörknöchelchenkette im Mittelohr. Implantate, die zur Wiederherstellung der Schallübertragung zwischen Trommelfell und Innenohr verwendet werden, müssen verschiedenen Anforderungen entsprechen. Die Ausbildung einer dünnen Oberflächenschicht auf dem Implantat sowie eine feste Verankerung des Implantates am Trommelfell und am ovalen Fenster zum Innenohr sind erwünscht. Eine knöcherne Fixierung durch überschießendes Gewebe sollte hingegen vermieden werden, da dies zu einer Beeinträchtigung der Schallübertragung führen kann. Insofern sollten die verwendeten Materialien eine angepasste – nicht eine optimale – Aktivität im Hinblick auf die Besiedlung mit Knochenzellen aufweisen. Die derzeit verwendeten Mittelohrprothesen weisen, möglicherweise aufgrund sich vom Knochen unterscheidender das Schwingungsverhalten beeinflussender elastischer Eigenschaften, gegenüber dem gesunden Mittelohr deutlich verminderte Schallleitungseigenschaften auf. An das natürliche Vorbild angelehnte, synthetische Kompositwerkstoffe sollten in ihrem elastischen Verhalten den natürlichen Gehörknöchelchen deutlich ähnlicher sein und so für eine verbesserte Schallübertragung sorgen.

Ein Teil dieser Arbeit befasst sich mit grundlegenden *in-vitro* Untersuchungen zur Biokompatibilität und Bioaktivität von Nanostrukturen im unteren Nanometerbereich (< 100 nm). Die Auswirkung von Strukturen im Mikrometer- und im oberen

Nanometerbereich (> 100 nm) auf das Verhalten von Zellen wurden bereits eingehend untersucht [CR01] [TABM03]. Die Zelladhäsion und -proliferation auf im unteren Nanometerbereich strukturierten Materialoberflächen wurde hingegen weniger intensiv untersucht. In dieser Arbeit werden nanostrukturierte Silica-Filme* durch Tauchbeschichtung auf verschiedene Trägermaterialien aufgebracht und strukturanalytisch charakterisiert. Die strukturdirigierende Synthese ermöglicht durch Verwendung verschiedener Tenside – wie amphiphiler Blockcopolymere oder nicht-ionischer Tenside – die Herstellung von Silica-Filmen mit Nanostrukturen im Bereich zwischen 5 und 12 nm. Anzumerken ist, dass die in dieser Arbeit als nanostrukturiert bzw. nanoporös bezeichneten Silica-Materialien in der chemischen Literatur meist als mesostrukturiertes bzw. mesoporöses Silica benannt werden. Klassische Beispiele sind die mesoporösen M41S-Materialien, wie zum Beispiel das MCM-41 oder SBA-15-Materialien [KLRV92] [BVRL92] [HMCF94] [ZHFC98]. Die Größenordnung „meso“ steht jedoch nicht in Übereinstimmung mit der in der Medizin verwendeten Nomenklatur. Die hergestellten nanoporösen Materialien werden für grundlegende Untersuchungen zum Einfluss von Nanostrukturen auf das Zellverhalten der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig zur Verfügung gestellt. Die Herstellung nanostrukturierter Silica-Filme mit Porenweiten zwischen 15 und 100 nm ist mit den strukturdirigierenden Ansätzen bislang nicht möglich, so dass für weitere zellbiologische Studien nanoporöse Gläser (*Controlled Pore Glass*, CPG®) mit nominellen Porenweiten von 50 nm, 70 nm und 100 nm von der Firma CPI Bitterfeld bezogen wurden.

Zusätzlich zu den Zell-Biomaterial-Interaktionen ist die Ausbildung einer Apatitschicht auf der Materialoberfläche ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung der Biokompatibilität und Bioaktivität des Materials, denn in der Literatur beschriebene Untersuchungen zeigen, dass die Anbindungsfähigkeit eines Biomaterials an das umgebende Gewebe sowohl *in-vivo* als *in-vitro* durch die Ausbildung einer Apatit-

* Eine gute Erläuterung zum Begriff Silica – wie er auch in dieser Arbeit verwendet wird – findet sich in der Dissertation von Musolf in einer Fußnote zum Begriff „Mesostrukturiertes Silica“: „Häufig findet man auch den Ausdruck „mesostrukturiertes SiO_2 “. Dies ist jedoch nicht ganz korrekt, da die verwendete Summenformel eine stöchiometrische Zusammensetzung suggeriert. Dies ist allerdings nicht der Fall, denn der Kondensationsgrad in solchen Verbindungen ist deutlich geringer als beispielsweise beim Quarz. So finden sich gerade auf der Oberfläche viele Silanol-Gruppen. In dieser Arbeit wird deshalb dem aus dem Englischen entlehnten Begriff „Silica“ der Vorzug gegeben, der eine stöchiometrische Festlegung vermeidet und sowohl kristalline als auch amorphe Varietäten umfasst.“ [Muso05, Seite 24]

schicht in (simulierter) Körperflüssigkeit evaluiert werden kann [KKSK90] [KITHH90] [Hench91]. In dieser Arbeit werden *in-vitro* Untersuchungen an den nanostrukturierten Silica-Filmen in einer simulierten Körperflüssigkeit (*simulated body fluid, SBF*) durchgeführt. *Simulated body fluid* ist eine Lösung, die nahezu die gleiche Ionenkonzentration und pH-Wert wie menschliches Blutplasma aufweist und deren Temperatur auf 37 °C eingestellt wird.

Diese Arbeit befasst sich darüber hinaus mit der Synthese und Charakterisierung von organisch-anorganischen Kompositmaterialien auf Basis von Hydroxylapatit. Als organische Komponente werden die natürlich vorkommenden Polysaccharide Chitosan und Hyaluronsäure gewählt. Nach der strukturanalytischen Charakterisierung wurden an der Medizinischen Hochschule Hannover funktionelle Messungen zur Prüfung der Schalleitungseigenschaften durchgeführt.

Im Rahmen von Tierversuchen wurden Prothesen aus Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen und mit nanoporösen Silica-Filmen beschichtete Bioverit®II-Prothesen in Kaninchenohren implantiert. Bioverit®II ist eine kommerziell erhältliche Glimmer- Glaskeramik für biomedizinische Anwendung, deren Komponentenzusammensetzung gemäß den Angaben des Herstellers 3di GmbH/D-Jena durch SiO₂, Al₂O₃, MgO, Na₂O, K₂O, F, P₂O₅ und CaO beschrieben werden kann. Auf die Ergebnisse der Tierversuche wird in dieser Arbeit nur kurz eingegangen. Ausführliche Auswertungen werden von Herrn Hamidreza Mojallal [Moja], Frau Christina Turck [Turc] und Frau Birte Süß [Süß] im Rahmen ihrer Doktorarbeiten vorgestellt.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Biominerale als Vorbild für Biomaterialien

2.1.1 Einführung

Biominerale wie Knochen, Zähne oder Exoskelette werden von Lebewesen im Prozess der Biomineralisation gebildet [Volk99] [Mann86] [MBDF97] [WA97] [LW89]. Bei der Biomineralisation kontrollieren und beeinflussen organische Biopolymere (wie Polypeptide, Polysaccharide oder Glycoproteine) die Kristallkeimbildung, das Kristallwachstum und die räumliche Organisation der anorganischen Komponente und nehmen somit Einfluss auf den hierarchischen Aufbau der organisch-anorganischen Kompositstruktur des Biominerals. Im Verlauf der Biomineralisation werden im Allgemeinen die organischen Komponenten in das Biomineral eingeschlossen, sodass ein auf verschiedenen Größenskalen durchwobenes hybrides Kompositmaterial entsteht. Der charakteristische hierarchische Strukturaufbau führt zu ungewöhnlichen mechanischen Eigenschaften. Er verleiht beispielsweise dem Knochen seine besonderen Eigenschaften wie die Kombination von Härte und Elastizität.

Ein wichtiges Merkmal der Biominerale ist, dass sie an die Herausforderungen und Aufgaben in der Natur angepasst sind. Schachtelhalme und Gräser wie Bambus oder Reis erhalten ihre Stabilität durch kondensierte Polykieselsäure und auch die Nesselhaare der Brennesselgewächse enthalten in ihrer Zellwand Kieselsäure. Sie sind so aufgebaut, dass sie bei Berührung schräg abbrechen und hautreizende Giftstoffe freisetzen. Ein weiteres Beispiel sind Kieselalgen, die einen schachtelförmigen zweiteiligen Panzer aus Kieselsäure besitzen, der ihnen Halt und Schutz vor natürlichen Feinden gewährt. Exoskelette, wie Schalen oder Schuppen werden dagegen bevorzugt aus Calciumcarbonat aufgebaut. In Tabelle 2-1 sind Beispiele wichtiger Biominerale aufgeführt.

Die bei der Biomineralisation ablaufenden Prozesse können durch verschiedene

Ansätze beschrieben werden. Zum einen ist es möglich, dass die organische Substanz unter vorausgehender Selbstorganisation wohldefinierte supramolekulare Überstrukturen aufbaut, die während der Biomineralisation auf den anorganischen Bestandteil übertragen werden, ohne dass eine strukturelle Veränderung auftritt. Zum anderen besteht auch die Möglichkeit, dass die anorganische Komponente erst die Selbstorganisation des Templats bewirkt und dass so die Struktur von organischen und anorganischen Bestandteilen gemeinsam ausgebildet wird. Räumliche Begrenzungen wie Vakuolen oder Vesikel nehmen ebenfalls Einfluss auf die Struktur des Komposits. Denkbar ist außerdem eine Kombination der eben genannten Ansätze.

Tabelle 2-1: Beispiele wichtiger Biominerale [nach Sche00].

Mineralname	Formel	Organismus	Funktion
Calcit	CaCO_3	<i>Coccolithen</i> (Kieselflagellaten)	Exoskelett
		Säugetiere	Schwerkraftsensor
Aragonit	CaCO_3	Muscheln	Exoskelett
Vaterit	CaCO_3	Schnecken	Exoskelett
Hydroxylapatit	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	Wirbeltiere	Knochen, Zähne
Gips	$\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Quallen	Schwerkraftsensor
Cölestin	SrSO_4	<i>Acantharia</i> („stachelstrahlige Radiolarien“)	Skelett
Barit	BaSO_4	<i>Loxodes</i> (Wimperntiere)	Schwerkraftsensor
Magnetit	Fe_3O_4	Magnetobakterien	Magnetotaxis
		<i>Chitonidae</i> (Käferschnecken)	Zähne
Kieselsäure	$\text{SiO}_{2-x}(\text{OH})_x \cdot n\text{H}_2\text{O}$	<i>Bacillariophyceae</i> (Kieselalgen)	Endoskelett
		Radiolaren	Endoskelett
		<i>Graminales</i> (Gräser, etc.)	mechanische Stabilisierung

2.1.2 Der Aufbau von Knochen

Der Knochen ist für Menschen und Wirbeltiere das wichtigste Biomineral. Seine Aufgabe liegt einerseits in der mechanischen Stabilisierung des Körpers und andererseits in der Speicherung von Calcium und Phosphat für diverse metabolische Zwecke. Die außergewöhnlichen Eigenschaften wie die Kombination aus Härte und Elastizität sind auf den hierarchischen Strukturaufbau der niedrigkristallinen Apatit-Phasen in Verbindung mit Kollagen (Typ 1) zurückzuführen. Neben dem Kollagen, das 85-90 % des Proteinanteils einnimmt, enthält der Knochen ca. 200 nicht-kollagene Proteine wie Osteocalcin, Osteonectin und Osteopontin. Die genaue Zusammensetzung und die Strukturparameter der mineralischen Phase von Knochen sind der Literatur zu entnehmen [DE02] [DBL97] [LG91].

Knochen weist – wie die meisten Biominerale – auf mehreren Größenskalen einen hohen Organisationsgrad auf: Die kristalline atomare Struktur im Ångström-Bereich, die Apatit-Kristalle mit Abmessungen im Nanometer-Bereich, eine hochorganisierte Kollagen-Apatit-Matrix und schließlich verschiedene Knochenarten wie lamellarer, corticaler oder spongioser Knochen [LW89] [Man95] [WW98] [BC76].

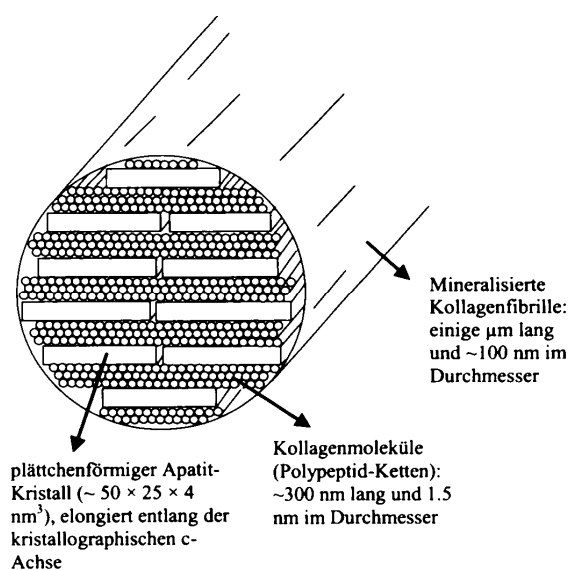


Abbildung 2-1: Anordnung der Apatit-Kristalle in den Kollagenfibrillen (aus [Epp03]).

Die hochorganisierte Anordnung der blättchenförmigen Apatit-Kristalle in den Kollagenfibrillen ist in Abbildung 2-1 gezeigt. Die Kristallite sind in den 40 nm breiten Zwischenräumen zwischen den Kollagenfibrillen entlang der kristallographischen *c*-Achse elongiert [WW98] [WAST97] [Epp03]. Die Kristallitgröße konnte mittels Röntgenbeugungsuntersuchungen auf ca. $50 \times 25 \times 4 \text{ nm}^3$ bestimmt werden. Das Diffraktogramm einer humanen Knochenprobe weist die für nanokristalline Materialien typischen verbreiterten Reflexe auf (Abb. 2-2).

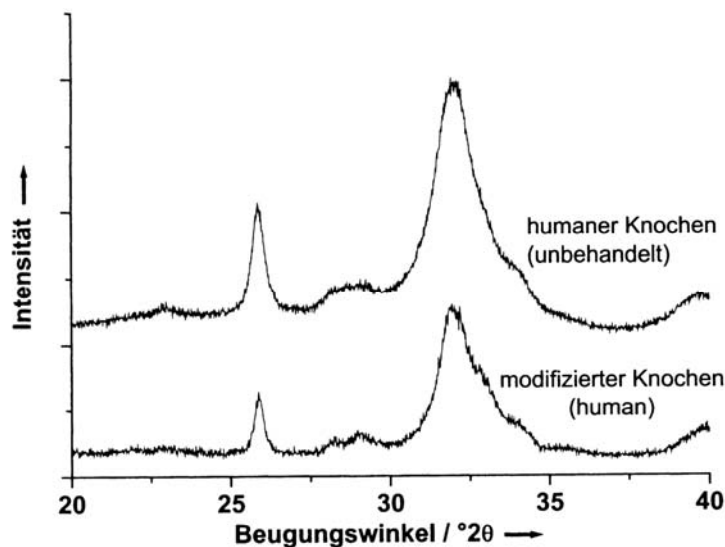


Abbildung 2-2: Röntgendiffraktogramme ($\lambda=1.54 \text{ \AA}$) von unbehandelten humanen Knochen und von einem Knochenersatzmaterial, das durch chemische Behandlung aus Knochen hergestellt wurde (aus [Epp03]).

Eine Kollagenfibrille besteht aus drei Polypeptidketten, die zu einer Tripel-Helix-Struktur zusammengefügt sind. Der Durchmesser einer Fibrille liegt bei ungefähr 1.5 nm, die Länge bei 300 nm. Die mineralisierten Kollagenfibrillen können sich in verschiedenen dreidimensionalen Netzwerken anordnen (Abb. 2-3). In lamellaren Knochen können die Kollagenfibrillen z. B. parallel zueinander (*parallel fibered bone*) oder in einer Art verdrehter Sperrholzstruktur (*rotated plywood structure*) ausgerichtet sein. Eine deutlich geringe Vorzugsorientierung ist dagegen in Callusknochen (*woven bone*, neugebildeter Knochen) zu finden.

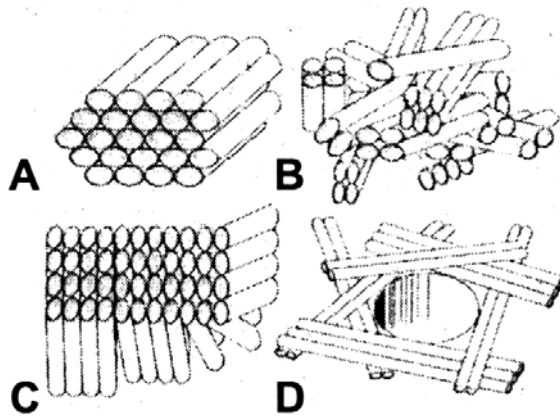


Abbildung 2-3: Verschiedene Anordnungen der mineralisierten Kollagenfibrillen. A: parallel, B: Callusknochenstruktur, C: verdrehte Sperrholzstruktur, D: radiale Anordnung (aus [Pete01], dort nach [WW98]).

Die makroskopisch sichtbaren Überstrukturen im Zentimeterbereich sind in Abbildung 2-4 dargestellt. Die innen liegende Spongiosa (Schwammgewebe) weist einen gerüstartigen Aufbau auf, der von der kompakten Corticalis ummantelt wird. Ein Übergang zwischen diesen beiden Knochenarten ist nicht auszumachen. Alle Knochen sind bis auf die Gelenkflächen und die Ansatzstellen von Bändern und Sehnen von Knochenhaut, dem Periost, umgeben. Diese dient der Ernährung und Durchblutung des Knochens und ist auch wesentlich an dessen Regeneration beteiligt. Der ständige Knochenauf- und -abbau, das *remodelling*, wird von dem zellulären Zusammenspiel der Knochenzellen (Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten) sowie von Hormonen und Zytokinen gesteuert und beeinflusst.

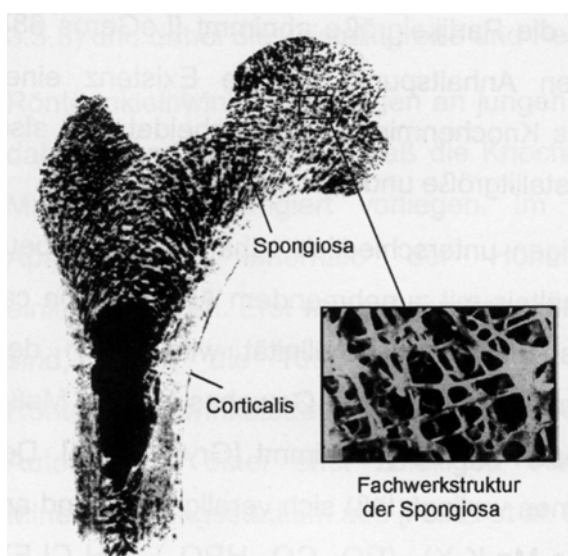


Abbildung 2-4: Querschnitt durch einen Femurkopf (Oberschenkelknochen) (aus [Pete01], dort nach [NSch96]).

2.1.3 Biomaterialien

Unter dem Begriff Biomaterialien werden nicht-körpereigene Materialien verstanden, die nach einer Implantation vollständig oder teilweise Funktionen des Körpers ersetzen/übernehmen können. Sie finden nicht nur Anwendung als Ersatz für Knochen sondern auch für Zähne, Haut, Gefäße oder Adern. Für die verschiedenen Anwendungsbereiche müssen jeweils verschiedene Biomaterialien entwickelt werden, deren Eigenschaften den jeweiligen Anforderungen entsprechen. So sollten biostabile (permanente) Materialien für den Zahn- oder Gelenkersatz sowie Schrauben, Nägel oder Drähte im Körper auch über einen längeren Zeitraum in ihren mechanischen und chemischen Eigenschaften unverändert bleiben. Biodegradierbare Biomaterialien, die beispielsweise zum Füllen von Knochendefekten oder als Nahtmaterialien verwendet werden, sollten vom Körper resorbiert werden.

Eine grundsätzliche Voraussetzung für Biomaterialien besteht darin, dass sie biokompatibel sind und keine Abwehrreaktionen im Körper hervorrufen. Die Definition der *European Society for Biomaterials* für die Biokompatibilität verdeutlicht zudem, dass ein Biomaterial für eine spezielle Anwendung angepasst sein muss, um wirklich geeignet zu sein: „*The ability of a material to perform with an appropriate host response in specific application.*“ (aus [Will99]). Weiterhin ergibt sich die Biokompatibilität aus einem Zusammenspiel der mechanischen, chemischen sowie biologischen Anforderungen, wie in Abbildung 2-5 schematisch dargestellt ist [Epp03]. Die mechanische Kompatibilität spielt insbesondere bei der Belastbarkeit und der Stabilität von Knochen- und Zahnersatzmaterialien eine wichtige Rolle. Speziell bei biodegradierbaren Implantaten, zu denen auch kontrolliert korrodierende wie jene aus Magnesium gehören, müssen diverse chemische Anforderungen erfüllt werden wie z.B. eine angepasste Resorptionsgeschwindigkeit oder die Freisetzung von ungiftigen Abbauprodukten, um Gewebeschädigungen auszuschließen. Die biologische Kompatibilität beinhaltet die Implantat-Gewebe-Wechselwirkungen.

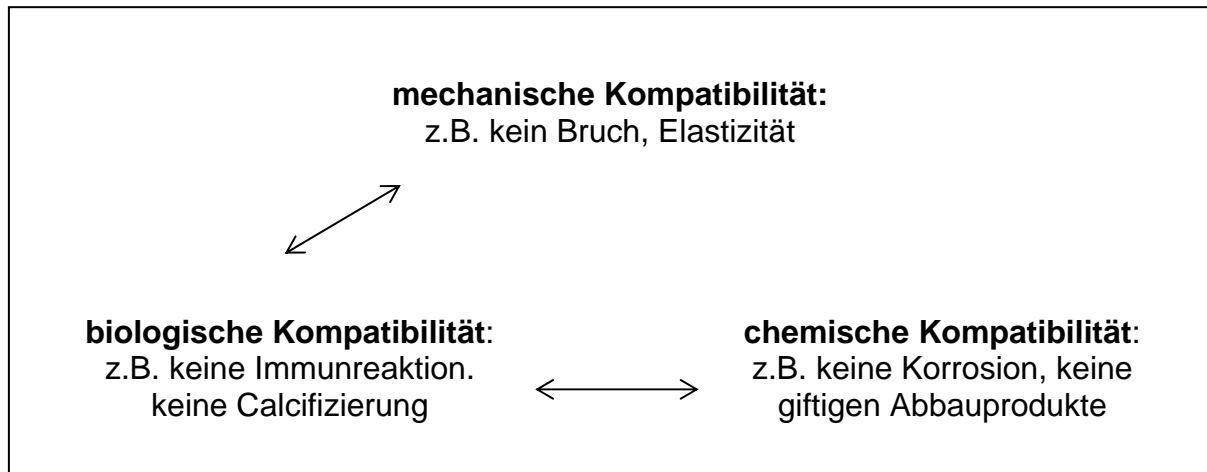


Abbildung 2-5: Zusammenspiel der mechanischen, chemischen sowie biologischen Anforderungen an ein Biomaterial [aus Epp03].

In diesem Bereich stellen sich ebenfalls verschiedene Anforderungen wie zum einen das Anheften von Zellen oder Biomolekülen der extrazellulären Matrix an die Biomaterial-Gewebe-Grenzfläche und zum anderen das Ausbleiben von Immun- bzw. Abwehrreaktionen sowie von (meist unerwünschten) Calcifizierungsreaktionen und Bindegewebeinkapselungen. Die Ausbildung einer Biomaterial-Gewebe-Grenzfläche wird u. a. von den Oberflächentopologien, den vorliegenden Ionenkonzentrationen und dem pH-Wert beeinflusst. Interkonnektierende Porensysteme im Bereich von ca. 100 – 400 µm begünstigen das Hineinwachsen von körpereigenen Knochen in das Implantat und verbessern somit die mechanische Fixierung [dG80]. Bei jedem operativen Eingriff erweist es sich als problematisch, dass nur die körpereigenen (autogenen) Substanzen vollständig vom Körper akzeptiert und integriert werden. Nicht-körpereigene Materialien, die in den menschlichen Organismus eingesetzt werden, werden als Fremdkörper erkannt und rufen gewisse Wechselwirkungen mit dem Gewebe hervor [Pic01]. Anhand der an dieser Biomaterial-Gewebe-Grenzfläche auftretenden Reaktionen können die Materialien in drei Klassen eingeteilt werden: bioinert, biokompatibel bzw. biotolerant sowie bioaktiv. Bioinerte Materialien wie Aluminiumoxid oder Gold werden zwar vom Körper akzeptiert, gehen aber keine Reaktionen oder Interaktionen mit der physiologischen Umgebung ein, während bioaktive Materialien die Ausbildung einer engen Bindung an das Gewebe aktiv fördern. Die biologische Aktivität lässt sich durch eine Modifizierung der Implantatoberfläche mit zellbiologisch aktiven Molekülen (z. B. Integrine) oder zur Förderung des Knochenkontaktes durch das Aufbringen von

Calciumphosphatphasen erhöhen. Die Beschichtung von gebräuchlichen Implantatmaterialien wie Aluminiumoxid, Zirkoniumdioxid sowie Titan und dessen Legierungen mit Calciumphosphatphasen ist in der Literatur vielfach beschrieben [WGZ05] [INKY04] [KPCCK05] [RSPP04] [RWBS00] [C03] [BER92]. Neben den Metallen und den Polymeren werden häufig Keramiken als Biomaterialien eingesetzt. Trotz ihrer Sprödigkeit werden bioinerte Hartkeramiken wie Aluminiumoxid und Zirkoniumdioxid wegen ihrer hohen mechanischen Belastbarkeit und ihrer Härte verwendet. Biodegradierbare Keramiken auf Basis von Calciumphosphaten finden in der Hartgeweberegeneration (Knochen und Zähne) Anwendung [DBL97] [SC92] [Rueg98]. Eine Übersicht über die als Biomaterialien eingesetzten Keramiken zeigt Tabelle 2-2.

Tabelle 2-2: Übersicht über als Biomaterialien eingesetzte Keramiken [Epp03].

Material	Biologische Kompetenz	Typische Einsatzgebiete
Calciumphosphate	biokompatibel/bioaktiv; meist resorbierbar	Knochenersatz, Beschichtung von Implantaten
Biogläser	biokompatibel/bioaktiv; meist resorbierbar	Knochenersatz
Aluminiumoxid	bioinert; nicht resorbierbar	Gelenkköpfe und Gelenkpfannen von Endoprothesen, Zahnersatz
Zirkoniumdioxid	bioinert; nicht resorbierbar	Gelenkköpfe und Gelenkpfannen von Endoprothesen, Wurzelstifte
Glaskeramik auf Feldspat-Basis (K ₂ O- Na ₂ O-Al ₂ O ₃ -SiO ₂)	bioinert; nicht resorbierbar	Zahntechnik: Verblendungen von Brücken und Kronen; künstliche Zähne

In der Regel dienen Keramiken aus Hydroxylapatit (HAp), β -Tricalciumphosphat (β -TCP) und biphasischen Calciumphosphat, einer Mischung aus HAp und β -TCP, als Knochenersatzmaterial [Rueg98] [LGLG97] [LG91] [LG94]. Diese Calciumphosphate zeichnen sich durch eine gute Osteokonduktivität aus, d. h. die

Geschwindigkeit der Degradation bzw. Resorption ist an die Geschwindigkeit der Knochenneubildung angepasst. HAp wird aufgrund seiner geringeren Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen langsamer abgebaut als β -TCP. Die Desorptions- bzw. Resorptionsgeschwindigkeit hängt aber nicht nur von der Art der Calciumphosphat-Phase, sondern auch von deren Kristallinität ab: Die geringere thermodynamische Stabilität von nanokristallinem HAp im Vergleich zu hochkristallinem (gesintertem) bewirkt eine höhere Löslichkeit und daraus folgend eine bessere Resorption des nanokristallinen HAp.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Biomaterialien stammen aus verschiedenen, sehr unterschiedlichen Werkstoffklassen (Polymere, Keramiken, Metalle), und sind in ihren Materialeigenschaften weitestgehend auf ihr Anwendungsgebiet angepasst. Der Aufbau dieser z. T. sehr erfolgreich eingesetzten Materialien spiegelt nicht den Aufbau natürlicher Biominerale wider. Häufig wird auch der geometrischen Oberflächenstruktur im Mikrometer- und Nanometermaßstab wenig Beachtung geschenkt, obwohl bekannt ist, dass die Oberflächentopologie das Verhalten von Zellen und somit die Akzeptanz des Biomaterials im Körper beeinflusst.

2.1.4 Rekonstruktive Mittelohrchirurgie – ein Anwendungsgebiet für Biomaterialien

Ein spezielles Anwendungsgebiet für Knochenersatzmaterialien ist der Ersatz der Mittelohrknochen durch totale oder partielle Prothesen. Das Mittelohr besteht aus der luftgefüllten Paukenhöhle, die über das Trommelfell mit dem äußeren Gehörgang und über die Stapesfußplatte mit dem ovalen Fenster des Innenohres verbunden ist (Abb. 2-6). Die drei Gehörknöchelchen Hammer, Amboss und Steigbügel (Stapes) sind für die Schallübertragung vom Trommelfell auf das Innenohr verantwortlich. Eine störungsfreie Übertragung ist von dem schwingenden Trommelfell und einer intakten Gehörknöchelchenkette abhängig.

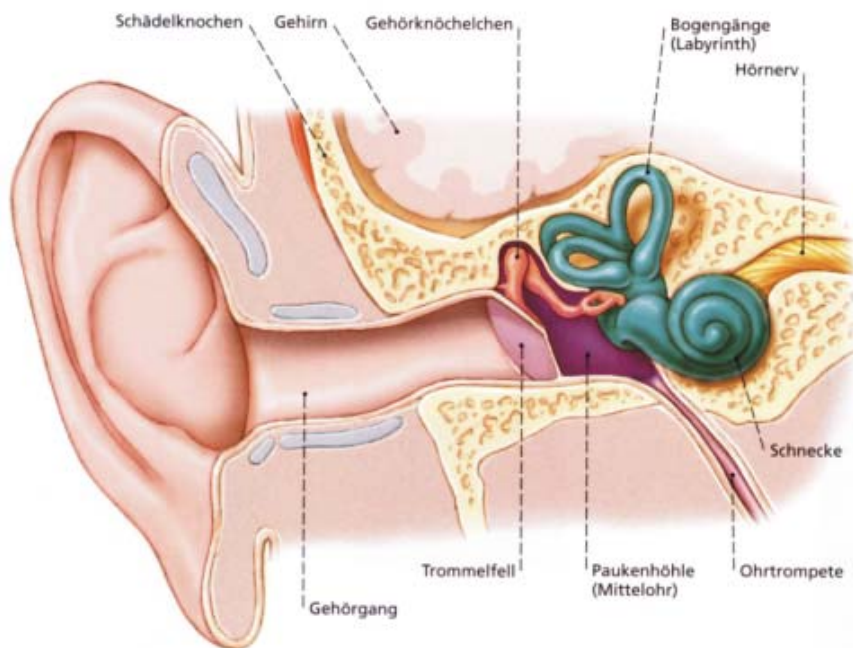


Abbildung 2-6: Physiologie des Mittelohres (aus [Weit98]).

Bei einigen Krankheitsbildern wie der chronischen Schleimhaut- oder Knocheneiterung wird die Funktionalität der Gehörknöchelchen gestört. Die Schallleitung kann so stark eingeschränkt werden, dass eine Rekonstruktion des Kontaktes zwischen Trommelfell und Innenohr notwendig wird. Das Grundprinzip der

rekonstruktiven Mittelohrchirurgie besteht somit darin, die mechanische Schallübertragung zwischen Trommelfell und Innenohr wiederherzustellen. In Abbildung 2-7 sind zwei Rekonstruktionsmöglichkeiten der Gehörknöchelchenkette im Vergleich zu einer intakten Mittelohrkonstruktion dargestellt [BL05]. Liegt ein großer Defekt vor, wird eine Totalprothese (*total ossicular replacement prothesis*, TORP) direkt auf der Stapesfußplatte platziert und mit dem Trommelfell verbunden. Sind lediglich der Amboss und der Hammer zerstört, kann die Schallleitung durch eine Teilprothese (*particular ossicular replacement prothesis*, PORP) wiederhergestellt werden, die zwischen Stapeskopf und Trommelfell eingefügt wird.

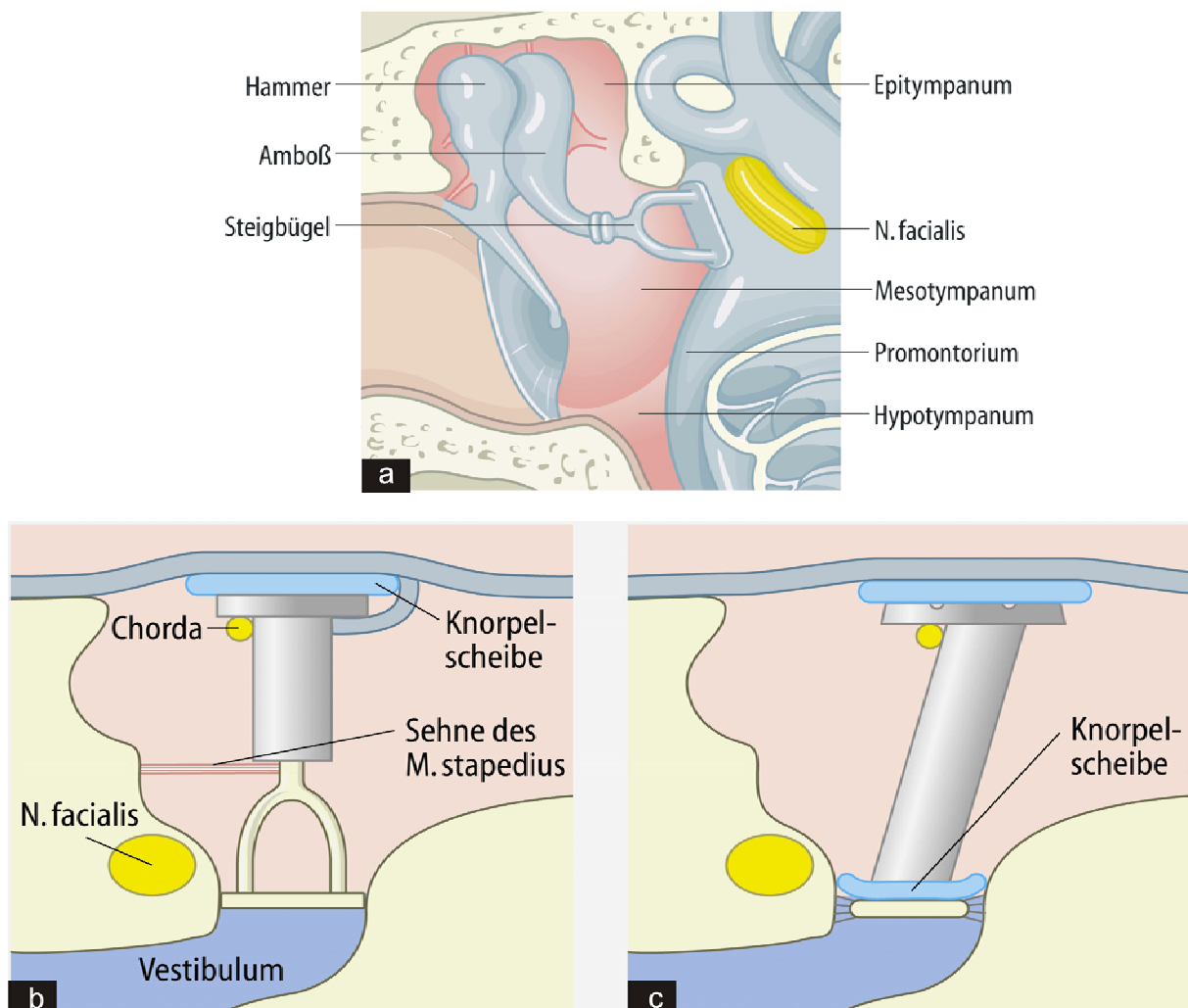


Abbildung 2-7: Schema eines intakten Mittelohres, einer Teilprothese und einer Totalprothese. (a) intakte Mittelohrkonstruktion; (b) Teilprothese zwischen Trommelfell und Stapeskopf; (c) Totalprothese zwischen Trommelfell und Stapesfußplatte. Aus [BL05].

Eine Problematik bei der Gehörknöchelrekonstruktion ist die Ankoppelung der Prothese an das Trommelfell und an den Stapes bzw. dessen Fußplatte [Hütt92a] [Hütt92b]. Eine Einschränkung der Schallübertragung kann von einer vollständigen Verwachsung (knöcherne Fixation) der Prothese verursacht werden. Metallische Implantate zeigen zum Beispiel bei der Rekonstruktion der Gehörknöchelchenkette zwar ein sehr gutes physiologisches Verhalten, weisen aber zum Teil schlechte Schallleitungseigenschaften auf. Eine Übersicht über die derzeit verwendeten Implantatmaterialien liefert Abbildung 2-8. Allogene* Transplantate – mit Ausnahme von Dentin – werden aufgrund der möglichen Infektionsgefahr (HIV, Creutzfeld-Jakob-Erkrankungen, etc.) nur wenig verwendet. Im Gegensatz zu Knochen und Knorpel kann Dentin unter Erhalt seiner Stabilität sterilisiert werden [HL93]. Nähere Informationen zu den verschiedenen Implantatmaterialien und deren klinischen und funktionellen Ergebnisse sind Übersichtartikeln von Geyer zu entnehmen [Gey00] [Gey99].

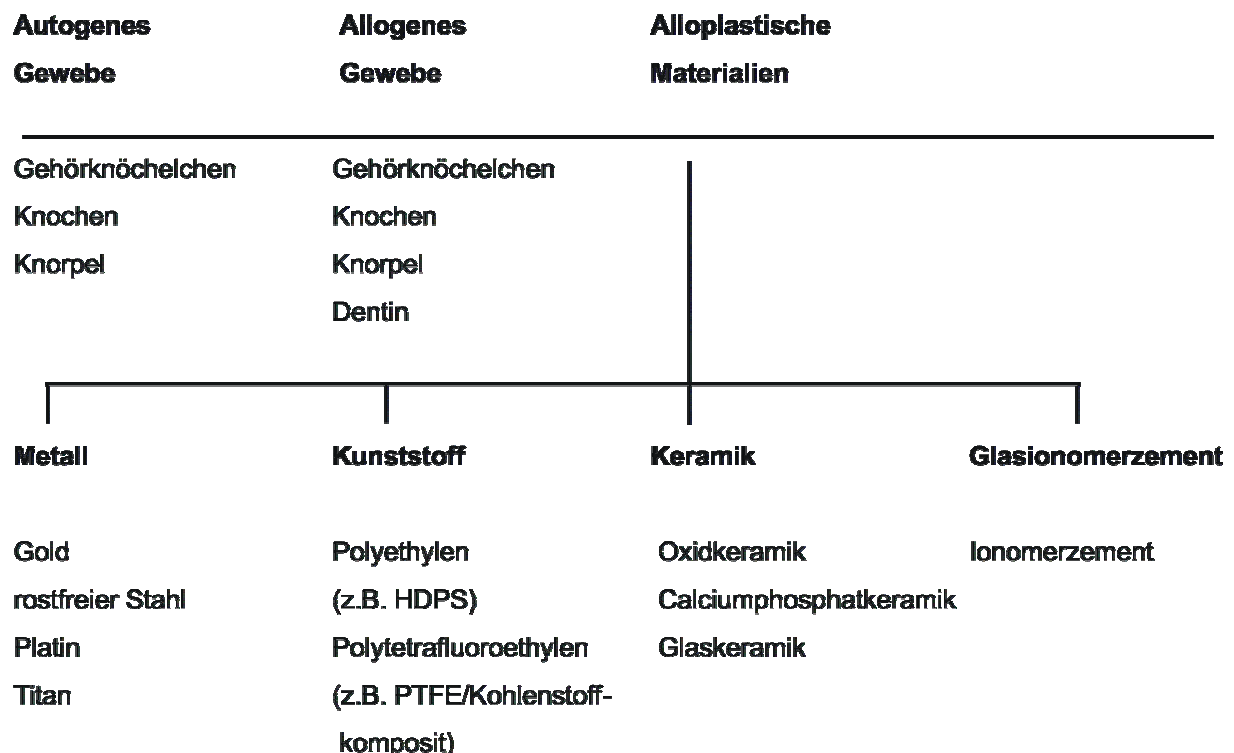


Abbildung 2-8: Materialien zur Rekonstruktion der Gehörknöchelchenkette (nach [Gey99]).

* Autogene Transplantate stammen vom Empfänger selbst, allogene Transplantate dagegen von anderen Personen. Xenogene Transplantate stammen von tierischen Spendern.

Die Implantate, die in der rekonstruktiven Mittelohrchirurgie eingesetzt werden, sollten biokompatibel sein, jedoch im Gegensatz zu anderen Knochenersatzstoffen keine zu hohe Bioaktivität aufweisen. Biokompatible Materialien fördern die Besiedlung mit einer dünnen Schleimhaut bzw. Zellschicht und dadurch den stabilen Verbund mit dem Trommelfell bzw. mit den verbliebenen Resten der Gehörknöchelchen. Ein rascher Bewuchs mit Bindegewebe und Epithel verringert die Gefahr von Infektionen durch freiliegende Oberflächen. Allerdings sollte das Material keine übermäßige Bindegewebsentwicklung fördern. Eine zu hohe Bioaktivität ist bei der Anwendung im Mittelohr unerwünscht, da das Wachstum von knochenähnlichen Strukturen nur begrenzt gefördert und das Material nicht resorbiert werden darf. Das Verwachsen des Implantats mit den Mittelohrkonstruktionen führt zu einer unerwünschten Einschränkung der Schallübertragung. Auf der anderen Seite führt eine mangelnde Biokompatibilität / -aktivität zu einer Abstoßung (Extrusion) der Prothese oder einer Gefährdung des Innenohres, wenn sich die TORP-Prothese löst und in das Vestibulum der Cochlea wandert [HL93] [PLH91] [Gey99].

Da es sich beim Mittelohr um einen luftgefüllten Raum handelt, der über die Eustachische Röhre mit der Außenluft in Kontakt steht, tritt gelegentlich eine bakterielle Kontamination oder Infektion in der Paukenhöhle auf. Die Biostabilität sowie die Formstabilität des Prothesenmaterials muss auch in diesem Fall gewährleistet sein. Darüber hinaus ist es von Vorteil, wenn sich das Material einfach bearbeiten lässt, damit es intraoperativ der anatomischen Situation angepasst werden kann. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Auswahl der Knochenersatzmaterialien sind die Schalleitungseigenschaften, die wiederum von den elastischen Eigenschaften abhängen: Leichte Prothesen begünstigen die Übertragung hoher Frequenzen, schwere hingegen die niedrigen Frequenzen [Gey99]. Dies deutet an, wie wichtig die Auswahl der richtigen Masse bei der Simulation der Resonanzeigenschaften des normalen Mittelohres ist. Die Mittelohrfunktion und die Schalleitungseigenschaften können mit der Laser-Doppler-Vibrometrie (LDV)-Analyse und mittels der Multifrequenztympometrie (MFT) gemessen werden [Zahn03] [SP97] [BZHH99] [SchM99]. Mit der Laser-Doppler-Vibrometrie (LDV) kann die Übertragungsfunktion des Mittelohrsystems bei der Schallweiterleitung bestimmt werden. Es handelt sich hierbei um eine Messmethode zur kontaktfreien Analyse der Schwingungsabläufe. Das Prinzip der LDV basiert auf interferometrischen Messungen von Schwingungsgeschwindigkeiten an einem bestimmten Punkt eines

Objektes. Bei der Scanning-Laser-Doppler-Vibrometrie (SLDV) wird an mehreren Punkten eines Objektes zweidimensional gemessen. Die Multifrequenztypanometrie ist eine Methode zur funktionellen Messung des Trommelfells und der Gehörknöchelchen, mit der Informationen über das Schwingungsverhalten des Mittelohrs gewonnen werden können. Für diese Messungen wird eine spezielle Sonde in den Gehörgang eingeführt, mit der die akustische Impedanz und die Einflüsse der physikalischen Eigenschaften – wie die Masse und Steifigkeit – des Mittelohres in Abhängigkeit von der Frequenz und dem Luftdruck bestimmt werden kann.

Der Aufbau der teilweise sehr erfolgreich eingesetzten Materialien (Abb. 2-8) spiegelt nicht den Aufbau natürlicher Biominerale wieder. Die Materialien weisen vermutlich aufgrund unterschiedlicher elastischer Eigenschaften gegenüber der intakten Mittelohrkonstruktion verminderte Schallleitungseigenschaften auf. Der an das natürliche Vorbild angelehnte, synthetische Kompositwerkstoff sollte in seinem elastischen Verhalten den natürlichen Gehörknöchelchen deutlich ähnlicher sein und so für eine verbesserte Schallweiterleitung sorgen. Zur Entwicklung von Materialien, die den Eigenschaften des Knochens möglichst nahe kommen, werden in dieser Arbeit in einem bio-inspirierten Ansatz organisch-anorganische Kompositmaterialien hergestellt und im Hinblick auf ihren Einsatz in der rekonstruktiven Mittelohrchirurgie untersucht.

2.1.5 *In-vitro*-Untersuchungen zur Biokompatibilität

Eine grundlegende Voraussetzung für einen Einsatz als Knochenersatzmaterial ist einerseits eine ausreichende biologische Verträglichkeit, andererseits eine gute Anbindung an das umgebende Gewebe. Untersuchungen haben ergeben, dass für die Anbindung der Knochenersatzmaterialien an „lebenden“ Knochen die Ausbildung einer Apatitschicht auf der Materialoberfläche essentiell ist [Hench91]. Es wird in Betracht gezogen, dass eine knochenähnliche Apatitschicht, die auf der Oberfläche eines bioaktiven Materials im Körper gebildet wird, eine entscheidende Rolle bei der chemischen Bindung zwischen bioaktivem Material und „lebenden“ Knochen spielt. Diese gebildete Apatitschicht fördert die Adhäsion zu dem umgebenden Weichgewebe und verbessert die Wundheilung.

Die Knochenanbindungsfähigkeit und somit auch die Bioaktivität der Materialien kann sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* durch die Ausbildung einer Apatitschicht auf der Materialoberfläche in (simulierter) Körperflüssigkeit evaluiert werden [KKSK90]. *In-vitro* Untersuchungen werden typischerweise in so genannter „*simulated body fluid*“ (SBF) durchgeführt, einer Lösung, die nahezu die gleiche Ionenkonzentration und pH-Wert wie menschliches Blutplasma aufweist und deren Temperatur auf 37 °C eingestellt wird (siehe Kapitel 4, Tabelle 4-1). SBF ist eine metastabile Calciumphosphat-Lösung, die ebenso wie das Blutplasma in Bezug auf die Apatitkristallisation übersättigt ist [NN58].

Untersuchungen in SBF zeigen, dass bioaktive Materialien, z.B. bioaktives Glas oder Glaskeramiken, mit einer Apatitschicht überzogen werden, deren Apatitkriställchen hinsichtlich Partikelgröße, Zusammensetzung und Kristallinität der mineralischen Phase des Knochens ähneln. Bei nicht-bioaktiven Materialien ist dies nicht der Fall [KITHH90]. Folglich ist es möglich, die Knochenanbindungsfähigkeit eines Materials *in-vitro* durch die Untersuchung der in SBF gebildeten Apatitschicht zu evaluieren [KHSK87] [KIHH90].

Erste Untersuchungen von Hench et al. an Bioglass® [Hench 88] haben ergeben, dass eine Silica-reiche Materialoberfläche und ein alkalischer pH-Wert an der Material-Lösung-Grenzfläche für die Ausbildung einer Apatitschicht wichtig sind. Li et al. [LOKNS92] vermuten, dass die vorhandenen Silanolgruppen auf der Oberfläche von Silica-Materialien möglicherweise die Apatitkristallisation induzieren. Diese

Annahme basiert darauf, dass Silica-Gel mit einer relativ hohen Dichte an Silanolgruppen beim Eintauchen in SBF einen Apatitüberzug ausbildet, während dies bei Silica-Glas und Quarz mit einer geringen Konzentration an Silanolgruppen auf der Oberfläche nicht der Fall ist. In Einklang mit diesen Beobachtungen steht, dass Silica-Gel, das durch die Kondensation von Tetraethoxysilan (TEOS) in Gegenwart von Polyethylenglykol synthetisiert wurde, die Bildung einer Apatitschicht nach einer Temperaturbehandlung bei 600 °C induziert, nicht aber nach einer Calcination oberhalb von 900 °C, bei der die Anzahl der Silanolgruppen weiter reduziert wird [CNKS95]. Ferner wird davon ausgegangen, dass die Porengröße sowie das Porenvolumen des Silica die Apatitnukleation beeinflussen. Poren, die größer als 2 nm sind, induzieren vermutlich die Bildung einer Apatitschicht in Körperflüssigkeit [PCH95] [PH96]. Untersuchungen von Peltola et al. haben gezeigt, dass sowohl ein großes Porenvolumen als auch eine breite Porenweitenverteilung eine Apatitnukleation begünstigen [PJRL98]. Pereira et al. postulieren, dass die Apatitnukleation durch die Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht mit erhöhter Ionenkonzentration in den Poren stattfindet [PCH95]. Bei diesem Mechanismus spielen die Silanolgruppen ebenfalls eine bedeutende Rolle, da die Bildung der elektrischen Doppelschicht von der Dichte der Silanolgruppen auf der Oberfläche abhängt. Gomez-Vega et al. konnten in ihren Untersuchungen an nanoporösen Silica-Filmen hingegen keine Beziehung zwischen der Apatitbildungsgeschwindigkeit und der Porengröße sowie der Anzahl der Silanol-Gruppen feststellen [GSTH01]. Neben den Silanol-Gruppen begünstigen auch Nb-OH, Ta-OH, Ti-OH, Zr-OH sowie PO_4H_2^- Oberflächengruppen eine Apatitnukleation [Koku03]. Es stellte sich heraus, dass sich auf porösen Gelen aus Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , TiO_2 und ZrO_2 eine nanokristalline Apatitschicht ausbildet [KKKN00].

Zusätzlich zu der Ausbildung einer knochenähnlichen Apatitschicht auf der Materialoberfläche ist die Anheftung, das Wachstum und die Differenzierung von Zellen ein weiteres wichtiges Kriterium für die Beurteilung der Biokompatibilität und Bioaktivität eines Biomaterials. Während schon lange bekannt ist, dass Strukturen im Mikrometerbereich die Zellbesiedlung eines Biomaterials beeinflussen [Weis45] [CV64] [dG80], wird die Auswirkung von Nanostrukturen auf das Verhalten der Zellen erst seit kurzem untersucht [TABM03] [CR01] [DRJA02] [WEDS00] [WSB00] [WEDS01]. Dabei wurden bisher hauptsächlich Strukturen im oberen Nanometer-

bereich (> 100 nm) betrachtet, obwohl bestimmte zelluläre Strukturen, die u. a. für die Anheftung von Zellen an Oberflächen wichtig sind, charakteristische Abmessungen im Bereich von 50 bis 100 nm aufweisen. Die Untersuchungen wurden unter anderem an Polymeren durchgeführt, deren Nanostruktur durch lithographische Verfahren oder Laser-Bearbeitung auf die Polymeroberfläche geprägt werden [CR01]. Daneben wurden nanostrukturierte Keramiken [WEDS00] [WSB00], die durch Sinterung von vorgefertigten Nanoteilchen hergestellt wurden, sowie organisch-anorganische Kompositmaterialien untersucht, die anorganische Nanoteilchen enthalten [DHW01]. Untersuchungen an organisch-anorganischen Kompositmaterialien, die durch chemische Selbstorganisation gebildet wurden, wurden hingegen noch nicht durchgeführt. Ein interessanter Aspekt für zellbiologische Studien an organisch-anorganischen Kompositmaterialien, die durch chemische Selbstorganisation hergestellt wurden, besteht darin, dass Biominerale wie Knochen und Zähne in der Natur durch ähnliche Prozesse gebildet werden.

Mit Hilfe von Selbstorganisationsprozessen können nanostrukturierte organisch-anorganische Hybridmaterialien mit Abmessungen der Nanostruktur unter 15 nm hergestellt werden. Besonders gut gelingt dies im Falle des nanostrukturierten Silica (siehe Kapitel 2.2). Nanostrukturierte Silica-Materialien sind im Hinblick auf potentielle biotechnologische und medizinische Anwendungen von Bedeutung, vor allem wegen ihrer geordneten Strukturierung und der relativ leichten Modifizierung der großen Materialoberfläche mit funktionellen Gruppen. Diese Modifizierungen stellen einen wichtigen Aspekt bei der Herstellung von Implantatmaterialien dar, denn nicht nur die Oberflächentopologie, sondern auch die Oberflächenchemie beeinflusst die Adsorption von Biomolekülen der extra-zellulären Matrix (Proteine, Polysaccharide, u. a.) und das Zellverhalten (Literatur hierzu: [RWBS00] [BGHB02] [RBSW01] [CPSD00] [JDCA98] [KL88] [TKGK96] [TP93] [MVFW93] [GKM04]). Gezielte Modifizierungen der Implantatoberfläche ermöglichen zusätzlich eine Optimierung der Funktionalität der Implantate. So können beispielsweise Polymere oder Proteine wie Wachstumsfaktoren auf die Oberfläche aufgebracht werden, die die Zellbesiedlung stimulieren. Im Gegensatz zu dieser kovalenten Anbindung von Molekülen können aber beispielsweise auch Medikamente an der Materialoberfläche adsorbiert und nach der Implantation direkt im Körper freigesetzt werden (*local drug delivery*). Poröse Materialien können ferner als *drug delivery reservoir* dienen.

Die Eigenschaften einer Biomaterialoberfläche spielen somit eine entscheidende Rolle bei der Biokompatibilität bzw. Bioaktivität, was bei der Entwicklung neuer Knochenersatzmaterialien ausgenutzt werden kann: Durch eine entsprechend eingestellte Strukturierung sowohl im Nanometer- als auch im Mikrometerbereich könnte eine Ansiedlung von bestimmten körpereigenen Zellen gezielt gefördert oder eingeschränkt und deren Aktivität gezielt beeinflusst werden. Dies ist besonders interessant und wichtig bei Implantaten, die zur Rekonstruktion der Gehörknöchelchen im Mittelohrbereich eingesetzt werden. Hier ist neben geeigneten Schwingungseigenschaften, die das Schallübertragungsverhalten beeinflussen, vor allem auf eine angepasste Bioaktivität zu achten: Einerseits soll eine zu starke Knochenanbindung am Stapesrest, die über den Kontakt mit dem Stapesrest hinausgeht, vermieden werden, um eine knöcherne Fixierung zu vermeiden. Andererseits ist eine dünne Mucosaschicht auf dem Implantat erwünscht (siehe Kapitel 2.4).

2.2 Nanostrukturierte Silica-Materialien

2.2.1 Einführung

In diesem Kapitel wird zunächst eine Klassifizierung poröser Materialien mit den in der Chemie verwendeten Größenordnungen vorgenommen; die folgenden Kapitel befassen sich speziell mit den geordneten mesoporösen Silica-Materialien. Anzumerken ist, dass in der Einführung die in der Chemie verbreitete Größenbezeichnung „meso“ verwendet wird, die jedoch nicht in Übereinstimmung mit der in der Medizin verwendeten Nomenklatur steht. In den übrigen Kapiteln dieser Arbeit werden die in der chemischen Literatur als mesostrukturiert bzw. mesoporös bezeichnete Silica-Materialien daher als nanostrukturiertes bzw. nanoporöses Silica benannt.

Seit der ersten Veröffentlichung von Kresge et al. über die Herstellung mesoporöser M41S-Materialien zu Beginn der neunziger Jahre stieg das Interesse an der Entwicklung mesoporöser Silicas [KLRV92] [BVRL92]. Gemäß der Klassifizierung poröser Materialien nach IUPAC liegt der Porendurchmesser mesoporöser Materialien zwischen 2 und 50 nm. Materialien mit Porenweiten unterhalb 2 nm werden als mikroporös und Materialien mit Poren oberhalb 50 nm werden als makroporös bezeichnet [Ever72]. Die Einteilung in diese drei Gruppen erfolgt somit in Abhängigkeit der vorliegenden Porenweiten [Ever72] [RAFE94]. Ein wichtiger Aspekt im Hinblick auf die Anwendung poröser Materialien, beispielsweise in der Katalyse oder Adsorption, ist nicht nur die Porenweite, sondern auch die Porenweitenverteilung. Einen Überblick über die Porenweiten und Porenweitenverteilungen poröser Festkörper liefert Abbildung 2-9 [Behr93].

Die wichtigste Klasse mikroporöser Verbindungen stellen die Zeolithe dar, die mit einer engen Porenweitenverteilung und Porenweiten im Bereich zwischen 0.3 nm und 1.3 nm synthetisiert werden können [LGGM86]. Anwendung finden die Zeolithe unter anderem als Ionenaustauscher, Adsorbens oder Katalysator. Neben den Zeolithen zählen auch Zeosile, Clathrasile, Alumophosphate sowie die amorphen mikroporösen Metalloxide (AMM) zu den mikroporösen Materialien [MTWK93]

[MTWK93-2] [MMKH96]. Die verstreuten Schichtsilicate „*pillared clays*“ zeigen eine bimodale Porenweitenverteilung, die im mikroporösen Bereich relativ eng und im mesoporösen Bereich dagegen relativ breit ist [Behr93] [SPLG99]. Zu den makroporösen Materialien gehören die porösen Gläser wie CPG (*controlled pore glass*) oder PVG (*porous vycor glass*), die Porengrößen zwischen 7.5 nm und 300 nm aufweisen [Ile79] [JH82] [JE02]. Auf die Herstellung und Charakterisierung von CPG wird in dem Kapitel 5.6 eingegangen.

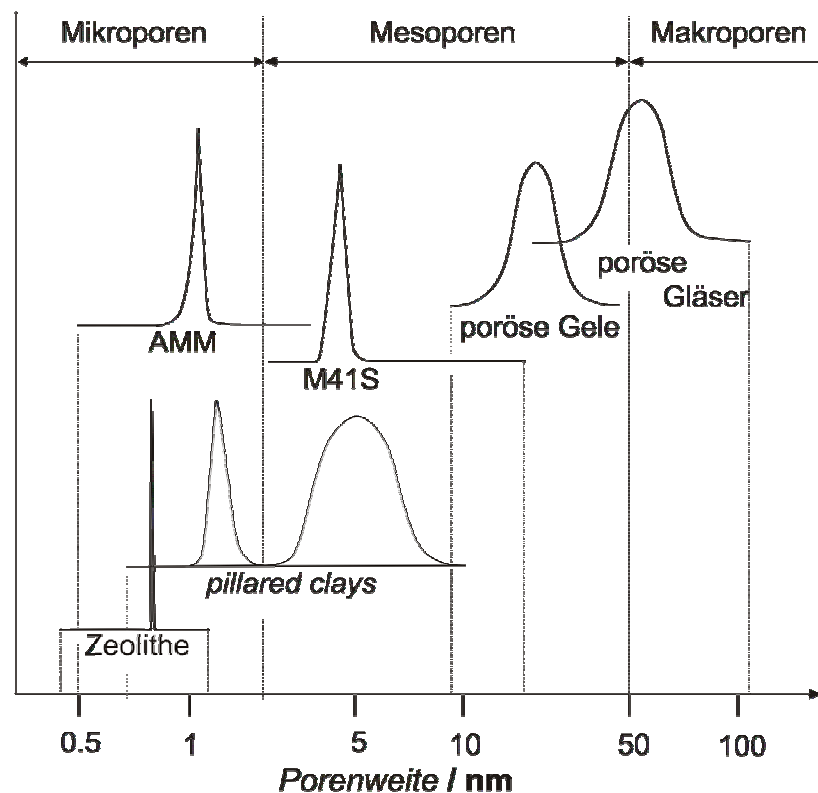


Abbildung 2-9: Porenweiten und Porenweitenverteilung poröser Materialien (nach [Behr93], aus [Mus04]).

Die von Kresge und Mitarbeitern vorgestellten M41S-Materialien weisen Porengrößen zwischen 2 nm und 10 nm, eine enge Porenweitenverteilung sowie ein hohes Maß an Strukturierung auf [KLRV92] [BVRL92]. Es zeigte sich, dass die bei der Synthese eingesetzten Tenside die Ausbildung der Mesostruktur beeinflussen und als strukturdirigierende Agenzien (*structure directing agents*, SDA) fungieren. Die klassische strukturdirigierende Synthese findet im alkalischen Milieu unter hydrothermalen Bedingungen statt. Bei diesen hohen pH-Werten liegen hauptsächlich

negativ geladene Silicat-Spezies vor, so dass kationische Tenside mit einer Alkyltrimethylammonium-Kopfgruppe als SDA eingesetzt werden. Neuere strukturdirigierende Syntheseverfahren ermöglichen mildere Reaktionsbedingungen bei niedrigeren Temperaturen im neutralen oder sauren Milieu und damit die Verwendung von nicht-ionischen oder anionischen Tensiden. Eine Übersicht über die verschiedenen Syntheseverfahren wurde von Huo et al. veröffentlicht [HMCF94].

Mittlerweile ist geordnetes mesoporöses Silica nicht nur mit verschiedenen Porengrößen und Porensystemen zugänglich, sondern auch in diversen Morphologien wie Monolithen ([WGA97] [LFHM99]), Filmen ([ZYMF98] [BLSF99] [OM00]) Fasern ([HZFW97] [BS90]) oder Röhren ([SKYY98] [LML00]). Diese unterschiedlichen Morphologien spielen im Hinblick auf den technischen Einsatz in der Katalyse, Stofftrennung oder in optoelektronischen Geräten eine wichtige Rolle [Thom99] [BLDK00] [SMS00]. Auf die Anwendungsmöglichkeiten von mesostrukturierten silicatischen Filmen wird in Kapitel 2.2.4 näher eingegangen.

Katalytische Anwendungen von M41S-Materialien in den Bereichen der Hydrierung [SCT99] und Epoxidierung ([ZYHL99] [MRST95]) von Alkenen, Oxidation [SDS02], Aminierung [JRSM99] oder Polymerisation [OTMO97] werden vielfach beschrieben. Aufgrund ihrer definierten Porengröße und der engen Porengrößenverteilung eignen sich mesoporöse Materialien auch zur Adsorption [DB96] [DMWH02] oder chromatographischen Trennung [ZGFJ02] von Makromolekülen wie DNS-Fragmenten, Proteinen oder Biomolekülen wie Cystein oder Glutathion und gewinnen somit auch in der Biotechnologie sowie Medizin an Bedeutung [GLU97] [FYGL03]. In der Literatur wird die Adsorption bzw. Immobilisierung von Penicillin Acylase-PA [HLED00], Trypsin [YBBW01] oder Albumin (BSA, Bovine Serum Albumin) und Lysozymen [KJSP05] beschrieben. Da die Silica-Materialien für den menschlichen Organismus unbedenklich sind, können sie als Träger für pharmazeutische oder biologisch funktionalisierte Systeme dienen, beispielsweise für Arzneistoffabgabesysteme (*controlled drug delivery*) [XS04] [BBKM94] [TMK90]. Studien von Vallet-Regi et al. zeigen, dass Ibuprofen, ein Schmerzmittel, an mesostrukturiertem Silica adsorbiert und beim Eintauchen in eine simulierte Körperflüssigkeit freigegeben wird [VRRP01] [RMPV03].

Ein weiteres potentielles Einsatzgebiet in der Medizin liegt in der Optimierung der Biokompatibilität und Bioaktivität von Implantatmaterialien. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Strukturierung der Implantatoberfläche einen Einfluss auf das

Zellverhalten und somit auf die Biokompatibilität ausübt (siehe Kapitel 2.1.5). Durch eine Beschichtung der Implantatoberfläche mit einer definierten silicatischen Mesostrukturierung könnte die Biokompatibilität der Implantate beeinflusst werden [GHST01]. Eine gezielte Modifizierung der mit Silica beschichteten Implantatoberfläche ermöglicht beispielsweise die Einbringungen von entzündungshemmenden Medikamenten, die nach der Implantation direkt im Körper freigesetzt werden können (*local drug delivery*).

2.2.2 Geordnete nanoporöse Materialien

Die von den anorganischen Silica-Precursoren beeinflusste Selbstorganisation von Tensiden führt zu einem nanostrukturierten Material, aus dem die organische Komponente entfernt werden kann und ein nanoporöses Material mit Porendurchmessern zwischen 2 und 10 nm resultiert. Je nach Reaktionsbedingungen kann das Porensystem verschiedene Topologien, wie lamellar, hexagonal oder kubisch aufweisen. In diesem Abschnitt werden die wichtigsten Strukturen geordneter nanostrukturierter Silicas vorgestellt. Eine schematische Darstellung der Strukturen vom MCM-41, MCM-48 und MCM-50 liefert Abbildung 2-10 [KLRV92] [BVRL92]. Die Abkürzung MCM steht für „Mobil’s Composition of Matter“.

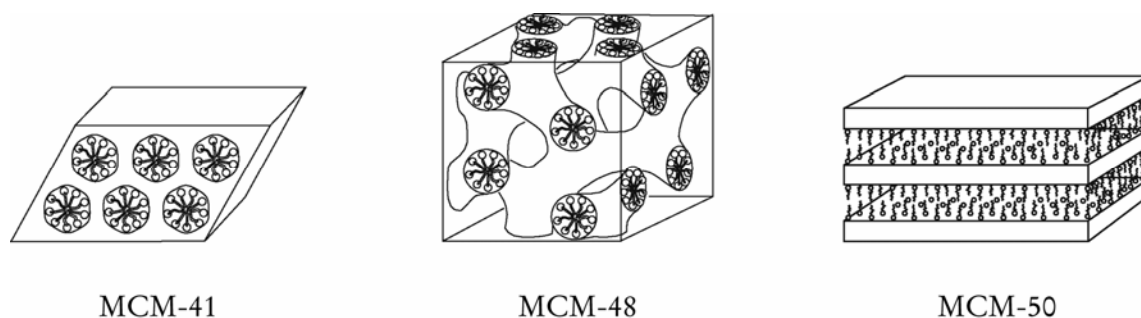


Abbildung 2-10: Schematische Darstellung der Strukturen des MCM-41, MCM-48 sowie MCM-50 (aus [Muso04]).

Die Struktur des MCM-41 zeigt einen hexagonalen Aufbau eindimensionaler zylindrischer Kanäle [KLRV92] [BVRL92] [AKMS94]. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen entlang der *a*- oder *b*-Achse zeigen die Kanalstruktur, während bei denen entlang der *c*-Achse die hexagonale Anordnung der Kanäle sichtbar wird. Die Reflexe im Röntgendiffraktogramm liegen im Bereich kleiner Winkel und lassen sich hexagonal (Ebenengruppe: $P6mm$) indizieren.

Das Röntgendiffraktogramm des MCM-48 weist ein Beugungsmuster auf, das der kubischen Raumgruppe $Ia3d$ zugeordnet werden kann [KLRV92] [BVRL92] [SSAT95]. Die Struktur setzt sich aus zwei einander durchdringenden dreidimensionalen Netzwerken zusammen, die zueinander enantiomer sind. Die beiden Kanalsysteme sind durch die silicatischen Wände vollständig voneinander getrennt, wie TEM-Untersuchungen von Schmidt et al. [SSAT95] sowie Simulationen von Anderson et al. [AHLL88] gezeigt haben.

Bei dem dritten Vertreter der M41S-Familie handelt es sich um eine lamellare Phase, bei der die silicatischen Schichten jeweils durch eine Schicht von Tensidmolekülen voneinander getrennt sind [KLRV92] [BVRL92]. Die charakteristischen (00 l)-Reflexe im Diffraktogramm spiegeln den schichtförmigen Strukturaufbau wider. Bei dem Entfernen der als Abstandhalter dienenden Tensidmoleküle bricht die lamellare Struktur zusammen und amorphes Silica bleibt zurück. Bei MCM-50 dagegen handelt es sich um eine stabilisierte lamellare Phase, die auch nach der Calcination ihren schichtförmigen Aufbau behält [VKRM96]. Eine nachträgliche (*post-synthetic*) Behandlung der lamellaren Phase ermöglicht die Ausbildung unregelmäßig angeordneter Verstrebungen zwischen den Silica-Schichten, so dass der schichtförmige Strukturaufbau auch nach dem Entfernen des Tensids erhalten bleiben kann.

Neben diesen typischen Vertretern der M41S-Familie werden weitere analoge Strukturen wie SBA-1 (kubisch, Raumgruppe $Pm\bar{3}n$) [HMC94], SBA-2 (hexagonal, Raumgruppe $P6_3/mmc$) [HLPS95] oder LMU-1 [BSHS97] beschrieben, auf die nicht näher eingegangen werden soll. SBA steht für „Santa Barbara“ und LMU für „Ludwig-Maximilians-Universität“.

Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit sind die MSU-Materialien, deren Struktur erstmalig an der Michigan State University beschrieben wurde [BPP95] [PP97] [BP96]. Mesoporöses Silica vom MSU-Typ ist aus gleichgroßen Kanälen aufgebaut, die aber hinsichtlich ihrer Anordnung keine Ordnung aufweisen. Die fehlende

Fernordnung wird durch das Auftreten von nur einem, relativ breiten Reflex im Röntgendiffraktogramm deutlich. Die Struktur wird auch als „wurmartig“ (*worm-like*) beschrieben.

2.2.3 Bildungsmechanismen für M41S-Materialien

Wie bereits aus den von Kresge et al. beschriebenen strukturdirigierenden Synthesen deutlich wurde, wird die Ausbildung einer geordneten Nano-/Mesostruktur durch strukturdirigierende Agenzien verursacht [KLRV92] [BVRL92]. Hierbei handelt es sich um langkettige amphiphile Tensidmoleküle, die aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einer hydrophoben Schwanzgruppe aufgebaut sind. Die hydrophobe Schwanzgruppe besteht in den meisten Fällen aus einer einfachen Alkylkette; möglich sind aber auch Alkenyl- oder Arylreste. Anionische Tenside besitzen Carboxylat-, Phosphat, Sulfat- oder Sulfonat-Gruppen als hydrophile Kopfgruppe, kationische dagegen Ammonium- oder Phosphonium-Gruppen. Bei nicht-ionischen Tensiden dienen polare Polyether oder Zuckermoleküle als Kopfgruppe. Häufig werden auch amphiphile Triblockcopolymer mit dem Handelsnamen Pluronic[®] der Firma BASF corp. als strukturdirigierende Agenzien eingesetzt. Die Pluronic[®]-Spezies setzen sich aus hydrophilen Polyethylenoxid-Blöcken (EO) zusammen, die durch einen hydrophoben Polypropylenoxid-Block (PO) voneinander getrennt sind. Die schematische Formel kann als $(EO)_x(PO)_y(EO)_x$, z.B. $(EO)_{20}(PO)_{70}(EO)_{20}$ für Pluronic[®]P123, beschrieben werden (Abb. 2-11).

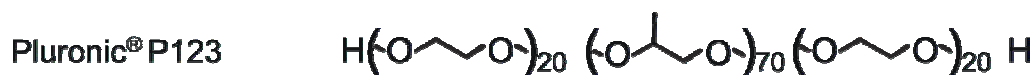


Abbildung 2-11: Strukturformel des amphiphilen Triblockcopolymer Pluronic[®]P123.

In Abhängigkeit von der Konzentration und Temperatur bilden die Tenside supramolekulare Aggregate aus, die in der strukturdirigierenden Synthese als die eigentlichen Template dienen [RAB96] [MTW83] [WHU94]. Die geordneten

Strukturen (Überstrukturen) der durch die Aggregation gebildeten Mizellen werden als lyotrope Mesophasen bezeichnet. Anhand von Phasendiagrammen kann der Einfluss der Temperatur und Tensidkonzentration auf die gebildeten flüssigkristallinen Mesophasen verdeutlicht werden. In Abbildung 2-12 ist exemplarisch das vereinfachte Phasendiagramm des kationischen Tensides Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) in Wasser dargestellt [RAB96]. In stark verdünnten Lösungen liegen noch einzelne Moleküle vor, während oberhalb einer tensidspezifischen Konzentration, der so genannten kritischen Mizellenkonzentration (*critical micelle concentration, cmc*) die Tensidmoleküle aggregieren und sphärische Mizellen bilden. Durch eine Erhöhung der Tensidkonzentration entstehen zylindrische Mizellen und anschließend hexagonale Anordnungen dieser zylindrischen Mizellen. Eine weitere Konzentrationserhöhung bewirkt eine Ausbildung einer flüssigkristallinen kubischen bzw. lamellaren Nanophase (bzw. Mesophase). Die Mizellenbildung beruht auf einem Selbstorganisationsprozess der Tensidmoleküle, der durch Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Tensidmolekülen hervorgerufen wird. Neben diesen

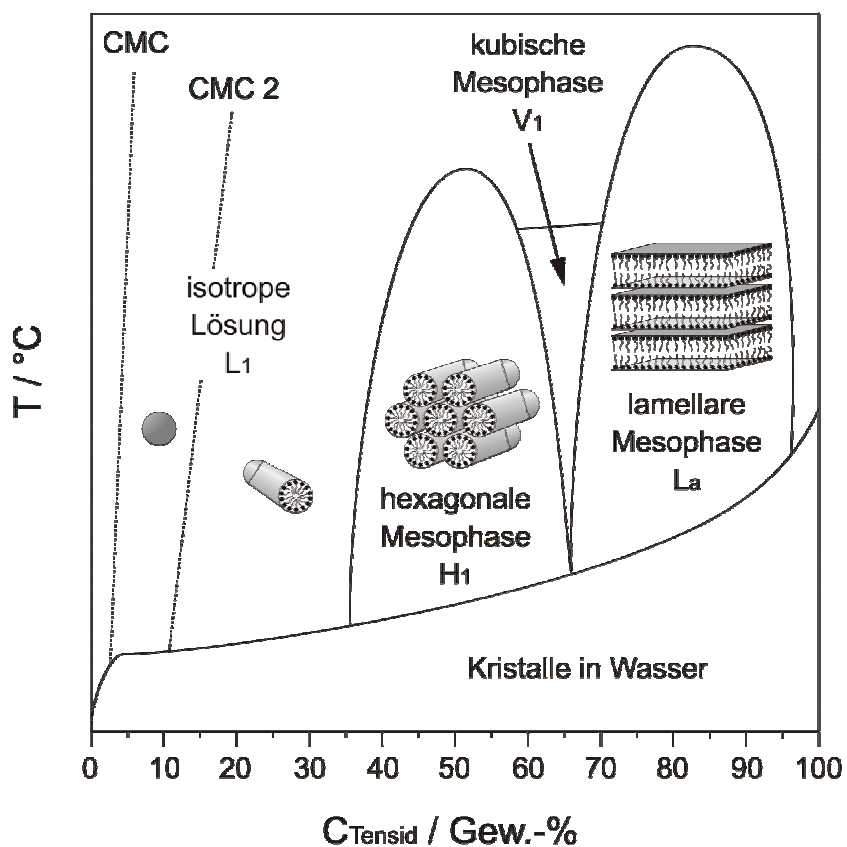


Abbildung 2-12: Vereinfachtes Phasendiagramm von Cetyltrimethylammoniumbromid in Wasser (nach [RAB96], aus [Muso04]).

zwischenmolekularen Tensid-Tensid-Wechselwirkungen spielen auch die zwischen den Tensid- und den Silica-Vorläufermolekülen auftretenden Wechselwirkungen bei der Bildung einer Tensid/Silica-Nanostruktur eine entscheidende Rolle [Isra85].

Nach der Veröffentlichung der strukturdirigierenden Synthese stellten Kresge und Mitarbeiter einen möglichen Bildungsmechanismus für die nanoporösen Silica-Materialien vor [BVRL92]. Dieser Flüssigkristall-Templat-Mechanismus beruht auf der Analogie zwischen den Strukturen der M41S-Materialien und den bereits bekannten flüssigkristallinen (lyotropen) Phasen, die von den reinen Tensiden in Wasser ausgebildet werden [MTW83] [WJ88] [Isra85] [Tidd80]. Kresge und Mitarbeiter postulieren, dass die Tenside zunächst einzelne Mizellen und anschließend eine flüssigkristalline Phase bilden [BVRL92]. Die Silica-Vorläufermoleküle dringen nach ihrer Zugabe in diese Phase ein und kondensieren an der Grenzfläche zwischen den einzelnen Mizellen (Abb. 2-13, Weg 1). Eine Bedingung für die Bildung der lyotropen Phase ist eine Tensidkonzentration oberhalb der kritischen Mizellenkonzentration (*critical micelle concentration, cmc*). Mit diesem Modell lässt sich demnach nicht die Bildung von MCM-41 bei deutlich geringeren Tensidkonzentrationen erklären [CCK95]. Dies ist wiederum mit dem zweiten von Kresge et al. vorgestellten Mechanismus möglich (Abb. 3-5, Weg 2). Dieser geht von einzelnen Mizellen aus, die noch keine flüssig-kristalline Phase bilden. Werden die Silica-Precursor hinzu gegeben, ummanteln sie die Mizellen und bilden gemeinsam mit ihnen eine geordnete Nanostruktur aus. Erst die Zugabe des Silica-Precursor ermöglicht die für die Bildung einer lyotropen Phase notwendige Änderung der Tensidkonzentration.

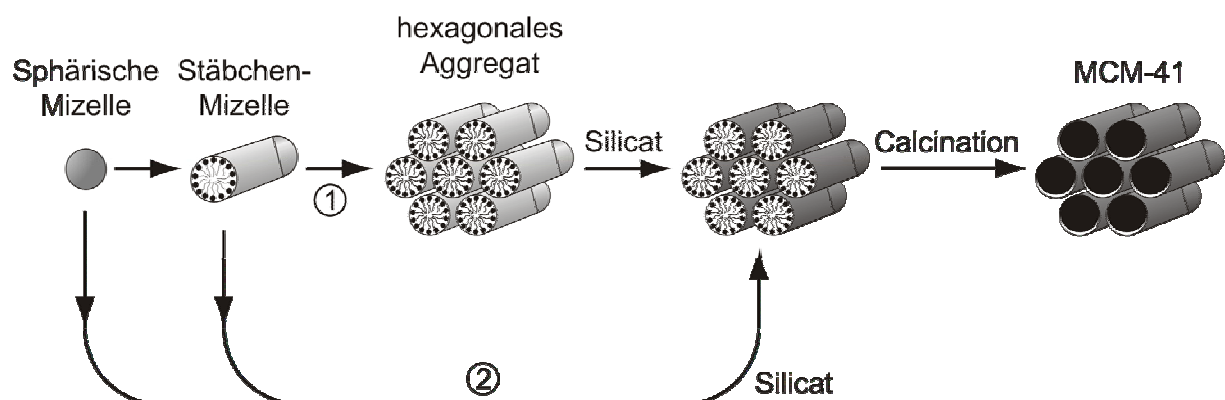


Abbildung 2-13: Darstellung des LCT-Mechanismus (nach [BVRL92], aus [Muso04]).

Ein weiteres Modell zur Bildung nanostrukturierter Silica-Materialien unter hydrothermalen, alkalischen Bedingungen wurde von Stucky und Mitarbeiter vorgestellt (Abb. 2-14) [HMCD94]. Dieser kooperative Templatmechanismus geht von einer Reaktion der Tensidmoleküle mit den gebildeten Silicatanionen aus, die als Dimere oder als Oligomere wie Doppeldreier- oder Doppelviererring vorliegen können. Im ersten Schritt bewirken die starken Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Tensidkopfgruppen und den mehrfach negativ geladenen Silicat-

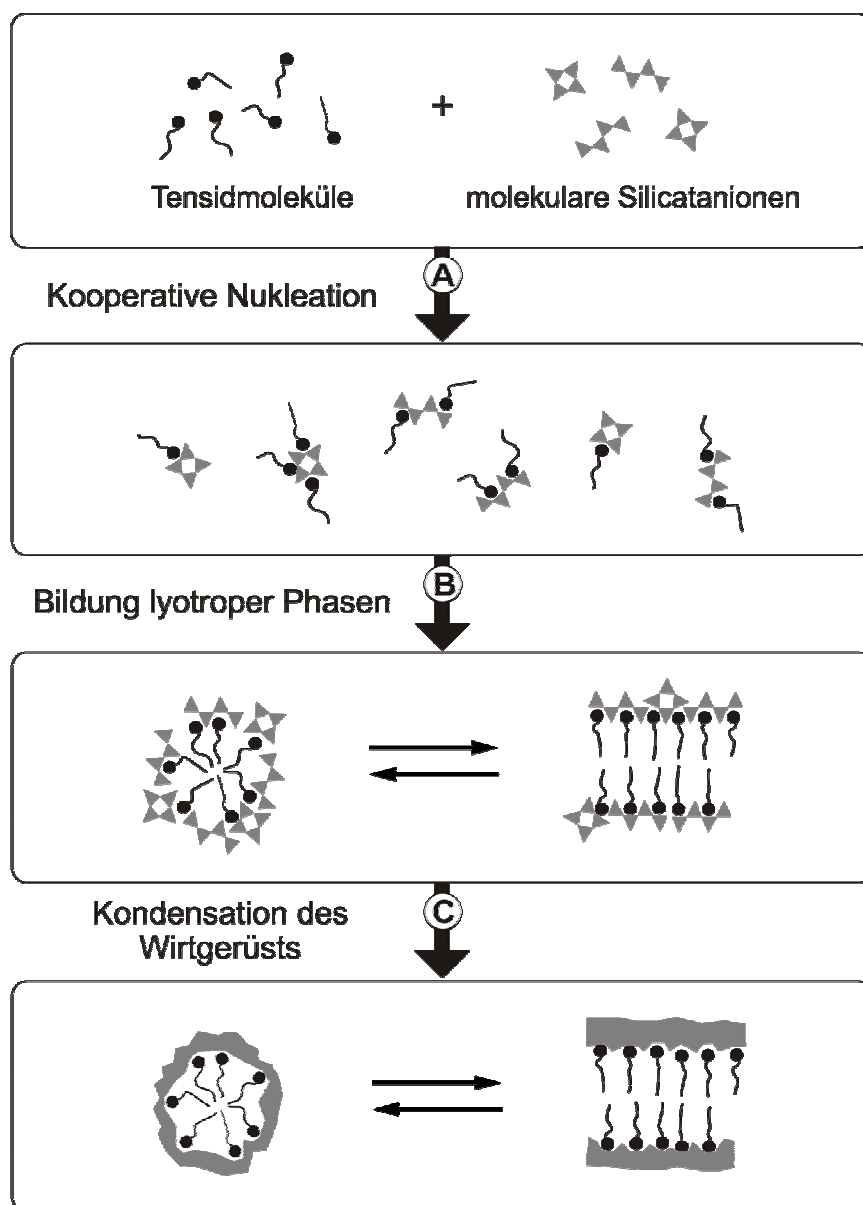


Abbildung 2-14: Schematische Darstellung des kooperativen Templatmechanismus (nach [HMCD94], aus [Muso04]).

spezies einen Austausch der vorhandenen Monoanionen gegen die silicatischen Oligoanionen. Eine anschließende Selbstorganisation dieser Addukte führt zu der Bildung flüssigkristalliner Phasen. Mit diesem Modell kann die Synthese nanostrukturierter Silicate bei niedrigen Tensidkonzentrationen erklärt werden, da das Vorliegen von Tensidmizellen für die Ausbildung der Nanophase nicht entscheidend ist. Allerdings weist auch dieses Modell einen Schwachpunkt auf. Untersuchungen von Vartuli und Mitarbeiter haben gezeigt, dass die für diesen Mechanismus wichtigen Silicatanionen vom Doppelviererring-Typ (D4R, $[\text{Si}_8\text{O}_{20}]^{8-}$) unter hydrothermalen Synthesebedingungen nicht stabil sind [VSKR94] [FKBB95] [FAOS97].

Neben den LCT-Mechanismen und dem kooperativen Templatmechanismus werden weitere Modelle von Monnier et al. [MSHK93], Regev [Rege96] oder Yanagisawa et al. [YSKK90] diskutiert, auf die hier nicht näher eingegangen wird. Einen Überblick über die verschiedenen Bildungsmechanismen kann man sich in den Übersichtsartikeln von Ciesla [CS99], Edler [ER01] oder Ying et al. [YMW99] verschaffen.

2.2.4 Nanostrukturierte Silica-Filme

Für einige potentielle Anwendungen der nanostrukturierten Silica-Materialien ist nicht nur die Nanostrukturierung entscheidend, sondern auch die makroskopische Morphologie. Speziell in der Membrantechnologie, der optischen und elektronischen Sensorik oder bei der Anwendung als Dielektrika gewinnt nanostrukturiertes Silica in Form dünner Filme zunehmend an Bedeutung [BDLK0] [SMS00] [LGDA97]. Silica-Filme mit einer hexagonalen Struktur werden beispielsweise als Träger für leitfähige Polymere oder anorganische Cluster [WB94] [YSIF96] [OTIH98] verwendet. Ein potentielles Anwendungsgebiet in der Medizin liegt – wie bereits in Kapitel 2.2.1 genannt – in der Optimierung der Biokompatibilität und Bioaktivität von Implantatmaterialien.

Erste Berichte über die Synthese stabiler nanoporöser Silica-Filme wurden 1996 von Grunar und Mitarbeitern [AHYZ96], Ogawa [Ogaw96] sowie Ozin und Mitarbeitern [YKCM96] veröffentlicht. Bei diesen Syntheseverfahren wurde das Trägermaterial direkt in ein Synthesegel – bestehend aus Lösungsmittel, einem Silica-Vorläufer sowie einem Tensid – eingetaucht. Die Konzentrationsverhältnisse waren denen für

die Herstellung von Pulvern nach dem Hydrothermalverfahren ähnlich. Diese ersten hexagonal strukturierten Silica-Filme wiesen aber keine homogene glatte Oberfläche auf [BLSF99]. Qualitativ hochwertigere Filme konnten aus Synthesegelen hergestellt werden, deren Tensid-Konzentration unterhalb der kritischen Mizellenkonzentration liegt. Die Ausbildung der Mizellen sowie der Nanostruktur erfolgt hier erst nach dem Herausziehen des Trägermaterials aus dem Synthesegel.

Für die Beschichtung von Trägermaterialien wird im Allgemeinen entweder die *spin-coating*- oder die *dip-coating*-Methode verwendet [BFHA91]. Bei dem *spin-coating*-Verfahren wird das Synthesegel auf ein sich drehendes Trägermaterial aufgebracht, während beim *dip-coating* das Trägermaterial in das Synthesegel eingetaucht und wieder herausgezogen wird. Die Bildung der nanostrukturierten Filme kann anhand des von Brinker et al. vorgestellten *EISA*-Prozess („*Evaporation-Induced Self-Assembly-Process*“) wie folgt beschrieben werden [BLSF99]: Das bei der Beschichtung nach dem Verfahren des *dip-coating* verwendete Synthesegel setzt sich aus einer homogenen Mischung aus Ethanol, Salzsäure, einem löslichen Silica-Vorläufer sowie einem strukturdirigierenden Agens (SDA) zusammen. Die Konzentration des SDA liegt unterhalb der *cmc*, so dass freie Tensidmoleküle in der Lösung vorliegen. Beim Herausziehen des Trägermaterials aus dem Synthesegel verdunstet das Ethanol und die Konzentrationen der Salzsäure, des Silica-Precursors sowie des SDAs auf dem Trägermaterial steigen an. Beim Erreichen der *cmc* bilden die Tensidmoleküle durch Selbstorganisation Mizellen und bei weiterer Aufkonzentrierung Tensid/Silica-Nanostrukturen. Eine schematische Darstellung dieses *EISA*-Prozesses liefert Abbildung 2-15 [BLSF99].

Neben dem eingesetzten SDA sowie der Zusammensetzung des Synthesegels [BHRM02] [GBAA02] beeinflussen auch die Temperatur, Verdampfungsrate und Luftfeuchtigkeit die Ausbildung einer bestimmten Mesostruktur [CGSB03] [GCSC04]. Je nach Reaktionsbedingungen können nanostrukturierte Silica-Filme mit unterschiedlichen Porensystemen und Porengrößen synthetisiert werden, wobei der Porendurchmesser von dem strukturdirigierenden Agens abhängt [ZYMF98].

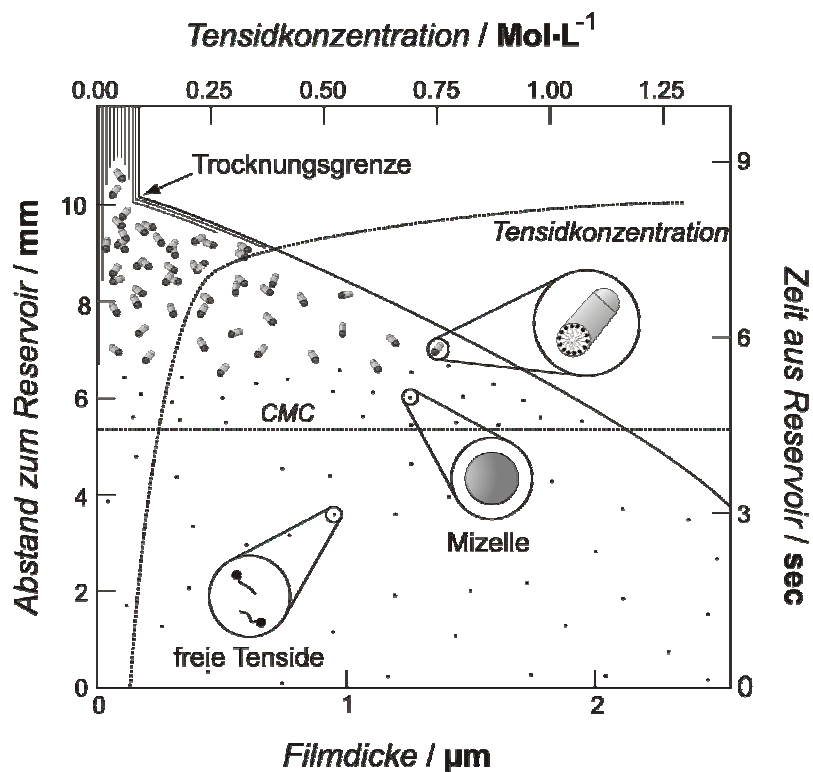


Abbildung 2-15: Darstellung unterschiedlicher Stadien der Bildung eines nanostrukturierten Silica-Filmes. Die linke Achse markiert gleichzeitig die Substratoberfläche (nach [BLSF99], aus [Muso04]).

Die Dicke der silicatischen Filme kann durch die Konzentration des Synthesegels oder über die Geschwindigkeit des Herausziehens zwischen 50 nm und 700 nm eingestellt werden, wobei höhere Konzentrationen des Synthesegels zu dickeren Filmen führen. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass Filme, die dicker als ~ 1 µm sind, leicht Risse zeigen und gegenüber thermischen Behandlungen nicht stabil sind [BS90] [ZYMF98]. Dünnere Filme zeigen dagegen auch nach einer Calcination bei 450 °C keine Rissbildung [ZYMF98].

Mittlerweile ist die Herstellung silicatischer Filme mit kubischer, zwei- oder dreidimensionaler hexagonaler [BRGJ00], lamellarer oder fehlgeordneter Struktur gelungen. Ein wichtiger Aspekt für die Anwendung in der Katalyse oder in Adsorptions- und Trennverfahren ist die Zugänglichkeit der Poren. Diese ist bei kubisch strukturierten Filmen gewährleistet, im Falle von lamellaren oder zweidimensional hexagonalen Filmen setzt dies eine Ausrichtung der Kanäle senkrecht zur Substratoberfläche voraus. Allerdings verlaufen die Kanäle in einer zweidimensionalen hexagonalen Struktur hauptsächlich parallel zu der Substrat-

oberfläche [AHYZ96] [YKCM96]. Es zeigt sich, dass die Ausrichtung bzw. die Orientierung der Kanäle durch das Anlegen eines elektrischen [TYKX97] [WJPH03], magnetischen [TFSC97] oder mechanischen Feldes [MDFP01] verändert werden kann. Elektrische Felder können beispielsweise die Umwandlung einer hexagonalen Nanostruktur zu einer unregelmäßig elliptischen oder einer stäbchenförmigen Struktur induzieren [WJPH03]. Es gibt aber noch kein allgemein anerkanntes und reproduzierbares Verfahren, nach dem z. B. hexagonal strukturierte Filme mit senkrecht zum Substrat stehenden Kanälen hergestellt werden können.

2.2.5 Modifizierung von M41S-Materialien

Besondere Beachtung wird der Funktionalisierung von nanoporösen Silica-Materialien geschenkt. Modifizierte Oberflächen spielen nicht nur in der Katalyse [Bru99] [ZYHL99] sondern auch bei der Extraktion von Metallionen [LFFW98] [LBS98] [AJ02] oder bei Adsorptionsprozessen [IKY00] eine wichtige Rolle. Diese Anwendungen erfordern eine poröse Matrix mit aktiven funktionellen Gruppen, die mit dem Adsorbat Wechselwirkungen eingehen. Die Thiol-Gruppe zeigt beispielsweise eine hohe Affinität zu Schwermetallen und mercaptopropylsilylierte Materialien werden häufig zum Entfernen von Schwermetallen verwendet [FFWK97] [LFFW98]. Eine Modifizierung mit 1-Allyl-3-propylthioharnstoff ermöglicht die Immobilisierung von Quecksilber [AJ02] während ein- oder mehrzählige Aminliganden Cobalt(II)-Ionen binden [DB97]. Interessant sind diese Modifizierungen auch im Hinblick auf ihre medizinische und biotechnologische Anwendung, da die Adsorption von Proteinen sowie das Verhalten von Zellen durch die Oberflächenchemie beeinflusst werden kann (siehe Kapitel 2.1.5).

Die Modifizierung der porösen Oberfläche kann auf verschiedene Arten durchgeführt. Eine Methode ist das nachträgliche Aufbringen (*post-synthetic modification*) der funktionellen Gruppe auf das detemplatisierte, nanoporöse Material [SMS00]. Dazu wird das nanoporöse Silica mit einem Organoalkoxysilan umgesetzt, das die gewünschte funktionelle Gruppe enthält. Die Silylierung findet an den freien Oberflächen-Silanolgruppen des nanoporösen Silicas statt, dessen ursprüngliche Nanostrukturierung in den meisten Fällen erhalten bleibt. Bei dieser Methode ist zu beachten, dass der Grad der Funktionalisierung von der Anzahl der freien

Silanolgruppen auf der Oberfläche abhängt. Die Konzentration der Silanolgruppen und folglich der Funktionalisierungsgrad ist bei einem nanoporösen Silica, aus dem das Tensid durch Extraktion entfernt wurde, höher als bei einem calcinierten Material, da der Kondensationsgrad bei der Calcination deutlich ansteigt. Ein erhöhter Funktionalisierungsgrad kann durch eine vorherige Behandlung mit Wasser erzielt werden. Eine alternative Methode ist die Co-Kondensation eines Tetraalkoxysilans mit einem Organoalkoxysilan. Im Gegensatz zu den zuerst genannten Verfahren wird bei der Co-Kondensation die funktionelle Gruppe direkt bei der strukturdirigierenden Synthese eingesetzt. Seit den ersten Untersuchungen von Mann [BSM96] [FBM97], Stucky [HMS96] und Stein [LBS97] und Mitarbeitern wurden diverse funktionelle Gruppen nach dieser Methode in nanoporöses Silica eingebaut. Einen guten Überblick über das weite Gebiet der Modifizierung liefern ein Artikel von Stein et al. [SMS00] und die Dissertation von Altmaier [Altm03].

2.3 Organisch-anorganische Kompositmaterialien als Biomaterialien

2.3.1 Einführung

Organisch-anorganische Kompositwerkstoffe bestehen aus mindestens einer organischen und einer anorganischen Komponente. Kompositmaterialien weisen im Vergleich zu den reinen Komponenten neue Eigenschaften auf. In Anlehnung an die Biominerale (siehe Kapitel 2.1) werden in Biomaterialien häufig Hydroxylapatit oder Silica als anorganischer und Polysaccharide, Polypeptide oder Glycoproteine als organischer Bestandteil ausgewählt. Da reines Hydroxylapatit sich schlecht mechanisch behandeln lässt und sehr spröde ist, werden Biopolymere wie z. B. Collagen oder Chitosan als organische Komponente in die Komposite eingebaut [IMT00] [YTF01] [MQS99] [BSH99]. Durch diesen Verbund entsteht ein zugleich elastisches und hartes Material, das den natürlichen Aufbau des Knochens in gewisser Weise nachahmt. Zudem wird die *in-vivo* Osteokonduktivität erhöht, was bedeutet, dass Knochen in das Implantat einwächst, während die Biopolymere zunehmend resorbiert werden [HYNI86]. Die gute Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit dieser Materialien ermöglicht die Anwendung als Knochenersatzmaterial. Ein weiteres potentiell Einsatzgebiet für röhrenförmige Hydroxylapatit-Chitosan-Komposite stellt die Regeneration von Nervengewebe dar [YISO03]. Allerdings sind die Komposite, die durch Vermischen von HAp-Pulver in einer Chitosan-Lösung entstehen, teilweise inhomogen und können Entzündungen verursachen [YTF01] [INMY94].

Im Vergleich zu der Verwendung von vorgefertigtem nanokristallinen HAp werden bei bio-inspirierten bzw. biomimetischen Syntheseverfahren, die die Prozesse der Biomineralisation nachahmen, homogenere Materialien erhalten. Bei diesen Syntheseverfahren werden die Komposite durch eine Co-Präzipitation beider Komponenten oder durch die Mineralisation der anorganischen Komponente innerhalb der organischen Matrix gebildet. Die organische Komponente steuert hierbei die Bildung des Hydroxylapatits und baut mit ihm eine gemeinsame Struktur

auf. Verschiedene Herstellungsmethoden und die Untersuchung der Kompositmaterialien in Hinblick auf ihre Anwendung als Knochenersatzmaterial werden in der Literatur ausführlich beschrieben [KL03] [ZZ02] [SRV02] [IMT01] [BDDH99] [LPLS00] [DCZF00] [LRM02] [YISO03] [WCLW95] [ZYLL02].

2.3.2 Calciumphosphate

Die Vielfalt an Calciumphosphaten ist – bei variierenden Wassergehalten – auf die Kombination von Calcium mit den Anionen der Orthophosphorsäure zurückzuführen. Die Benennung der Calciumphosphat-Phasen wird durch Abkürzungen vereinfacht, für die das molare Ca/P-Verhältnis sowie die Löslichkeit in Wasser entscheidend sind. Eine Übersicht über die bekannten Calciumphosphat-Phasen liefert Tabelle 2-4. Alle Calciumphosphate sind weiße Festkörper, die im neutralen Milieu schwerlöslich und im sauren Milieu gut löslich sind (siehe Abb. 2-16). Die Löslichkeit in Wasser nimmt mit steigendem Ca/P-Verhältnis ab [KATN80]. Ausführliche Informationen zu den Vorkommen, Eigenschaften und strukturellem Aufbau der einzelnen Phasen werden u. a. von Elliot gegeben [Elliott94].

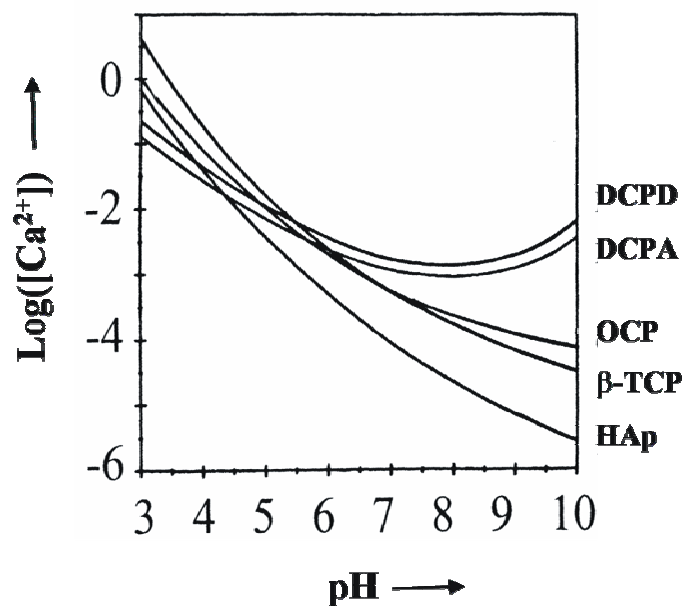


Abbildung 2-16: Löslichkeit von Calciumphosphat-Phasen als Funktion des pH-Wertes. DCPD: Dicalciumphosphat-Dihydrat, DCPA: Dicalciumphosphat-Anhydrat, OCP: Octacalciumphosphat, β -TCP: β -Tricalciumphosphat, HAp: Hydroxylapatit [aus Epp03].

Tabelle 2-4: Eigenschaften der biologisch relevanten Calciumorthophosphate. Die Löslichkeit ist angegeben als Logarithmus des Ionenprodukts für die angegebene Formel (ohne Hydratwasser) mit Konzentrationen in mol/L (nach [DE02]).

Ca:P-Verhältnis	Verbindung	Formel	Löslichkeit bei 25°C, [-log(K _{sp})]
0.5	Monocalciumphosphat-Monohydrat (MCPM)	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ · H ₂ O	1.14
0.5	Monocalciumphosphat-Anhydrat (MCPA)	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.14
1.0	Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD, Brushit)	CaHPO ₄ · 2 H ₂ O	6.59
1.0	Dicalciumphosphat-Anhydrat (DCPA, Monetit)	CaHPO ₄	6.90
1.33	Octacalciumphosphat (OCP)	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ · 5 H ₂ O	96.6
1.5	α-Tricalciumphosphat (α-TCP)	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	25.5
1.5	β-Tricalciumphosphat (β-TCP)	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	28.9
1.2-2.2	Amorphes Calciumphosphat (ACP)	Ca _x (PO ₄) _y · n H ₂ O	~ 25-33
1.5-1.67	Calcium-defizitärer Hydroxylapatit (CDHA)	Ca _{10-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} (OH) _{2-x} (0 < x < 1)	~ 85.1
1.67	Hydroxylapatit (HAp)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	116.8
2.0	Tetracalciumphosphat (TTCP)	Ca ₄ (PO ₄) ₂	38-44

Der Apatit ist das wichtigste Biomineral auf Calciumphosphat-Basis. Die Hartgewebe (Knochen, Zähne sowie z. T. die Sehnen) des menschlichen und tierischen Körpers enthalten carbonathaltigen Hydroxylapatit, der diesen Organen die notwendige Stabilität und Härte gibt. Pathologische Verkalkungen sind Kristallisationen von Calciumphosphaten an unerwünschten Orten, die unter Umständen zu lebensbedrohlichen Erkrankungen führen können. Als Beispiele seien Zahnstein, arteriosklerotische Ablagerungen und Steinbildungen genannt. In Zahnstein und Blasensteinen konnten sowohl Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD) [HH99], Octacalciumphosphat (OCP) [LeGe74] [Schr69] als auch β-Tricalciumphosphat (β-TCP) als Bestandteile nachgewiesen werden, während bei der Verkalkung von Weichgewebe amorphes Calciumphosphat (ACP) und β-TCP gefunden wurde

[HH99] [LeGe91] [LeGero01]. β -TCP kommt ebenfalls in Speicheldrüsensteinen, arthritischem Knorpel und bei der Kariesbildung vor. DCPD ist als intermediäre Phase bei der Auflösung von Zahnschmelz durch Karies und bei der Knochenbildung von großer biologischer Bedeutung. Aber auch in der unbelebten Natur sind Calciumphosphate häufig vorkommende Mineralien. Als wichtigste Vertreter seien hier die niedrig-kristallinen nicht-stöchiometrische Apatit-Phasen wie der Fluorapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) und die Phosphorite genannt [Elliot94].

2.3.2.1 Hydroxylapatit

Wie bereits die logarithmischen Auftragungen der Löslichkeitsisothermen in Abbildung 2-16 zeigen, ist der Hydroxylapatit das am wenigsten lösliche und folglich das stabilste Calciumphosphat. Neben dem stöchiometrischen Hydroxylapatit gibt es nicht-stöchiometrische, so genannte Calcium-defizitäre HAp-Phasen ($\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$, $0 < x < 1$), deren molare Ca/P-Verhältnisse zwischen 1.5 und 1.67 liegen. Diese werden unter anderem bei der Hydrolyse von OCP und ACP gebildet. HAp hat die Neigung Fremdionen in sein Kristallgitter einzubauen. Eine Substitution der Hydroxylgruppen durch Fluor-, Chlor- oder Carbonationen erfolgt ebenso leicht wie die Substitution der Calcium-Ionen durch Barium-, Strontium- oder Bleiionen. Die Phosphationen können zum Beispiel durch Arsenat- oder Vanadationen ersetzt werden. Aufgrund dieser Erkenntnisse sollten bei „nasschemischen“ Herstellungsverfahren möglichst Edukte gewählt werden, deren Gegenionen nur erschwert in das Kristallgitter eingebaut werden. Infolge des relativ großen Ionendurchmessers bieten sich Kalium-, Ammonium- und Nitrationen an. Untersuchungen von Zawacki et al. [ZKSN86] und Umegaki et al. [UNK89] haben gezeigt, dass diese Ionen einen geringen Einfluss auf die Kristallisationsgeschwindigkeit haben. Für die Synthese von stöchiometrischem, hochkristallinem HAp bieten sich Festkörperreaktionen an.

In Abbildung 2-17 sind die Röntgenpulverdiffraktogramme von Apatiten unterschiedlicher Kristallinitäten dargestellt, die die Abhängigkeit der Kristallinität von den Fällungsbedingungen verdeutlichen [Pete01]. Das Diffraktogramm des ACP (A), das im alkalischen Milieu synthetisiert und sofort von der Mutterlauge abgetrennt wurde, zeigt den charakteristischen breiten Reflex von „röntgenamorphen“ Materialien,

während der Apatit (B) bereits eine geringe Kristallinität mit einer Vorzugsorientierung in (002)-Richtung aufweist. Eine schnelle Fällung mit einer anschließenden Alterung in Wasser bringt die Bildung eines solchen nanokristallinen HAp mit sich. Die Kristallinität des HAp kann durch langsame Fällung (C) und anschließendes Sintern bei 900 °C (D) erhöht werden.

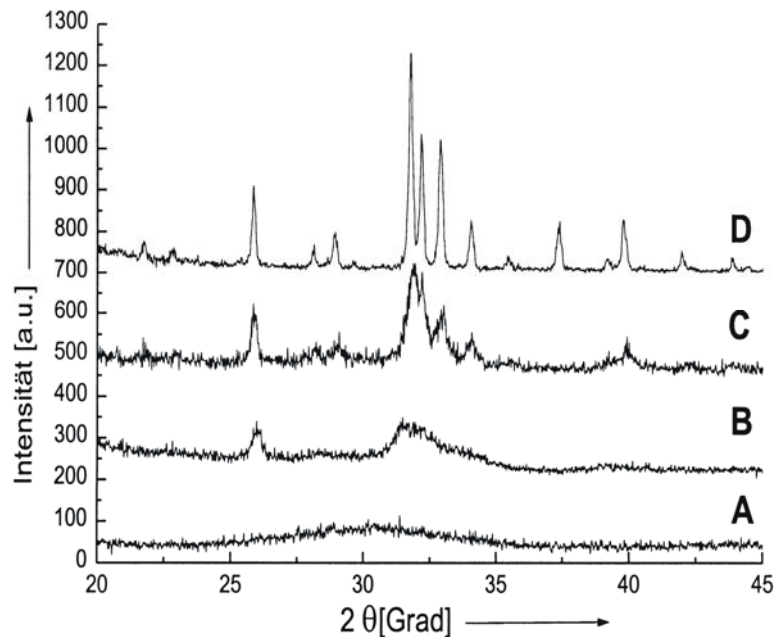


Abbildung 2-17: Röntgenpulverdiffraktogramme von Apatiten unterschiedlicher Kristallinitäten. A: ACP, hergestellt durch schnelle Fällung aus einer moderat übersättigten Lösung, B: nanokristalliner Apatit, hergestellt durch schnelle Fällung aus einer übersättigten Lösung und Alterung in Wasser, C: Hydroxylapatit, hergestellt durch langsame Fällung, D: Kristalliner HAp, hergestellt durch langsame Fällung und Sintern bei 900°C über Nacht (aus [Pete01]).

HAp kann sowohl monoklin (Raumgruppe: $P2_1/b$, Gitterparameter $a = 9.4214(8)$, $b = 2a$, $c = 6.8814(7)$ Å) als auch hexagonal (Raumgruppe $P6_3/m$, Gitterparameter: $a = b = 9.4302(5)$, $c = 6,8911(2)$ Å) kristallisieren, wobei die monokline Struktur unter Normalbedingungen stabiler ist [EMY73] [Elliot94]. Eine Umwandlung in die hexagonale Struktur findet oberhalb 250 °C statt. Unterhalb dieser Temperatur wird die hexagonale Form durch den Einbau von Fremdionen in das Kristallgitter stabilisiert [Elliot94].

Die Anordnung der Ionen im Kristallgitter des hexagonalen HAp ist in Abbildung 2-18 und 2-19 dargestellt. Die kristallographische c -Achse liegt parallel zur Ansicht. Die sechszählige Schraubenachse (6_3), auf der die Hydroxidionen positioniert sind,

verläuft in Richtung der *c*-Achse. In dieser Struktur können zwei Ca-Positionen unterschieden werden: Ca(1) und Ca(2).

Aufgrund der speziellen Koordination ordnen sich die Ca(1)-Ionen in parallel zur *c*-Achse verlaufenden Säulen an (Abb. 2-18). In einer Säule sind die Ca(1)-Ionen jeweils über 3 O-Atome mit dem benachbarten Ca^{2+} -Ion verknüpft, wobei die Säulen untereinander über PO_4^{3-} -Tetraeder verbunden sind, so dass dreidimensionale Netzwerke aus PO_4^{3-} -Tetraedern mit säulenartig verstrickten Ca(1)-Ionen entstehen. Aus dieser Anordnung resultiert eine Koordination der Ca(1)-Ionen mit 9 O-Atomen.

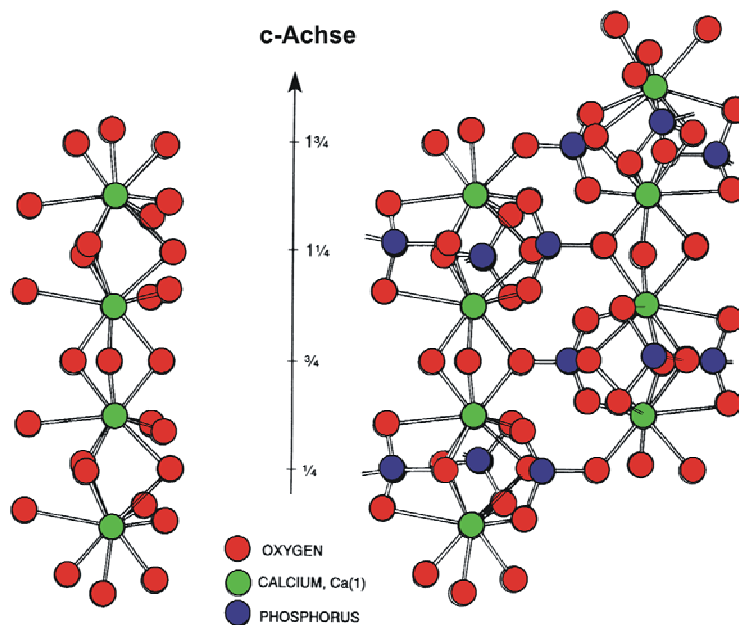


Abbildung 2-18: Anordnung der Ionen im Kristallgitter des Hydroxylapatits (aus [Elliot94]).

Im Gegensatz dazu koordinieren an die Ca(2)-Ionen auch die auf der sechszähligen Schraubenachse liegenden OH^- -Ionen (Abb. 2-19). Die trigonal-planar angeordneten Ca^{2+} -Ionen sind jeweils um 60° zueinander verdreht, woraus bei Aufsicht in *c*-Achsenrichtung eine hexagonale Anordnung der Ca-Atome um die OH^- -Ionen resultiert. Der Kanal, der durch diese Anordnung entsteht, wird Ionenkanal genannt.

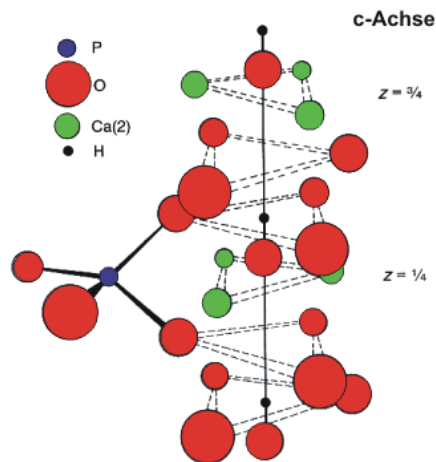


Abbildung 2-19: Anordnung der Ca(2)-Ionen im Kristallgitter des Hydroxylapatits (aus [Elliot94]).

2.3.3 Chitosan

Chitosan ist das wichtigste Chitinderivat, das durch N-Deacetylierung aus Chitin hergestellt werden kann [HL65]. Chitin kommt in der Natur in den Schalen, Hüllen und Panzern der Gliederfüßer (z. B. Krebstiere wie Shrimps und Krabben, Käfer und Spinnen) vor [Muzz90]. Die N-Deacetylierung des Chitosans erfolgt meist nicht vollständig. Im Chitosan ist der Anteil von deacetylierten Glucosamin-Einheiten definitionsgemäß größer als 50 %, im Chitin kleiner [KL03]. Ein Ausschnitt aus der Struktur des Chitosans ist in Abbildung 2-20 gezeigt. Die Kettenlänge von handelsüblichem Chitosan liegt zwischen 600 und 2000 Monomereinheiten.

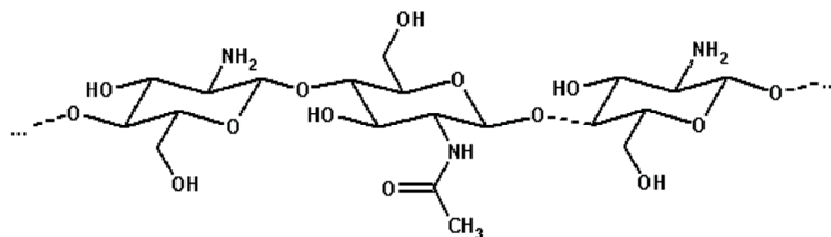


Abbildung 2-20: Ausschnitt aus der Struktur des Chitosans.

Die industrielle Verwendung von Chitosan ist vielfältig. Sie reicht vom Einsatz in der Abwasserbehandlung [WIT93] in Kläranlagen als Flockungsmittel, zur Komplexierung von Schwermetallionen [Muzz73] [MRF74] und als Bindemittel für Farbstoffe in der Textil- oder Kosmetikbranche [MR88] [KCC97] [BSZ91] [HDRV97] [DX94] [RH94] [Onso91]. Aber auch in der medizinischen und pharmazeutischen Anwendung gewinnt es zunehmend an Bedeutung. Chitosan zeigt keine allergenen Wirkungen, ist biokompatibel und durch Lysozyme im Körper enzymatisch abbaubar. Dabei ist die Abbau-, bzw. Verweilszeit umgekehrt proportional zum Deacetylierungsgrad: Chitosan mit einem hohen Deacetylierungsgrad ist bis zu einigen Monaten im Körper nachweisbar [MSR05]. Diese Eigenschaften ermöglichen den Einsatz als Nahtmaterial für künstliche Haut und im Bereich der Geweberekonstruktion („*Tissue Engineering*“) bei der Behandlung tiefer Wunden [KL03] [SM86]. Darüber hinaus wird berichtet, dass Chitosan die Wundheilung durch Steigerung der Produktionsrate von den dafür notwendigen polymorphonuclearen Zellen und Collagen fördert [III98] [UYYO99]. Ferner wird postuliert, dass implantierte poröse Chitosangerüste, so genannte „*scaffolds*“, das Zellwachstum und die Zellproliferation verbessern [MWHC01] [WCNW01]. In Verbindung mit anorganischen Komponenten wie Calciumphosphaten wird Chitosan als Knochenersatzmaterial eingesetzt [KL03] [MM02] [ZZ01]. Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite vereinen eine gute Osteokonduktivität und Biodegradierbarkeit mit einer guten mechanischen Stabilität. Die Synthese dieser Komposite kann nach verschiedenen Methoden durchgeführt werden. Dazu gehört zum Beispiel das Vermischen von HAp-Pulver in einer Chitosan-Lösung [MI96] [INMY94], die Mineralisation des HAp innerhalb eines Chitosan-Gerüsts [YISO03] [ZNZR03] [MPJW04] oder die Co-Präzipitation beider Komponenten [RNWT05] [YTFK01]. Komposite aus HAp und einem Netzwerk aus Chitosan und Gelatine können durch Zugabe eines Quervernetzungsmittels wie Glutardialdehyd synthetisiert werden [ZYLL02] [YZSD00]. Die Quervernetzung erfolgt durch eine Reaktion der primären Aminogruppe des Polysaccharids mit dem Glutardialdehyd unter Bildung einer Iminbindung. Die Quervernetzung spielt nicht nur bei der Herstellung von Kompositmaterialien eine wichtige Rolle, sondern auch bei der Synthese von Chitosan-Perlen („*chitosan beads*“) für die Schwermetallkomplexierung in der Abwasserreinigung [RSG00] [RHW93] [GMT98].

Eine Modifizierung der primären Aminogruppe mit Biomolekülen oder Arzneistoffen ermöglicht die Herstellung medikamentenhaltiger Wundabdeckungen sowie eine

Anwendung als „*drug-release*“-System (Literatur hierzu: [QWA00] [SK01] [HSK03] [AT99] [KL03]).

2.3.4 Hyaluronsäure

Die Hyaluronsäure ist ein natürlich vorkommendes Polysaccharid, das 1934 von Meyer und Palmer erstmals aus Rinderaugen isoliert werden konnte [MP34]. Heutzutage wird Hyaluronsäure durch aufwendige Proteinabtrennung aus Nabelschnüren oder Hahnenkämmen isoliert bzw. durch bakterielle Fermentation mit Hilfe von Streptokokken auf biotechnologischem Wege hergestellt. Die Struktur der Hyaluronsäure setzt sich aus 250 bis 25000 β -(1,4)-verknüpften Disaccharid-Einheiten zusammen, die von β -(1,3)-verknüpften D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin-Bausteinen aufgebaut sind (Abb. 2-21).

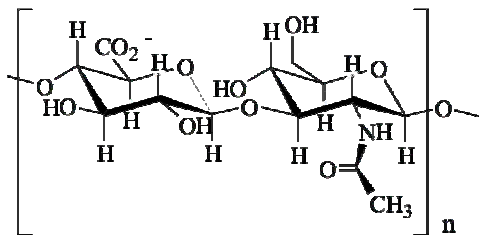


Abbildung 2-21: Disaccharid-Einheit der Hyaluronsäure.

Die Hyaluronsäure zählt zu der Klasse der Glycosaminoglycane (GAG) und ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM) aller höheren Lebewesen. Im menschlichen Körper ist sie in der Nabelschnur, der Haut, im Glaskörper des Auges und in der Gelenkflüssigkeit zu finden. Die Hyaluronsäure spielt nicht nur bei der Schmierung von Gelenken, der Zelldifferenzierung und dem Zellwachstum eine entscheidende Rolle, sondern auch bei der Wundheilung und bei Entzündungen (Literatur hierzu: [LBPS03] [CA99] [RO00] [WFL86] [WHAK85] [TKMK89] [Tool81] [AO95] [PSND89]). Eine weitere Aufgabe der Hyaluronsäure besteht im Schutz der Zellen vor dem Angriff freier Radikale [PS94] [AO95] und bei der Regulierung des Wassergleichgewichts der extrazellulären Matrix [LF92]. Die Hyaluronsäure zeichnet

sich durch ihr Wasserbindungsvermögen und ihre viskoelastischen Eigenschaften aus, wobei die Viskoelastizität von den auftretenden Scherkräften abhängt [Glyco] [WF96]. Bei geringen Scherkräften wird die Viskosität erhöht, bei hohen Scherkräften nimmt sie dagegen ab. Dies führt zum Beispiel bei Sprüngen zur Dämpfung der wirkenden Kräfte im Kniegelenk oder beim Laufen zur Minimierung der Reibung.

Diese Eigenschaften erklären die vielseitige Anwendung der Hyaluronsäure in der Medizin: Angefangen von der Behandlung von Verbrennungen über die Behandlung entzündeter Haut, Schleimhaut sowie Arthritis [BCDP87] [BD89] bis hin zur Anwendung in der Ophthalmologie [GONM91] [SMTC94]. Weitere Einsatzgebiete bilden die Bereiche der Geweberekonstruktion („*Tissue Engineering*“) [LS04] [LBPS03] und des „*drug delivery*“ [LLPB91] [JST92]. Anorganisch-organische Kompositmaterialien wie z. B. Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Kollagen-Komposite wurden eingehend auf ihre Eignung als Knochenersatzmaterialien und in der Knochenregeneration untersucht [IMT01] [BSH99]. Hyaluronsäure weist zwar eine sehr gute Biokompatibilität auf, zeigt aber aufgrund der Biodegradierbarkeit eine geringe mechanische Stabilität in physiologischen Umgebungen. Modifizierungen der Hyaluronsäure wie z. B. Vernetzungen als Hydrogel [LBPS03] [LS04] durch Veresterung oder *Cross-linking* [LKP00] [VP98] sowie die Anbindung von unterschiedlichen Trägergruppen verändern die physiko-chemischen Eigenschaften und bedingen häufig eine verminderte Biodegradierbarkeit. Die Derivate sind wie die native Hyaluronsäure im Allgemeinen sowohl biokompatibel als auch biodegradierbar und können ebenfalls in den oben genannten Bereichen der Medizin eingesetzt werden [LKP00] [VP98]. Eine Übersicht über die Eigenschaften und (potentiellen) Anwendungen der Hyaluronsäure und deren Derivate wird von Abatangelo und Weigel [AW00] und im Rahmen eines GlycoForums [Glyco] von verschiedenen Autoren gegeben.

3 Synthese und Charakterisierung von nanostrukturierten Silica-Filmen

In diesem Abschnitt werden zunächst die Synthese der nanostrukturierten Silica-Filme auf Standard-Glasobjektträgern und auf Bioverit[®] II sowie die Modifizierung der Silica-Filme mit ausgewählten Organoalkoxysilanen beschrieben. Anschließend wird die strukturanalytische Charakterisierung der Silica-Filme mittels Infrarotspektroskopie, Röntgendiffraktometrie sowie Rasterelektronenmikroskopie vorgestellt. Die Infrarot-Spektren wurden mit einem Spektrometer des Typs *Tensor 27* der Firma *BRUKER* aufgenommen. Hierfür wurden die Silica-Filme vom Trägermaterial abgekratzt und mit Kaliumbromid zu einer Tablette gepresst. Die Röntgenbeugungsuntersuchungen wurden an einem StadiP-Diffraktometer der Firma *STOE* mit θ/θ -Geometrie durchgeführt, wobei die beschichteten Trägermaterialien flach auf einem Proben-träger lagen. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem hochauflösenden Feldemissionselektronenmikroskop des Typs *JSM-6700F* der Firma *JEOL* aufgenommen.

3.1 Synthese von nanostrukturierten Silica-Filmen

3.1.1 Synthese von nanostrukturierten Silica-Filmen auf Standard-Glasobjektträgern und auf Bioverit[®] II

Die nanostrukturierten Silica-Filme werden nach dem *dip-coating* Verfahren in einem modifizierten Exsikkator (Abb. 3-1) hergestellt. Dieser Aufbau wurde bereits von Musolf [Muso04] bei der Tauchbeschichtung eingesetzt. Durch die Öffnung im Deckel des Exsikkators kann eine Metallstange, an deren unterem Ende der Objektträger mit einer Klammer befestigt ist, verwacklungsfrei in vertikaler Richtung auf und ab bewegt werden. Im Exsikkator selbst steht ein zylindrisches Gefäß, welches das Synthesegel zum Inhalt hat. Wird die präparierte Metallstange nach unten bewegt, taucht der Objektträger in das Synthesegel ein. Nach dem Tauch-

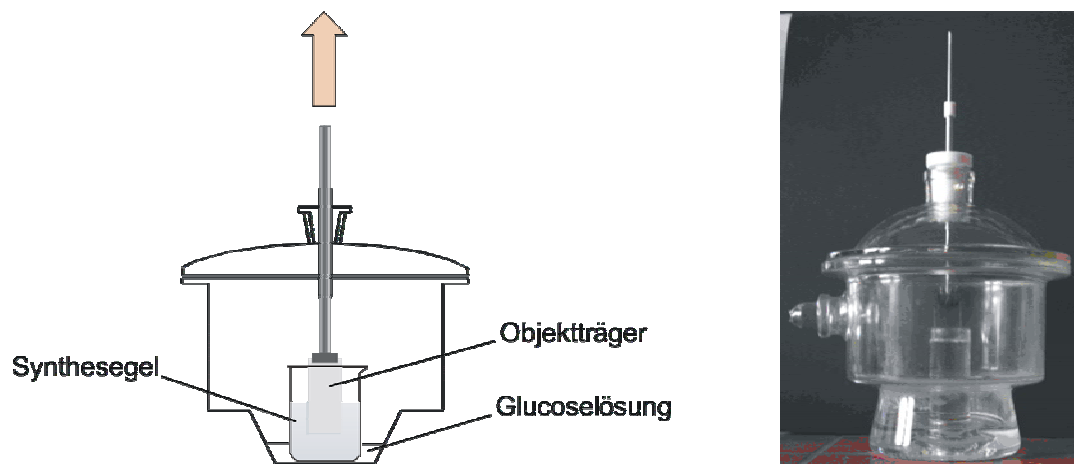


Abbildung 3-1: Modifizierter Exsikkator für das *dip-coating*-Verfahren.

vorgang kann die Stange gleichmäßig wieder herausgezogen werden und der beschichtete Objektträger befindet sich nunmehr im Hohlraum des Exsikkators. Eine Glucoselösung (50 Gew.-%) gewährleistet eine annähernd konstante Luftfeuchtigkeit im Exsikkator. Durch Öffnen des Exsikkatordeckels kann der Objektträger entnommen werden. Eine konstante Temperierung während der Beschichtung ist nicht vorgesehen.

Als Trägermaterial dienen herkömmliche Standard-Glasobjektträger. Um für zellbiologische Untersuchungen geeignete Probenformen zu erhalten, müssen von der Längsseite der Objektträger noch 2 mm abgeschliffen und die Ecken abgerundet werden. Für die quantitativen Zellkulturuntersuchungen ist es sehr wichtig, dass die Proben genau in die Zellkulturschalen passen und sich keine Lücken zwischen Proben- und Zellkulturschalenrand bilden, durch die die Zellen durchfallen könnten, weil sie dann auch auf der Rückseite der Probe wachsen würden, was die Ergebnisse verfälschen könnte. Als weiteres Trägermaterial wurde das gängige Implantatmaterial Bioverit®II gewählt, eine Glimmer-Glaskeramik, deren Komponentenzusammensetzung gemäß den Angaben des Herstellers 3di GmbH/D-Jena durch SiO_2 , Al_2O_3 , MgO , Na_2O , K_2O , F , P_2O_5 und CaO beschrieben werden kann. Die Beschichtung erfolgt auf Plättchen mit einem Durchmesser von 9 mm und einer Höhe von 1.5 - 2.0 mm sowie auf kommerziell vertriebenen Mittelohrimplantaten vom Typ Jena (Abb. 3-2). Nach eingehender strukturanalytischer Untersuchung werden

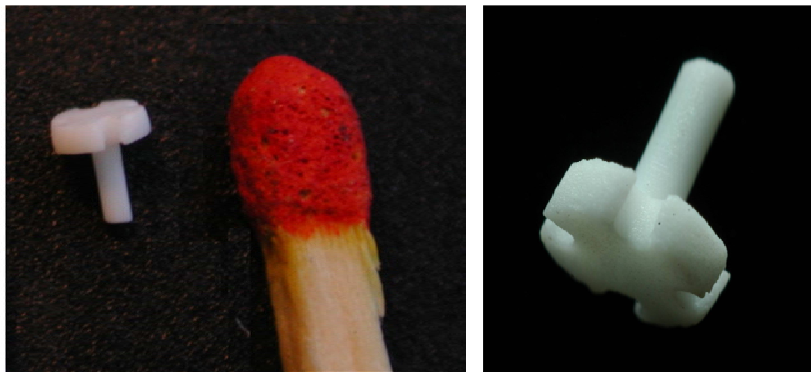


Abbildung 3-2: Bioverit® II-Mittelohrimplantat vom Typ Jena (Hersteller: 3di GmbH/D-Jena) im Vergleich zu einem Streichholzkopf (links) und in einer vergrößerten Darstellung (rechts).

die beschichteten Plättchen *in-vitro* zellbiologisch und *in-vivo* im Tierversuch durch die Implantation ins Weichgewebe eines Kaninchens auf ihre Biokompatibilität untersucht. Die beschichteten Implantate vom Typ Jena werden in das Mittelohr der Kaninchen eingesetzt.

Als strukturdirigierende Agenzien werden das nicht-ionische Tensid Octaethylenglycolmonododecylether ($C_{12}EO_8$) sowie die kommerziellen amphiphilen Triblockcopolymeren Pluronic®P123 ($EO_{20}PO_{70}EO_{20}$, EO: Ethylenoxid, PO: Propylenoxid), Pluronic®P103 ($EO_{17}PO_{85}EO_{17}$) sowie Pluronic® F127 ($EO_{106}PO_{70}EO_{106}$) eingesetzt (Abb. 3-3). Ferner werden Filme ohne Zusatz eines Tensides hergestellt. Zusammen mit einem Silica-Precursor (Tetraethoxysilan, TEOS) bilden diese Strukturdirektoren ein organisch-anorganisches Hybridmaterial, aus dem die organische Komponente durch Calcination entfernt wird, so dass eine Nanostruktur aus amorphem Siliciumdioxid resultiert.

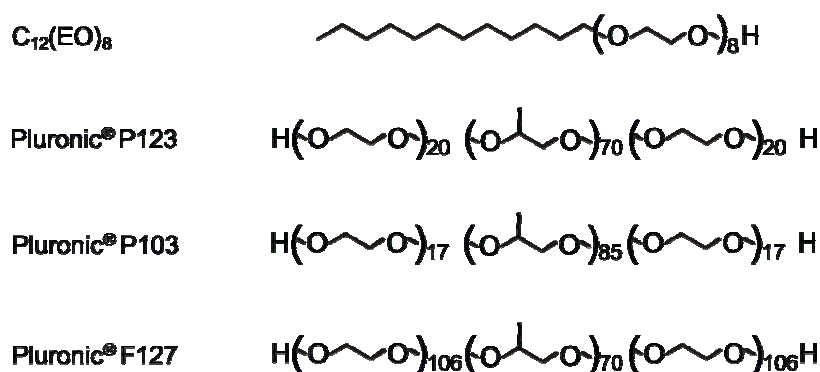


Abbildung 3-3: Strukturformeln der eingesetzten strukturdirigierenden Agenzien.

Die Herstellung des Synthesegels und die Prozedur des *dip-coating* soll an dem folgenden Beispiel beschrieben werden. Die molaren Verhältnisse aller verwendeten Synthesegele liefert Tabelle 3-1. Vor der Tauchbeschichtung werden alle Trägermaterialien mit Aceton und Ethanol gereinigt.

In einem zylindrischen Behälter wird eine Lösung aus 56.92 mL Ethanol, 0.6 mL 2 N Salzsäure sowie 9.0 mL destilliertem Wasser angesetzt und mit 1.495 g Pluronic®P123 als strukturdirigierendem Agens (SDA) versetzt. Nach der vollständigen Auflösung des SDAs werden 4.465 mL Tetraethoxysilan als Silica-Precursor hinzu gegeben und die Reaktionslösung für weitere 10 Minuten gerührt. Der Zylinder mit dem Synthesegel wird zur Tauchbeschichtung in den Exsikkator überführt. Die Trägermaterialien werden 30 Sekunden in das Synthesegel eingetaucht, mit einer Geschwindigkeit von ca. 2 mm/s herausgezogen und anschließend fünf Minuten in dem geschlossenen Exsikkator aufbewahrt. Zur Erhöhung des Kondensationsgrades des Siliciumdioxids werden die organisch-anorganischen Filme über Nacht bei 60 °C in einem Umluftofen getrocknet. Die organische Komponente wird meist durch eine nachfolgende Calcination (4 Stunden, 415 °C) entfernt. Alternativ zur Calcination wird in einigen Fällen eine Extraktion mit Ethanol durchgeführt. Bei der hohen Anzahl von Silica-Filmen, die für die zellbiologischen Untersuchungen auch zur statistischen Absicherung hergestellt werden mussten, erwies sich die Extraktion als nicht praktikabel. Der Zeitaufwand ist bei der Extraktion wesentlich größer, da jeweils nur ein einzelner Silica-Film extrahiert werden kann, während bei der Calcination 20 Filme auf einmal behandelt werden können.

Tabelle 3-1: Molare Verhältnisse aller verwendeten Synthesegele. SDA: strukturdirigierendes Agens, TEOS: Tetraethoxysilan, HCl: Salzsäure; EtOH: Ethanol.

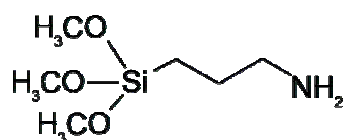
SDA	TEOS	SDA	HCl	H ₂ O	EtOH
C ₁₂ EO ₈	1	0.0065	0.0011	0.32	0.26
P123	1	0.0135	0.06	26.9	48.9
P103	1	0.0155	0.06	26.9	48.9
F127	1	0.0047	0.25	10.65	39.4
ohne	1	-	0.06	29.9	48.9

Für die grundlegenden Untersuchungen zu den Einflüssen von Nanostrukturen auf das Zellverhalten ist es notwendig, nanoporöse Silica-Filme mit unterschiedlichen Porengrößen zellbiologisch zu testen. Als problematisch erweist sich hier die Generierung von Materialien mit größeren Porendurchmessern, die sich nicht mehr direkt herstellen lassen.

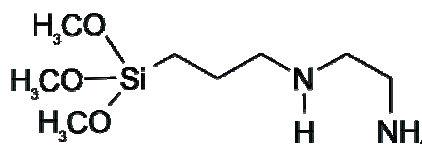
Eine gängige Methode zur Vergrößerung der Poren ist die Zugabe von organischen Substanzen wie Mesitylen (1,3,5-Trimethylbenzol) zum Synthesegel [ZFHM01] [BMWLO1] [BVR92]. Es wird angenommen, dass Mesitylen aufgrund seiner sperrigen, unpolaren Struktur sich im hydrophoben inneren Bereich der Mizellen lösen kann und diese bzw. die resultierenden Poren aufweitet. Für diese Versuche werden zu den oben beschriebenen Synthesegelen 3 mL Mesitylen hinzugefügt und die Tauchbeschichtung analog durchgeführt.

3.1.2 Modifizierung nanoporöser Silica-Filme mit Organoalkoxysilanen

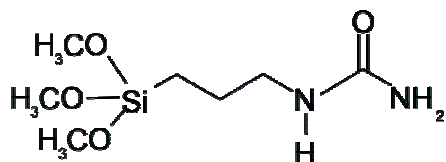
Wie bereits im Kapitel 2.1.5 erläutert, kann eine modifizierte Oberfläche für die Anbindung von synthetischen oder biologischen Molekülen (Proteinen) sowie für den Zellbewuchs eine große Rolle spielen. Dieser Teil der Arbeit befasst sich mit der Modifizierung von calcinierten Silica-Filmen, die auf Glasobjektträgern aufgebracht sind, mit Silanen, die verschiedene funktionelle Gruppen tragen. Die Strukturformeln der verwendeten Organoalkoxysilane sind Abbildung 3-4 dargestellt. Zunächst werden die Verfahren für die Modifizierung mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan, *N*-2-(Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan sowie Ureidopropyltrimethoxysilan beschrieben, anschließend die Modifizierung mit Hexamethyldisilazan (HMDS).



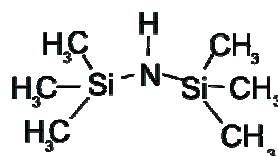
3-Aminopropyltrimethoxysilan



N-2(Aminoethyl)-3aminopropyltrimethoxysilan



Ureidopropyltrimethoxysilan



Hexamethyldisilazan (HMDS)

Abbildung 3-4: Strukturformeln der verwendeten Organoalkoxysilane.

Die Verfahren für die Umsetzung mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan, *N*-2-(Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan sowie Ureidopropyltrimethoxysilan sind identisch und werden am Beispiel des 3-Aminopropyltrimethoxysilan beschrieben. Die molaren Verhältnisse stimmen bei allen Ansätzen überein. Vor der Tauchbeschichtung werden die calcinierten Silica-Filme mit Ethanol und Aceton gereinigt. Zu einer Lösung aus 61.23 mL (1.005 mol) Ethanol, 3.74 mL (0.207 mol) destilliertem Wasser und 0.347 mL 37 %iger Salzsäure werden 3.672 mL (0.021 mol) 3-Aminopropyltrimethoxysilan getropft und 10 Minuten gerührt, bevor der Zylinder mit dem Synthesegel in den in Abbildung 3-1 gezeigten Exsikkator überführt wird. In diesem Synthesegel werden die calcinierten Silica-Filme 2 Minuten eingetaucht und anschließend mit einer Geschwindigkeit von ca. 2 mm/s herausgezogen. Analog zu der oben beschriebenen Tauchbeschichtung bleiben die Objektträger noch 5 Minuten im geschlossenen Exsikkator hängen, bevor sie bei 60 °C im Umluftofen über Nacht weiter getrocknet werden.

Im Falle des 3-Aminopropyltrimethoxysilan und des Ureidopropyltrimethoxysilan können die Silica-Filme auch durch 1 minütiges Eintauchen in eine 1 %ige Silanlösung in 95 %igem Ethanol modifiziert werden [JDCA98]. Die weitergehende Behandlung erfolgt analog der oben beschriebenen Funktionalisierung.

Die Modifizierung mit Hexamethyldisilazan ist angelehnt an eine Vorschrift von Jäger [Jäge97]. Zwei calcinierte Silica-Filme werden in einen Weithals-Rundkolben, der 100 mL Hexan und 3.1 mL Hexamethyldisilazan (HMDS) enthält, gelegt und 24 Stunden unter Argonatmosphäre unter Rückfluss erhitzt. Die modifizierten Silica-Filme werden aus der Lösung genommen und nicht umgesetztes HMDS wird durch das Erhitzen unter Rückfluss für eine weitere Stunde in 100 mL Hexan entfernt. Die Silica-Filme werden mit Hexan und Ethanol gespült und über Nacht bei 60 °C im Umluftofen getrocknet.

3.2 Charakterisierung nanostrukturierter Silica-Filme

3.2.1 Charakterisierung der mit nanostrukturierten Silica-Filmen beschichteten Standard-Glasobjekträgern

In Abbildung 3-5 ist das Infrarot-Spektrum eines as-synthesized (a) und eines calcinierten Silica-Filmes (b) wiedergegeben, der mit Octaethylenglycolmonododecylether ($C_{12}EO_8$) synthetisiert wurde. Der as-synthesized Film weist neben den charakteristischen Absorptionsbanden für $C_{12}EO_8$ auch solche für Silanolgruppen und das Silicagerüst auf.

Die breite Bande im Bereich von 3000 cm^{-1} bis 3700 cm^{-1} ist sowohl auf die (O–H)-Valenzschwingungen der Silanolgruppen als auch auf die (O–H)-Valenzschwingungen des Octaethylenglycolmonododecylether sowie möglicherweise auf gebundenes Wasser zurückzuführen. Aufgrund von Wasserstoffbrücken tritt eine starke Verbreiterung der Bande auf. Die (C–H)-Valenzschwingungen der organischen Komponente rufen Banden bei 2851 cm^{-1} und 2998 cm^{-1} hervor. Im *finger-print*-Bereich unterhalb 1500 cm^{-1} tritt eine Überlagerung der Absorptionsbanden des Tensids und des Silicagerüsts auf. Die breiten Absorptionen bei 1000 cm^{-1} und 1200 cm^{-1} werden sowohl von Schwingungen des Octaethylenglycolmonododecylether als auch von der unsymmetrischen (Si–O–Si)-Valenzschwingung verursacht. Die Banden der (Si–OH)-Valenzschwingung und der (Si–OH)-Deformationschwingung der Silanolgruppen liegen bei 950 cm^{-1} und 790 cm^{-1} , wobei auch charakteristische Schwingungen des $C_{12}EO_8$ in diesem Bereich liegen. Die sym-

metrische *out-of-phase*-(Si-O-Si)-Valenzschwingung ruft eine Bande bei 800 cm^{-1} und die entsprechende *in-phase*-(Si-O-Si)-Valenzschwingung eine schwache Bande bei 500 cm^{-1} hervor. Die Absorption bei 450 cm^{-1} entspricht der (Si-O-Si)-Deformationsschwingung. Bei den calcinierten Silica-Filmen treten lediglich drei Banden auf, die eindeutig von den (Si-O-Si)-Gerüstschwingungen verursacht werden (Abb. 3-5b). Charakteristische Schwingungen von Silanolgruppen sind nicht zu erkennen. Die Absorptionsbande der unsymmetrischen *in-phase*-(Si-O-Si)-Valenzschwingung ist bei 1100 cm^{-1} gut zu erkennen. Die Schulter bei 1200 cm^{-1} wird von der unsymmetrischen *out-of-phase*-(Si-O-Si)-Valenzschwingung hervorgerufen. Die Absorption bei 800 cm^{-1} ist auf die symmetrische (Si-O-Si)-Valenzschwingung zurückzuführen. Bei 470 cm^{-1} tritt schließlich die (Si-O-Si)-Deformationsschwingung auf. Durch eine zweistündige Calcination bei 415 °C wird das Tensid somit vollständig entfernt.

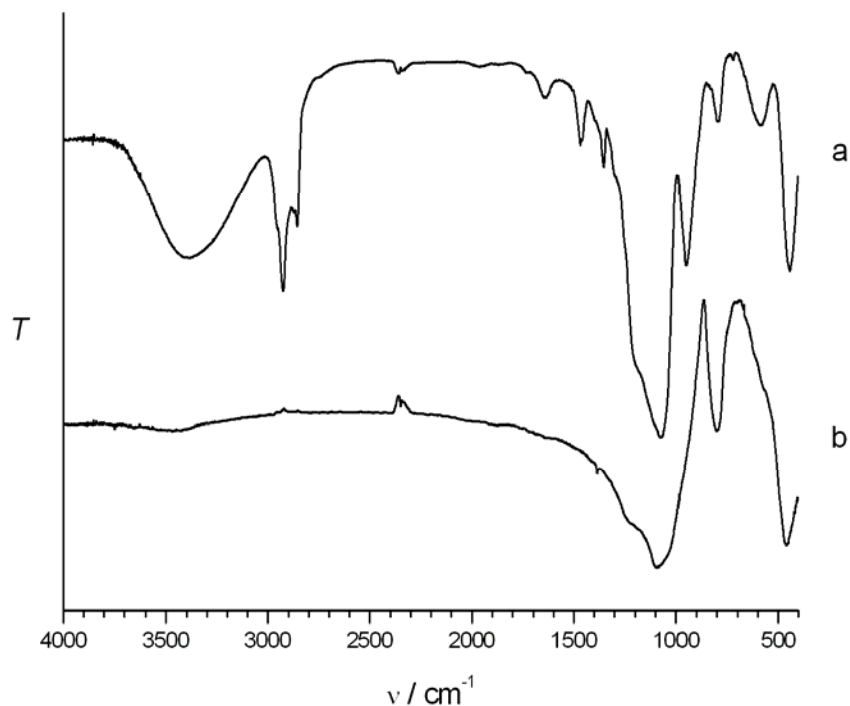


Abbildung 3-5: Infrarot-Spektren eines Silica-Filmes, der unter Verwendung von C_{12}EO_8 als strukturdirigierendes Agens synthetisiert wurde. (a) vor und (b) nach der Calcination.

Die Infrarot-Spektren der Filme, die mit Pluronic®P123, Pluronic®P103 oder Pluronic®F127 synthetisiert wurden, zeigen ein ähnliches Verhalten. In Abbildung 3-6 sind stellvertretend die Spektren eines Filmes vor und nach der Calcination gezeigt, der unter Verwendung von Pluronic®P103 dargestellt wurde. Vor der Calcination weisen die Filme neben den charakteristischen Absorptionsbanden für das Tensid auch solche für das Silica-Gerüst und die Silanolgruppen auf, während nach der Calcination lediglich drei Banden vorliegen, die von den (Si-O-Si)-Gerüstschwingungen verursacht werden.

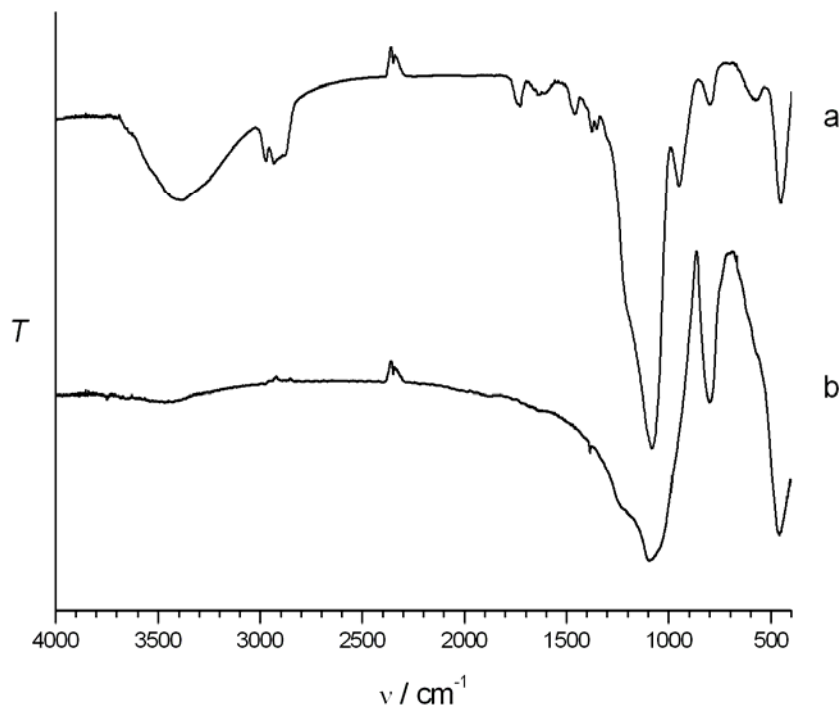


Abbildung 3-6: Infrarot-Spektren eines Silica-Filmes, der unter Verwendung von Pluronic®P103 hergestellt wurde, vor (a) und nach der Calcination (b).

Die Röntgendiffraktogramme der as-synthesized und calcinierten Silica-Filme, die mit C_{12}EO_8 als SDA synthetisiert wurden, weisen mehrere Reflexe im Bereich zwischen 1 und 10 $^\circ 2\theta$ auf (Abb. 3-7). Durch die Diffraktogramme wird klar, dass hier eine hochgeordnete Nanostrukturierung vorliegen muss. Ein Vergleich mit den Beugungsmustern anderer bekannter Nanostrukturen zeigt Ähnlichkeiten mit dem von Sato et al. [SHAG04] vorgestellten Beugungsmustern, die dieser als

zweidimensionale orthorhombische Struktur indizieren konnte. Sato et al. interpretieren aus diesem Beugungsmuster, dass elliptisch geformte Kanäle eine wohlgeordnete Anordnung ausbilden, bei der alle Kanäle parallel zu der Oberfläche liegen. Für die in dieser Doktorarbeit synthetisierten Proben ergeben sich Gitterparameter von $a = 4.15$ und $b = 6.98$ nm. Die Calcination bei 415 °C verursacht eine Verschiebung der Reflexe zu größeren Winkeln, was eine Verkleinerung der Gitterparameter auf $a = 2.88$ und $b = 4.99$ mit sich bringt. Die Kontraktion der Nanostruktur wird der Kondensation der Silanolgruppen zugeschrieben, die in den Poren von dem Tensid umgeben waren.

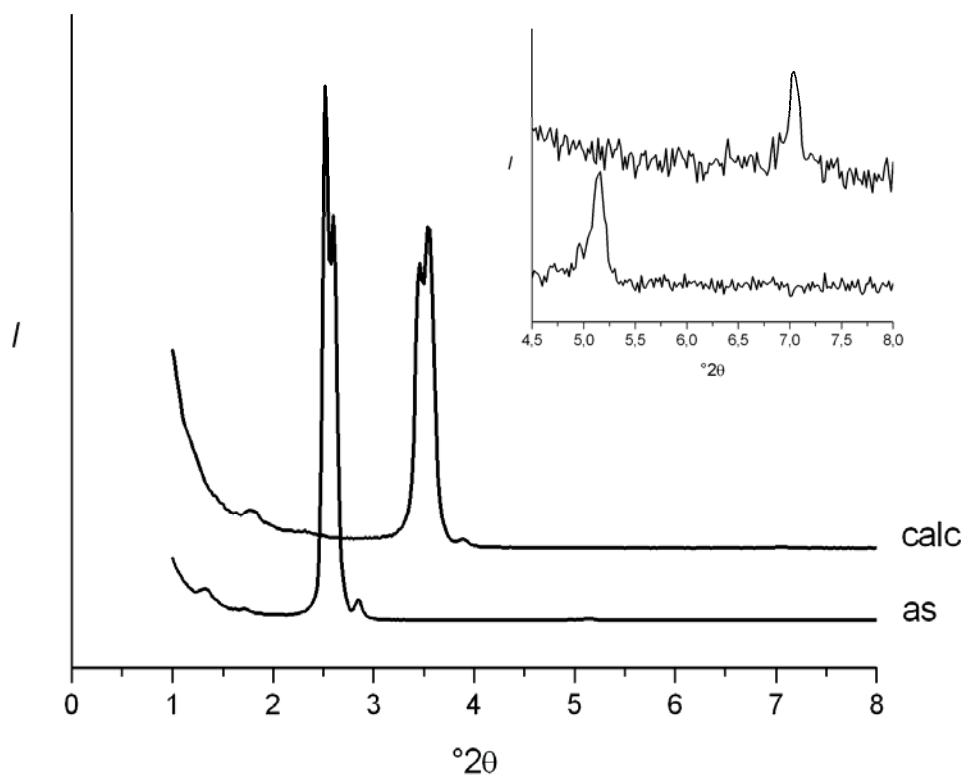


Abbildung 3-7: Röntgendiffraktogramme eines as-synthesized (as) und eines calcinierten (calc) Silica-Filmes, der unter Verwendung von $C_{12}EO_8$ synthetisiert wurde.

Abbildung 3-8 zeigt die Röntgendiffraktogramme der Silica-Filme, die unter Verwendung der Triblockcopolymeren Pluronic®P123, Pluronic®P103 sowie Pluronic®F127 hergestellt wurden. Im Gegensatz zu den oben diskutierten Diffraktogrammen tritt hier jeweils nur ein breiter Reflex auf. Das Fehlen weiterer Reflexe und die Breite des Reflexes schließen das Vorhandensein einer hoch geordneten Nanostrukturierung aus. Vermutlich liegt eine „nicht geordnete Anordnung“ von runden Kanälen vor, die alle einen ähnlichen Durchmesser besitzen. In dieser als „wurmartig“ (*worm-like*) oder „Makkaroni-ähnlich“ beschriebenen Anordnung weisen die Kanäle keine bevorzugte Orientierung auf. Der d -Wert des Reflexes kann als nominaler Abstand zwischen den Kanälen angesehen werden. Diese Annahme wird durch den Vergleich mit den Röntgendiffraktogrammen der MSU-Materialien [BPP95] [PP97] bekräftigt, die aus unregelmäßig angeordneten, „wurmartigen“ Kanälen aufgebaut werden. Der einzelne Beugungsreflex wird von dem durchschnittlichen Abstand zwischen den Poren des ungeordneten Wurmloch-Gerüsts hervorgerufen; seine Breite verdeutlicht die fehlende kristallographische Fernordnung [BLS01]. Im Falle der Silica-Filme, die mit Pluronic®P123 hergestellt wurden, beträgt der d -Wert des as-synthesized Filmes 8.0 nm und der des calcinierten 5.7 nm. Die korrespondierenden Werte für die mit Pluronic® F127 synthetisierten Filme liegen bei 8 nm vor und 7 nm nach der Calcination. Das Diffraktogramm eines Filmes, der unter Verwendung von Pluronic®P103 dargestellt wurde, zeigt ebenfalls die zu erwartende Verschiebung des Reflexes zu größeren Winkeln. Der d -Wert verringert sich um 1 nm von 13 nm auf 12 nm. Eine Übersicht der erzielten d -Werte ist in Tabelle 3-2 gegeben.

Erwartungsgemäß treten in den Diffraktogrammen der Silica-Filme, die ohne ein strukturdirigierendes Agens hergestellt wurden, keine Reflexe auf. Daraus lässt sich folgern, dass keine Strukturierung vorliegt und dass die Filme röntgenamorph sind.

Tabelle 3-2: Aus den Röntgendiffraktogrammen der as-synthesized und der calcinierten Silica-Filme ermittelte Daten in nm.

	C ₁₂ EO ₈	P123	P103	F127	ohne SDA
as-synthesized	$a = 4.15$ $b = 6.98$	$d = 8.0$	$d = 13$	$d = 8$	-
calciniert	$a = 2.88$ $b = 4.99$	$d = 5.7$	$d = 12$	$d = 7$	-

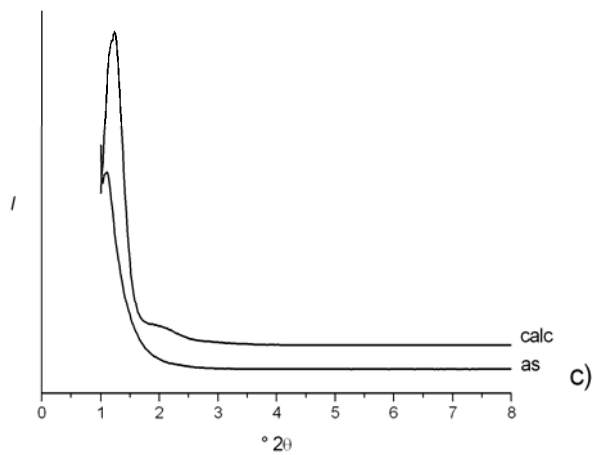
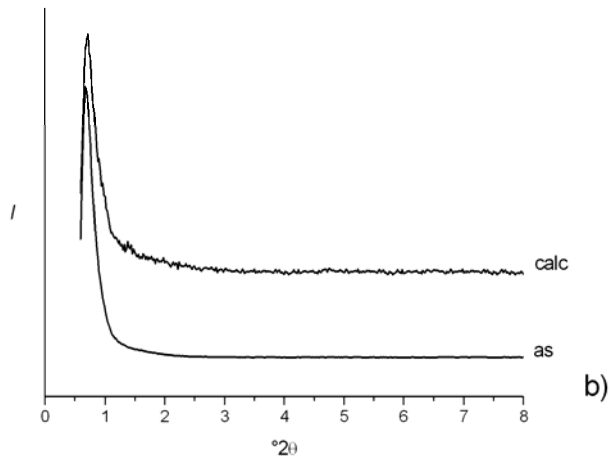
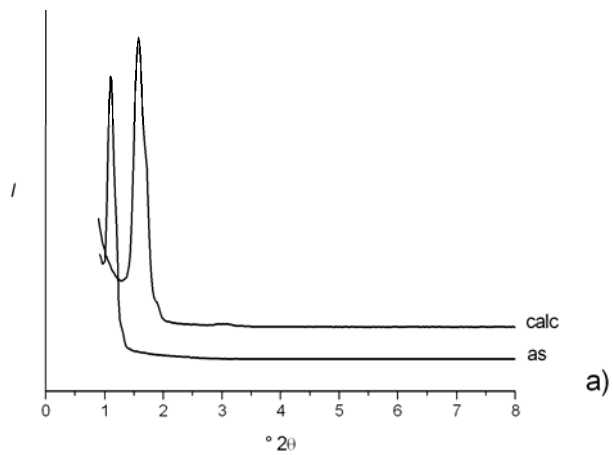


Abbildung 3-8: Röntgendiffraktogramme der as-synthesized (as) und calcinierten (calc) Silica-Filme, die unter Verwendung von Pluronic[®]P123 (a), Pluronic[®]P103 (b) bzw. Pluronic[®]F127 (c) hergestellt wurden.

Ein Diffraktogramm der Silica-Filme, die mit $C_{12}EO_8$ als SDA und unter Zugabe von 3 mL Mesitylen synthetisiert wurden, ist in Abbildung 3-9 dargestellt. Im Vergleich zu den Filmen, die kein Mesitylen in ihrem Synthesegel enthielten, zeigt sich eine geringe Porenvergrößerung.

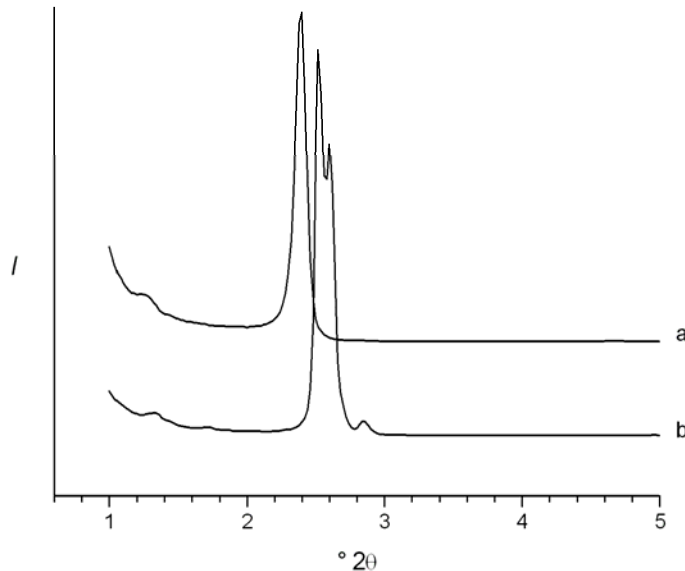


Abbildung 3-9: Röntgendiffraktogramm eines as-synthesized Silica-Filmes, der unter Verwendung von Octaethylglycolmonododecylether unter Zugabe von Mesitylen synthetisiert wurde, im Vergleich zu einem Film der ohne Mesitylen hergestellt wurde.

Eine wichtige Methode, die unmittelbar Aufschlüsse über die Oberflächentopologie der Proben liefern kann, ist die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung am hochauflösenden Feldemissionselektronenmikroskop. Dazu wurde jeweils ein kleines Stück aus dem beschichteten Objektträger heraus gebrochen und mit einer leitfähigen Paste auf einen Probenträger geklebt.

In Abbildung 3-10 sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines calcinierten Silica-Filmes dargestellt, der unter Verwendung von Pluronic[®]P123 als SDA synthetisiert wurde. Die Aufnahme zeigt deutlich den Rand des Filmes. Die daraus ermittelte Dicke des Filmes beträgt ca. 300 nm. Einen Eindruck über die Porenanordnung auf der Oberfläche wird in Abbildung 3-10 rechts vermittelt. Für diese Aufnahmen wurde ein Teil des Silica-Filmes vom Objektträger abgekratzt und auf

einem Graphitblock verteilt. Die dunklen Porenmünder der Kanäle sind nicht gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt, treten aber häufiger in Gruppen auf. An diesen Bereichen kann zwischen Poren ein Abstand von 5 – 7 nm ausgemacht werden. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Röntgenbeugungsmessungen, bei denen ein nominaler Porenabstand von 5.7 nm ermittelt wurde.

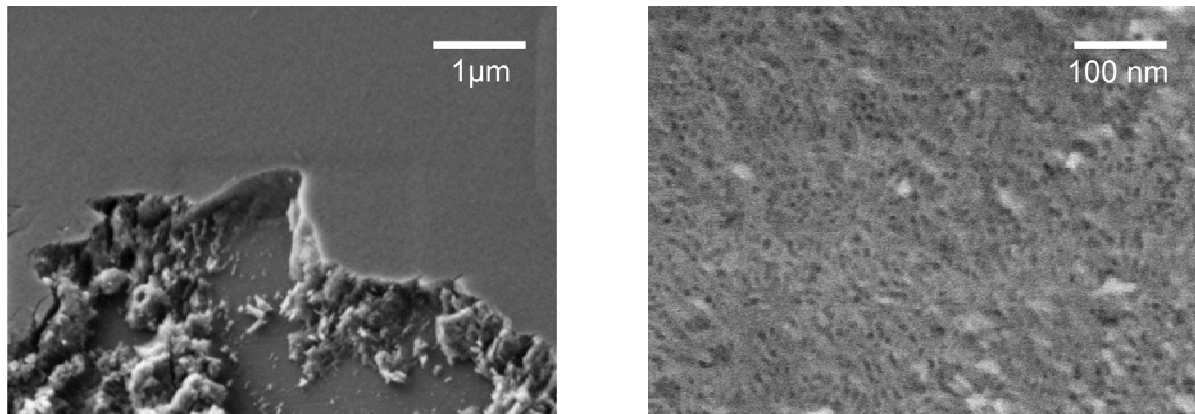


Abbildung 3-10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines calcinierten Filmes, der mit Pluronic®P123 hergestellt wurde. Links: Bruchkante, die die Filmdicke zum Vorschein bringt. Rechts: Sichtbare Poren auf der Filmoberfläche.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Filme, die unter Verwendung von den Triblockcopolymeren Pluronic®P103 sowie Pluronic®F127 hergestellt wurden, weisen ebenfalls diese Porenmünder auf. Repräsentative Aufnahmen sind in Abbildung 3-11 gezeigt. Aus diesen Bildern entnommene Werte stimmen wiederum mit denen aus den Röntgendiffraktogrammen überein. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigen somit die Interpretationen der Beugungsuntersuchungen. Es wird deutlich, dass die Struktur der oben diskutierten Silica-Filme aus annähernd gleichgroßen Kanälen aufgebaut ist, die aber keine Vorzugsorientierung untereinander und auch nicht zum Substrat aufweisen. Nur so aber finden sich Porenmünder dann auch an der Oberfläche des Filmes und können das Zellverhalten beeinflussen. Eine Ähnlichkeit mit dem MSU-Strukturtyp kann festgestellt werden [BPP95] [PP97]. In Abbildung 3-12 ist ein Schema der möglichen Anordnung wiedergegeben.

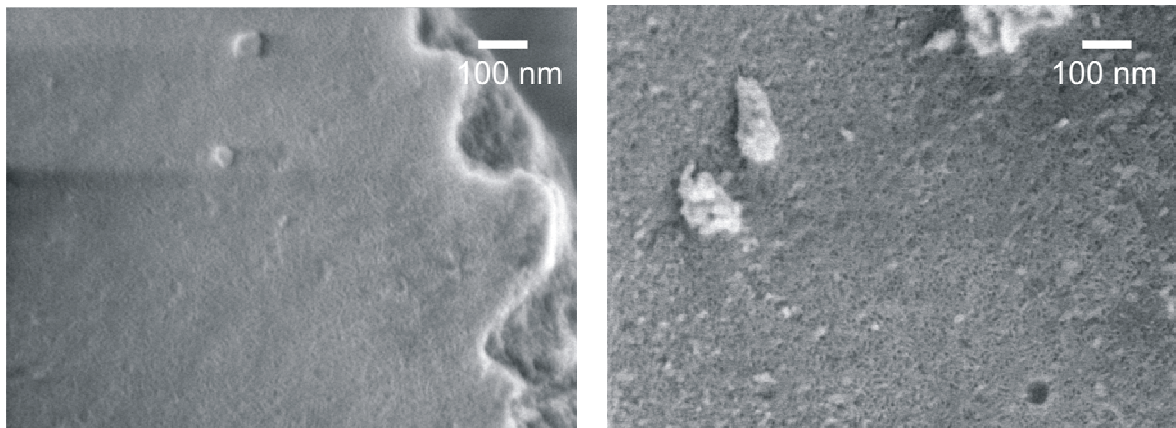


Abbildung 3-11: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen calcinierter Filme, die unter Verwendung von Pluronic® P103 (links), bzw. Pluronic® F127 (rechts) hergestellt wurden.

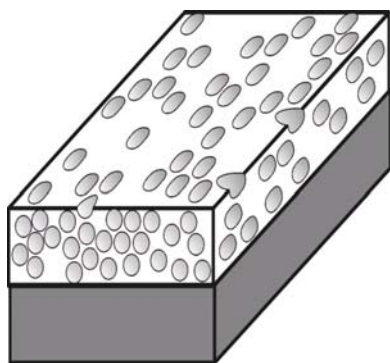


Abbildung 3-12: Schema einer möglichen Anordnung der Kanäle in einem Silica-Film, der unter Verwendung von eines Pluronic®-Tensides synthetisiert wurde.

Im Gegensatz dazu zeigen die calcinierten Filme, die mit Hilfe von $C_{12}EO_8$ als strukturdirigierendes Agens synthetisiert wurden, andere charakteristische Merkmale auf (Abb. 3-13). Die Oberfläche dieser Silica-Filme scheint relativ glatt zu sein, was mit der Interpretation der Diffraktogramme im Einklang steht. Die Diffraktogramme weisen auf eine hochgeordnete Porenstruktur hin, bei der die Kanäle parallel zu der Substratoberfläche verlaufen; dementsprechend sollten in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Filmoberfläche keine Porenöffnungen sichtbar sein. Ein Schema einer möglichen Anordnung der Kanäle ist in Abbildung 3-14 wiedergegeben.

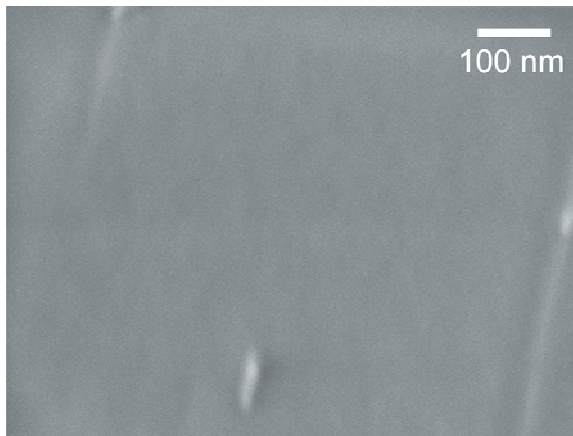


Abbildung 3-13: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines calcinierten Silica-Filmes, der mit $C_{12}EO_8$ als strukturdirigierendes Agens synthetisiert wurde.

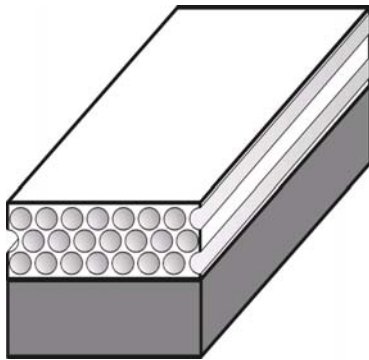


Abbildung 3-14: Schema einer möglichen Anordnung der Kanäle in einem Silica-Film, der unter Verwendung von $C_{12}EO_8$ als SDA hergestellt wurde.

Neben der Strukturierung im Nanometerbereich spielt auch die Oberflächenbeschaffenheit im Mikrometerbereich eine große Rolle. Inhomogene Beschichtungen oder Risse vermindern die Qualität und machen die Filme für weitere *in-vitro* Untersuchungen in Hinblick auf ihre Biokompatibilität unbrauchbar. Die Beschichtung des Trägermaterials muss gleichmäßig und ohne weitere Störungen möglich sein. Eine Voraussetzung dafür ist, dass der Silica-Film vollständig auf der Oberfläche des Trägermaterials haftet. Feine Glassplitter, die beim Kürzen des Objektträgers und beim Abschmirlen der Ecken entstanden sind, wurden daher vorsichtig entfernt und die Objektträger – wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben – mit organischem Lösungsmittel gereinigt. Es zeigte sich, dass diese Vorbehandlung für eine relativ homogene Anheftung der Filme ausreicht.

Während sich in der Mitte des Objektträgers keine Inhomogenitäten abzeichnen, ist dies an den Rändern und an der Grenze zwischen beschichteten und nicht-beschichteten Glas der Fall. Die lichtmikroskopische Aufnahme dieser Grenzlinie zeigt die wellenartige Form, die senkrecht zur Ziehrichtung läuft (Abb. 3-15). Die Ränder und besonders der untere Rand scheinen deutlich dicker zu sein, da sich dort beim Trocknen der Filme die Reaktionsmischung ansammelt und einen „Wall“ ausbildet. Musolf führte diese beiden Phänomene auf ein ungleichmäßiges Abperlen der Reaktionsmischung beim Herausziehen des Objektträgers aus dem Synthesegel zurück [Muso04]. Ein Vorschlag für die Verbesserung des Abperlverhaltens ist das Anätzen der Glasoberfläche mit konzentrierter Base oder Fluorwasserstoffsäure.

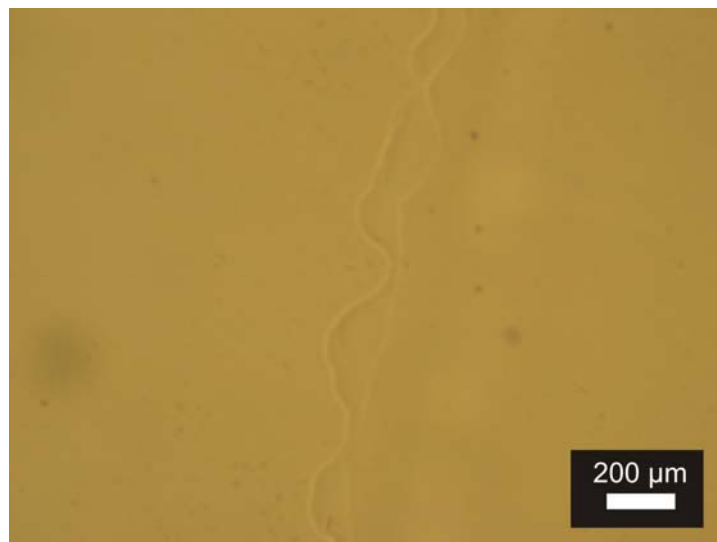


Abbildung 3-15: Lichtmikroskopische Aufnahme der wellenförmigen Grenzlinie zwischen dem Silica-Filme (linker Rand) und dem unbeschichteten Objektträger (rechter Rand). Die Ziehrichtung des Objektträgers verlief bei dieser Beschichtung von links nach rechts.

Manche Filme weisen auch Versätze senkrecht zur Ziehrichtung auf, die von einer ungleichmäßigen Ziehgeschwindigkeit verursacht werden können. Besonders deutlich ist der Versatz bei den Filmen zu erkennen, die bewusst mit unterschiedlichen Ziehgeschwindigkeiten oder ruckartigen Bewegungen aus dem Synthesegel gezogen wurden. Das Herausziehen der Objektträger mit einer konstanten Geschwindigkeit konnte das Auftreten solcher Versätze verringern, aber nicht vollständig verhindern. Hierzu wäre ein automatisiertes Herausziehen beispielsweise mittels eines Schrittmotors nötig [Muso04]

Vor der Calcination zeigen die Silica-Filme keine Rissbildung. Erst durch die thermische Behandlung bildeten sich in einigen Fällen – vor allem an den Rändern und Versätzen – Risse aus (Abb. 3-16). Es zeigte sich, dass sich die Calcinationstemperatur auf die Häufigkeit der Rissbildung auswirkte. Die Silica-Filme, die zwei Stunden bei 450°C calciniert wurden, weisen im Vergleich zu denen, die bei 415°C behandelt wurden, deutlich mehr Risse auf.

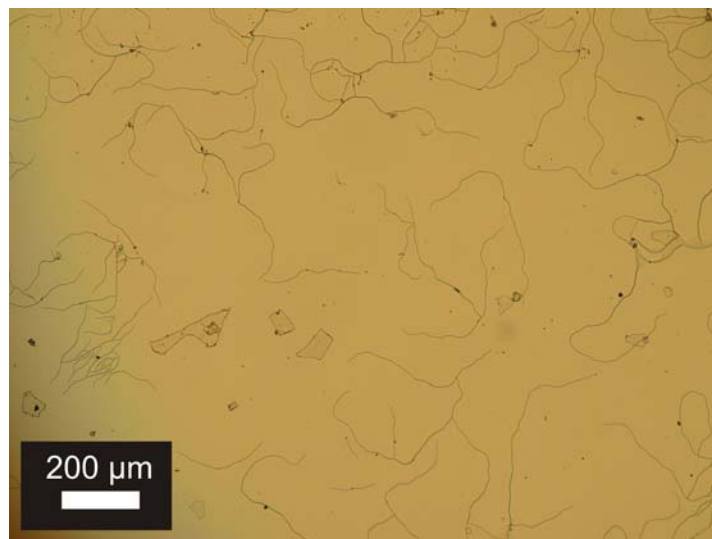


Abbildung 3-16: Lichtmikroskopische Aufnahmen eines Silica-Filmes nach der Calcination bei 450°C.

Um für die weiteren Untersuchungen qualitativ hochwertigere Beschichtungen zu erzielen, wurden die Tenside bei 415 °C entfernt. Speziell für die Untersuchungen in *simulated body fluid* (siehe Kapitel 4) und in der Zellbiologie (siehe Kapitel 5) ist es von großer Bedeutung, dass die Silica-Filme keine Inhomogenitäten oder Risse aufweisen. Diese Störungen können zum einen zusätzlichen Einfluss auf die Biokompatibilität ausüben und zum anderen die Reproduzierbarkeit der Versuche beeinträchtigen.

3.2.2 Charakterisierung der mit nanoporösen Silica beschichteten Bioverit® II-Proben

In Abbildung 3-17 ist das Röntgendiffraktogramm eines unbehandelten Bioverit®II-Plättchen dargestellt. Im Bereich größerer Winkel zeigt es mehrere Reflexe, die charakteristisch für eine Glimmer-Glaskeramik bestehend aus SiO_2 , Al_2O_3 , MgO , Na_2O , K_2O , F , P_2O_5 und CaO sind. Auf eine Zuordnung der Reflexe zu kristallinen Phasen wurde verzichtet. Entscheidend ist, dass im Bereich kleiner Winkel nur ein Beugungsreflex bei $8.9^\circ 2\theta$ auftritt, der für die weiteren Untersuchungen als Bezugspunkt dient.

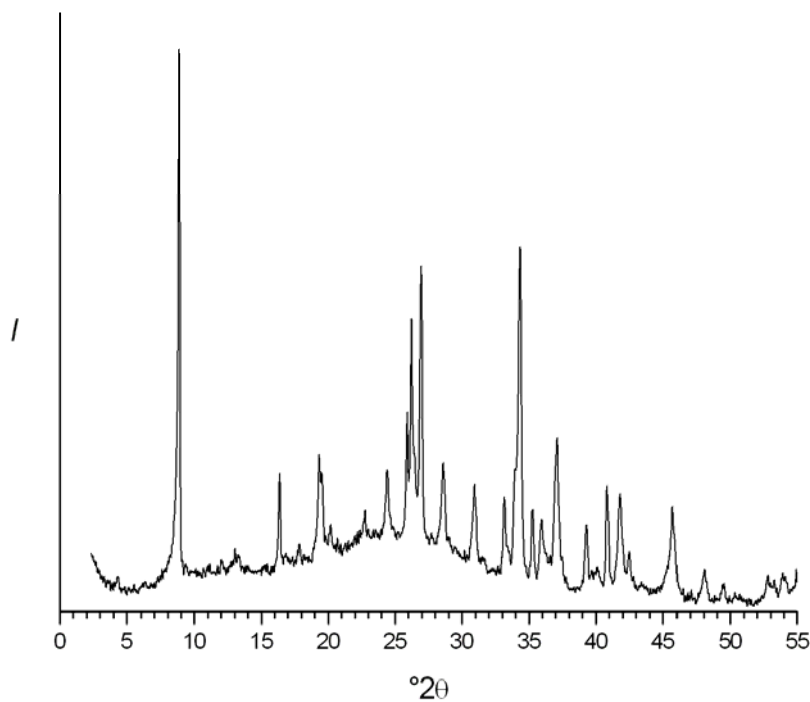


Abbildung 3-17: Röntgendiffraktogramm eines unbehandelten Bioverit®II-Plättchens.

Die Diffraktogramme der Proben, die unter Verwendung der amphiphilen Triblock-copolymere Pluronic®P123 oder Pluronic®P103 beschichtet wurden, zeigen nur einen relativ breiten Reflex, der auf eine ungeordnete Anordnung der Kanäle hindeutet (Abb. 3-18). In allen Diffraktogrammen wird ein schwacher Beugungsreflex bei $8.9^\circ 2\theta$ beobachtet, der von dem Bioverit®II hervorgerufen wird. Ein Vergleich mit den Diffraktogrammen der Silica-Filme, die auf Standard-Glasobjektträgern aufgebracht wurden, zeigt keine signifikanten Unterschiede.

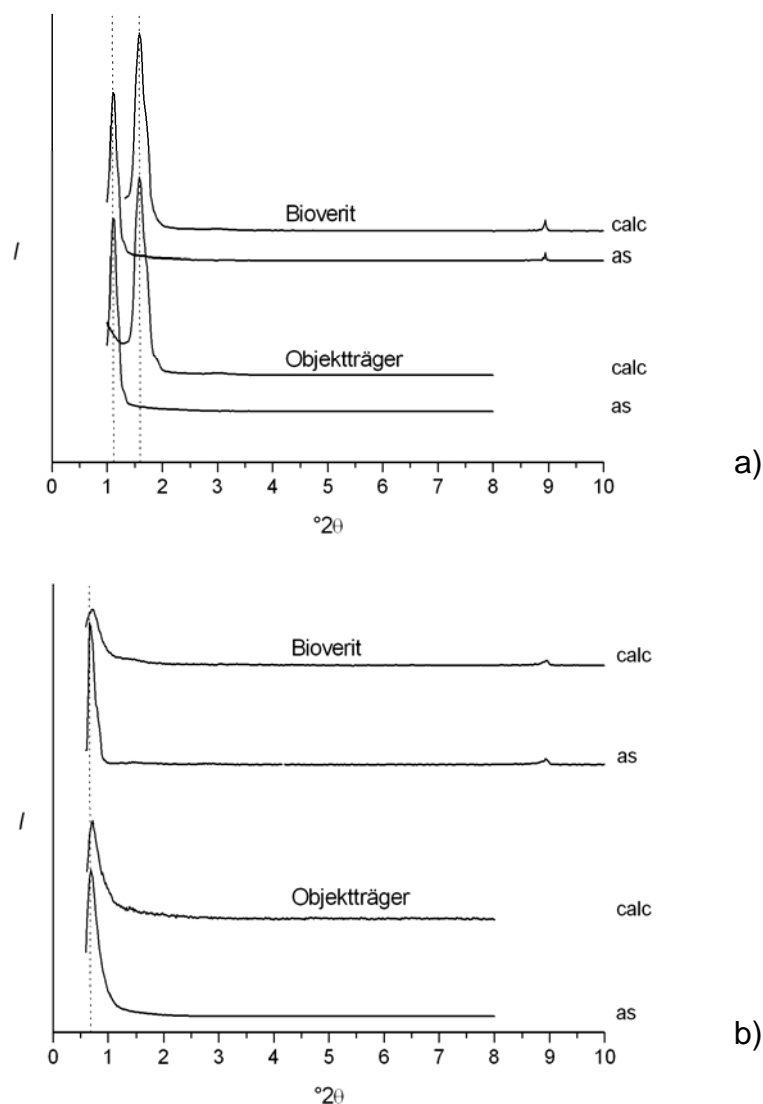


Abbildung 3-18: Röntgendiffraktogramme der mit Silica-Filmen beschichteten Bioverit®II-Plättchen im Vergleich zu beschichtete Objektträgern, die unter Verwendung von a) Pluronic®P123 bzw. b) Pluronic®P103 als strukturdirigierendem Agens hergestellt wurden. As: as-synthesized; calc: calciniert.

Es wird somit davon ausgegangen, dass die in Kapitel 3.2.1 diskutierten Ergebnisse auf diese beschichteten Bioverit®II-Plättchen übertragen werden können.

Für rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen* werden aus den Bioverit®II-Plättchen kleine Stücke heraus gebrochen, auf einen mit einer leitfähigen Unterlage aus Graphit versehenen Probenträger geklebt und mit Gold bedampft. Die Aufnahmen einer unbehandelten und einer beschichteten Bioverit®II-Probe sind in Abbildung 3-19 gegenübergestellt. Ein signifikanter Unterschied ist nicht auszumachen, was bei dieser Vergrößerung allerdings nicht verwundert: Wie die Aufnahmen von beschichteten Standard-Glasobjektträgern am hochauflösenden Feldemissionselektronenmikroskop in Abbildung 3-10 gezeigt haben, weisen die Silica-Filme eine Dicke von nur ungefähr 300 nm auf.

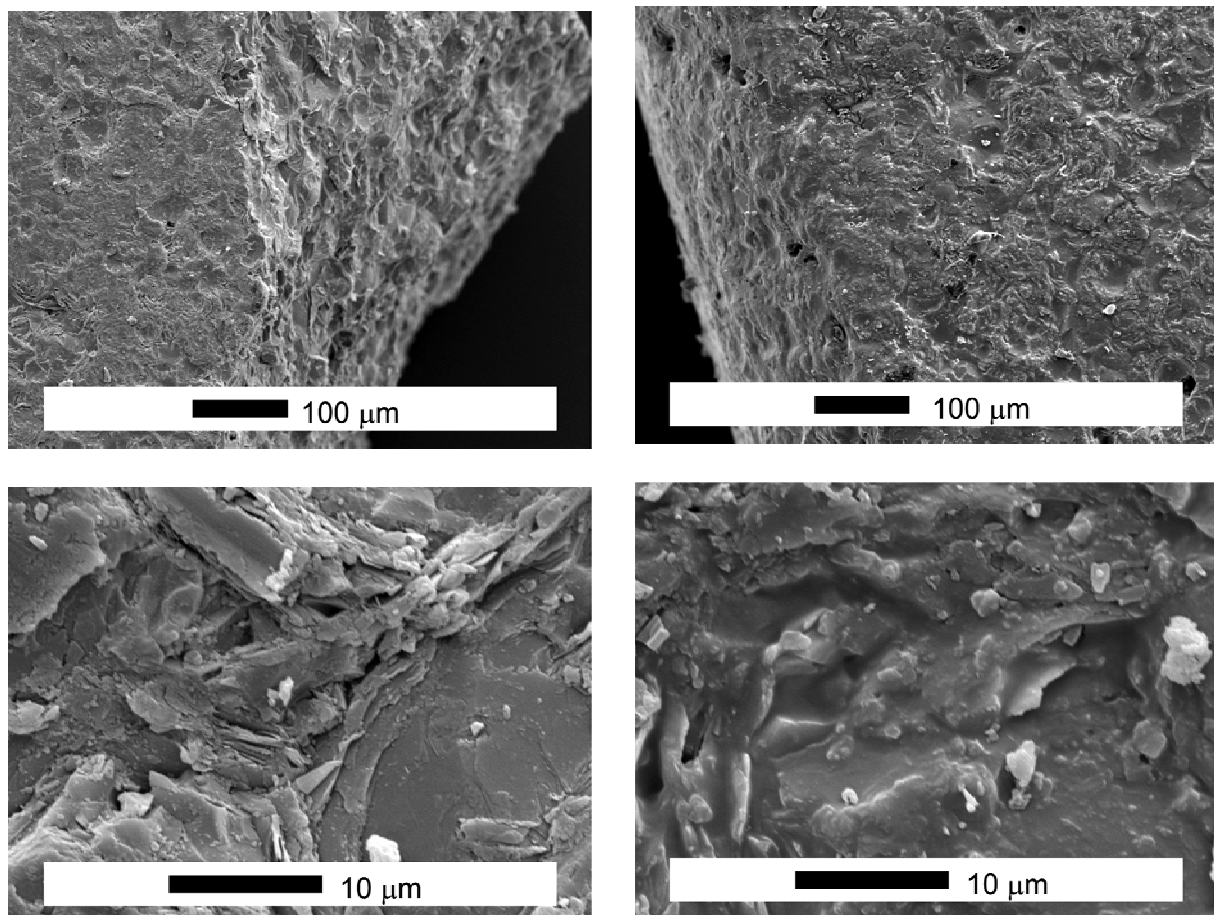


Abbildung 3-19: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines unbehandelten (rechts) und eines beschichteten Bioverit®II-Plättchens (links).

* Die Aufnahmen wurden am Rasterelektronenmikroskop des Typs XL30 der Firma *Philipps* gemacht.

3.2.3 Charakterisierung der modifizierten Silica-Filme

In diesem Kapitel werden zunächst die Ergebnisse der Infrarot-Spektroskopie vorgestellt, die an den calcinierten Silica-Filme erhalten wurden, die mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan, *N*-2-(Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan bzw. mit Ureidopropyltrimethoxysilan funktionalisiert wurden; anschließend werden die Ergebnisse der mit Hexamethyldisilazan (HMDS) modifizierten Silica-Filme erläutert. Die Erkenntnisse aus den Röntgenbeugungsuntersuchungen werden abschließend dargelegt.

Einen Hinweis auf die erfolgreiche Modifizierung der Silica-Oberfläche liefern infrarotspektroskopische Untersuchungen. In Abbildung 3-20 sind die mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan, *N*-2-(Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan sowie mit Ureidopropyltrimethoxysilan funktionalisierten Silica-Filme im Vergleich zu einem calcinierten Silica-Film dargestellt. Die Werte für ausgewählte Absorptionsbanden sind in Tabelle 3-3 aufgeführt.

Der calcinierte Silica-Film weist vor der Modifizierung lediglich drei Banden bei 1100 cm^{-1} , 800 cm^{-1} und 470 cm^{-1} auf, die von der asymmetrischen *in-phase*-, der symmetrischen (Si–O–Si)-Valenzschwingung und der (Si–O–Si)-Deformationschwingung hervorgerufen werden. Die Schulter bei 1200 cm^{-1} wird der unsymmetrische *out-of-phase*-(Si–O–Si)-Valenzschwingung zugeordnet. Die modifizierten Filme zeigen weitere charakteristische Banden der jeweiligen funktionellen Gruppen. In allen Spektren der modifizierten Silica-Filme sind die Banden der asymmetrischen und symmetrischen (C–H)-Valenzschwingung im Bereich zwischen 3000 cm^{-1} und 2800 cm^{-1} sowie die der (C–H)-Deformationschwingung bei ungefähr 1480 cm^{-1} deutlich zu erkennen. Die (Si–C)-Deformationschwingung zeigt sich bei 1410 cm^{-1} als Schulter. Die Bande bei 1580 cm^{-1} wird von der (N–H)-Deformationsschwingung verursacht und ist ein weiterer Hinweis auf die erfolgreiche Umsetzung mit den Organoalkylsilanen. Die Schultern bei 1639 cm^{-1} bzw. 1635 cm^{-1} deuten bei der Umsetzung mit *N*-2-(Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan bzw. 3-Aminopropyltrimethoxysilan auf eine Reaktion der NH_2 -Gruppe mit dem Kohlenstoffdioxid des Wasser unter Bildung eines $\text{NH}_3^+\text{HCO}_3^-$ -Salzes hin [CIK84]. Nach Culler et al. weisen die Spektren dieser Salze mehrere

Banden im Bereich von $3400\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$, eine Schulter bei 1640 cm^{-1} sowie starke Banden bei 1575 cm^{-1} und 1480 cm^{-1} auf [CIK84]. Im Spektrum des mit Ureidopropyltrimethoxysilan modifizierten Silica-Filmes wird die Absorption bei 1653 cm^{-1} von der Amid I-(C=O)-Valenzschwingung der Amidgruppe hervorgerufen.

Auf eine erfolgreiche Umsetzung der Silanolgruppen mit HMDS kann aufgrund der (Si-C)-Schwingungen der Trimethylsilylgruppe bei $850\text{ bzw. }755\text{ cm}^{-1}$ sowie der (C-H)-Valenzschwingungen bei ungefähr 2900 cm^{-1} geschlossen werden (Abb.3-21). Ein Vergleich mit den Spektren von Jäger [Jäge97] zeigt eine gute Übereinstimmung bei der Lage der Banden.

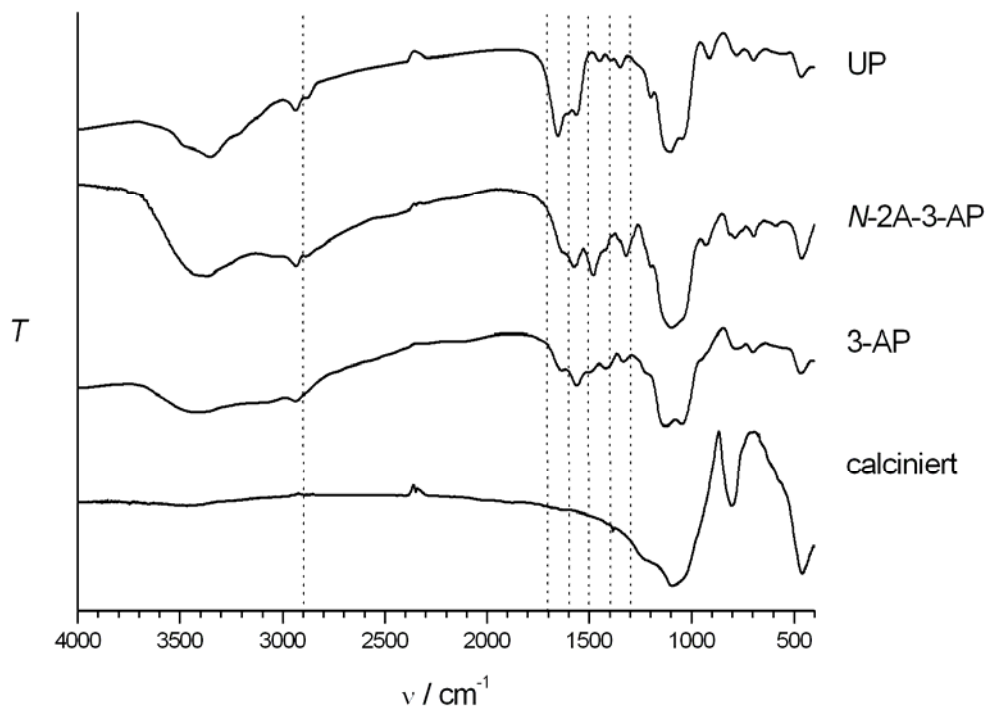


Abbildung 3-20: Infrarot-Spektren der mit Ureidopropyltrimethoxysilan (UP), *N*-2-(Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan (*N*-2A-3-AP) sowie mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan (3-AP) funktionalisierten Silica-Filme im Vergleich zu einem calcinierten Silica-Film (calciniert).

Tabelle 3-3: Ausgewählte Absorptionsbanden der mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan (3-AP), *N*-2-(Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan (*N*-2A-3-AP) sowie mit Ureidopropyltrimethoxysilan (UP) funktionalisierten Silica-Filme im Vergleich zu Literaturdaten.

[DBBK97]	[Jäge97]				
N-2A-3-AP	N-2A-3-AP	N-2A-3-AP	3-AP	UP	Schwingungs-
ν / cm^{-1}	ν / cm^{-1}	ν / cm^{-1}	ν / cm^{-1}	ν / cm^{-1}	typ
2944	2959	2934	2934	2937	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$
2886	2895	2887	2889	2890	$\nu_{\text{s}}(\text{C-H})$
~2832	-	-	-	-	$\nu_{\text{s}}(-\text{OCH}_3)$
~1584	1578	1575	1558	1563	$\delta(\text{N-H})$
1478	1482	1478	1489	1448	$\delta(\text{C-H})$
1410	1411	1419	-	1394	$\delta(\text{Si-CH}_3)$

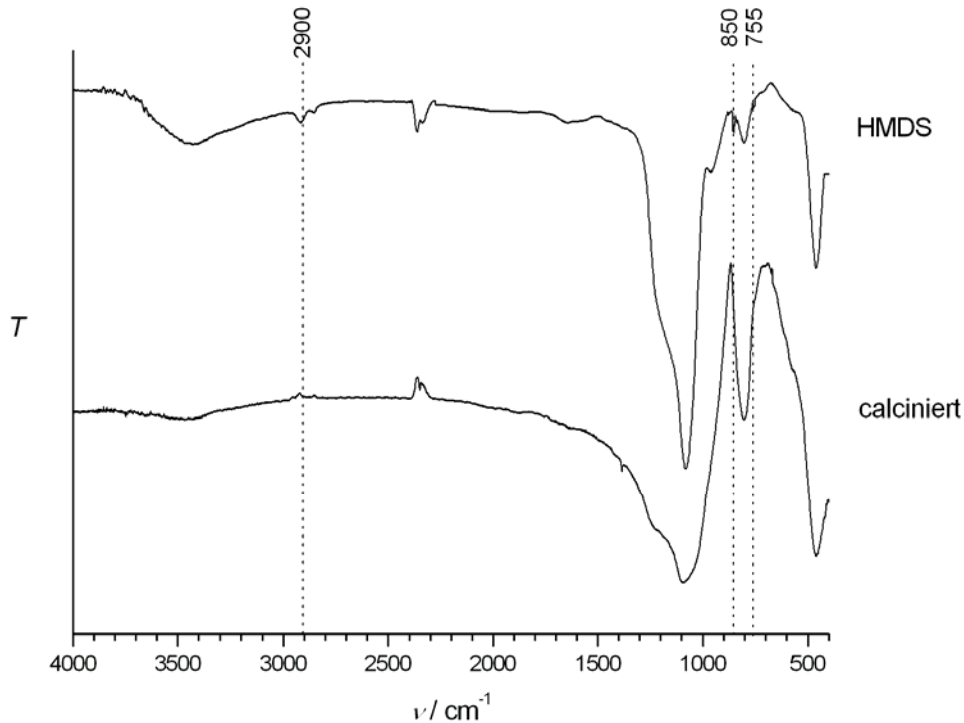


Abbildung 3-21: Infrarot-Spektren eines mit Hexamethyldisilazan funktionalisierten Silica-Filmes (HMDS) im Vergleich zu einem calcinierten Silica-Film (calciniert).

Die Röntgendiffraktogramme der calcinierten Silica-Filme zeigen vor und nach der Modifizierung keine signifikanten Unterschiede, wie in Abbildung 3-22 deutlich zu erkennen ist. Die geringen Abweichungen liegen im Rahmen der Messgenauigkeit. Sowohl die Breite als auch die Lage der Reflexe bleiben annähernd konstant, und folglich auch der charakteristische d -Wert dieser „MSU-ähnlichen“ Kanalstruktur (siehe Kapitel 3.2.1)[BPP95] [PP97]. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass bei der Umsetzung mit diesen Organoalkoxysilanen lediglich der Porenradius verkleinert wird.

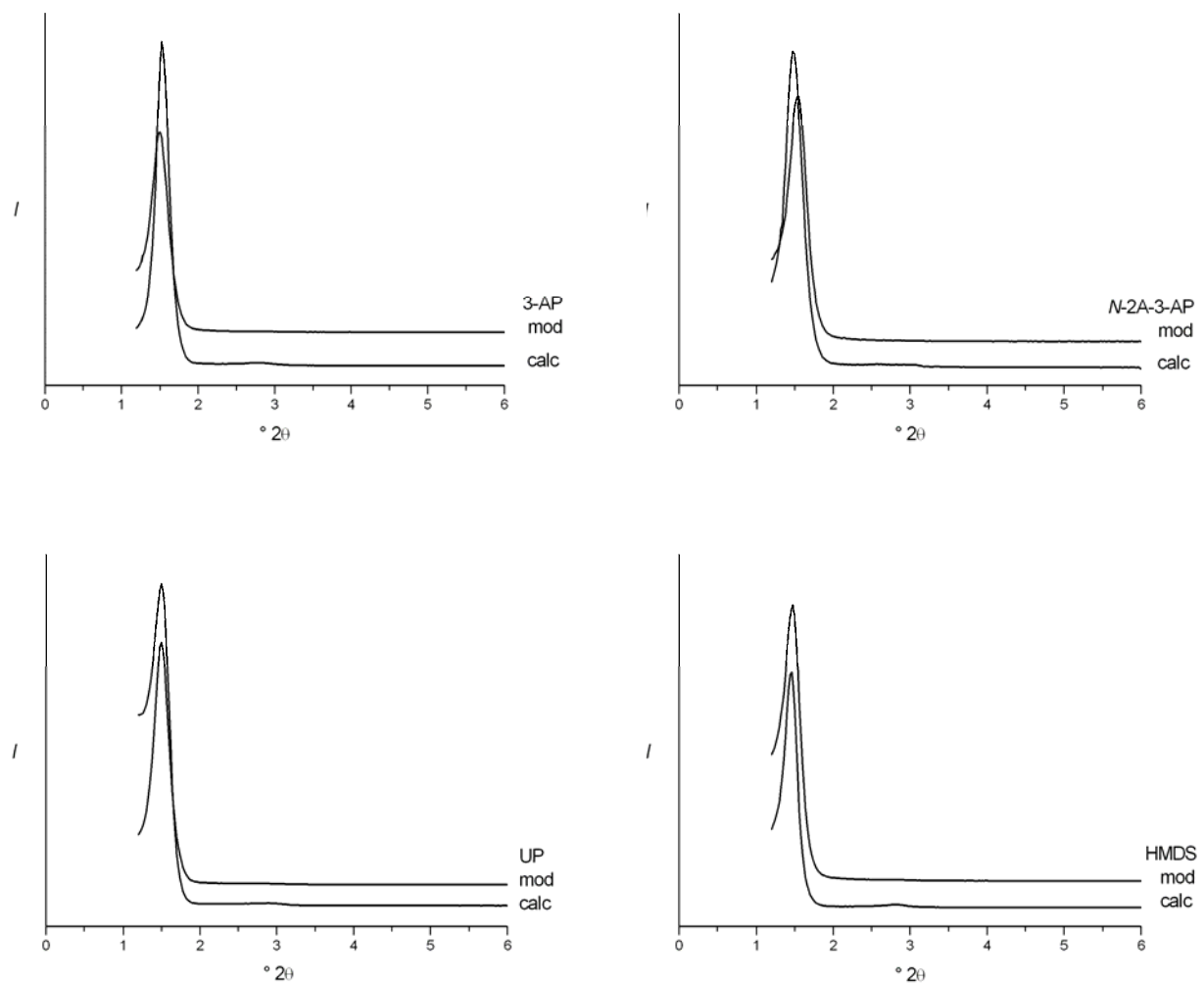


Abbildung 3-22: Röntgendiffraktogramme der calcinierten Silica-Filme vor (calc) und nach (mod) der Modifizierung mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan (3-AP), N-2-(Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan (N-2A-3-AP), Ureidopropyltrimethoxysilan (UP) bzw. Hexamethyldisilazan (HMDS).

4 Untersuchungen zur *in-vitro*-Bioaktivität von nanoporösen Silica-Filmen

In diesem Kapitel wird zunächst das experimentelle Vorgehen bei der Untersuchung von nanoporösen Silica-Filmen in *simulated body fluid* (SBF) erläutert. Anschließend wird die Charakterisierung der Silica-Filme nach der Behandlung in SBF vorgestellt und diskutiert. Die Synthese und die strukturanalytische Charakterisierung der verwendeten nanoporösen Silica-Filme, die auf Standard-Glasobjektträger aufgebracht wurden, sind in Kapitel 3.1.1 und 3.2.1 beschrieben.

4.1 Experimentelles Vorgehen

Die Herstellung der *simulated body fluid* (SBF) erfolgt nach einer Vorschrift von Kokubo et al. [KKSK90], bei der NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₄, MgCl₂, CaCl₂ und Na₂SO₄ in der genannten Reihenfolge in destilliertem Wasser gelöst werden. Die Ionenkonzentrationen der SBF im Vergleich zu den Konzentrationen im humanen Blutplasma sind in Tabelle 4-1 aufgeführt. Der physiologische pH-Wert von 7.4 wird bei 37 °C mit Tris(hydroxymethyl)aminomethan ((CH₂OH)₃CNH₂) und 1 M Salzsäure eingestellt. Für die Untersuchung zur *in-vitro*-Bioaktivität werden nanoporöse, d. h.

Tabelle 4-1: Ionenkonzentrationen von *simulated body fluid* (SBF) und humanen Blutplasma (aus [LOKN92]).

	Ionenkonzentration (mM/L)							
	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₃ ²⁻	SO ₄ ²⁻
SBF	142.0	5.0	2.5	1.5	147.8	4.2	1.0	0.5
Blutplasma	142.0	5.0	2.5	1.5	103.0	27.0	1.0	0.5

calcinierte Silica-Filme, die durch Tauchbeschichtung auf Standard-Glasobjektträger aufgebracht wurden, für verschiedene Zeiträume jeweils bei 37° C in 25 mL SBF gelagert. Nach 7, 14 oder 21 Tagen werden die Filme aus der Lösung genommen, mit destilliertem Wasser abgespült und an der Luft getrocknet.

4.2 Strukturanalytische Charakterisierung der mit nanoporösem Silica beschichteten Glasobjektträger

Bereits bei der Betrachtung mit dem bloßen Auge kann auf den beschichteten Glasobjektträgern, die 7 Tage in SBF gelagert wurden, ein dünner hellbrauner Überzug beobachtet werden. Einen ersten Eindruck über diesen Bewuchs gibt die lichtmikroskopische Aufnahme in Abbildung 4-1. Die Oberfläche der in SBF gelagerten Silica-Filme wird mittels Infrarot-Spektroskopie und Röntgen-diffraktometrie strukturanalytisch charakterisiert. Die Infrarot-Spektren werden mit einem Spektrometer des Typs *Tensor 27* der Firma *BRUKER* gemessen. Die Röntgendiffraktogramme werden am *STOE-StadiP*-Diffraktometer mit θ/θ -Geometrie aufgenommen, wobei die Silica-Filme flach auf einem Probenhalter liegen und in Reflexion gemessen werden. Einen Einblick in die Morphologie liefern die Aufnahmen am Rasterelektronenmikroskop des Typs *XL30* der Firma *Philips*.

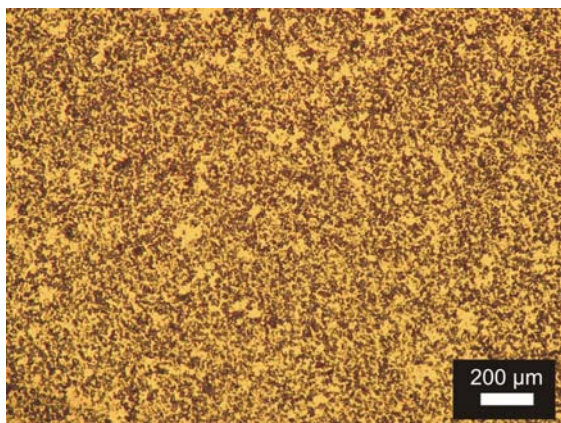


Abbildung 4-1: Lichtmikroskopische Aufnahme eines nanoporösen Silica-Filmes, der unter Verwendung von Pluronic®P123 synthetisiert wurde, nach 7-tägiger Lagerung in *simulated body fluid* (SBF).

In Abbildung 4-2 sind die Infrarot-Spektren der Silica-Filme nach verschiedenen langen Lagerungszeiten in SBF gegenüber gestellt. Nach siebentägiger Behandlung in SBF sind die charakteristischen Absorptionsbanden des Hydroxylapatits deutlich neben denen des (Si-O-Si)-Gerüsts zu beobachten. Die Absorptionsbanden bei 795 cm^{-1} und 477 cm^{-1} werden von der symmetrischen (Si-O-Si)-Valenzschwingung bzw. der (Si-O-Si)-Deformationsschwingung hervorgerufen. Neben der starken $\nu_3(\text{P-O})$ -Valenzschwingung bei 1035 cm^{-1} zeigt sich bei 962 cm^{-1} eine Schulter, die der totalsymmetrischen $\nu_1(\text{P-O})$ -Valenzschwingung zugeordnet werden kann. Die Banden der antisymmetrischen $\nu_4(\text{P-O})$ -Valenzschwingung liegen bei 603 cm^{-1} und 564 cm^{-1} . Diese Aufspaltung deutet auf die Ausbildung eines nanokristallinen Hydroxylapatits [Pete01]. Das Vorliegen der Carbonat-Absorptionen bei 1460 cm^{-1} , 1423 cm^{-1} sowie 874 cm^{-1} lässt auf einen carbonathaltigen Hydroxylapatit schließen.

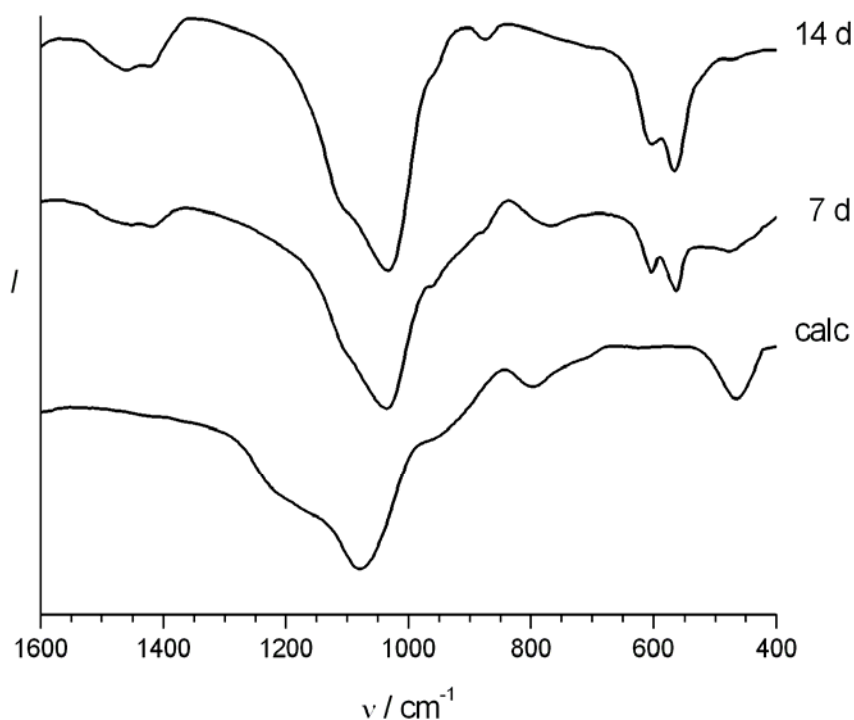


Abbildung 4-2: Infrarot-Spektren eines calcinierten Silica-Filmes vor und nach 7- bzw. 14-tägiger Aufbewahrung in *simulated body fluid*.

Bei einer Betrachtung der Intensitätsverhältnisse der Absorptionsbanden in Abhängigkeit von der Lagerungszeit in SBF ist ein leichter Intensitätsanstieg der (P–O)-Schwingungen und ein Intensitätsverlust der (Si–O–Si)-Gerüstschwingungen zu beobachten. Die Veränderung des Intensitätsverhältnisses kann mit der Zunahme der Hydroxylapatit-Schicht mit ansteigender Verweildauer in der SBF erklärt werden. Die Dicke – und somit auch die Menge an Hydroxylapatit – nimmt zu, während die Dicke des Silica-Filmes konstant ist. Das Intensitätsverhältnis verschiebt sich somit zu Gunsten der (P–O)-Schwingungen, die nach 21-tägiger SBF-Behandlung die (Si–O–Si)-Gerüstschwingungen nahezu vollständig überdecken.

Abbildung 4-3 zeigt die Röntgendiffraktogramme der Silica-Filme vor und nach der Behandlung in SBF für verschiedene Zeiträume. In der dargestellten $^{\circ}2\theta$ -Region weisen die calcinierten Silica-Filme eine sehr breite Intensitätserhebung im Bereich von 15 bis 35 $^{\circ}2\theta$ auf, die für amorphes Silica charakteristisch ist. Dieses Phänomen wird auch als „amorphous halo“ bezeichnet. Nach siebentägiger Lagerung in SBF erscheinen schwache Reflexe bei 25.8 und 32.2 $^{\circ}2\theta$. Mit steigender Aufbewahrungszeit nimmt die Intensität der Reflexe, die als (002)- und (211)-Reflexe einer apatit-ähnlichen Phase indiziert werden können, zu. Die Breite der Reflexe lässt auf einen nanokristallinen Apatit schließen. Auf eine Abschätzung der Kristallitgröße wird wegen des erhöhten Untergrundes durch den „amorphous halo“ verzichtet. Ein Vergleich mit einem Diffraktogramm eines humanen Knochens (Abb. 2-2, Kapitel 2.1.2) deutet darauf hin, dass die Abmessungen der hier gebildeten Apatitkristalle in der gleichen Größenordnung liegen.

Aus den Ergebnissen der Infrarot-Spektroskopie und der Röntgenbeugungsuntersuchungen wird klar, dass es sich bei dem gebildeten Oberflächenbewuchs um einen carbonathaltigen Hydroxylapatit handelt.

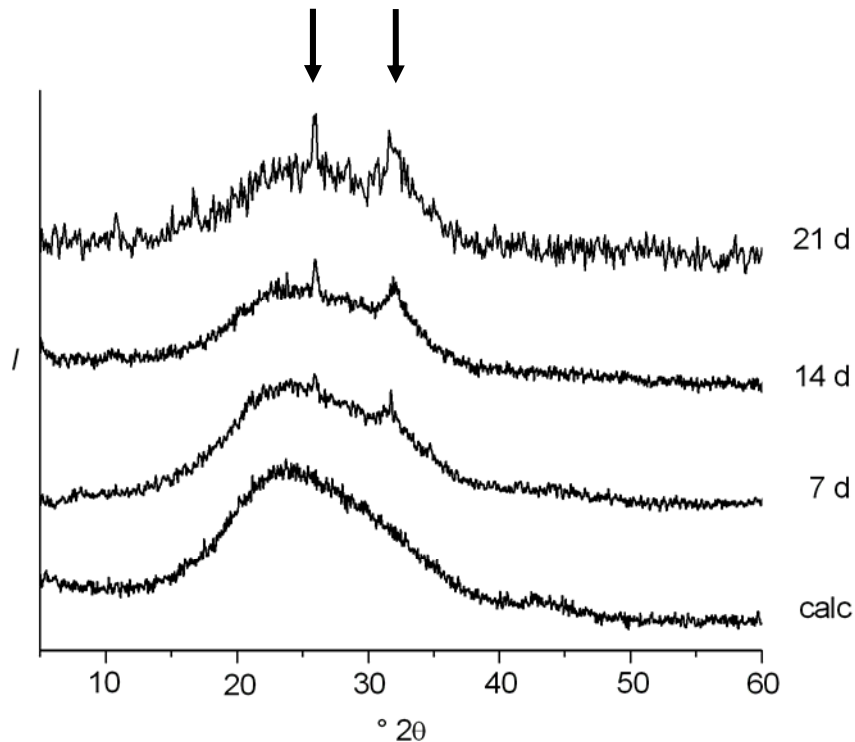


Abbildung 4-3: Röntgendiffraktogramme calcinierter Silica-Filme vor bzw. nach 7-, 14- und 21-tägiger Lagerung in *simulated body fluid*.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Silica-Filme, die verschiedene Zeiträume in *simulated body fluid* gelagert wurden, sind in Abbildung 4-4 gegenüber gestellt. Wie bereits die lichtmikroskopische Aufnahme (Abb. 4-1) gezeigt haben, hat sich nach 7-tägiger Lagerung in SBF auf allen untersuchten Silica-Filmen ein Oberflächenbewuchs gebildet. Eine charakteristische Morphologie kann nicht ausgemacht werden; es haben sich hauptsächlich unregelmäßig geformte Aggregate ausgebildet, die die Oberfläche noch nicht vollständig bedecken. Dagegen sind die Silica-Filme, die 14 Tage in SBF gelegen haben, mit zusammengewachsenen sphärischen Partikeln bedeckt. Die sphärischen Partikel auf den Filmen, die unter Verwendung von Pluronic[®]P123, Pluronic[®]P103 sowie Pluronic[®]F127 hergestellt wurden, erreichen einen Durchmesser von 1-5 μm . Wurde C_{12}EO_8 als SDA eingesetzt, zeigen die Silica-Filme nach 14 Tagen dagegen sphärische Partikel mit Durchmessern von 5-10 μm . Noch größere Partikel sind im Falle der unstrukturierten Filme zu beobachten. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen nach 21-tägiger Aufbewahrung in SBF zeigen, dass jeder Silica-Film vollständig mit Apatit überzogen ist.

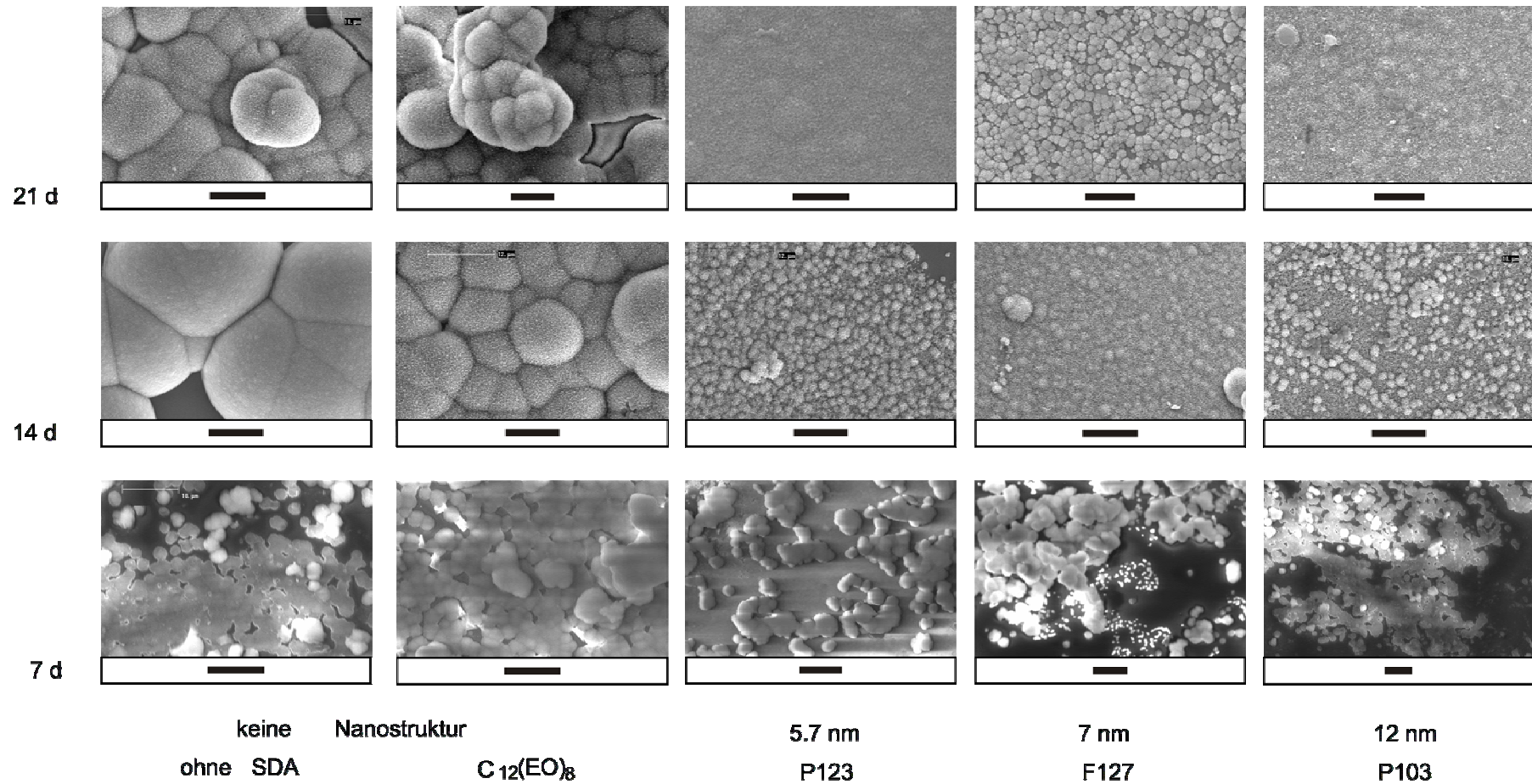


Abbildung 4-4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der calcinierten Silica-Filme, die 7 d, 14 d bzw. 21 d bei 37 °C in *simulated body fluid* aufbewahrt wurden. Der Skalierungsbalken beträgt jeweils 10 µm.

Die sphärischen Aggregate haben sich zu einer durchgehenden Schicht zusammengeschlossen.

In Abbildung 4-5 sind Ausschnitte der Morphologien bei höherer Vergrößerung dargestellt. Die sphärischen Partikel können als aus „plättchenartigen“ Teilchen zusammengesetzten beschrieben werden. Vergleichbar ist diese Morphologie mit dem Hydroxylapatit, der sich nach 14 Tagen Aufbewahrung in SBF auf Silica-Gel gebildet hat [LNKG93]. Kleine flockenartige Teilchen konstruieren in einer „blumenartigen“ Aggregation die Apatitkristalle. Eine ähnliche „blättchenartige“ (*leaf-like*) Morphologie weist die Apatitschicht auf, die auf einem Silica-Film mit geordneten, parallel zur Substratoberfläche verlaufenden Mesokanälen gebildet wird [GSTH01]. Mesostrukturierte Gläser mit einem dreidimensionalen „wurmartigen“ (*worm-like*) Porensystem zeigen eine vergleichbare stäbchenartige (*rod-like*) Morphologie [YYZT04].

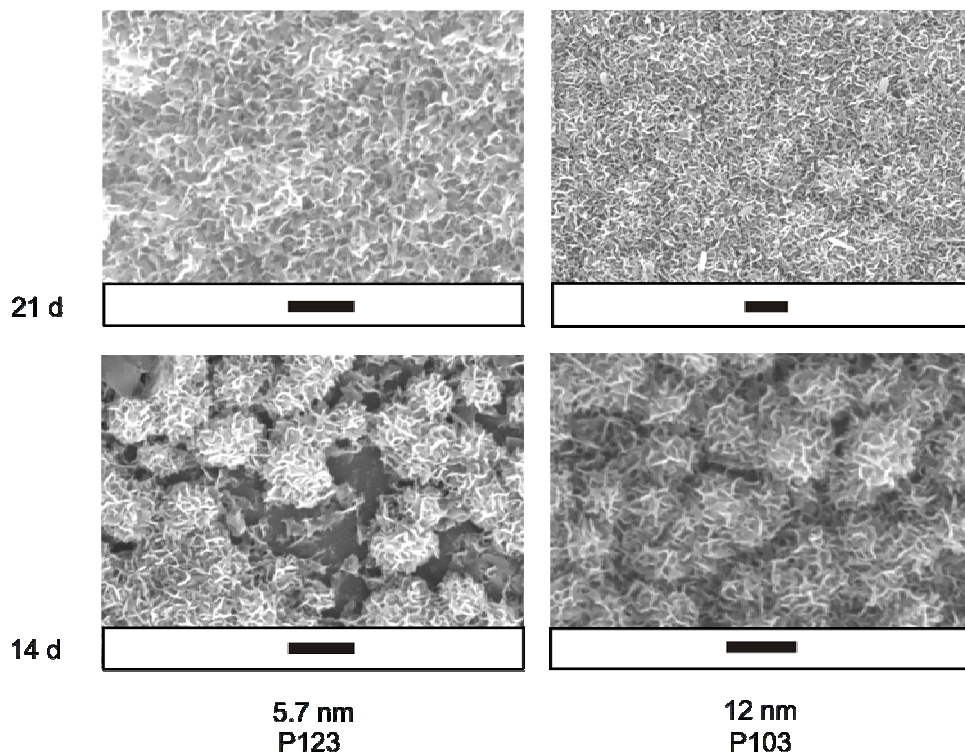


Abbildung 4-5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen calcinierter Silica-Filme, die unter Verwendung von Pluronic®P123 bzw. Pluronic®P103 hergestellt und 14 d bzw. 21 d in *simulated body fluid* aufbewahrt wurden. Der Skalierungsbalken beträgt jeweils 2 µm.

Bei einer zeitabhängigen – kinetischen – Betrachtung wird deutlich, dass weder das Vorhandensein einer Nanostrukturierung noch der unterschiedliche Porendurchmesser einen signifikanten Einfluss auf das *in-vitro* Verhalten von Silica in SBF haben. Die Bildung einer Apatitschicht ist bei allen Silica-Filmen unabhängig ihrer Nanostrukturierung im gleichen Zeitraum zu beobachten. Die *in-vitro* Bioaktivität des nanostrukturierten Silica ist sehr ähnlich mit der des unstrukturierten Silica, wie der Vergleich mit dem amorphen Silica-Film und dem mit C₁₂EO₈ synthetisierten zeigen. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Gomez-Vega et al., die bei ihren Untersuchungen von mesoporösen Silica-Filmen ebenfalls keinen Einfluss der Porengröße auf die Apatitkristallisationsgeschwindigkeit ausmachen konnten [GSTG01]. Dagegen stellten Pereira et al. fest, dass sowohl die Porengröße als auch das Porenvolumen einen großen Effekt auf die Bildungsgeschwindigkeit des Apatits haben und dass die Apatitbildung vermutlich in den Poren statt findet [PCH95] [PH96]. Diese Autoren untersuchten allerdings Sol-Gel-Silicas mit ungeordneter Porosität. Untersuchungen von Yan et al. zeigen, dass das Porensystem sowie die Porenstruktur die *in-vitro* Bioaktivität beeinflussen [YYZT04]. Bei annähernd gleicher Zusammensetzung, gleichem Porenvolumen sowie gleicher Porengröße zeigen die mesostrukturierten Gläser mit einer dreidimensionalen Porenstruktur eine stäbchenartige Morphologie, während auf hexagonal strukturierten Gläsern hauptsächlich Nanopartikel gebildet haben. Yang et al. schließen daraus, dass dreidimensionale Porensysteme den Transport von gelösten Ca²⁺-Ionen und (Si-O-Si)-Spezies ebenso wie die Ablagerung von Apatit möglicherweise erleichtern.

Die in dieser Arbeit untersuchten un- bzw. nanostrukturierten Silica-Filme zeigen zwar keinen Unterschied in der Apatitbildungsgeschwindigkeit, aber bei der Größe der gebildeten sphärischen Apatitpartikel. Während sich auf unstrukturierten Silica-Filmen relativ große Partikel bilden, zeigen die Filme, die eine Oberfläche mit unregelmäßig angeordneten Poren besitzen, eher kleinere sphärische Morphologien. Die Größe jener Apatitpartikel, die auf Silica-Filmen gebildet wurden, die unter Verwendung von C₁₂EO₈ synthetisiert wurden und die parallel zur Oberfläche verlaufende Kanäle besitzen, liegt dazwischen.

Die unterschiedlichen Partikelgrößen verdeutlichen einen Einfluss der Oberflächenstrukturierung auf die Morphologie des gebildeten Apatits. Die verschiedenen Nanostrukturen weisen unterschiedliche Anhäufungen der Silanolgruppen in den Bereichen der Porenmünder auf; möglicherweise dienen diese Bereiche als Kristallisationszentrum für den Apatit und beeinflussen somit dessen Morphologie. Dies stünde im Einklang mit den oben geschilderten Beobachtungen von Pereira et al. [PCH95] [PH96]. Die mittlere Silanolgruppendichte auf der Oberfläche ist nach der Calcination bei 415 °C bei den Silica-Filmen annähernd gleich und hat somit keinen Einfluss auf die gebildete Morphologie. Selbst nach einer Calcination bei 600 °C können die verbliebenen Silanolgruppen noch die Apatitkristallisation induzieren [CNKS95]. Ihnen wird eine wichtige Rolle bei Apatitbildung auf bioaktiven Materialien zugeschrieben [LOKNS92] [PCH95]. Eine Beziehung zwischen der Apatitbildungsgeschwindigkeit und der Anzahl der Silanolgruppen konnte bei den Untersuchungen von Gomes-Vega et al. ebenfalls nicht ausgemacht werden [GSTH01].

Die Untersuchungen in SBF verdeutlichen, dass die nanostrukturierten Silica-Filme eine hohe *in-vitro* Bioaktivität und somit gute Voraussetzung für Anwendungen in der Medizin besitzt. Die Morphologie der gebildeten Apatitschicht wird – im Gegensatz zu der Kristallisationsgeschwindigkeit – von dieser Nanostrukturierung beeinflusst. Dies stellt einen interessanten Aspekt für die *in-vivo*-Biokompatibilität dar, weil bekannt ist, dass die Resorptionsgeschwindigkeit von Calciumphosphat-Phasen durch Osteoklasten mit abnehmender Größe der Calciumphosphat-Partikel zunimmt [Epp03].

5 Der Einfluss von nanostrukturierten Silica-Materialien auf die Biomaterial-Zellinteraktionen

Mit den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten nanostrukturierten Silica-Filmen wurden grundlegende Untersuchungen zum Einfluss von Nanostrukturen im unteren Nanometerbereich (< 12 nm) auf die Zelladhäsion, das Zellwachstum und die Zellproliferation durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden durch Tauchbeschichtung dünne Filme von mesostrukturierten Silica auf Standard-Objektträger aufgebracht (siehe Kapitel 3.1.1 und Kapitel 3.2.1). Nach der strukturanalytischen Charakterisierung wurden die synthetisierten Silica-Filme im Hinblick auf ihre Biokompatibilität und –aktivität zellbiologisch untersucht. Die zellbiologischen Untersuchungen wurden von Frau F. Dimpfel und Herrn Dr. P. P. Müller an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig durchgeführt. Bei den Untersuchungen von Material-Gewebe-Interaktionen werden zwei Zelllinien eingesetzt: epithel-ähnliche Nierenkrebszellen der Linie HEK293 (human embryonic kidney carcinoma cell line 293) und murine mesenchymale Vorläuferzellen (BMP2-Zellen) der Linie C3H10T1/2 (Bindegewebszellen). Die humanen Nierenkrebszellen sind nicht von der Anheftung an Substrate abhängig, sodass toxische Effekte und die Adhärenz der Zellen getrennt untersucht werden können. Mesenchymale Vorläuferzellen können unter geeigneten Bedingungen in Knochen- oder Knorpelzellen differenzieren und sind somit im Hinblick auf die vorgesehene Anwendung in der rekonstruktiven Mittelohrchirurgie interessant. Ein Vorteil von Zelllinien besteht darin, dass sie in homogenen Kulturen vorliegen, gut charakterisiert sind sowie eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Resultate gewährleisten. Im Gegensatz dazu verändert sich das Verhalten von primären Zellen mit zunehmender Kultivierungsdauer.

Einen ersten guten Eindruck im Hinblick auf die Bioverträglichkeit von Materialien können lichtmikroskopische Aufnahmen vermitteln. Die Physiologie der Zellen gibt Auskunft über deren Interaktion mit der Oberfläche. Mit entsprechendem Aufwand können nicht nur qualitative, sondern auch reproduzierbare quantitative Resultate erhalten werden. Die Zellen werden hierfür von der Oberfläche abgelöst und mikroskopisch ausgezählt. Um auch auf den in limitierten Mengen verfügbaren

opaken Biomaterialien (Bioverit[®] II sowie CPG[®]) Beobachtungen durchführen zu können, wird ein Zellkulturmodell etabliert mit Zellen, die mit dem Gen für das fluoreszierende Protein eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) markiert wurden. Diese Methode erlaubt eine semiquantitative Aussage durch die mikroskopische Charakterisierung der lebenden Zellen auf einzelnen Proben zu verschiedenen Zeitpunkten. Diese werden so gewählt, dass einzelne Phasen der Material-Zellinteraktionen unterschieden werden können: die initiale Anheftung der Zellen, die Zellausbreitung und schließlich die Vermehrung der Zellen.

5.1 Untersuchungen zur Stabilität der nanoporösen Silica-Filme

Ein entscheidender Aspekt für die zellbiologischen Untersuchungen ist die Stabilität der nanoporösen Silica-Filme während der Sterilisation und unter Standard-Zellkulturbedingungen. Hierzu wurden nanoporöse Silica-Filme, die auf Glasobjektträger aufgebracht wurden, auf unterschiedliche Art sterilisiert und mittels Röntgendiffraktometrie strukturanalytisch charakterisiert. Die nanoporösen Filme zeigen nach einer Inkubation in Ethanol (5 Minuten in 70 %igen Ethanol bzw. 24 Stunden in 100 % Ethanol) oder einer Heißluft-Sterilisation (6 Stunden, 180 °C) keine signifikanten Veränderungen im Röntgendiffraktogramm (Abb. 5-1 (a), (b)). Dagegen wird beim Wasserdampf-Autoklavieren (20 Minuten, 130 °C, Wasserdampf) die Nanostruktur der Silica-Filme zerstört. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da bekannt ist, dass die Strukturierung unter hydrothermalen Bedingungen nicht stabil ist. Im Röntgendiffraktogramm ist dies am Verschwinden des Reflexes zu erkennen (Abb. 5-1c). Die Nanostruktur der Silica-Filme bleibt nach dreitägiger Inkubation unter Standard-Zellkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) erhalten, wie die Diffraktogramme in Abbildung 5-1 (d) und (e) verdeutlichen. Die Reflexintensitäten nehmen allerdings ab und eine leichte Reflexverbreiterung ist zu beobachten. Für diese Untersuchungen wurden die mit Silica beschichteten Glasobjektträger 5 Minuten in 70 %igem Ethanol inkubiert, mit PBS-Puffer gespült, in DMEM-Zellkulturmedium gegeben und 3 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Anwesenheit von fötalem Kälberserum (FCS) im Zellkulturmedium zeigt keine Auswirkungen auf das Röntgen-

diffraktogramm. In beiden Fällen treten ebenfalls eine Intensitätsabnahme und eine leichte Verbreiterung des Reflexes auf.

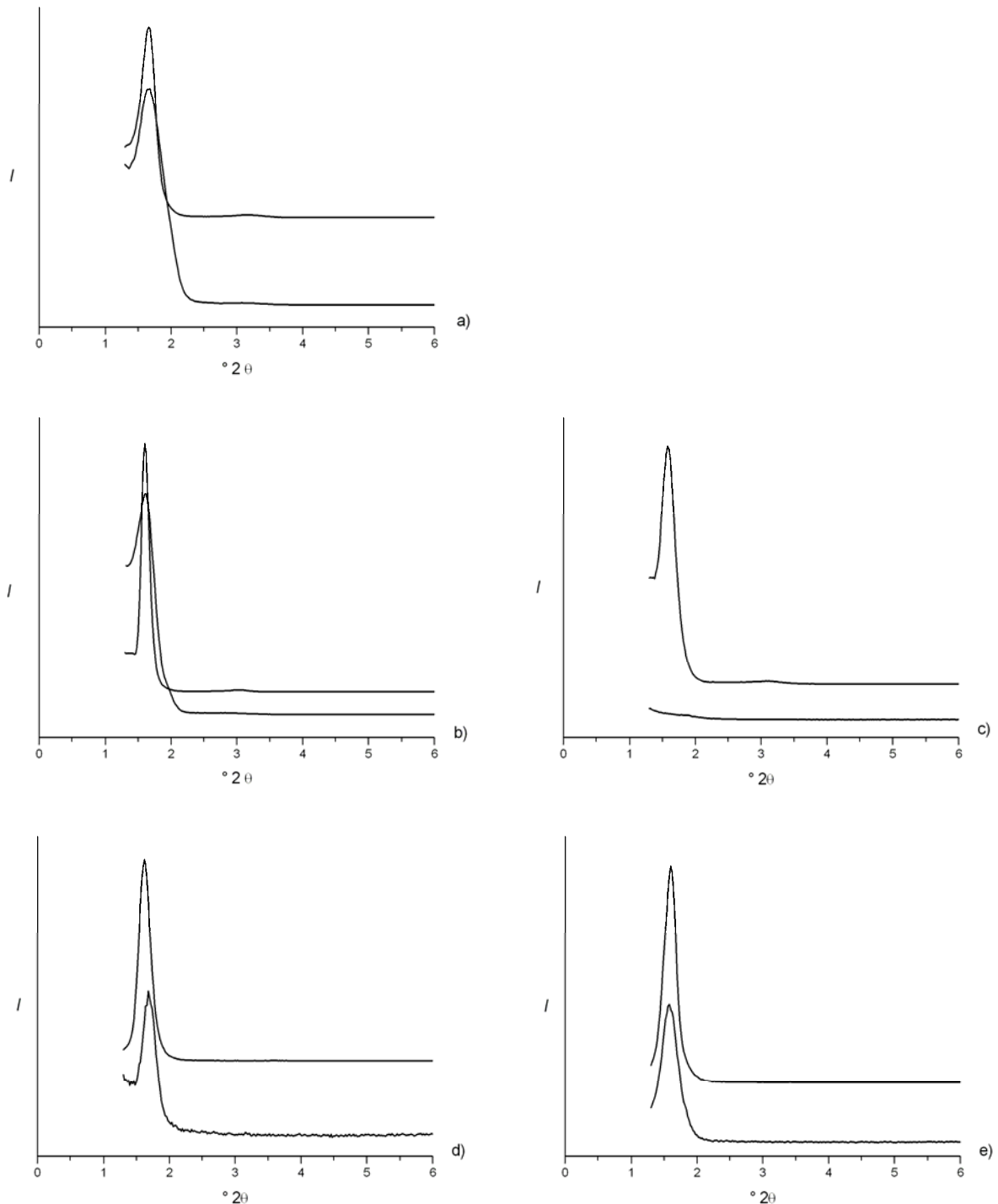


Abbildung 5-1: Röntgendiffraktogramme nanoporöser Silica-Filme jeweils vor (oben) und nach (unten) Anwendung verschiedener Sterilisationsmethoden (a-c) und nach der Inkubation unter Standard-Zellkulturbedingungen (d, e). (a) Inkubation in Ethanol (24 Stunden, 100 %iges Ethanol), (b) Heißluft-Sterilisation (6 Stunden, 180 °C), (c) Wasserdampf-Autoklavieren (20 Minuten, 130 °C Wasserdampf); Inkubation unter Standard-Zellkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) in DMEM-Zellkulturmedium mit (d) und ohne (e) fötalem Kälberserum (FCS).

5.2 Experimentelles Vorgehen

5.2.1 Qualitative Untersuchungen an mit Silica beschichteten Glasobjektträgern

Für die qualitativen Untersuchungen werden die Objektträger 24 Stunden in Ethanol aufbewahrt, mit PBS-Puffer gespült und in eine Petrischale mit DMEM-Zellkulturmedium gelegt. Die murinen mesenchymale Vorläuferzellen (BMP2-Zellen) der Linie C3H10T1/2 bzw. die epithel-ähnlichen Nierenkrebszellen der Linie HEK293 werden mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen auf dem jeweiligen Objektträger ausgesät. Nach 1 Stunde Inkubation wird die Petrischale mit vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgefüllt und 3 Tage unter Standard-Zellkulturbedingungen (37 °C , 5% CO_2) im Brutschrank inkubiert. Nach 1 Stunde, 3 Stunden, nach 1 Tag sowie nach 3 Tagen werden die Versuche lichtmikroskopisch dokumentiert.

5.2.2 Quantitative Untersuchungen an mit Silica beschichteten Glasobjektträgern

Die zu untersuchenden Objektträger werden 24 Stunden in Ethanol inkubiert, mit PBS-Puffer gespült und in eine rechteckige Zellkulturschale mit Deckel gelegt. Die C3H10T1/2-Zellen werden mit einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen auf dem jeweiligen Objektträger ausgesät. Nach einer Stunde Inkubation wird die gesamte Petrischale mit temperiertem Zellkulturmedium (DMEM, 1% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS und $750\text{ }\mu\text{g/mL}$ G418) aufgefüllt und unter Standard-Zellkulturbedingungen (37 °C , 5% CO_2) im Brutschrank inkubiert. Nach 3 Tagen wird das Medium vollständig entfernt und die Objektträger werden in eine neue Zellkulturschale überführt. Durch die Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung werden die Zellen vom Objektträger abgelöst und ihre Anzahl anschließend im Zellcounter bestimmt. Im Zellcounter wird eine

dreifache Bestimmung vorgenommen. Die Zellzahl wird in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

5.2.3 Semiquantitative Untersuchungen an opaken Materialien

Die zu untersuchenden Materialproben (Bioverit[®] II oder CPG[®]) werden 24 Stunden in Ethanol inkubiert, mit PBS-Puffer gespült und in DMEM-Zellkulturmedium ohne fötalem Kälberserum (FCS) gegeben. EGFP-markierte C3H10T1/2-Zellen werden bei einer Zelldichte von 10^5 / mL ausgesät und unter Standard-Zellkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Nach einer Stunde wird die Adhäsion der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie bei einer Anregung von 405-495 nm (Bandpassfilter) und einem 535AF45 Grünfilter bestimmt. Anschließend wird frisches Medium mit 10 % FCS zugegeben und die Zellen weiter inkubiert. Die Zellausbreitung bzw. das Zellwachstum wird nach 3 Stunden, 1 Tag und nach 3 Tagen mikroskopisch dokumentiert.

5.3 Zellbiologische Untersuchungen an mit Silica-Filmen beschichteten Standard-Glasobjektträgern

In diesem Abschnitt werden die zellbiologischen Ergebnisse der nanostrukturierten Silica-Filme vorgestellt, die auf Standard-Glasobjektträger aufgebracht wurden. Die Synthese und die strukturanalytische Charakterisierung dieser Silica-Filme wurde in den Kapitel 3.1.1 und 3.2.1 erläutert.

Erste Zellkulturuntersuchungen mit der murinen mesenchymalen Vorläuferzelllinie C3H10T1/2 (siehe Kapitel 5.2.1) zeigen auf den noch templathaltigen nanostrukturierten Silica-Filmen eine reduzierte Anzahl an Zellen. Bei den calcinierten Filmen hingegen ergibt sich eine hocheffiziente Anhaftung (Abb.5-2a); ähnliche Ergebnisse werden auch für die humane Nierenkrebszelllinie HEK293 erzielt (Abb. 5-2b). Nach dem Anhaften zeigen die Zellen auf den calcinierten Proben eine kontinuierliche adhärente Proliferation, bis eine zusammenhängende Besiedlung erreicht wird. Die

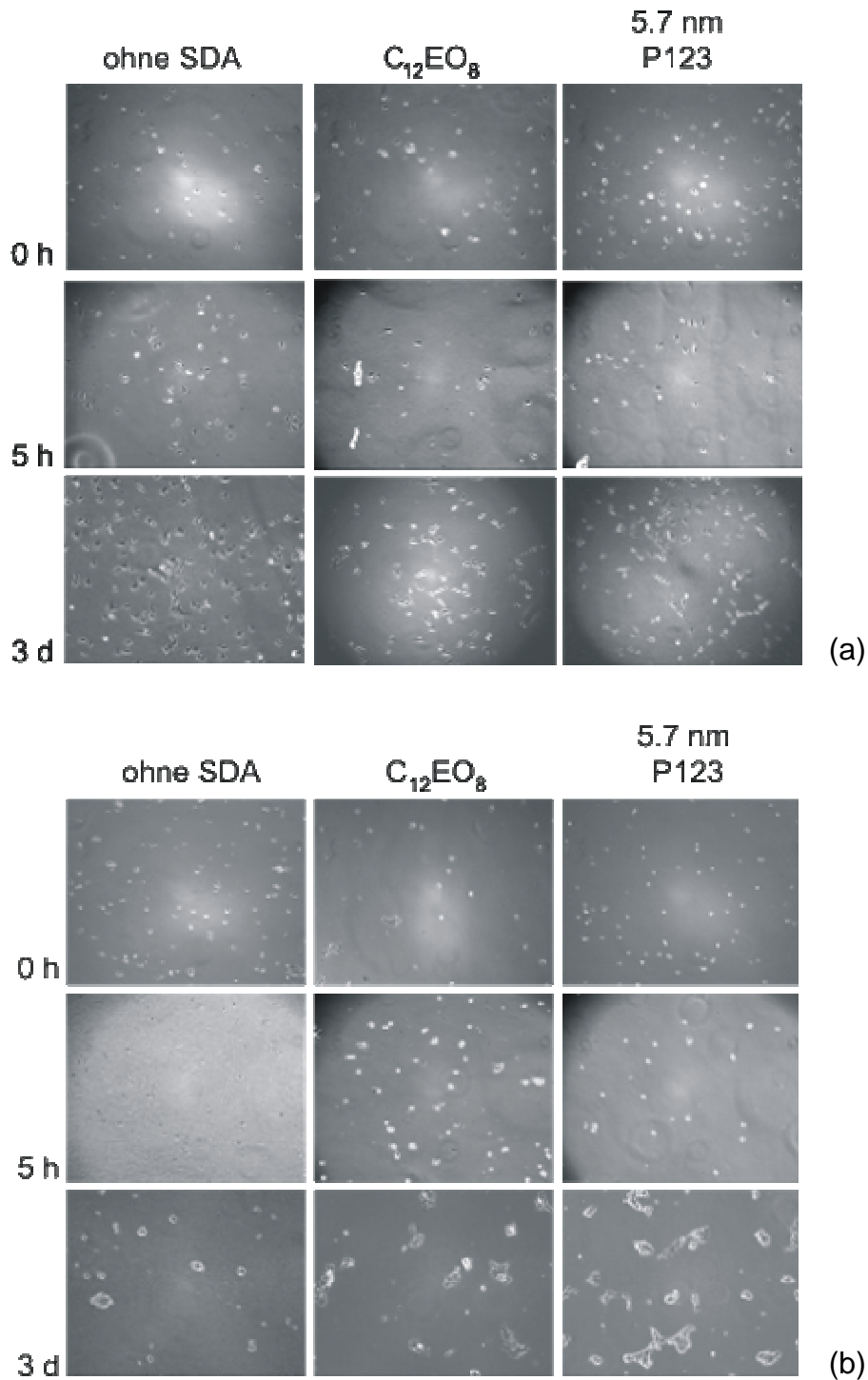


Abbildung 5-2: Adhäsion und Proliferation von murinen mesenchymalen (BMP2) Vorläuferzellen der Linie C3H10T1/2 (a) und von Zellen der humanen Nierenkrebszelllinie HEK293 (b) auf calcinierten Silica-Filmen, die ohne strukturdirigierendem Agens (SDA), bzw. unter Verwendung von C₁₂EO₈ oder Pluronic®P123 synthetisiert wurden. Die Proben wurden in DMEM-Zellkulturmedium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) inkubiert.

lichtmikroskopischen Aufnahmen direkt nach der Inkubation bzw. nach 5 Stunden zeigen noch abgerundete Zellen, während nach 3 Tagen eine Ausbreitung der Zellen zu beobachten ist. Diese qualitativen Resultate sind unabhängig von den verschiedenen Nanostrukturen der Proben. Aus den Ergebnissen lässt sich zudem schließen, dass die verwendeten strukturdirigierenden Agenzien die Zellen abstoßen und nicht adhärent wirken. Dies steht im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Fähigkeit von Polyethylenglycol (PEG)- und Polyethylenoxid (PEO)-Oberflächen, die Adhäsion von Biomolekülen zu vermindern [KG99] [GDRT98]. Erst nach der Calcination heften sich die Zellen gut an die Silica-Oberfläche an und breiten sich nach der Ausscheidung der extrazellulären Matrix aus. Es zeigt sich, dass die Art und Dimension der Nanostrukturen die Zelladhäsion nicht signifikant beeinflussen.

Um quantitative Ergebnisse zu erhalten, wurde die Anzahl der Zellen auf den Proben bestimmt. Dazu wurden die Zellen abgelöst und mikroskopisch ausgezählt. Als Referenz diente die Zelldichte auf dem Zellkulturplastik (siehe Kapitel 5.2.2). Die ersten Versuche waren unbefriedigend und mit großen Fehlern behaftet (Abb. 5-3). Für die Zellversuche wurden – wie bei den qualitativen Untersuchungen – herkömmliche Standard-Glasobjektträger verwendet, die nur in eine Petrischale passen (Abb. 5-4, links). Hierbei erwies es sich als problematisch, dass die Zellen von der Oberseite des Objektträgers „herunterfallen“ und auch auf der Rückseite wachsen können, was zur Verfälschung der Ergebnisse führen könnte. Dies spiegelt sich in den großen Schwankungen der Zellzahl wider. Um reproduzierbare, quantitative Ergebnisse erzielen zu können, musste die Form der beschichteten Standard-Glasobjektträger an die Form gängiger Zellkulturschalen angepasst werden. Für die weiteren Versuche wurden rechteckige Zellkulturschalen gewählt (Abb. 5-4, rechts). Allerdings sind diese Schalen für die herkömmlichen Standard-Glasobjektträger zu klein, so dass von der Längsseite eines jeden Objektträgers 2 mm abgeschliffen und zusätzlich noch die Ecken abgerundet werden mussten. Dies brachte einen erheblichen Zeitaufwand vor der Beschichtung mit einem Silica-Film mit sich. Erst durch diese genaue Abstimmung der Größe der beschichteten Objektträger und der Zellkulturschalen konnten reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden (Abb. 5-5). Alle Oberflächen werden gut besiedelt und weisen im Vergleich zur Zellkulturplastik nur eine geringfügig kleinere Zellzahl auf (Abb. 5-6).

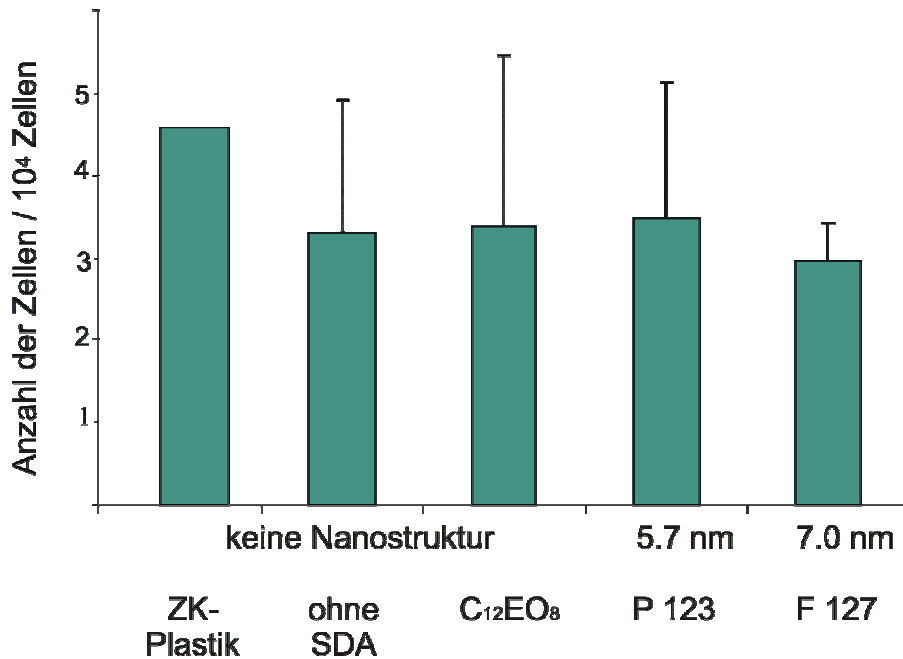


Abbildung 5-3: Zelladhäsion und -proliferation von murinen mesenchymalen Vorläuferzellen C3H10T1/2 auf nanostrukturierten Silica-Filmen im Vergleich zu Glas (Objektträger), nicht nanostrukturierten Silica-Filmen (ohne SDA) und zur Zellkulturplastik (ZK-Plastik); Ergebnisse nach drei Tagen Inkubation unter Standardzellkulturbedingungen.

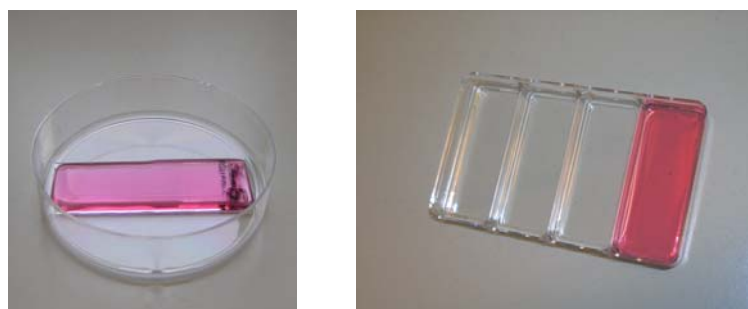


Abbildung 5-4: Abstimmung der Größe der Objektträger an die Form der Zellkulturschalen für qualitative (links) und für quantitative (rechts) Untersuchungen.

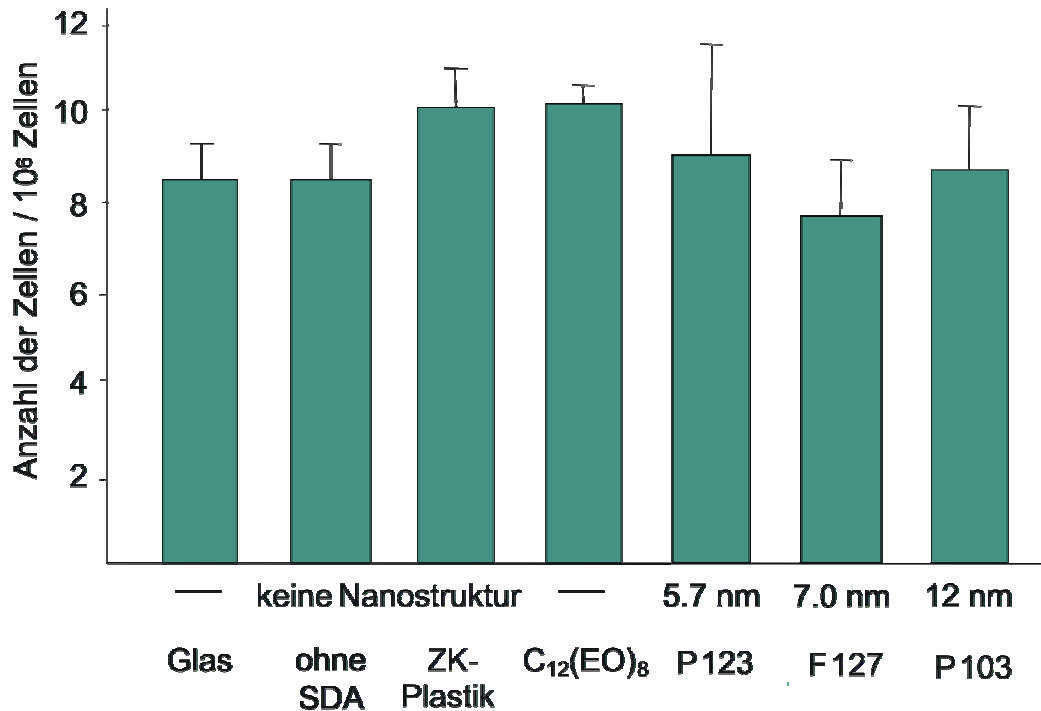


Abbildung 5-5: Zelladhäsion und -proliferation von murinen mesenchymalen Vorläuferzellen C3H10T1/2 auf nanostrukturierten Silica-Filmen im Vergleich zu Glas (Objekträger), nicht nanostrukturierten Silica-Filmen (ohne SDA) und zur Zellkulturplastik (ZK-Plastik); reproduzierbare Ergebnisse nach der Optimierung des Verfahrens; Zellzahlbestimmung nach drei Tagen Inkubation unter Standardzellkulturbedingungen.

Das Entfernen des organischen Tensids erwies sich als essentiell für eine gute *in-vitro*-Biokompatibilität. Danach kann ebenfalls für unstrukturiertes Siliciumdioxid eine gute Biokompatibilität festgestellt werden. Allerdings sind bei den hier untersuchten Nanostrukturen keine signifikanten Einflüsse auf Zelladhärenz und -proliferation festzustellen. Die untersuchten Nanostrukturen sind vermutlich zu klein, um Zellbesiedlung und -wachstum deutlich zu beeinflussen. Möglicherweise werden die Strukturierungen gleich zu Beginn der Zelladhäsion durch die Ausschüttung einer extrazellulären Matrix effizient maskiert. Aus diesen Experimenten lässt sich somit schließen, dass die vollständige Entfernung der organischen Komponente wichtig ist und dass Nanostrukturen im Bereich von 5 – 12 nm keinen signifikanten Einfluss auf das Zellverhalten haben.

5.4 Zellbiologische Untersuchung an mit modifizierten Silica-Filmen beschichteten Standard-Glasobjektträgern

Erste zellbiologische Untersuchungen an nanostrukturierten Silica-Filmen, die nach der Calcination mit Organoalkoxyalkylsilanen modifiziert wurden (siehe Kapitel 3.1.2 und Kapitel 3.2.3), wurden nach der in Kapitel 5.2.3 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Formeleinheiten der unterschiedlich funktionalisierten Silica-Filme sind in Abbildung 5-6 dargestellt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von eGFB-markierten C3H10T1/2-Zellen nach 3 Stunden bzw. 3 Tagen Kultivierung sind in Abbildung 5-7 gezeigt. Im Vergleich zu dem Deckglas und dem nicht modifizierten, nanostrukturierten Silica-Film, weisen die modifizierten Silica-Filme eine verminderte Zellzahl und eine geringere Ausbreitung der Zellen auf. Zwischen den unterschiedlich funktionalisierten Silica-Filmen ist kein signifikanter Unterschied in der Zelladhäsion auszumachen, was auf einen minimalen Einfluss der funktionellen Gruppen hindeutet. Es zeigt sich jedoch, dass die Anzahl der Zellen auf den nanostrukturierten Silica-Filmen, die mit Hexamethyldisilazan modifiziert wurden, geringer ist als bei den anderen modifizierten Silica-Filmen. Diese verminderte *in-vitro*-Biokompatibilität kann auf die hydrophobe Oberfläche des Silica-Filmes zurückgeführt werden. Die Oberflächen des Deckglases, des nanostrukturierten nicht-modifizierten Silica-Filmes sowie die Oberflächen, der mit Aminopropyltrimethoxysilan (3-AP), N-2-(Aminoethyl)-3-amino-propyltrimethoxysilan (N-2A-3-AP) bzw. der mit Ureidopropyl-trimethoxysilan (UP) modifizierten Silica-Filme sind dagegen hydrophil und zeigen eine erhöhte *in-vitro*-Biokompatibilität. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei Untersuchungen von Jenney et al. erzielt [JDCA98]. Hydrophobe Oberflächen mit terminalen Methylgruppen zeigen eine reduzierte Zelladhäsion und funktionelle Gruppen wie (OH)-, (COOH-) oder (CF₃)-Gruppen einen minimalen Effekt.

Anhand der hier durchgeführten Experimente kann allerdings keine gesicherte Aussage über den Einfluss der funktionellen Gruppen auf die Adhäsion und Proliferation von eGFB-markierten C3H10T1/2-Zellen getroffen werden. Hierfür sind weiterführende (quantitative) Untersuchungen notwendig.

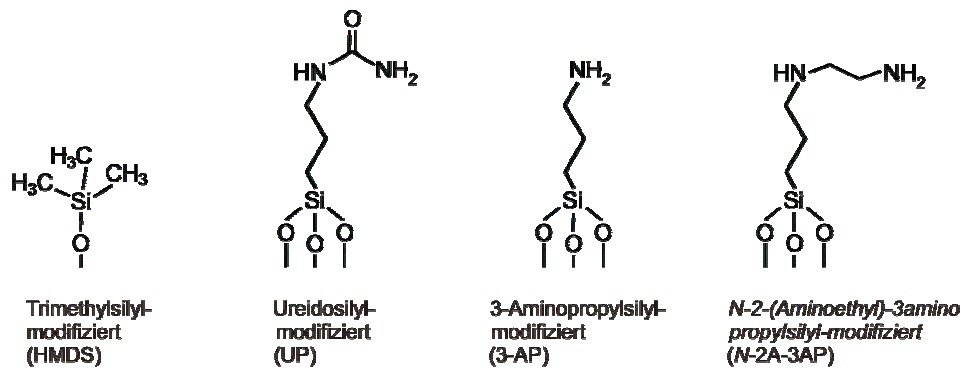


Abbildung 5-6: Formeleinheiten der modifizierten Silica-Filme.

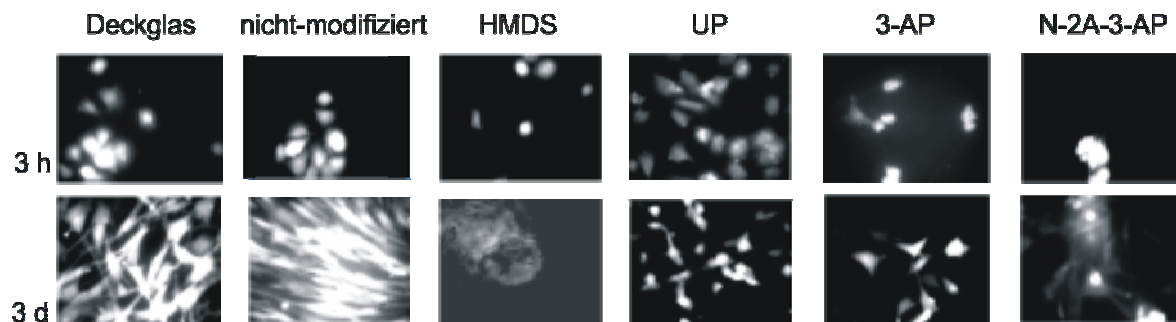


Abbildung 5-7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von eGFP-markierten C3H10T1/2-Zellen nach 3 Stunden bzw. 3 Tagen Kultivierung auf einem Deckglas, einem nicht-modifizierten nanoporösen Silica-Film und auf nanoporösen Silica-Filmen, die mit Hexamethyldisilazan (HMDS), Ureidopropyltrimethoxysilan (UP), Aminopropyltrimethoxysilan (3-AP) oder mit *N*-2-(Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan (*N*-2A-3-AP) modifiziert wurden.

5.5 Zellbiologische Untersuchungen an mit Silica-Filmen beschichtetem Bioverit® II

Bioverit®II (Bezugsquelle: *3di GmbH, D-Jena*) ist ein gängiges Biomaterial, aus dem auch kommerziell erhältliche Mittelohrprothesen angefertigt werden. Um den Einfluss nanostrukturierter Silica-Beschichtungen auf das Zellverhalten zu charakterisieren, wurden zellbiologische Untersuchungen mit der in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Methode durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden nanostrukturierte Silica-Filme mittels dip-coating auf Bioverit®II-Plättchen aufgebracht. Die Synthese und die Charakterisierung der Silica-Filme sind in Kapitel 3.1.1 und 3.2.2 beschrieben. Der Vergleich der Adhäsion der mesenchymalen Vorläuferzellen der eGFP-markierten

C3H10T1/2-Zelllinie, der Zellausbreitung sowie der Proliferation auf den nanostrukturierten Oberflächen ergibt deutliche Unterschiede zu unbehandeltem Bioverit®II (Abb. 5-8). Obwohl auch die Beschichtung eine gute Biokompatibilität zeigt, ist die von Bioverit®II deutlich höher. Während die Zellen auf Bioverit®II ein robustes Wachstum zeigen und sich auf der Oberfläche ausbreiten, sind bei den beschichteten Proben die Zellen weniger dicht, weniger homogen und zum Teil abgerundet. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Bioverit®II ein hoch bioaktives Knochenersatzmaterial ist und eine hohe Bioaktivität gegenüber den mesenchymalen Vorläuferzellen aufweist. Die Bioaktivität wird durch die Silica-Beschichtung vermindert, was an der Abrundung der Zellen gut zu erkennen ist. Dies könnte für einen geplanten Einsatz in der rekonstruktiven Mittelohrchirurgie von Vorteil sein, da die dort eingesetzten Implantatmaterialien eine angepasste – nicht eine optimale – Aktivität im Hinblick auf die Besiedlung mit Knochenzellen aufweisen sollten. Unterschiede im Zellverhalten können zwischen den drei verschiedenen strukturierten Silica-Beschichtungen nicht festgestellt werden (Abb. 5-8). Dieses Ergebnis korreliert mit den Resultaten der zellbiologischen Untersuchung der mit nanostrukturiertem Silica beschichteten Objektträger (siehe Kapitel 5-3). Die Nanostrukturen befinden sich möglicherweise in einer Größenordnung, die unter einem zellbiologisch relevantem Grenzwert liegt.

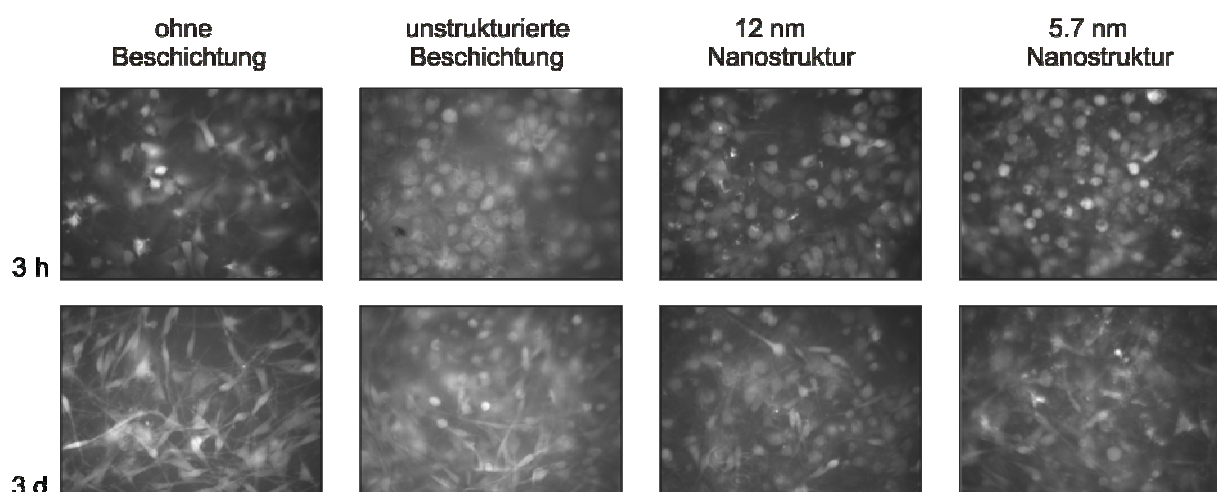


Abbildung 5-8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von eGFP-markierten C3H10T1/2-Zellen nach 3 Stunden bzw. 3 Tagen Kultivierung auf unbehandelten Bioverit®II-Plättchen und auf beschichteten Bioverit®II-Plättchen, die ohne strukturdirigierendem Agens (unstrukturierte Beschichtung) und unter Verwendung von Pluronic®P103 (12 nm Nanostruktur) bzw. Pluronic®P123 (5.7 nm Nanostruktur) hergestellt wurden.

5.6 Chemische und zellbiologische Untersuchungen an kommerziellen nanoporösen Gläsern (CPG[®])

Die zellbiologischen Untersuchungen an nanostrukturierten Silica-Filmen haben gezeigt, dass die Strukturierung im unteren Nanometerbereich (< 12 nm) keinen signifikanten Einfluss auf das Verhalten von Zellen hat (siehe Kapitel 5.3). Die Synthese strukturierter Silica-Filme mit Porenweiten zwischen 15 und 100 nm ist bislang mit den strukturdirigierenden Ansätzen – wie sie hier vorgestellt wurden – nicht möglich. Im Rahmen der Untersuchung zum Einfluss von Nanostrukturen auf das Zellverhalten wurden daher nanoporöse Gläser (controlled pore glass, CPG[®]) mit charakteristischen Abmessungen zwischen 50 und 100 nm zellbiologisch untersucht. Dieser Größenbereich ist sehr interessant, da bestimmte zelluläre Strukturen, die u. a. für die Anheftung von Zellen an Oberflächen wichtig sind, in diesem Größenbereich liegen. Durch ihre Porosität bieten diese Gläser auch prinzipiell die Möglichkeit eines lokalen *drug-delivery*.

Nanoporöse Gläser (CPG[®]) mit nominellen Porenweiten von 50 nm, 70 nm bzw. 100 nm wurden in Form zylindrischer Körper mit 8 mm Durchmesser von der Firma CPI Bitterfeld¹ bezogen. Diese porösen Gläser werden aus Alkaliborosilicatgläsern durch thermische Entmischung in Alkaliborat- bzw. Siliciumdioxidreiche Domänen hergestellt. Die Boroxiddomänen lassen sich mit Säure auswaschen und hinterlassen Poren mit Größen im Nanometerbereich und einer verhältnismäßig engen Porenweitenverteilung, aber einer unregelmäßigen Porenstruktur. Das eigentliche nanoporöse Glas besteht somit aus amorphem Siliciumdioxid [JE03] [EJS03].

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie die Resultate der Quecksilberintrusions-Porosimetrie² der untersuchten Gläser sind in Abbildung 5-9 und Abbildung 5-10 gegenübergestellt. Die Gläser weisen bei einer engen Porenweitenverteilung ein ungeordnetes Porensystem auf.

¹ CPI ChemiePark Institut GmbH, Bitterfeld

² Die Quecksilberintrusions-Porosimetrie-Messungen wurden von Herrn Dr. Dirk Enke an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

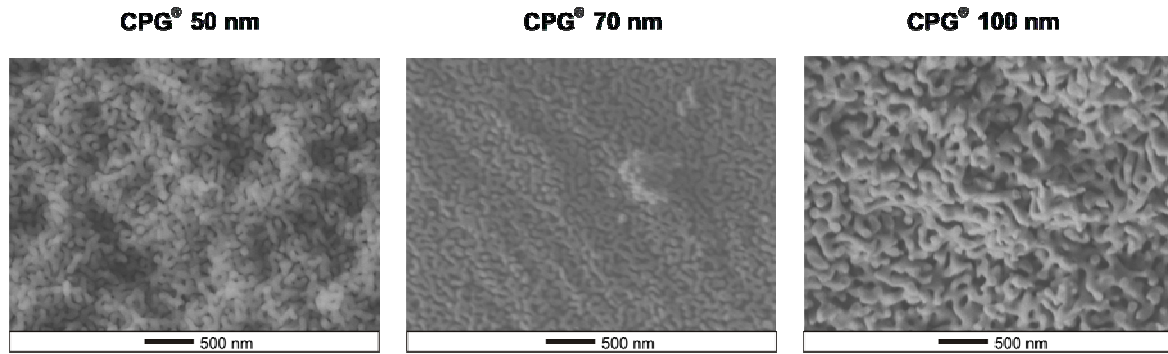


Abbildung 5-9: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von controlled pore glass (CPG[®]) mit nominellen Porenweiten von 50 nm, 70 nm und 100 nm.

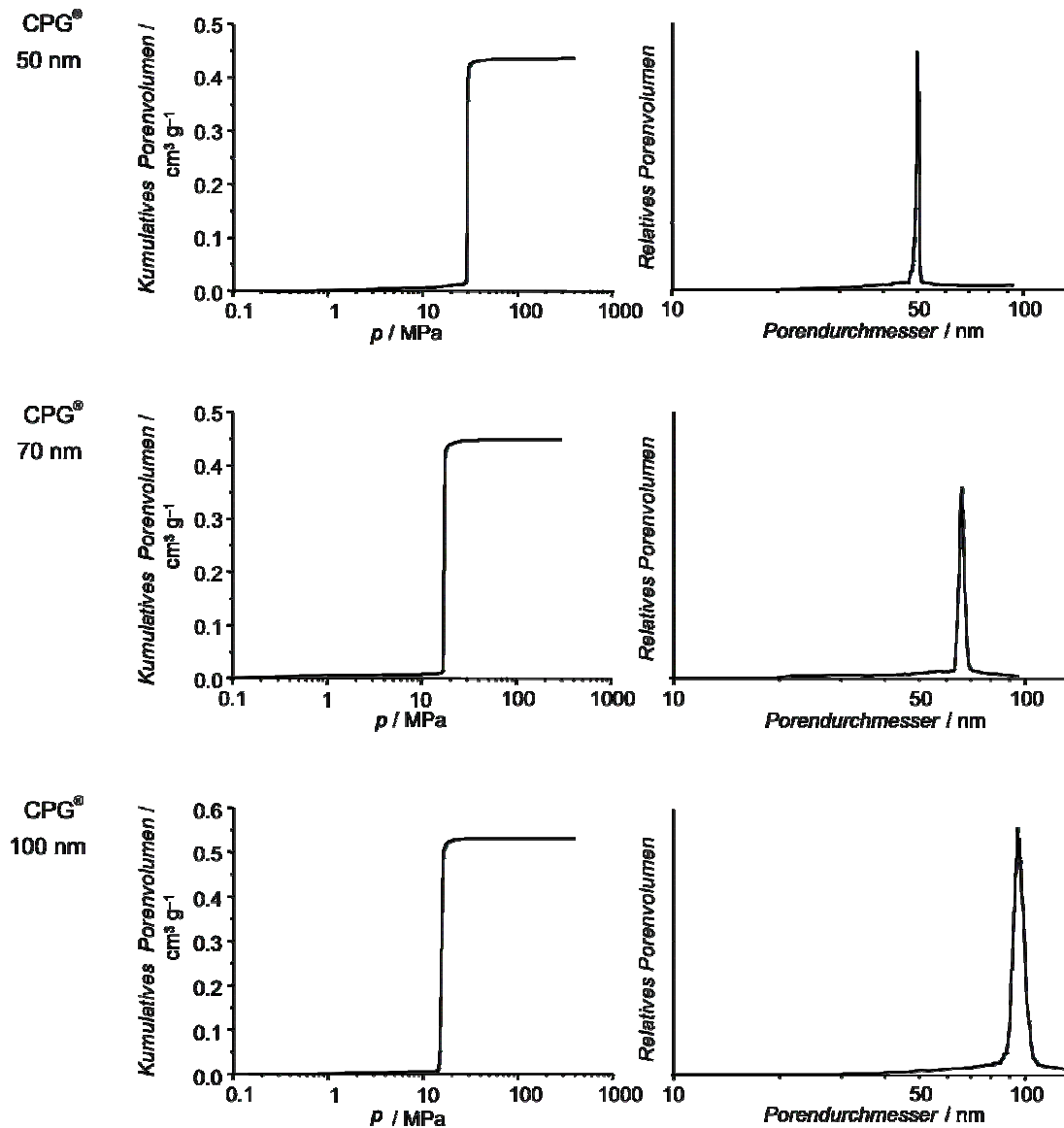


Abbildung 5-10: Quecksilberintrusions- porosimetrie von controlled pore glass (CPG[®]) mit nominellen Porenweiten von 50 nm, 70 nm und 100 nm.

Für die zellbiologischen Untersuchungen wurde – wie bereits bei den beschichteten Bioverit®II-Plättchen – das Zellkultursystem auf Basis der eGFP-markierten C3H10T1/2-Zellen verwendet, das semiquantitative Aussagen erlaubt. Das experimentelle Vorgehen entsprach dem in Kapitel 5.2.3 beschriebenen. Als Vergleichsproben wurden Deckgläschen für mikroskopische Zwecke gewählt. Die nanoporösen Gläser zeigen prinzipiell eine gute Biokompatibilität, die jedoch gegenüber den Deckgläsern reduziert ist (Abb. 5-11). Verfolgt man den zeitlichen Ablauf der Zellanheftung und -ausbreitung, so erfolgt diese im Falle der nanoporösen Gläser verzögert. Diese verminderte Biokompatibilität gegenüber Standardbiomaterialien wie dem Bioverit®II kann für den Einsatz im Mittelohr durchaus von Vorteil sein, da dort nur ein begrenztes Wachstum von knochenähnlichen Strukturen gewünscht wird. Einen Einblick in die Morphologie der Zellen liefern die raster-elektronischen Aufnahmen in Abbildung 5-12. Die Zellen auf den nanoporösen Gläsern sind im Vergleich zu denen auf dem Deckglas weit ausgebreitet und mit den feinen fadenartigen Strukturen der extrazellulären Matrix überdeckt. Die raster-elektronenmikroskopische Untersuchung wurde von Frau Birte Süß und Herrn Dr. Manfred Rohde an der GBF in Braunschweig durchgeführt.

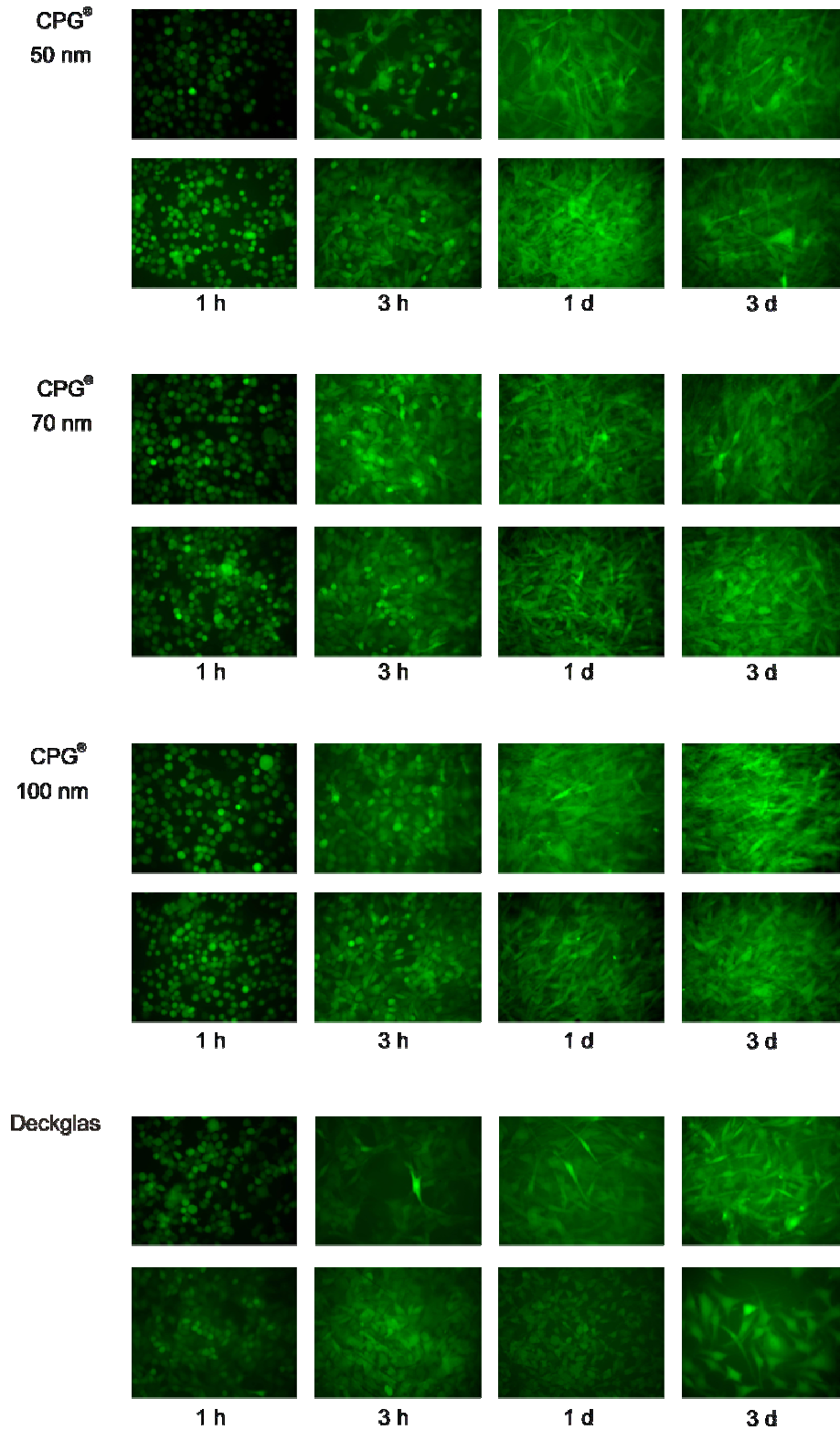


Abbildung 5-11: Zellwachstum von eGFP-markierten C3H10T1/2-Zellen auf nanoporösen Gläsern mit Porendurchmessern von 50 nm, 70 nm bzw. 100 nm sowie auf einem Deckglaschen. Fluoreszenzmikroskopie nach 1 Stunde, 3 Stunden, 1 Tag bzw. 3 Tagen.

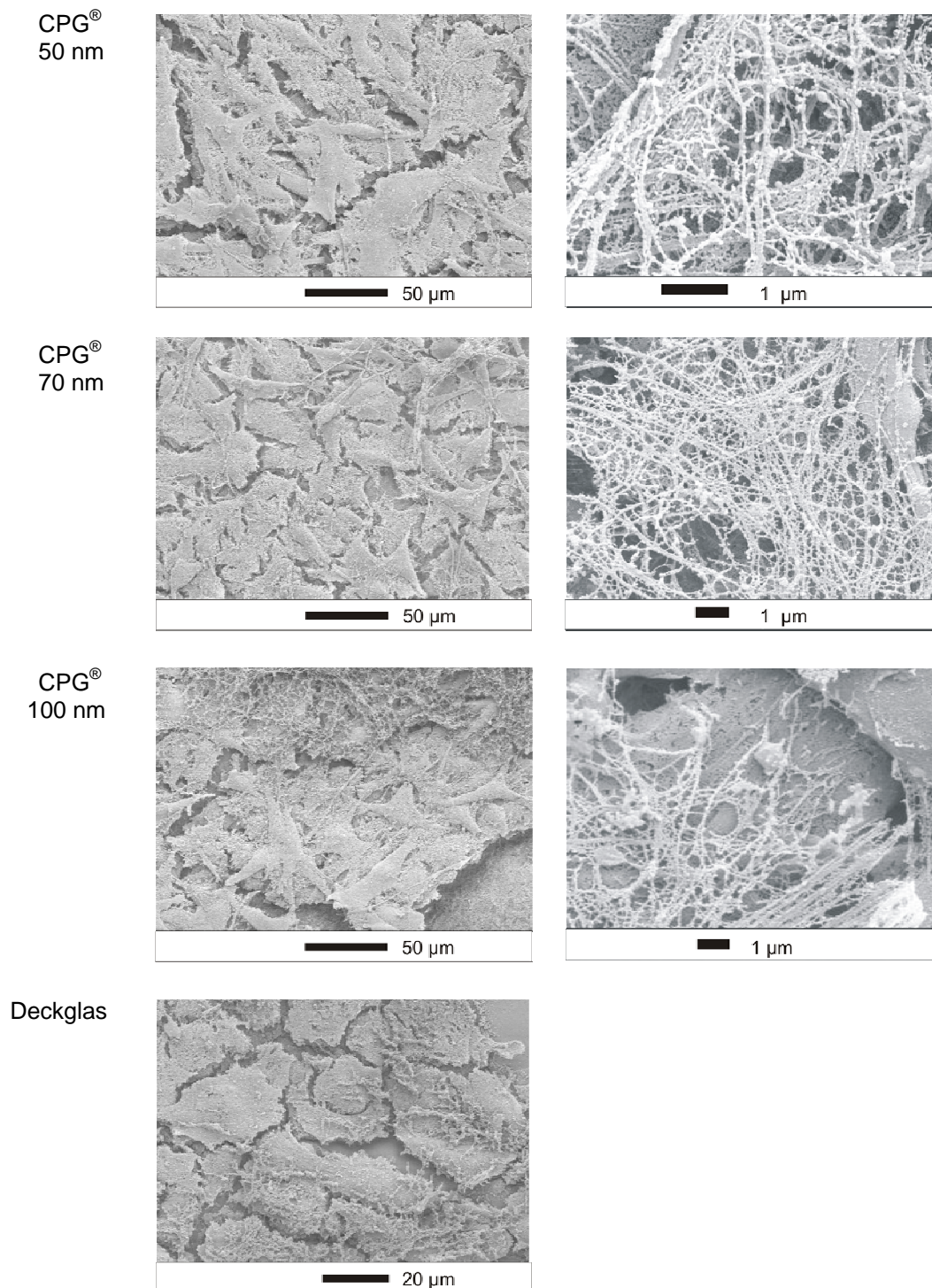


Abbildung 5-12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von eGFP-markierten C3H10T1/2-Zellen nach 3 Tagen Kultivierung auf nanoporösen Gläsern mit Porendurchmessern von 50 nm, 70 nm bzw. 100 nm sowie auf einem Deckglas.

6 *Synthese und Charakterisierung von organisch-anorganischen Kompositen auf Basis von Hydroxylapatit*

In diesem Kapitel werden zunächst verschiedene Methoden für die Synthese von organisch-anorganischen Kompositmaterialien auf Basis von Hydroxylapatit beschrieben; anschließend wird die strukturanalytische Charakterisierung dieser Kompositmaterialien vorgestellt. Als organische Komponenten wurden Chitosan, quervernetztes Chitosan und Hyaluronsäure ausgewählt. Der Anteil an organischer und anorganischer Komponente wurde variiert. Bei den angegebenen Massenverhältnissen handelt es sich um im Voraus berechnete, theoretische Verhältnisse, die eine vollständige Ausfällung beider Komponenten zu Grunde legen. Zu Vergleichszwecken wurden auch die reinen Komponenten unter analogen Bedingungen ausgefällt.

6.1 *Synthese organisch-anorganischer Komposite auf Basis von Hydroxylapatit*

6.1.1 *Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite*

Die Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite werden durch eine Co-Präzipitation aus einer essigsäuren Lösung hergestellt, wobei die Fällung durch eine Erhöhung des pH-Wertes erfolgt. Die hierzu verwendete Prozedur soll an dem folgenden Beispiel beschrieben werden. Eine Ansatzübersicht über die Herstellung von Präparaten mit ausgewählten Massenverhältnissen ist in Tabelle 6-1 aufgeführt.

0.36 g Chitosan werden in 20 mL 2%-iger Essigsäure vorgelegt und nach Ausbildung einer homogenen gel-artigen Lösung mit jeweils 100 mL 0.108 M Calciumacetat- und 0.0648 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung und 1 g Kaliumcarbonat versetzt. Der pH-Wert der Reaktionslösung wird mit 1 M Kaliumhydroxidlösung auf einen Wert von 8 eingestellt. Nach 12 Stunden Alterung wird der Niederschlag abzentrifugiert, dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und mittels einer Druckfiltration (1 bar

Argon, 3 Minuten) vorgetrocknet. Der Niederschlag wird in zylindrische Gefäße (3-mL-Rollrand-schnappdeckelgläschen und in Glasröhrchen unterschiedlichen Durchmessers gefüllt, mechanisch verdichtet und an der Luft getrocknet. Beim Trocknen entstehen die in Abbildung 6-1 und 6-2 gezeigten zylindrischen oder stäbchenförmigen Proben.

Tabelle 6-1: Ansatzübersicht für die Herstellung der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite. HAp: Hydroxylapatit; HAc: Essigsäure; Ac: Acetat.

Chitosan/HAp / m-% (theoretisches Massenverhältnis)	Chitosan / g	2 %ige		0.108 M	0.0648 M	K ₂ CO ₃ / g
		HAc / mL	Ca(Ac) ₂ / mL	KH ₂ PO ₄ / mL		
100/0	2	100	-	-	-	-
65/35	4	130	200	200	2	2
48/52	2	100	200	200	2	2
35/65	1.167	48	200	200	2	2
25/75	0.72	40	200	200	2	2
0/100	-	-	200	200	2	2

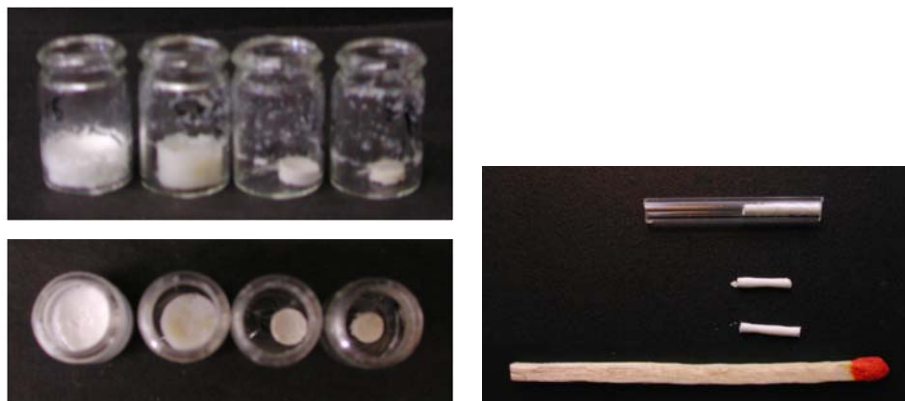


Abbildung 6-1: Fotos der verschiedenen Trocknungsstadien der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite.

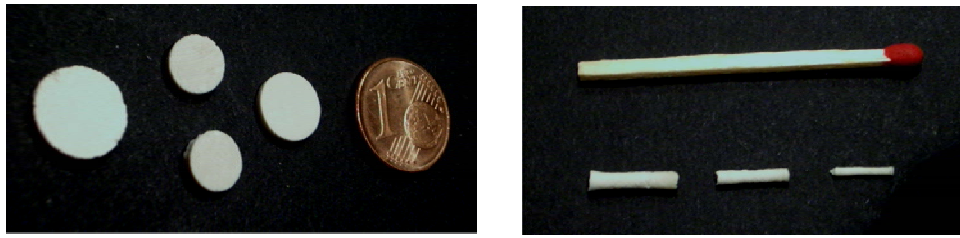


Abbildung 6-2: Fotos der getrockneten stäbchenförmigen und zylindrischen Chitosan-Hydroxyl-apatit-Komposite.

6.1.2 Abscheidung von Hydroxylapatit in einem Chitosan-Gerüst

Eine weitere Methode zur Herstellung von organisch-anorganischen Kompositmaterialien ist die Abscheidung der anorganischen Komponente in einer bereits vorgebildeter organischen Matrix. In diesem Abschnitt wird die Präzipitation von Hydroxylapatit in einem Chitosan-Gerüst vorgestellt.

Für die Herstellung von Chitosan-Gerüsten werden in einem Schnappdeckelgläschen 0.1 g Chitosan mit 1.5 mL 2 %-iger Essigsäure vermischt. Das entstandene Gel wird zunächst 48 Stunden bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und vor dem Trocknen im Vakuum nochmals in flüssigem Stickstoff gekühlt. Nach dem Trocknen haben sich die Gerüste der Größe der umgebenden Rollrandschnappdeckelgläschen angepasst. Das durch Gefriertrocknung hergestellte Chitosan-Gerüst wird mit Hilfe eines Drahtes im unteren Bereich eines Erlenmeyerkolben fixiert und mit 100 mL 0.054 M Calciumacetatlösung, 100 mL 0.0342 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung sowie 0.5 g Kaliumcarbonat versetzt. Anschließend erfolgt eine Anhebung des pH-Wertes durch Zugabe von 1 M Kaliumhydroxidlösung bis zu einem Wert von 8. Das mineralisierte Chitosan-Gerüst wird nach 24 Stunden aus dem Erlenmeyerkolben entfernt, mit destilliertem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet.

6.1.3 Quervernetzte Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite

Neben den Kompositen auf Basis von Chitosan und Hydroxylapatit, wurden auch Komposite mit quervernetztem Chitosan als organischen Bestandteil hergestellt. Die Quervernetzung des Chitosans und die Synthese von quervernetzten Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen werden nachfolgend beschrieben. Die Synthese von quervernetztem Chitosan mit Glutardialdehyd ist an eine Vorschrift von Rorrer et al. [RHW93] bzw. Ruiz et al. [RSG00] angelehnt. Die Quervernetzung erfolgt nach einer Schiffsbasis-Reaktion zwischen der Aldehydgruppe und der Aminogruppe des Chitosans [NA92] [KHC99]. Dies führt zunächst zu der Bildung eines Halbaminals, das unter Wasserabspaltung eine Iminbindung ausbildet.

Zu einer homogenen gel-artigen Mischung aus 1 g Chitosan und 30 mL 2 %-iger Essigsäure werden 50 mL 2.5 M Natriumhydroxidlösung hinzugetropft. Der gebildete Niederschlag wird abfiltriert, drei Mal mit 20 mL 2.5 M Natriumhydroxidlösung gewaschen und anschließend mit 20 mL 2.5 %-ige Glutardialdehydlösung versetzt. Nach 24 Stunden Reaktionszeit wird der bräunliche Rückstand abfiltriert und solange mit destilliertem Wasser gewaschen, bis das Filtrat farblos und von restlicher Glutardialdehydlösung befreit ist.

Die Komposite aus quervernetztem Chitosan und Hydroxylapatit wurden mit drei unterschiedlichen Massenverhältnissen (25/75 und 75/25 m-% quervernetztes Chitosan/Hydroxylapatit) hergestellt. Wie zu Beginn des Kapitels bereits erwähnt, handelt es sich bei den angegebenen Massenverhältnissen um im Voraus berechnete, theoretische Verhältnisse, die eine vollständige Fällung beider Komponenten voraussetzen. Die Masse des quervernetzten Chitosan wird mit der des reinen Chitosans gleichgesetzt, da der Vernetzungsgrad nicht bekannt ist. Die Darstellung der Komposite wird an dem folgenden Beispiel beschrieben.

0.36 g Chitosan werden in 20 mL 2 %-iger Essigsäure gelöst und mit je 100 mL 0.108 M Calciumacetat- und 0.0648 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung sowie 4 mL 5 %-iger Glutardialdehydlösung versetzt. Nach 15 Minuten wird eine Mischung aus 10 mL 0.4 M Kaliumcarbonat- und 2 mL 1 M Kaliumhydroxidlösung hinzu gegeben, weitere 30 Minuten später wird der pH-Wert des Reaktionsgemisches mit 1 M Kaliumhydroxidösung auf 8 eingestellt. Nach 24 Stunden wird der Niederschlag

abzentrifugiert, dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und mittels einer Druckfiltration (1 bar Argon, 3 Minuten) vorgetrocknet. Anschließend wird der Niederschlag in zylindrische Gefäße (z. B. 3-mL-Rollrandschnappdeckelgläschen) und in Glasröhrchen unterschiedlichen Durchmessers gefüllt, verdichtet und an der Luft getrocknet.

6.1.4 Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposite

Die Komposite auf Basis von Hyaluronsäure und Hydroxylapatit wurden ebenfalls nach dem Prinzip der Co-Präzipitation dargestellt. Im Gegensatz zu den Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen erfolgt hier die Ausfällung über eine Erhöhung des pH-Wertes in Verbindung mit der Zugabe von Aceton. Wie bereits in Kapitel 2.2.4 aufgeführt, ist die Hyaluronsäure auch im basischen Milieu löslich und kann daher nicht durch eine pH-Wert-Erhöpfung ausgefällt werden. Die Darstellung der Komposite mit einem Massenverhältnis von 25/75 Massen.-%, bzw. 75/25 Massen.-% Hyaluronsäure/ Hydroxylapatit wird nachfolgend beschrieben.

0.72 g (bzw. 6.504 g) Hyaluronsäure werden in 100 mL (bzw. 300 mL) destilliertem Wasser vorgelegt und nach Ausbildung einer homogenen, gel-artigen Mischung mit jeweils 200 mL 0.108 M Calciumacetat- und 0.0648 M Kaliumdihydrogenphosphat-lösung sowie mit 2 g Kaliumcarbonat versetzt. Der pH-Wert der Reaktionslösung wird mit einer (8/1 Vol.-%)-Mischung aus Aceton und 1 M Kaliumhydroxidlösung auf einen Wert von 8 eingestellt. Nach 12 Stunden Alterung wird der Niederschlag abzentrifugiert, dreimal mit einer (8/1 Vol.-%)-Mischung aus Aceton und destilliertem Wasser gewaschen und zunächst mittels einer Druckfiltration (1 bar Argon, 3 Minuten) getrocknet. Der Niederschlag wird in zylindrische Gefäße (3-mL-Rollrandschnappdeckelgläschen) und in Glasröhrchen unterschiedlichen Durchmessers gefüllt, verdichtet und an der Luft getrocknet. Beim Trocknen entstehen zylindrischen oder stäbchenförmigen Proben.

Eine weitere Methode zur Herstellung der Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposite ist an eine Vorschrift von Ikoma et al. [IMT01] angelehnt. Die Ausfällung beider Komponenten erfolgt – wie nachfolgend beschrieben - durch eine pH-Wert-Erniedrigung einer Calciumhydroxidsuspension mit Phosphorsäure.

0.0678 g Hyaluronsäure werden mit 0.2 M Calcium-hydroxidsuspension versetzt. Nach 30 Minuten wird der pH-Wert der Suspension mit 0.15 M Phosphorsäure auf einen Wert von 8 erniedrigt. Der Niederschlag wird nach 24 Stunden Alterung abzentrifugiert, zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet.

6.1.5 Hyaluronsäure-Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite

Die Synthese von Hyaluronsäure-Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen erfolgt in Analogie zu der Synthese von Hyaluronsäure-Kompositen nach einer Vorschrift von Ikoma et al. [IMT01].

0.1092 g Chitosan werden in 10 mL 2 %iger Essigsäure gelöst und mit 0.0705 g Hyaluronsäure versetzt. Nach 90 Minuten werden 25 mL 0.2 M Calciumhydroxidsuspension hinzu gegeben, weitere 60 Minuten später wird der pH-Wert durch Zugabe von 0.15 M Phosphorsäure auf 8 erniedrigt. Der Niederschlag wird nach 24 Stunden Alterung abzentrifugiert, zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet.

6.2 Charakterisierung der organisch-anorganischen Komposite auf Basis von Hydroxylapatit

In diesem Kapitel wird die strukturanalytische Charakterisierung der auf unterschiedliche Weise synthetisierten organisch-anorganischen Kompositmaterialien mittels Infrarot-Spektroskopie, Röntgendiffraktometrie, Thermoanalyse und Rasterelektronenmikroskopie erläutert und diskutiert. Die Infrarot-Spektren werden mit einem Spektrometer des Typs *Tensor 27* der Firma *BRUKER* aufgenommen. Die Materialien werden als Kaliumbromid-Pressling in Transmission gemessen. Die Röntgenbeugungsuntersuchungen werden an einem Diffraktometer vom Typ *StadiP* der Firma *STOE* mit $\theta/2\theta$ -Geometrie durchgeführt. Für die Thermoanalyse wird eine Thermowaage vom Typ *Simultaneous Thermal Analyser 429* der Firma *NETSCH* verwendet, wobei α - Al_2O_3 -Korund als Referenzmaterial dient. Für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde ein Rasterelektronenmikroskop des Typs *XL30* der Firma *Philips* verwendet.

6.2.1 Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite

In Abbildung 6-3 sind die Infrarot-Spektren der Komposite mit unterschiedlichen Massenverhältnissen wiedergegeben. Zum Vergleich sind Chitosan und Hydroxylapatit gezeigt, die unter den gleichen Reaktionsbedingungen gefällt wurden. Die breite Bande im Bereich von $3000\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$ ist sowohl auf die (O-H)- und (N-H)-Valenzschwingungen des Chitosans als auch auf die (O-H)-Valenzschwingungen des Hydroxylapatits sowie möglicherweise auf Wasser zurückzuführen. Aufgrund von Wasserstoffbrücken tritt eine starke Verbreiterung der Bande auf. Die (C-H)-Valenzschwingungen des Chitosans rufen zwei Banden bei ca. 2900 cm^{-1} und 2800 cm^{-1} hervor. Die Banden zwischen 1600 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} deuten auf die (H-O-H)-Deformationsschwingungen von freien Wassermolekülen hin. Die Absorptionsbanden bei 1655 cm^{-1} und 1543 cm^{-1} sind charakteristisch für die Amid I-(C=O)-Valenz- und Amid II-(N-H)-Deformationsschwingung des

N-acetylierten Chitins. Die (N-H)- Deformationsschwingung der Aminogruppe liegt bei 1594 cm^{-1} , während die Bande bei 1378 cm^{-1} der symmetrischen (C-H)-Deformationsschwingung der Methylgruppe zugeordnet werden kann. Die Zuckerstruktur des Chitosans ruft die Banden bei ca. 900 cm^{-1} und 1100 cm^{-1} hervor [YZSD00]. Neben der starken $\nu_3(\text{P-O})$ -Valenzschwingung bei 1035 cm^{-1} zeigt sich bei ungefähr 960 cm^{-1} eine Schulter, die der totalsymmetrischen $\nu_1(\text{P-O})$ -Valenzschwingung zugeordnet werden kann. Die Aufspaltung der asymmetrischen $\nu_4(\text{P-O})$ -Valenzschwingung bei 601 cm^{-1} und 564 cm^{-1} deutet auf einen Hydroxylapatit mit erhöhter Kristallinität hin. Das Auftreten der $\nu_3(\text{C-O})$ -Streckschwingung bei 1430 cm^{-1} und 1418 cm^{-1} sowie der $\nu_2(\text{C-O})$ -Bindungsschwingung bei ungefähr 865 cm^{-1} lässt auf ein carbonathaltiges Kompositmaterial schließen.

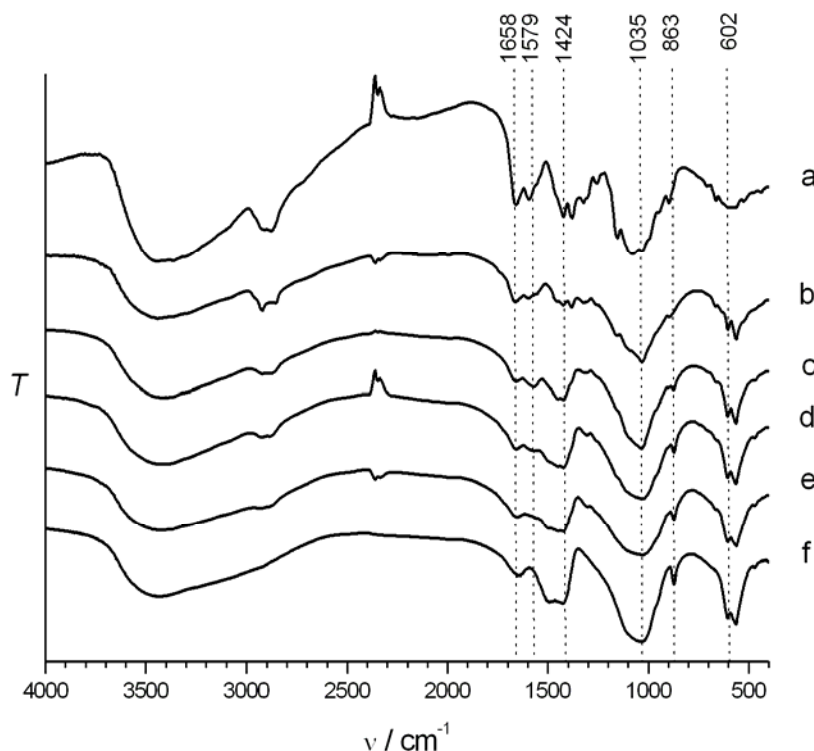


Abbildung 6-3: Infrarot-Spektren der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite im Vergleich zu reinem Chitosan (a) und Hydroxylapatit (f): (b) 65/35 m-% Chitosan/Hydroxylapatit, (c) 48/52 m-% Chitosan/Hydroxylapatit, (d) 35/65 m-% Chitosan/Hydroxylapatit, (e) 25/75 m-% Chitosan/ Hydroxylapatit.

Ein Vergleich der Infrarot-Spektren zeigt, dass die Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite neben den charakteristischen Schwingungen des Apatits und des Chitosans auch typische Absorptionsbanden von Carbonationen aufweisen. Im *finger-print*-Bereich unterhalb 1600 cm^{-1} ist eine Zuordnung der Banden sowohl zu Schwingungen des Hydroxylapatits als auch des Chitosans möglich. Ferner kann eine Intensitätszunahme der (C-H)-Valenzschwingung mit steigendem Massenanteil von Chitosan in den Kompositen festgestellt werden. Einen Hinweis über die Kristallinität des Apatits liefert die Aufspaltung der antisymmetrischen $\nu_4(\text{P-O})$ -Valenzschwingung, die bei allen Kompositen ähnlich ist. Dieses deutet auf eine vergleichbare Kristallinität hin, die aber mittels IR-Spektroskopie nicht näher bestimmt werden kann. Eine Übersicht und einen Vergleich der gemessenen Wellenzahlen mit Literaturdaten finden sich in Tabelle 6-2.

Abbildung 6-4 zeigt die Röntgendiffraktogramme von Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen mit verschiedenen organischen und anorganischen Massenanteilen. Zum Vergleich sind die Diffraktogramme von reinem Hydroxylapatit und reinem Chitosan abgebildet, die unter den gleichen Reaktionsbedingungen gefällt wurden. Wie schon bei den IR-Spektren können auch hier die Reflexe vom Hydroxylapatit und Chitosan in den Kompositen zugewiesen werden. Während die charakteristischen Reflexe des Hydroxylapatits deutlich zu erkennen sind, ist der breite

Tabelle 6-2: Ausgewählte Absorptionsbanden eines Chitosan-Hydroxylapatit-Komposites im Vergleich zu den reinen Komponenten und zu Literaturdaten. Chit: Chitosan; HAp: Hydroxylapatit

Chit/HAp [YTFK01]	Chit/HAp 48/52 m-%	Chit/HAp 100/0	Chit/HAp 0/100	HAp [Fow74]	Schwingungstyp
ν / cm^{-1}	ν / cm^{-1}	ν / cm^{-1}	ν / cm^{-1}	ν / cm^{-1}	
~ 2900	~ 2910	~ 2900	-	-	$\nu(\text{C-H})$
1665	1658	1655	-	-	$\nu(\text{C=O})$, Amid I
1595	1579	1594	-	-	$\delta(\text{N-H})$
1543	-	1536	-	-	$\delta(\text{N-H})$, Amid II
1453, 1422	1440, 1424	-	1430, 1418	-	$\nu_3(\text{C-O})$, Carbonat
1031	1034	-	1035	1087, 1046	$\nu_3(\text{P-O})$
963	~ 960 (sh)	-	~ 960 (sh)	962	$\nu_1(\text{P-O})$
875	863	-	865		$\nu_2(\text{C-O})$, Carbonat
603, 565	602, 560		601, 565	601, 571	$\nu_4(\text{P-O})$

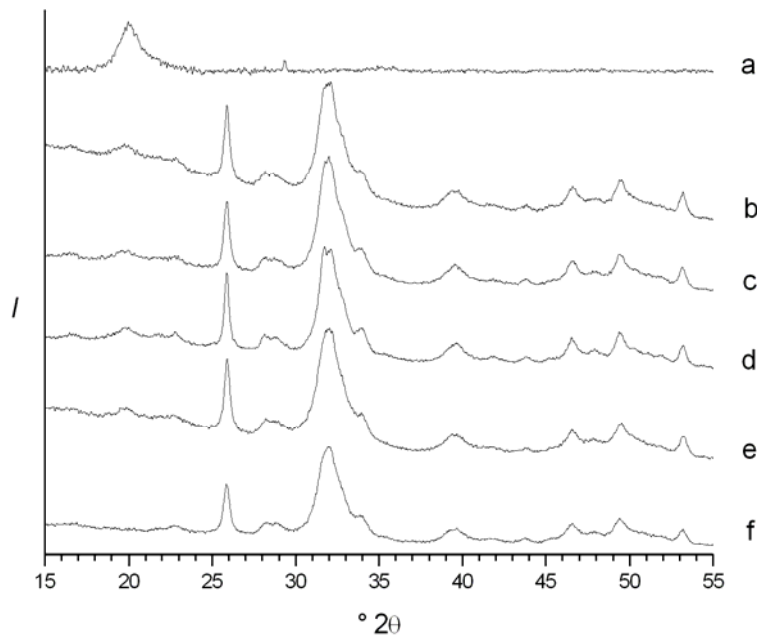


Abbildung 6-4: Röntgendiffraktogramme der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite. (a) 100 m-% Chitosan, (b) 65/35 m-% Chitosan/Hydroxylapatit, (c) 48/52 m-% Chitosan/Hydroxylapatit, (d) 35/65 m-% Chitosan/Hydroxylapatit, (e) 25/75 m-% Chitosan/Hydroxylapatit, (f) 100 m-% Hydroxylapatit.

Reflex des Chitosans im Bereich von 18 bis 22 $^{\circ}2\theta$ gegenüber dem Grundrauschen nur sehr schwach ausgeprägt. Dieses korreliert mit der nichtkristallinen, amorphen Struktur des Chitosans. Eine Intensitätszunahme des Chitosan-Reflexes mit zunehmendem Massenanteil kann nicht ausgemacht werden. Die Intensität des Reflexes ist bei allen Kompositen annähernd gleich. Röntgenbeugungsuntersuchungen von Yamagucci et al. [YTFK01] an Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen haben dagegen gezeigt, dass der Beugungsreflex des Chitosans mit zunehmendem Massenanteil an Hydroxylapatit in den Kompositen abnimmt. Yamagucci et al. führen dies auf homogen dispergierte Chitosanmoleküle zurück, die nur minimale bzw. keine zwischenmolekularen Interaktionen / Wechselwirkungen ausüben können. Diese Wechselwirkungen sind demzufolge für den breiten Beugungsreflex des Chitosans verantwortlich [YTFK01]. Die Diffraktogramme des reinen Hydroxylapatits und der Komposite (Abb. 6-4) zeichnen sich durch den (002)-Reflex bei 25.9 $^{\circ}2\theta$ und einen breiten Reflex im Bereich von 30 bis 34 $^{\circ}2\theta$ aus, der von einer Überlagerung der (211)-, (112)- sowie (300)-Reflexe hervorgerufen wird. Weitere breite Reflexe, die auf nicht differenzierbare Reflexe zurückzuführen sind,

sind trotz ihrer geringen Intensitäten deutlich zu erkennen. Die Breite der Reflexe ist charakteristisch für nanokristallinen Hydroxylapatit, der durch eine schnelle Fällung mit anschließender Alterung hergestellt wurde. Ein Vergleich mit den in Abbildung 2-17 (Kapitel 2.3.2.1) gezeigten Röntgendiffraktogrammen verdeutlicht dies. Eine Ähnlichkeit zu dem Diffraktogramm einer menschlichen Knochenprobe (Abb. 2-2, Kapitel 2.1.2) kann ebenfalls festgestellt werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Röntgenbeugungsuntersuchung und der Infrarot-Spektroskopie kann aus den thermogravimetrischen Analysen das tatsächliche Massenverhältnis der Komposite ermittelt werden. Die Thermoanalysen der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite zeigen einen Massenverlust in drei Stufen (Abb. 6-5). Die erste, endotherme Stufe im Temperaturbereich von Raumtemperatur bis etwa 130 °C wird durch den Verlust von Restwasser hervorgerufen. Die Zersetzung des Chitosans schließt sich direkt an und endet im Bereich von etwa 700 bis 750 °C [QWA00] [YTFK01]. In diesem Temperaturbereich treten zwei exotherme Stufen mit einem Minimum in der DTA-Kurve auf. Bei reinem Chitosan liegen diese Minima bei 295 °C und 505 °C. Die Temperaturen, bei denen diese Minima auftreten, variieren bei den verschiedenen Massenverhältnissen der Komposite. Eine Tendenz bei der Verschiebung der Minima und somit auch der Zersetzungstemperatur kann nicht beobachtet werden. Yamagucci et al. [YTFK01] berichten hingegen über eine Verringerung der Zersetzungstemperatur mit zunehmendem Chitosananteil der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite. Zur Berechnung des Chitosangehalts wurde der Massenverlust zwischen 130 °C und 700 °C bzw. 750 °C herangezogen, da oberhalb dieser Temperaturen kein Massenverlust mehr festzustellen ist. Der Massenanteil des Hydroxylapatit wurde jeweils aus der Restmasse bestimmt. Bei dieser Berechnung werden die durch die Hydroxyl- und Carbonationen des Hydroxylapatits hervorgerufenen Massenverluste nicht berücksichtigt. Dieses Verfahren wurde von Yamagucci et al. zur Berechnung der Massenanteile in Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen verwendet. Zur Ermittlung des Chitosangehalts wurde von Yamagucci et al. der Massenverlust zwischen 200 °C und 800 °C [YTFK01] bzw. 250 °C und 800 °C [YISO03] zu Grunde gelegt. Die jeweiligen Massenverluste, der Massenanteil an Hydroxylapatit sowie die daraus berechneten Massenverhältnisse sind in Tabelle 6-3 aufgelistet. Die Tabelle verdeutlicht, dass die theoretisch berechneten Massenverhältnisse, die unter der Voraussetzung einer

vollständigen Fällung beider Komponenten berechnet wurden, gut mit den experimentell ermittelten Werten übereinstimmen. Es zeigen sich aber auch die Ungenauigkeiten der thermogravimetrischen Analyse, die insbesondere durch die geringe Einwaage hervorgerufen werden können. Deutlich zu erkennen ist dies bei der Summe der Massenverluste und der Restmasse, die nicht immer 100 % beträgt.

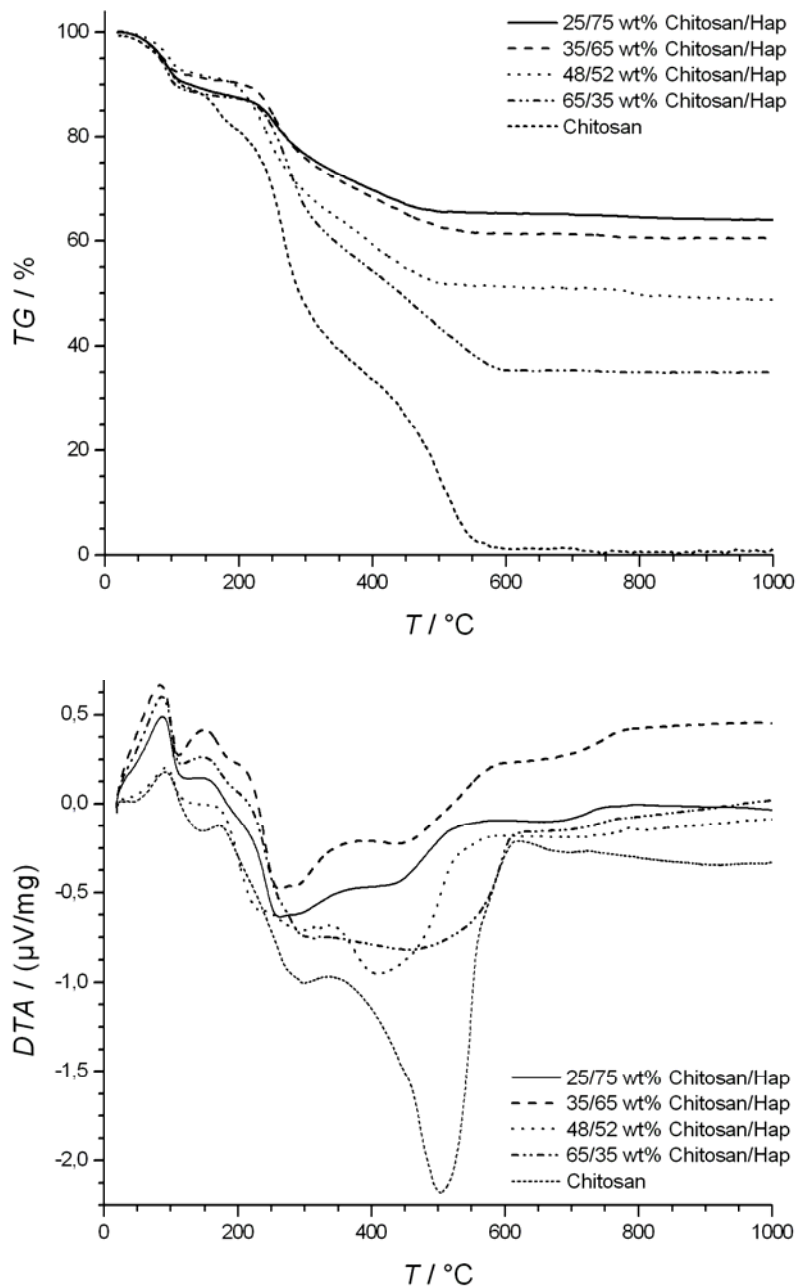


Abbildung 6-5: Thermoanalytisediagramme der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite.

Tabelle 6-3: Massenverluste und Massenverhältnisse der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite gemäß der Thermoanalyse.

Chitosan/HAp / m-% (theoretisches Massenverhältnis)	Wasser / m-% (1.Stufe, 25°C-130°C)	Chitosan / m-% (2. Stufe, 130°C-750°C)	HAp / m-%	Chitosan/HAp / m-% (experimentelles Massenverhältnis)
100/0	9.9	88.1	-	-
65/35	7.1	60.7	31.9	65.3/34.2
48/52	7.5	42.3	50.2	45.7/54.2
35/65	8.2	30.4	61.4	33.1/66.9
25/75	9.8	24.2	66.0	26.8/73.2

In Abbildung 6-6 sind typische rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des reinen Chitosans und des reinen Hydroxylapatits wiedergegeben, so wie die Präparate bei der Fällung anfallen. Chitosan weist strangartige bzw. bündelige Morphologien aus, während sich das Hydroxylapatit durch weitgehend unstrukturierte Morphologien, z. T. mit scharfen Ecken und Kanten, und kleinere Partikel auf der Oberfläche auszeichnet. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Komposite in Abbildung 6-7 zeigen eine charakteristische Morphologie, die sich von der Strukturierung der einzelnen Komponenten unterscheidet, was die Ausbildung eines Komposites bestätigt. Die Oberflächen der Komposite können als „wulstartig“ beschrieben werden kann. Die Strukturierung der Komposite liegt im Mikrometerbereich. Bei einem höheren Massenanteil an Hydroxylapatit entsteht der Eindruck „ummantelter“ Apatitkristalle. Eine eindeutige Abhängigkeit der Morphologie von den Massenverhältnissen kann nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der Kompositcharakter der Proben durch die strukturanalytischen Untersuchungen bestätigt werden konnte. Aus den Ergebnissen der Infrarot-Spektroskopie und der Röntgenbeugungsuntersuchung wird deutlich, dass ein carbonathaltiger nanokristalliner Hydroxylapatit gebildet wurde, dessen Kristallinität vergleichbar mit der einer menschlichen Knochenprobe ist. Es ist aber anzunehmen, dass die Apatitkristalle im Gegensatz zu den Apatitkristallen im Kollagen des Knochens keine Vorzugsorientierung in dem Chitosan

aufweisen (siehe Kapitel 2.1.2, Abb. 2.1). Mittels Thermogravimetrie konnten die theoretisch berechneten Massenverhältnisse experimentell bestätigt werden, so dass eine vollständige Fällung beider Komponenten angenommen werden kann.

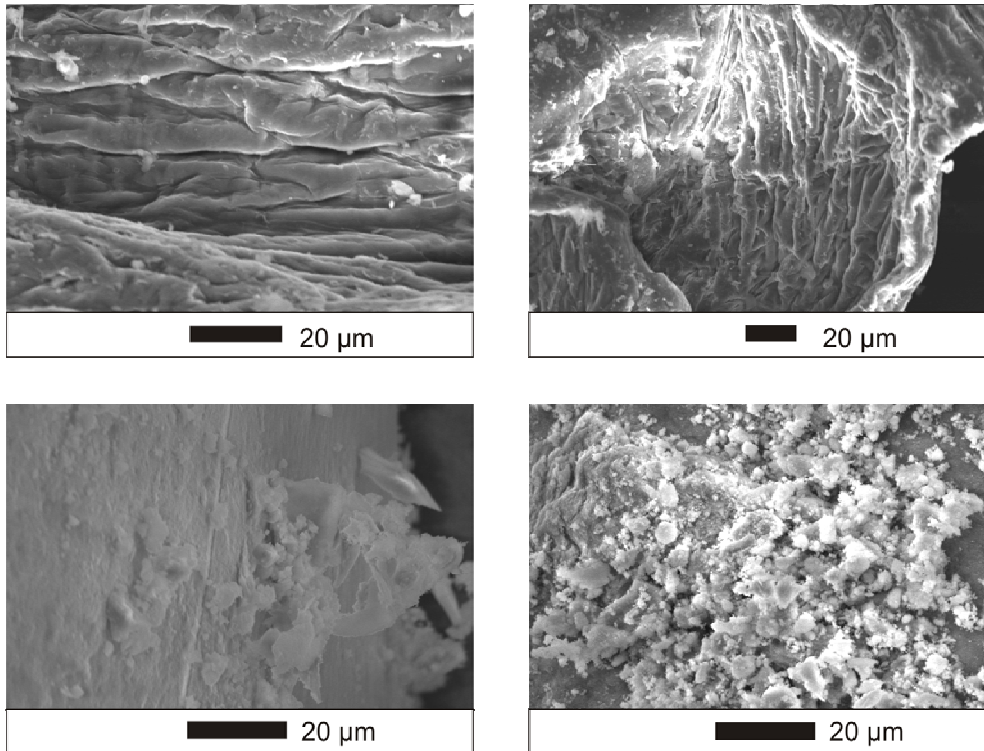


Abbildung 6-6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des reinen Chitosans (oben) und des reinen Hydroxylapatits (unten).

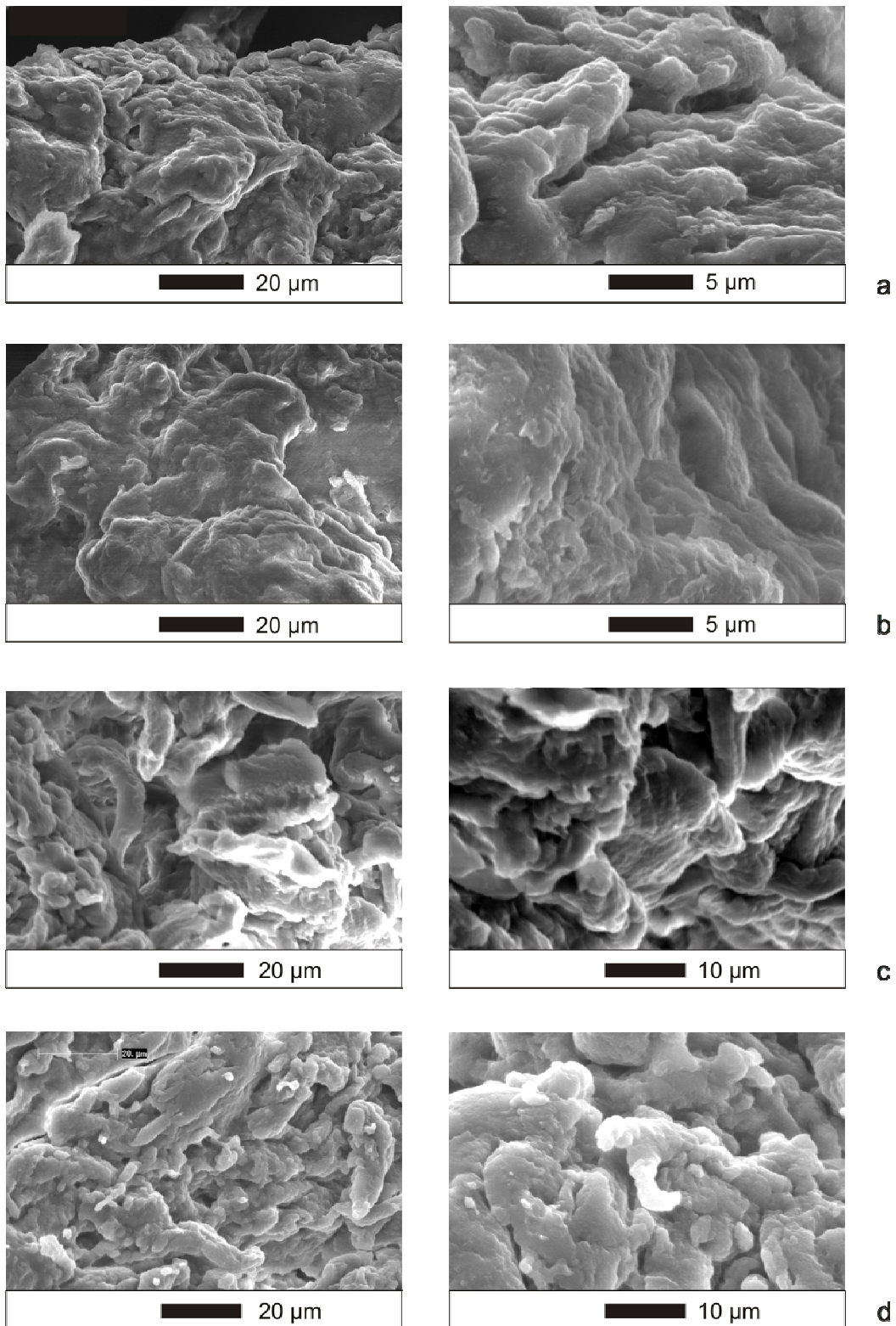


Abbildung 6-7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite. (a) 65/35 m-% Chitosan/Hydroxylapatit, (b) 48/52 m-% Chitosan/Hydroxylapatit, (c) 35/65 m-% Chitosan/Hydroxylapatit, (d) 25/75 m-% Chitosan/Hydroxylapatit.

6.2.2 Abscheidung von Hydroxylapatit in einem Chitosan-Gerüst

Im Gegensatz zu den zuvor vorgestellten Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen, die durch Co-Fällung erhalten wurden, wurde bei der Synthese der im Folgenden beschriebenen Komposite ein vorgefertigtes Chitosan-Gerüst eingesetzt, in dem sich der Hydroxylapatit abscheidet.

Die Infrarot-Spektren eines Chitosan-Gerüsts vor und nach der Fällung sind in Abbildung 6-8 wiedergegeben. Im Vergleich zum reinen Chitosan und Hydroxylapatit wird der Kompositcharakter deutlich: Das Schwingungsspektrum des Komposites weist neben den charakteristischen Absorptionsbanden des Chitosans auch solche des Hydroxylapatits auf. Dazu gehören die Banden der $\nu_3(\text{P-O})$ -Valenzschwingung bei 1031 cm^{-1} sowie die der asymmetrischen $\nu_4(\text{P-O})$ -Valenzschwingung bei 603 cm^{-1} und 562 cm^{-1} . Die Banden der (C-O)-Streckschwingung bei 1453 cm^{-1}

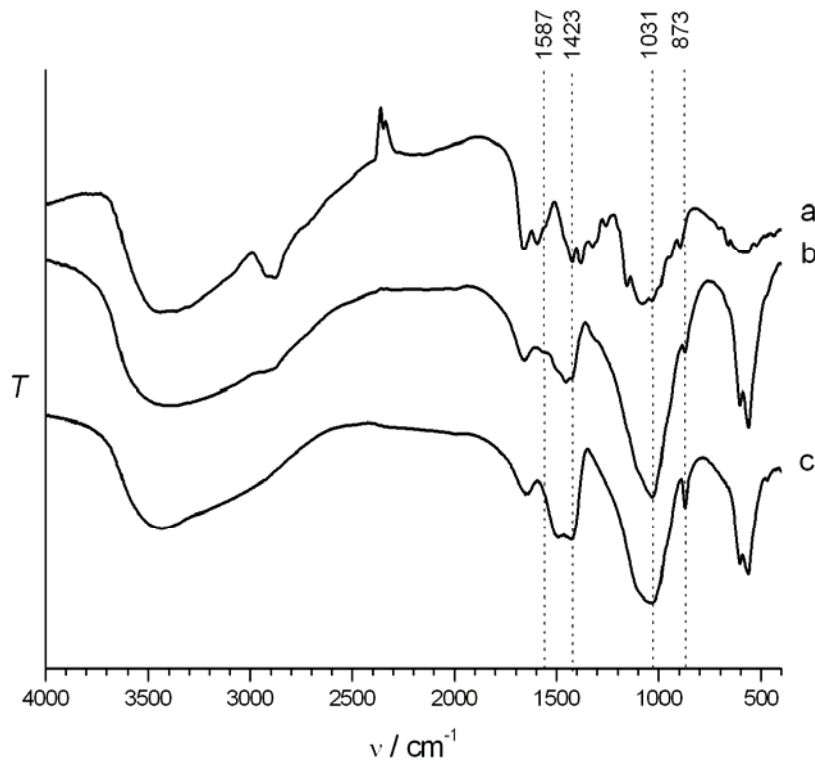


Abbildung 6-8: Infrarot-Spektren eines Chitosan-Gerüsts vor (a) und nach (b) der Apatitfällung im Vergleich zu reinem Hydroxylapatit (c).

bzw. 1423 cm^{-1} sowie der (C–O)-Deformationsschwingung bei ungefähr 873 cm^{-1} deuten auf einen carbonathaltigen Hydroxylapatits hin. Die Absorptionsbanden der (C–H)-Valenzschwingung, der Amid I-(C=O)-Valenzschwingung und der (N–H)-Deformationsschwingung finden sich bei 2940 cm^{-1} , 1657 cm^{-1} bzw. 1587 cm^{-1} .

Die Röntgenbeugungsuntersuchungen bestätigen die Bildung von Hydroxylapatit; dessen Beugungsreflexe sind deutlich in dem Röntgendiffraktogramm der Abbildung 6-9 zu erkennen. Ein Vergleich mit den Diffraktogrammen der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite, die durch Co-Präzipitation hergestellt wurden, zeigt eine gute Übereinstimmung in der Reflexbreite und somit in der Kristallinität des Apatits. In beiden Fällen kann auf die Bildung eines nanokristallinen Hydroxylapatit geschlossen werden. Einen weiteren Hinweis für eine vergleichbare Kristallinität liefern die Infrarot-Spektren, bei denen eine ähnliche Aufspaltung der asymmetrischen $\nu_4(\text{P–O})$ -Valenzschwingung festzustellen ist.

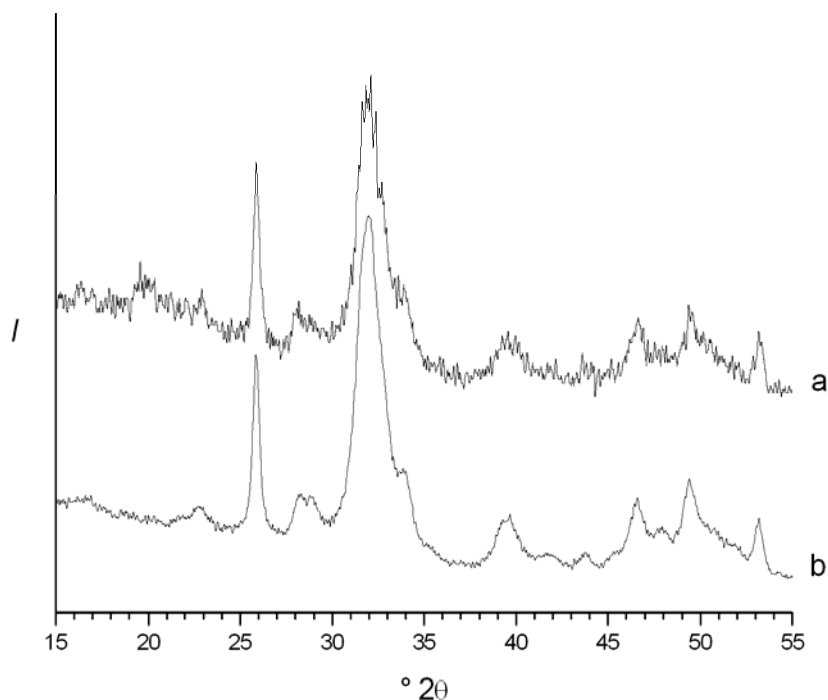


Abbildung 6-9: Röntgendiffraktogramm eines Chitosan-Gerüsts nach der Mineralisation des Hydroxylapatits (a) im Vergleich zu reinem Hydroxylapatit (b).

Die Morphologien des gefriergetrockneten Chitosan vor und nach der Mineralisation des Hydroxylapatits sind in Abbildung 6-10 dargestellt. Gefriergetrocknetes Chitosan zeichnet sich durch ein makroporöses, interkonnektierendes Porensystem aus, wie in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zu sehen ist. Nach der Mineralisation des Hydroxylapatits sind diese Poren weitestgehend verschlossen, nur zum Teil deuten sie sich auf der Oberfläche an. Die Oberflächen scheinen aus kleinen sphärischen Partikeln zusammengesetzt zu sein, deren Zusammensetzung als wolkenartig beschrieben werden kann. Im Vergleich zu der „wulstartigen“ Morphologie der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite, die durch Co-Präzipitation hergestellt wurden, zeigt sich hier eine Feinstruktur mit deutlich kleineren sphärischen Partikeln. Die Strukturierung liegt im Nanometerbereich.

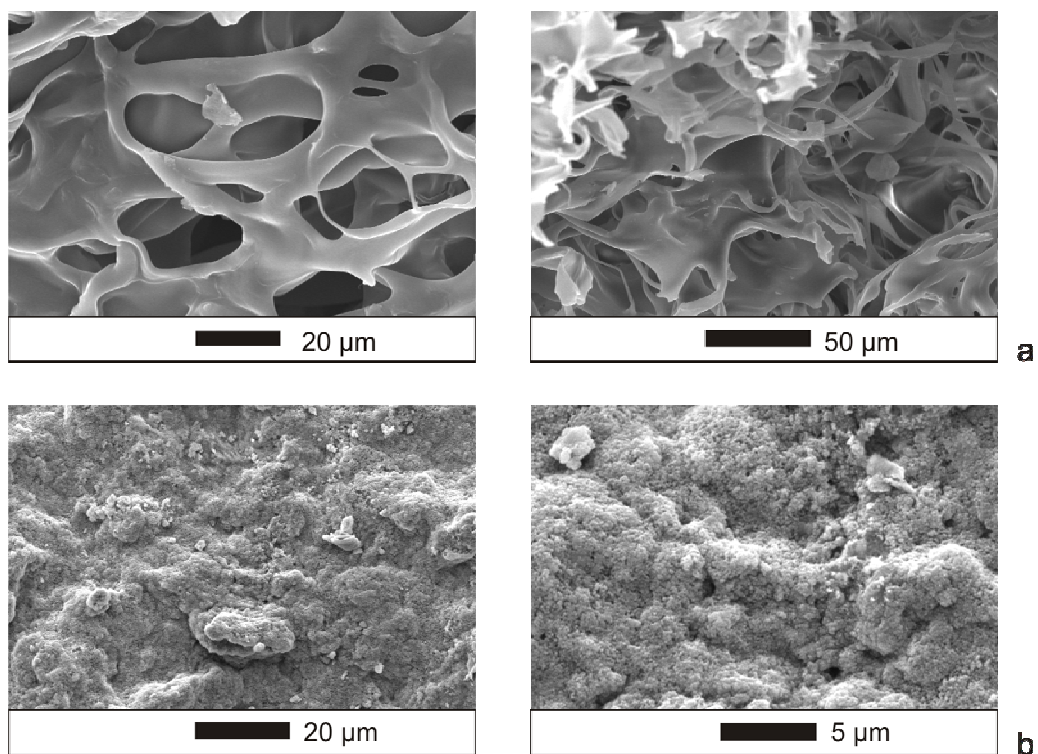


Abbildung 6-10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von gefriergetrocknetem Chitosan vor (a) und nach (b) der Mineralisation von Hydroxylapatit.

6.2.3 Quervernetzte Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite

Neben der Synthese von Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen wurden ebenfalls Komposite mit quervernetztem Chitosan hergestellt. Wie in Abbildung 6-11 zu erkennen ist, unterscheiden sich quervernetztes Chitosan und dessen Komposite durch ihre rot-bräunliche Färbung von den Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen.

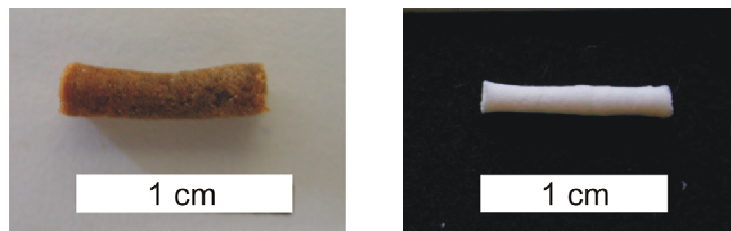


Abbildung 6-11: Fotos eines quervernetzten Chitosan-Hydroxylapatit-Komposites (links) und eines Chitosan-Hydroxylapatit-Komposites (rechts).

Die Infrarot-Spektren des quervernetzten Chitosans und des unbehandelten Chitosan weisen im Bereich zwischen 1700 und 1500 cm^{-1} charakteristische Absorptionsbanden, die z. T. dicht beieinander liegen und eine eindeutige Zuordnung erschweren (siehe Tabelle 6-4). Das Infrarot-Spektrum des quervernetzten Chitosans zeigt eine Absorptionsbande bei 1654 cm^{-1} , die von der (C-N)-Valenzschwingung, der (C=N)-Deformationsschwingung oder der Amid I-(C=O)-Valenzschwingung hervorgerufen werden kann (Abb. 6-12). Die (N-H)-Valenzschwingung der (-NH-R)-Gruppe des Halbaminals deutet sich bei 1565 cm^{-1} an. Die (N-H)-Deformationsschwingung der Aminogruppe bei 1594 cm^{-1} ist nur im Chitosan eindeutig zu erkennen. Diese Ergebnisse deuten auf eine Quervernetzung der Aminogruppe unter Bildung eines Halbaminals bzw. eines Imins hin.

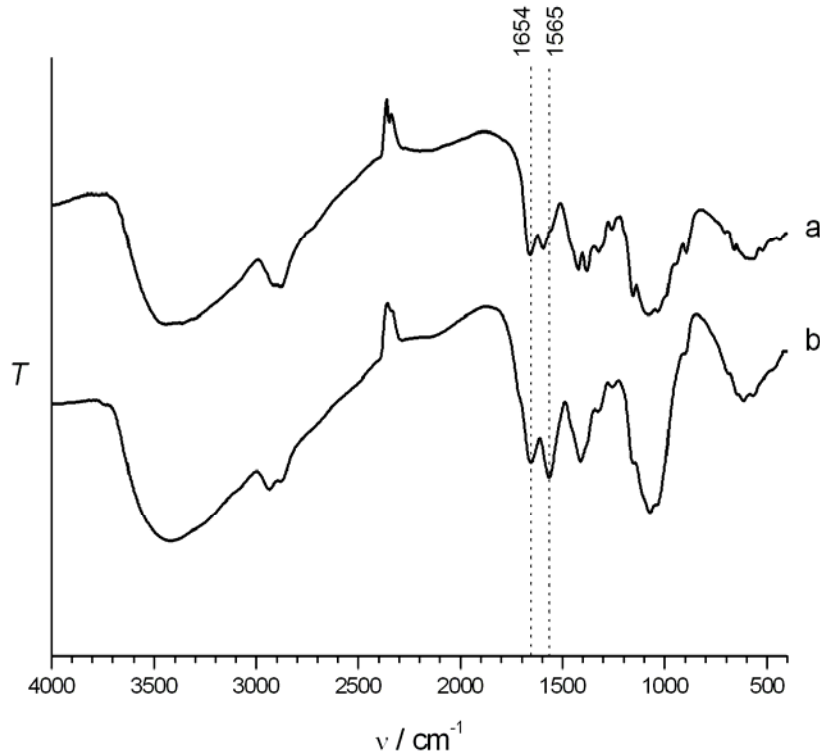


Abbildung 6-12: Infrarot-Spektren von unbehandeltem (a) und quervernetztem (b) Chitosan.

Die Absorptionsbanden des quervernetzten Chitosan finden sich zusammen mit denen des Hydroxylapatits in den Infrarot-Spektren der Komposite wieder (Abb. 6-13, Tabelle 6-4). Die unterschiedlichen Massenanteile an quervernetztem Chitosan und Hydroxylapatit spiegeln sich in den Intensitätsverhältnissen wider. Im Vergleich zu der $\nu_3(\text{P-O})$ -Valenzschwingung bei etwa 1033 cm^{-1} sind die Banden der Iminschwingungen, der (N-H)-Valenzschwingung des Halbaminals sowie die Bande der (C-H)-Deformationsschwingung bei 1653 cm^{-1} , 1569 cm^{-1} bzw. 1415 cm^{-1} in den Kompositen mit einem theoretisch berechneten organischen Massenanteil von 75 % stärker ausgeprägt. Wie in Tabelle 6-4 deutlich wird, ist die Zuordnung der Banden im Bereich zwischen 1500 cm^{-1} und 1660 cm^{-1} allerdings schwierig, da die Banden der einzelnen Schwingungen dicht beieinander liegen.

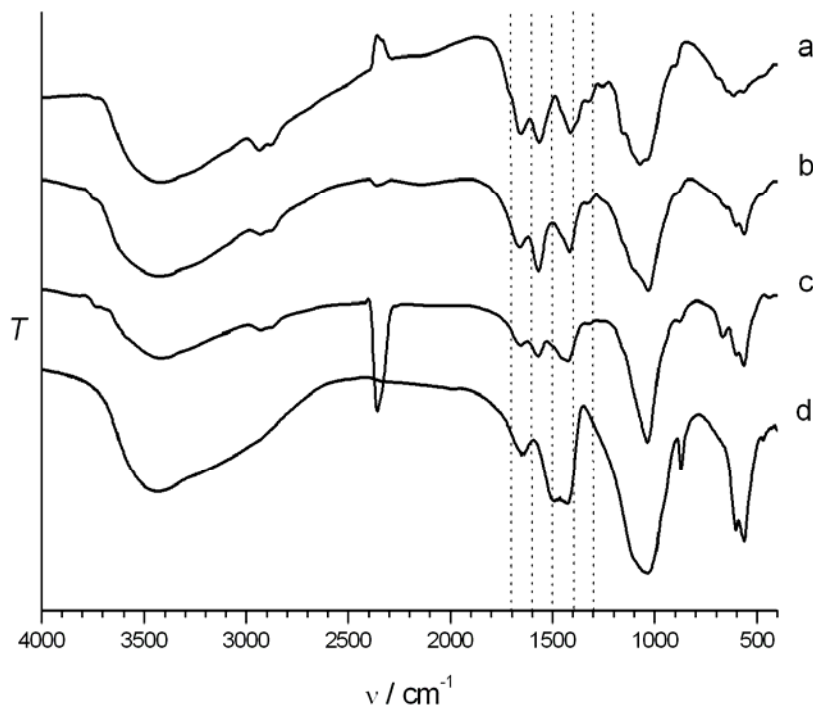


Abbildung 6-13: Infrarot-Spektren der quervernetzten Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite. (a) 100 m-% quervernetztes Chitosan, (b) 75/25 m-% quervernetztes Chitosan/Hydroxylapatit, (c) 50/50 m-% quervernetztes Chitosan/Hydroxylapatit, (d) 100 m-% Hydroxylapatit.

Tabelle 6-4: Ausgewählte Absorptionsbanden eines quervernetzten Chitosan-Hydroxylapatit-Komposites im Vergleich zu den reinen Komponenten und zu Literaturdaten. CQ: quervernetztes Chitosan; HAp: Hydroxylapatit; k. A.: keine Angabe; sh: Schulter

CQ/HAp [YZSD00]	CQ/HAp 75/25 m-%	CQ	Chitosan	Schwingungstyp
ν / cm^{-1}	ν / cm^{-1}	ν / cm^{-1}	ν / cm^{-1}	
k. A.	~ 2930	2935	~ 2900	$\nu(\text{C-H})$
1655	1653	1654		$\delta(\text{C=N})$
1652	1653	1654	1655	$\nu(\text{C-N})$
1650				$\nu(\text{C=O})$, Amid I
1589	1594	-	1575	$\delta(\text{N-H})$, Amin
1564	1569	1565		$\nu(\text{N-H})$, Halbaminale
k. A.	-	-	1536	$\delta(\text{N-H})$, Amid II
k. A.	1440, 1424		-	$\nu_3(\text{C-O})$, Carbonat
k. A.	1415	1410		$\delta(\text{C-H})$
1100	~ 1100(sh)	1070	1055	Zuckerstruktur
1092, 1043	1029	-	-	$\nu_3(\text{P-O})$
962	~ 960 (sh)	-	-	$\nu_1(\text{P-O})$
875	871	-	-	$\nu_2(\text{C-O})$, Carbonat
603, 567	603, 565			$\nu_4(\text{P-O})$

Die Röntgendiffraktogramme in Abbildung 6-14 zeigen die Reflexe des Hydroxylapatits sowie den sehr breiten Reflex des quervernetzten Chitosan im Bereich von 18 bis 34 °2θ. Die Reflexe des Hydroxylapatit sind hier breiter und schwächer als bei den Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen, die in Kapitel 6.2.1 vorgestellt wurden. Dies deutet auf eine geringere Kristallinität hin. Die Ergebnisse der Infrarot-Spektroskopie und der Röntgenbeugungsuntersuchungen lassen auf das Vorliegen eines Kompositmaterials schließen. Eine Aussage über das tatsächliche Massenverhältnis kann mit Hilfe der thermogravimetrischen Analyse getroffen werden.

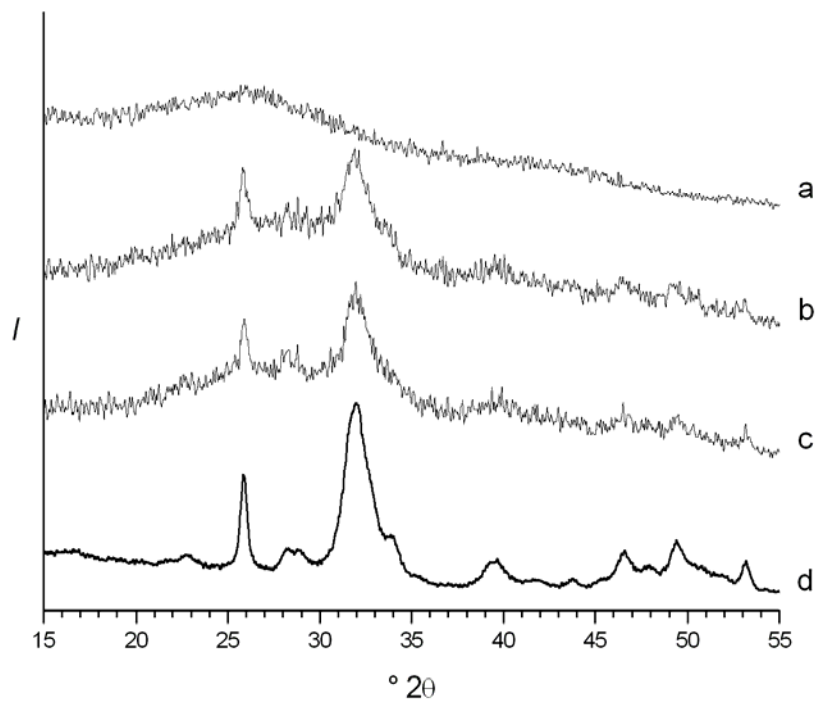


Abbildung 6-14: Röntgendiffraktogramme der quervernetzten Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite. (a) 100 m-% quervernetztes Chitosan/Hydroxylapatit, (b) 75/25 m-% quervernetztes Chitosan/Hydroxylapatit, (c) 50/50 m-% quervernetztes Chitosan/Hydroxylapatit, (d) 100 m-% Hydroxylapatit.

Die Kurven der thermogravimetrischen Messung eines quervernetzten Chitosan-Hydroxylapatit-Komposites im Vergleich zu unbehandeltem und quervernetztem Chitosan sind in Abbildung 6-15 wiedergegeben. Die abgebildeten Thermoanalysen zeigen im Bereich von Raumtemperatur bis 150 °C einen Massenverlust auf, der durch die Abgabe von Restwasser verursacht wird. Der Restwassergehalt ist bei quervernetztem Chitosan deutlich höher als beim Komposit und beim unbehandelten Chitosan. Der auftretende Massenverlust zwischen 150 °C und etwa 750 °C deutet auf den Kompositcharakter des Materials hin. In diesem Temperaturbereich findet die Zersetzung des Chitosans [YTFK00] [QWA00] und auch des quervernetzten Chitosans statt. Der Massenverlust dieses Bereich wird – wie bereits bei den Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen – für die Berechnung des Organikanteils des Komposites verwendet. Der Massenanteil des Hydroxylapatites ergibt sich aus der Restmasse. In Tabelle 6-5 sind die Massenverluste und das experimentell ermittelte Massenverhältnis eines quervernetzten Chitosan-Hydroxylapatit-Komposit aufgeführt. Die Ergebnisse der Thermoanalyse bestätigen die Bildung eines Kompositmaterials. Eine Aussage darüber, ob unbehandeltes oder quervernetztes Chitosan im Komposit vorliegt, kann mit diesen Messungen allerdings nicht getroffen.

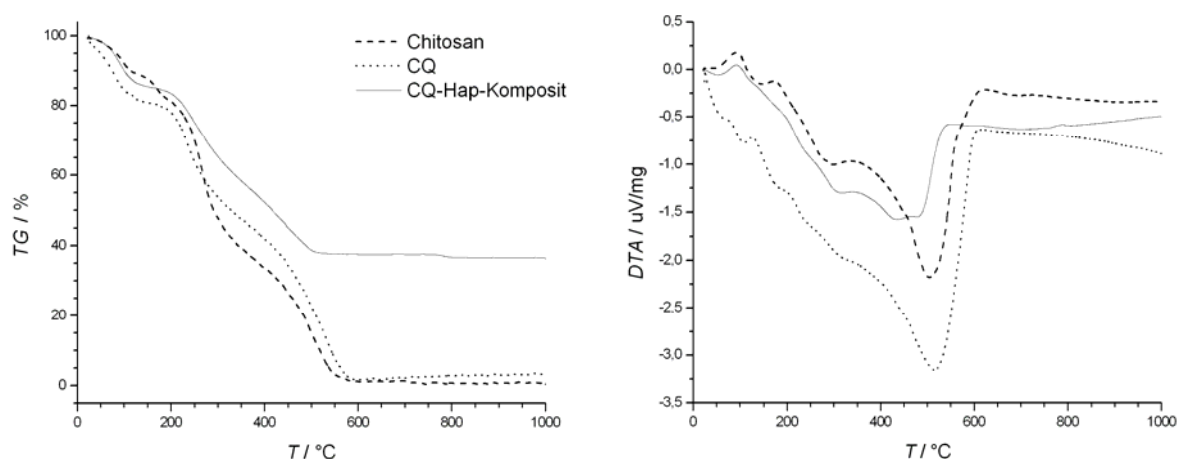


Abbildung 6-15: Thermoanalysediagramme von Chitosan, quervernetztem Chitosan und einem quervernetzten Chitosan-Hydroxylapatit-Komposit (CQ-HAp-Komposit).

Tabelle 6-5: Massenverluste und Massenverhältnis eines quervernetzten Chitosan-Hydroxylapatit-Komposites gemäß der Thermoanalyse. CQ: quervernetztes Chitosan; HAp: Hydroxylapatit.

	Wasser / m-% (1. Stufe 25°C-130°C)	Organik / m-% (2. Stufe 130°C-750°C)	HAp / m-%	CQ/HAp / m-% (experimentelles Massenverhältnis)
Chitosan	9.9	88.1	-	-
CQ	18.8	79.4	-	-
CQ-HAp-Komposit	7.5	42.3	50.2	45.7/54.3

Charakteristische rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des quervernetzten Chitosans und der Komposite sind in Abbildung 6-16 abgebildet. Im Gegensatz zu dem unbehandelten Chitosan in Abbildung 6-6 zeigt das quervernetzte Chitosan eine relativ glatte Oberfläche. Diese Struktur scheint, wie an der Detailaufnahme in Abbildung 6-16a ersichtlich wird, aus ineinander verschmolzenen Strängen zu bestehen. Die Komposite mit einem Massenverhältnis von 75/25 m-% quervernetztes Chitosan/Hydroxylapatit (Abb. 6-16b) zeichnen sich durch strangartige und „wulstartige“ Bereiche aus. Bei einem geringen Organikanteil treten bevorzugt „wulstartige“ und zum Teil unstrukturierte Morphologien mit Ecken und Kanten auf, die eine gewisse Ähnlichkeit zu der Morphologie des reinen Hydroxylapatit aufweisen.

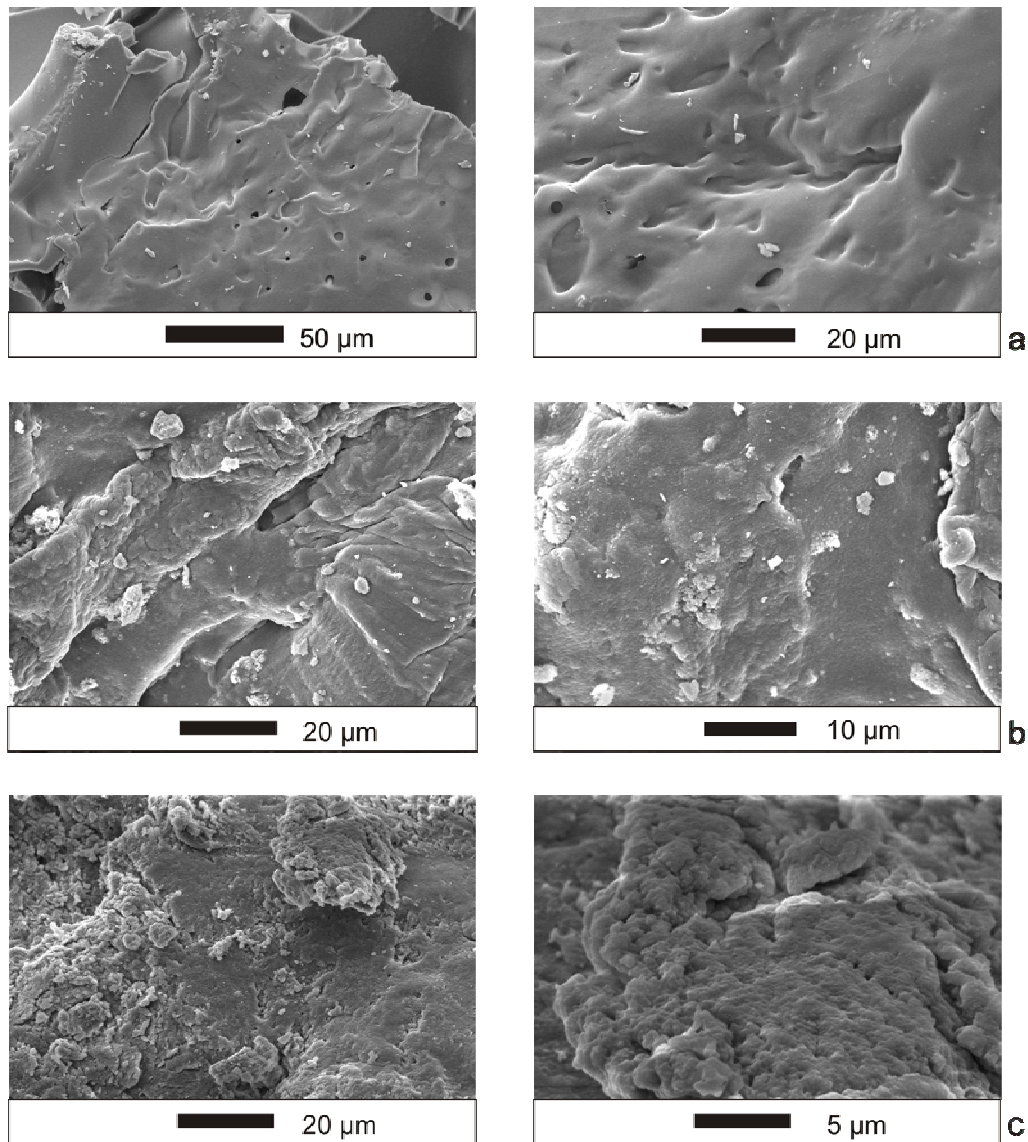


Abbildung 6-16: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von quervernetztem Chitosan (a) und quervernetztem Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen. (b) 75/25 m-% quervernetztes Chitosan/Hydroxylapatit; (c) 50/50 m-% quervernetztes Chitosan/Hydroxylapatit.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen den Kompositcharakter des Materials bestätigen. Mittels Infrarot-Spektroskopie und Röntgenpulverdiffraktometrie kann die Bildung eines carbonathaltigen Hydroxylapatit nachgewiesen werden. Einen Hinweis auf das Vorliegen von quervernetzten Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen liefern die Infrarot-Spektren. Zudem weisen die Kompositmaterialien eine rötlich-braune Färbung auf, die auch bereits bei lediglich quervernetztem Chitosan zu beobachten ist, so dass vermutlich quervernetztes Chitosan im Komposit vorliegt.

6.2.4 Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposite

In diesem Kapitel werden zunächst die Ergebnisse vorgestellt, die an den Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Kompositen erhalten wurden, die durch eine Co-Präzipitation hergestellt wurden. Anschließend werden diese mit jenen verglichen, die an Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Kompositen bestimmt wurden, die durch eine pH-Wert-Erniedrigung einer Calciumhydroxidsuspension mit Phosphorsäure dargestellt wurden.

Die hier beschriebenen Komposite wurden nach dem Prinzip der Co-Präzipitation dargestellt. Die Ausfällung erfolgte über eine pH-Wert-Erhöhung in Verbindung mit der Zugabe von Aceton. Die Infrarot-Spektren in Abbildung 6-17 zeigen sowohl charakteristische Absorptionsbanden des Hydroxylapatits als auch jene der Hyaluronsäure. Die Werte für ausgewählte Absorptionsbanden sind in Tabelle 6-6 aufgeführt. Die Banden bei etwa 2920 cm^{-1} und 1653 cm^{-1} sind auf die (C–H)-Valenzschwingung und die Amid I-(C=O)-Valenzschwingung zurückzuführen. Die Bande der Amid II-(N–H)-Deformationsschwingung ist bei 1562 cm^{-1} zu erkennen. Die breite Bande in dem Bereich von ungefähr 900 bis 1200 cm^{-1} wird von der $\nu_3(\text{P–O})$ -Valenzschwingung, der totalsymmetrischen $\nu_1(\text{P–O})$ -Valenzschwingung und den Schwingungen der Zuckerstruktur hervorgerufen. Die asymmetrische $\nu_4(\text{P–O})$ -Valenzschwingungen bei 602 cm^{-1} und 564 cm^{-1} deuten auf einen Hydroxylapatit mit einer erhöhten Kristallinität hin. Die Banden der $\nu_3(\text{C–O})$ -Valenzschwingung bei etwa 1486 cm^{-1} , bzw. 1417 cm^{-1} und der $\nu_2(\text{C–O})$ -Deformationsschwingung bei 869 cm^{-1} lassen auf einen Einbau von Carbonationen in das Kristallgitter des Hydroxylapatits schließen. Die Bande bei 1417 cm^{-1} kann aber auch von der (C–H)-Deformationsschwingung verursacht werden. Aus den Infrarot-Spektren wird klar, dass es sich um ein carbonathaltiges Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposit handelt.

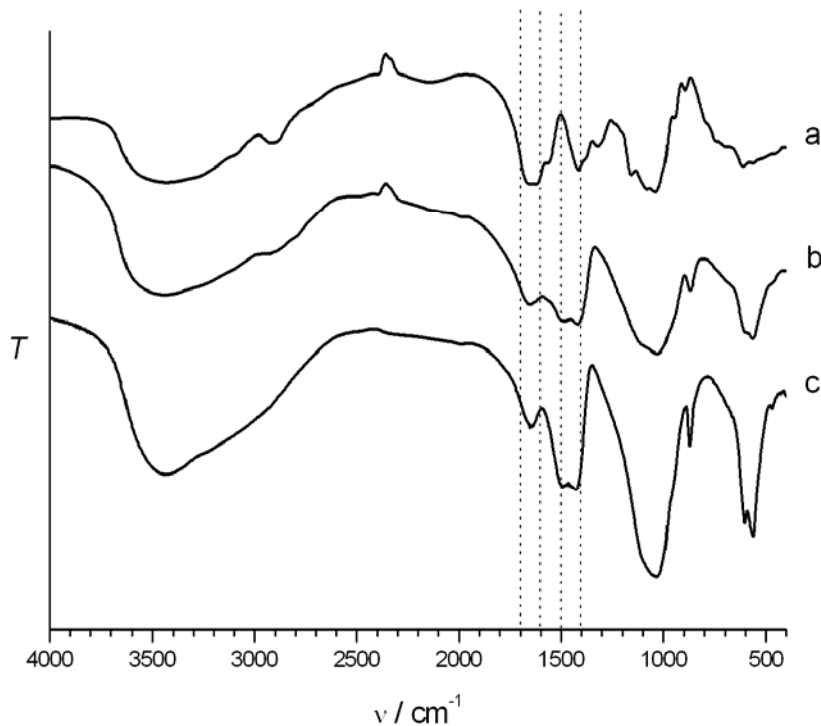


Abbildung 6-17: Infrarot-Spektren von reiner Hyaluronsäure (a), einem Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposites (b) und reinem Hydroxylapatit (c).

Tabelle 6-6: Ausgewählte Absorptionsbanden eines Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposites im Vergleich zu den reinen Komponenten. Hya: Hyaluronsäure, HAp: Hydroxylapatit, sh: Schulter

Hya/HAp	Hyaluronsäure	HAp	Schwingungstyp
75/25 m-%			
ν / cm^{-1}	ν / cm^{-1}	ν / cm^{-1}	
~ 2930	~2920		$\nu(\text{C-H})$
1653	1654		$\nu(\text{C=O})$, Amid I
1562	1559		$\delta(\text{N-H})$, Amid II
1486, 1417		1430, 1418	$\nu_3(\text{C-O})$, Carbonat
1417	1415		$\delta(\text{C-H})$,
~ 1100(sh)	1070		Zuckerstruktur
1029		1035	$\nu_3(\text{P-O})$
-	-	~ 960 (sh)	$\nu_1(\text{P-O})$
869		865	$\nu_2(\text{C-O})$, Carbonat
602, 564		601, 565	$\nu_4(\text{P-O})$

Das Röntgendiffraktogramm eines Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposites zeigt das charakteristische Beugungsmuster des Hydroxylapatits (Abb. 6-18). Der breite Reflex der Hyaluronsäure ist nicht zu erkennen. Die Reflexe des Hydroxylapatits sind etwas schärfer als die der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite, was auf eine höhere Kristallinität hindeutet.

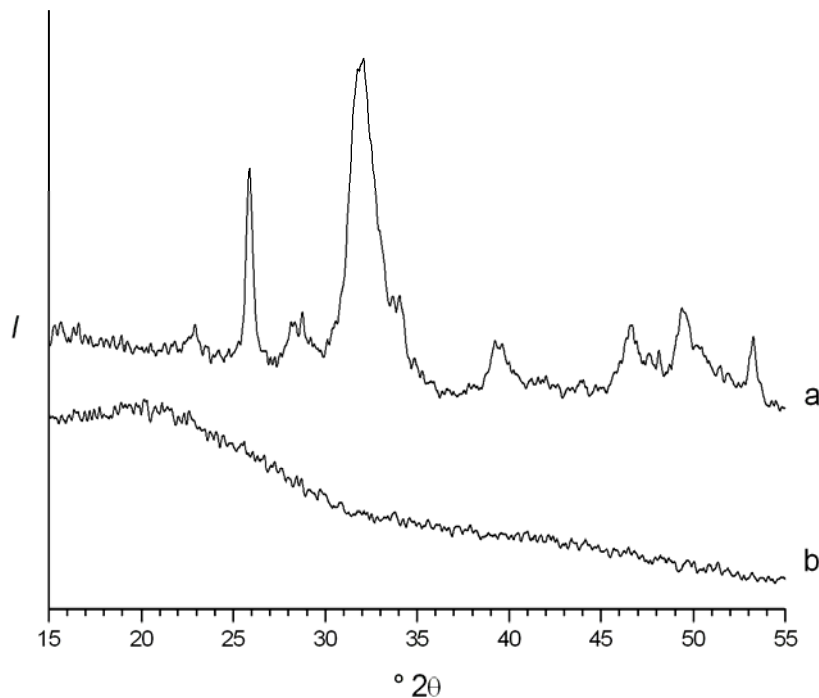


Abbildung 6-18: Röntgendiffraktogramme eines Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposites (a) im Vergleich zur reiner Hyaluronsäure (b).

Die Thermoanalysen in Abbildung 6-19 lassen ebenfalls auf das Vorliegen eines Komposites schließen, wie der Vergleich mit den reinen Komponenten zeigt. Das Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposit weist eine endotherme Stufe im Temperaturbereich von Raumtemperatur bis etwa 150 °C auf, die durch den Verlust von Wasser verursacht wird. Der Restwassergehalt der Hyaluronsäure von 24.3 % ist auf das hohe Wasserbindungsvermögen des Polysaccharids zurückzuführen. Im Gegensatz zu den in der Literatur genannten Wassergehalten von bis zu 40 % [IMT01] enthalten diese Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposite nur maximal 10 % Restwasser. Die Zersetzung der Hyaluronsäure findet im Temperaturbereich zwischen 150 °C und 750 °C in drei exothermen Stufen statt. Die DTA-Kurve der Hyaluronsäure zeigt deutliche Minima bei etwa 250 °C, 325 °C und 600 °C. Die

Minima des Komposites sind nicht so stark ausgeprägt und in ihrer Lage verschoben. Dies kann auf den geringen Massengehalt an Hyaluronsäure zurückgeführt werden. Für die Ermittlung des Hyaluronsäuregehalts wird der Temperaturbereich oberhalb 150 °C herangezogen. Die Massenverluste sowie das experimentell ermittelte Massenverhältnis eines Komposites sind in Tabelle 6-7 aufgeführt.

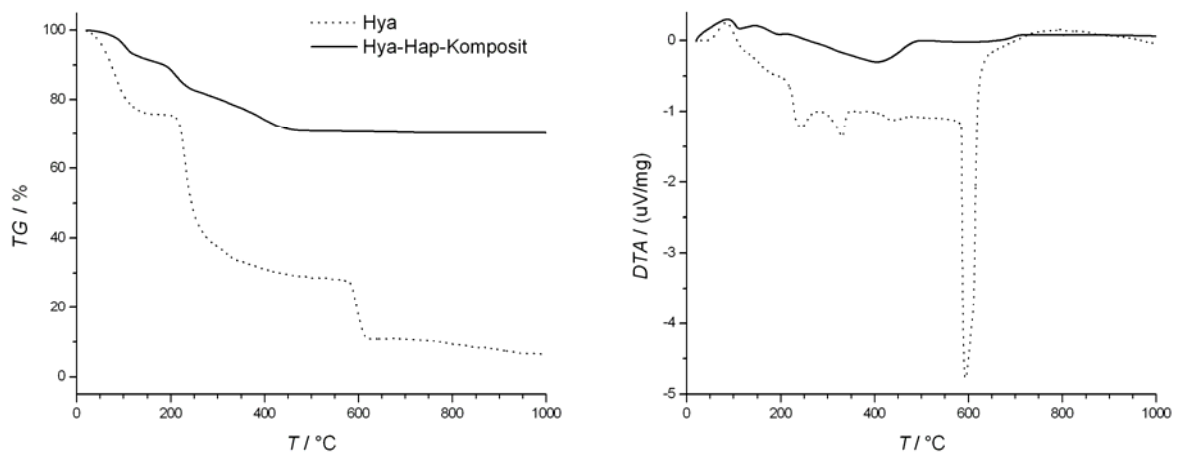


Abbildung 6-19: Thermoanalytische Diagramme eines Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposites im Vergleich zur Hyaluronsäure (Hya).

Tabelle 6-7: Massenverluste und Massenverhältnisse eines Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposites gemäß der Thermoanalyse. Hya: Hyaluronsäure; HAp: Hydroxylapatit.

	Wasser / m-% (1.Stufe 25°C-150°C)	Hya / m-% (2. Stufe 150°C-750°C)	HAp / m-%	Hya/HAp / m-% (experimentelles Massenverhältnis)
Hya	24.3	68.9	-	-
Hya-HAp-Komposit (25/75 m-%)	7.5	21.8	69.7	23.6/75.4

Einen Einblick in die Morphologie der Hyaluronsäure und deren Komposite bieten die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 6-20. Die Hyaluronsäure weist zum einen faserige Bereiche und zum anderen Bereiche mit sphärischen Partikeln und deren Aggregaten auf (Abb. 6-20a). Die Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposite zeigen dagegen Morphologien auf, die sowohl als „wolkenartig“ als auch als „wulstartig“ beschrieben werden können. Zudem zeichnet sich eine charakteristische faserige Oberflächenstruktur ab, die sich aber deutlich von den Fasern der reinen Hyaluronsäure unterscheidet.

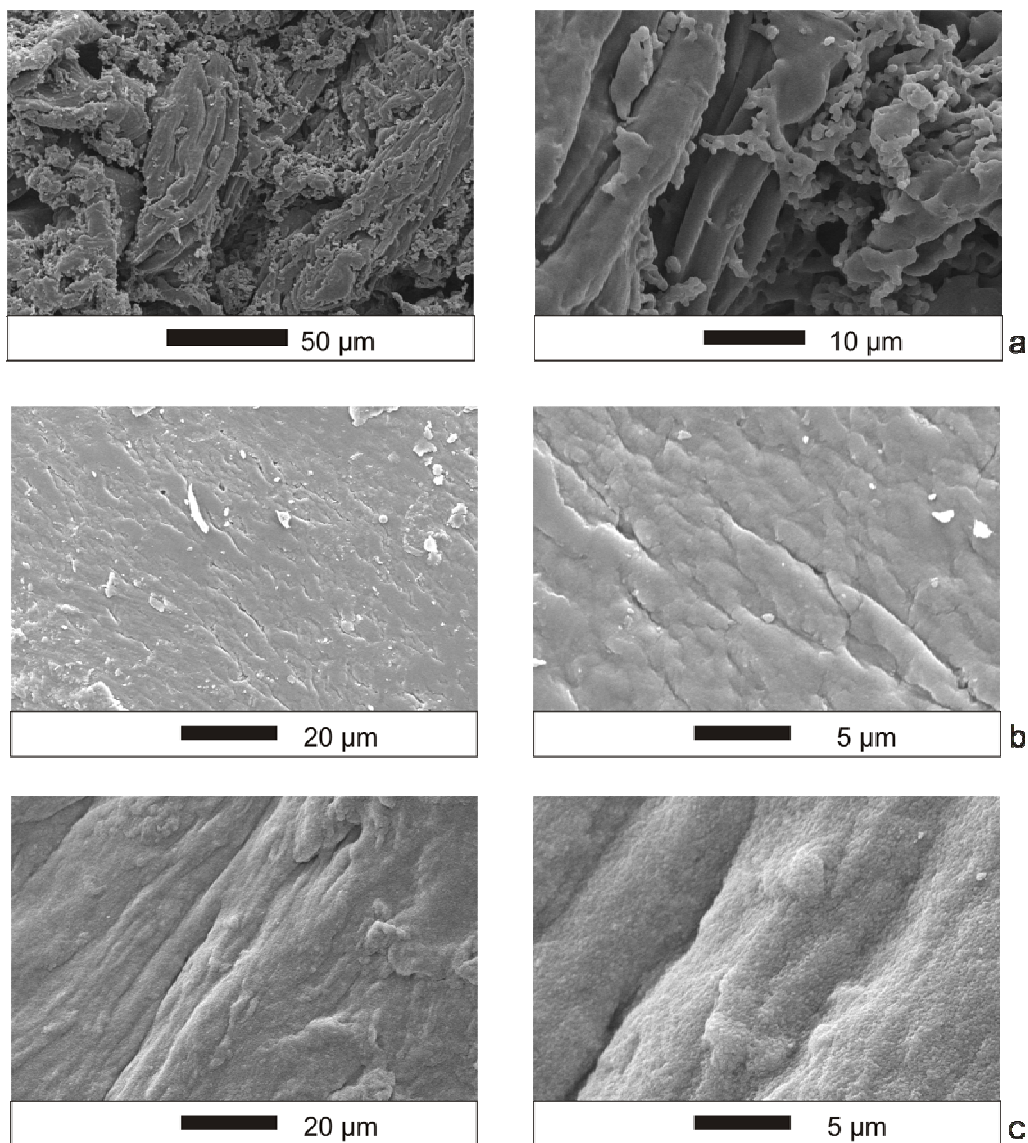


Abbildung 6-20: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Hyaluronsäure (a) und Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Kompositen. (b) 75/25 m-% Hyaluronsäure/Hydroxylapatit; (c) 25/75 m-% Hyaluronsäure/Hydroxylapatit.

Die unterschiedlichen Morphologien im Vergleich zu der reinen Hyaluronsäure und dem reinen Hydroxylapatit (Abb. 6-6, Kapitel 6.2.1) verdeutlichen den Kompositcharakter der Materialien. Die gemeinsame Ausfällung der Hyaluronsäure und des Hydroxylapatits kann zudem durch die Ergebnisse der Infrarot-Spektroskopie und der Thermoanalyse bestätigt werden, während die Röntgendiffraktogramme lediglich die Beugungsreflexe des Hydroxylapatit zeigen.

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse vorgestellt, die an Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Kompositen erhalten wurden, die in Anlehnung an eine Vorschrift von Ikoma et al. [IMT00] durch eine pH-Wert-Erniedrigung einer Calciumhydroxidsuspension mit Phosphorsäure synthetisiert wurden. Anzumerken ist, dass die Hyaluronsäure bei den eingestellten pH-Bereichen relativ gut löslich ist. Es ist daher fraglich, ob diese Methode zur Herstellung der oben genannten Komposite geeignet ist. Typische Infrarot-Spektren der Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposite im Vergleich zu den reinen Komponenten sind in Abbildung 6-21 dargestellt. Die Banden der $\nu_3(\text{P-O})$ -Valenzschwingung bei 1033 cm^{-1} sowie der asymmetrischen $\nu_4(\text{P-O})$ -Valenzschwingung bei 602 cm^{-1} und 561 cm^{-1} sind deutlich zu erkennen. Neben den Schwingungen des Hydroxylapatits zeigen sich die Banden der $\nu_3(\text{C-O})$ -Valenzschwingung bei 1462 cm^{-1} und 1424 cm^{-1} und jene der $\nu_2(\text{C-O})$ -Deformationsschwingung bei 872 cm^{-1} . Wie aus den Spektren der Hyaluronsäure deutlich wird, liegen deren charakteristischen Schwingungen ebenfalls in diesen Bereichen, so dass eine genaue Zuordnung der Banden schwierig ist. Es ist anzunehmen, dass unter den Apatit- bzw. Carbonatbanden die Absorptionsbanden der Hyaluronsäure verdeckt sind. Die breite Bande bei ungefähr 1650 cm^{-1} kann auf die Amid I-(C=O)-Valenzschwingung der Hyaluronsäure zurückgeführt werden. Die (N-H)-Deformationsschwingung deutet sich bei ungefähr 1589 cm^{-1} als Schulter an. Die Banden der (C-H)-Valenzschwingung im Bereich von 2950 cm^{-1} bis 2850 cm^{-1} sind nur sehr schwach ausgeprägt. Diese Absorptionsbanden können als Hinweis auf den Kompositcharakter der Materialien verstanden werden. Allerdings muss diese Interpretation mit Vorsicht genossen werden, da die Intensitäten der Banden sehr gering sind und die Hyaluronsäure mittels Röntgendiffraktometrie prinzipiell nicht nachgewiesen werden kann. Die Röntgendiffraktogramme in Abbildung 6-21 weisen lediglich die Beugungsreflexe des Hydroxylapatits auf, die auf nanokristallinen Apatit schließen lassen. Die Reflexe sind im Vergleich zu jenen, die an durch Co-

Präzipitation hergestellten Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Kompositen gemessen wurden, etwas schmaler, was auf eine erhöhte Kristallinität hindeutet. Ein weiterer Hinweis auf eine höhere Kristallinität ist die Aufspaltung der $\nu_4(\text{P-O})$ -Valenzschwingung bei 602 cm^{-1} und 561 cm^{-1} , die bei den hier beschriebenen Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Kompositen deutlich ausgeprägter ist.

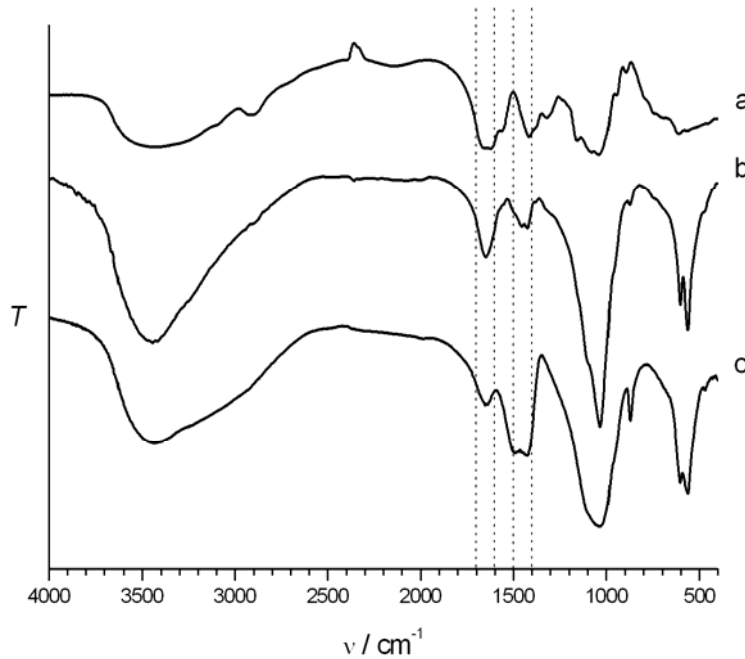


Abbildung.6-21: Infrarot-Spektrum eines Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposites (b) im Vergleich zur Hyaluronsäure (a) und zum Hydroxylapatit (c).

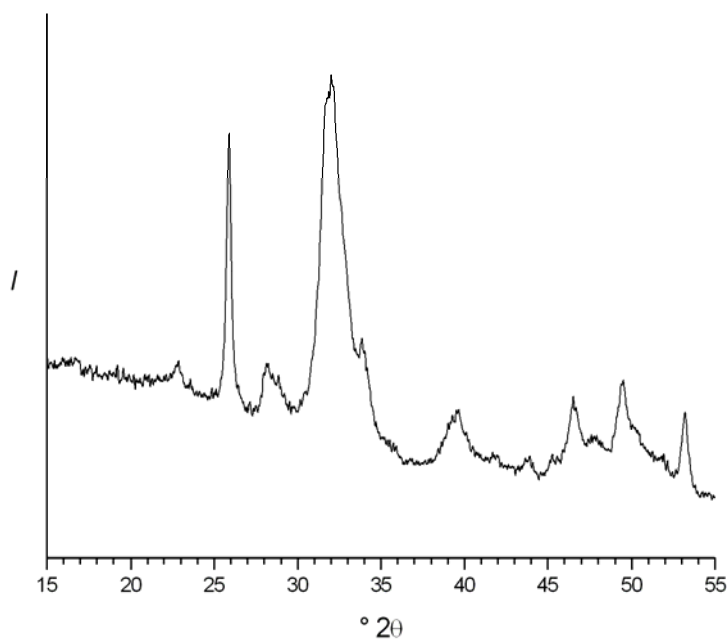


Abbildung 6-22: Röntgendiffraktogramm eines Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposites.

Die thermogravimetrischen Messungen¹ der Komposite und der Hyaluronsäure liefern einen weiteren Hinweis auf das Vorliegen eines Kompositmaterials. Die Thermoanalysen in Abbildung 6-23 zeigen Massenverluste in den Temperaturbereichen von Raumtemperatur bis etwa 175 °C und von 175 °C bis 850 °C. Diese Stufen werden von der Abgabe des Wassers und von der Zersetzung der Hyaluronsäure verursacht. Der Verlauf der TG-Kurven zeigt eine gute Übereinstimmung mit jenen, die an Hyaluronsäure-Kompositen gemessen wurden, die durch Co-Präzipitation hergestellt wurden (Abb. 6-19). Der Gehalt des Restwassers in der Probe liegt bei 10,5 m-%. Im Vergleich zur Literatur [IMT01] und unter Berücksichtigung des hohen Wasserbindungsvermögens sind diese Wassergehalte sehr gering. Der aus der zweiten Stufe ermittelte Massenanteil an Hyaluronsäure beträgt 11,7 m-%. Aus diesen Massenverlusten resultiert ein Hydroxylapatitgehalt von 77,9 m-% und ein Massenverhältnis Hyaluronsäure/Hydroxylapatit von 13/87 m-% (Tabelle 6-8).

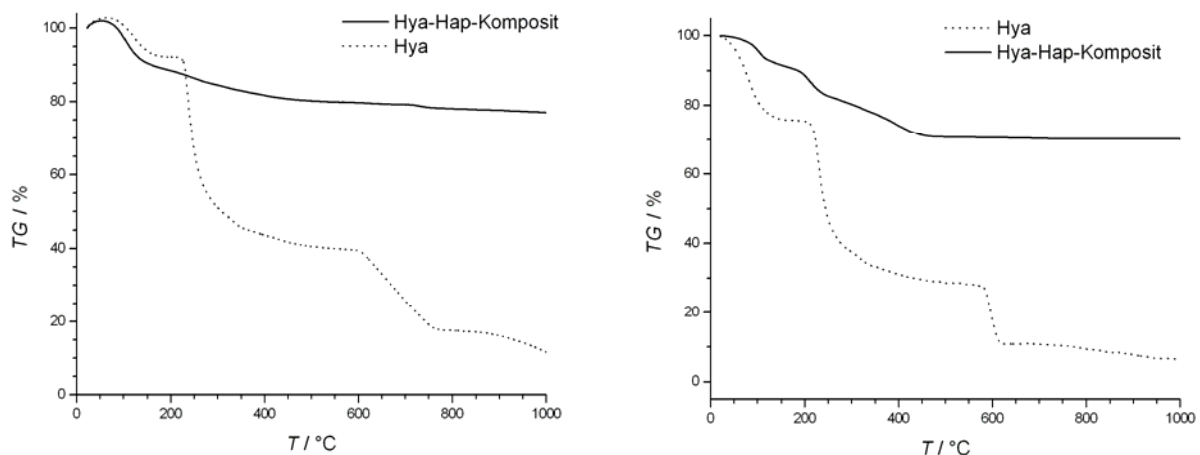


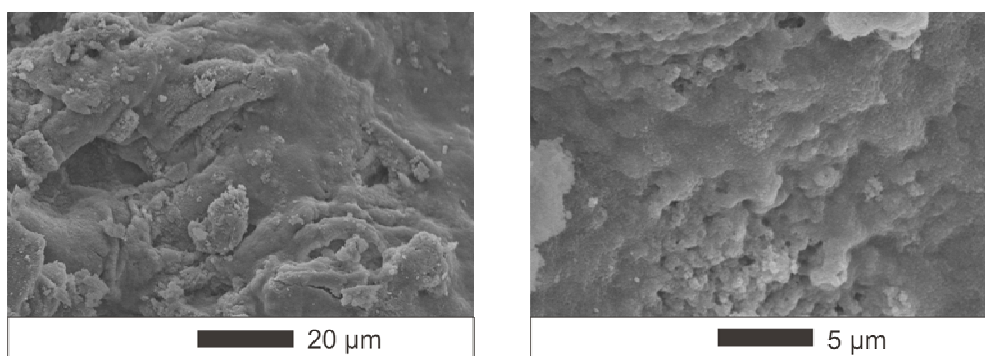
Abbildung 6-23: Thermoanalytische Diagramme der Hyaluronsäure und eines Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposites (links), das mit einer Calciumhydroxidsuspension hergestellt wurde, im Vergleich zu einem Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposit, das durch Co-Präzipitation dargestellt wurde (rechts).

¹ Diese thermogravimetrischen Messungen wurden an einer Thermowaage L81 der Firma Linsei mit einer Aufheizrate von 5 °C pro Minute durchgeführt. Als Referenzmaterial diente α -Al₂O₃.

Tabelle 6-8: Massenverluste und Massenverhältnisse eines Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposites gemäß der Thermoanalyse. Hya: Hyaluronsäure; HAp: Hydroxylapatit.

	Wasser / m-% (1.Stufe 25°C-175°C)	Hya / m-% (2. Stufe 175°C-900°C)	HAp / m-%	Hya/HAp / m-% (experimentelles Massenverhältnis)
Hya	7.6	81.5	-	-
Hya-HAp- Komposit	10.5	11.7	77.8	13/87

Typische rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposite sind in Abbildung 6-24 wiedergegeben. Neben strangartigen Bereichen, die auf den Einbau der Hyaluronsäure hindeuten, treten auch wolkenartige Bereiche auf. Diese wolkenartige Morphologie setzt sich aus sphärischen Partikeln zusammen, wie an der Detailaufnahme ersichtlich ist. Im Gegensatz zu den Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Kompositen, die durch Co-Präzipitation hergestellt wurden (Abb. 6-20), sind diese wolkenartigen Bereiche hügeliger und bilden nur teilweise eine geschlossene „Wolkendecke“. Eine gewisse Ähnlichkeit kann aber dennoch beobachtet werden, was einen Hinweis auf Kompositcharakter des Materials liefert.

**Abbildung 6-24:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposites.

Aus den Ergebnissen der Infrarot-Spektroskopie, der Thermoanalyse und der Rasterelektronenmikroskopie kann zusammenfassend geschlossen werden, dass die Hyaluronsäure gemeinsam mit dem carbonathaltigen Hydroxylapatit ausfällt, obwohl sie unter diesen Reaktionsbedingungen relativ gut löslich ist.

6.2.5 Hyaluronsäure-Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite

Die Hyaluronsäure-Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite wurden durch eine pH-Wert-Erniedrigung einer Calciumhydroxidsuspension mit Phosphorsäure synthetisiert (siehe Kapitel 6.1.5). Wie bereits bei der Charakterisierung der Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposite, die auf analoge Weise hergestellt wurden, angemerkt wurde, ist die Hyaluronsäure bei den eingestellten pH-Werten der Reaktionsmischung relativ gut löslich. Dagegen fällt Chitosan bereits vor Zugabe der in der Phosphorsäure in der Calciumhydroxidsuspension aus.

In Abbildung 6-25 ist ein typisches Infrarot-Spektrum eines Hyaluronsäure-Chitosan-Hydroxylapatit-Komposites wiedergegeben. Zum Vergleich sind die Infrarot-Spektren der reinen Komponenten beigefügt. Wie schon bei den Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Kompositen, die nach dieser Methode synthetisiert wurden (Abb. 6-21), können auch in diesem Schwingungsspektrum charakteristische Banden des carbonathaltigen Hydroxylapatits und der Polysaccharide ausgemacht werden; allerdings sind hier die Absorptionsbanden der Polysaccharide etwas stärker ausgeprägt. Die Banden der (C-H)-Valenzschwingung im Bereich von 2950 cm^{-1} bis 2850 cm^{-1} , die der Amid I-(C=O)-Valenz- und Amid II-(N-H)-Deformationsschwingung bei 1652 cm^{-1} und 1564 cm^{-1} sowie die Banden der (N-H)-Deformationsschwingung einer Aminogruppe bei ungefähr 1587 cm^{-1} können einerseits von der Hyaluronsäure, andererseits vom Chitosan bzw. N-acetylierten Chitin hervorgerufen werden. Eine Aussage, ob Chitosan und Hyaluronsäure oder lediglich eines der beiden Polysaccharide in dem carbonathaltigen Hydroxylapatit eingeschlossen sind, kann daher nicht getroffen werden.

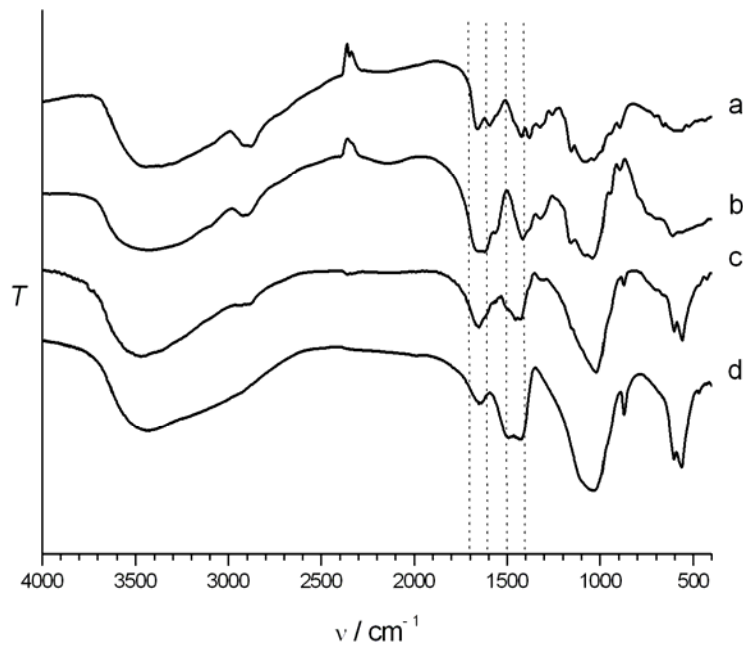


Abbildung 6-25: Infrarot-Spektren von Chitosan (a), Hyaluronsäure (b), einem Hyaluronsäure-Chitosan-Hydroxylapatit-Komposites (c) und vom Hydroxylapatit (d).

Das Röntgendiffraktogramm in Abbildung 6-26 bestätigt die Bildung eines nanokristallinen Hydroxylapatits, kann aber keinerlei Auskunft über eingebaute Polysaccharide geben. Die Röntgenbeugungsreflexe des Hydroxylapatit sind jedoch deutlich breiter als jene der Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposite, die nach der gleichen Methode hergestellt wurden.

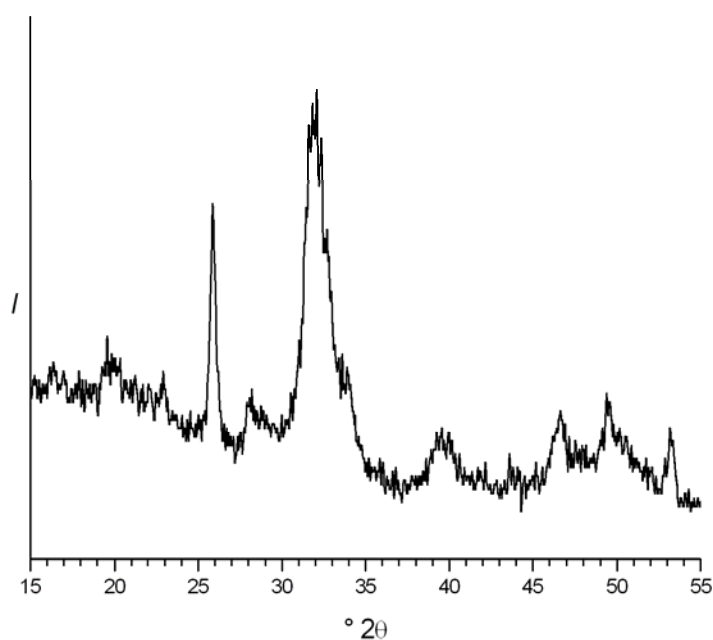


Abbildung 6-26: Röntgendiffraktogramm eines Hyaluronsäure-Chitosan-Hydroxylapatit-Komposites.

Die Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung lassen wiederum auf das Vorliegen eines Kompositmaterials schließen (Abb. 6-27). Die Hyaluronsäure-Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite weisen unterschiedlich strukturierte Bereiche in der Oberflächenmorphologie auf. Es gibt zum einen „strangartige“ und zerklüftete, „wulstartige“ Bereiche, die mit jenen der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite (Abb. 6-7) vergleichbar sind. Zum anderen treten Bereiche auf, die am besten als „wolkenartig“ beschrieben werden können. Eine ähnliche Morphologie war bereits in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposite (Abb. 6-20 und Abb. 6-24) und der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite zu erkennen. Die in Abbildung 6-27 gezeigten Morphologien liefern somit keinen Hinweis darüber, ob beide Polysaccharide oder eventuell nur eines der beiden eingebaut wurde.

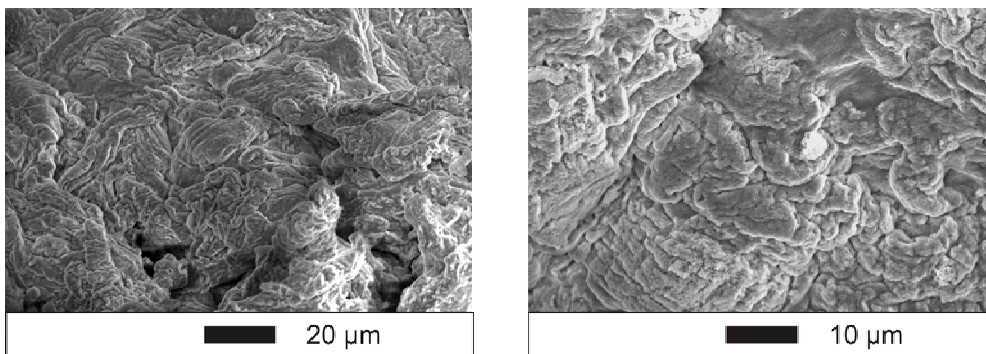


Abbildung 6-27: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Hyaluronsäure-Chitosan-Hydroxylapatit-Komposites.

Zusammenfassend kann aus der strukturanalytischen Charakterisierung festgestellt werden, dass ein organisch-anorganisches Komposit auf Basis von carbonathaltigem Hydroxylapatit gebildet wurde. Die Ergebnisse der Infrarot-Spektroskopie, der Thermoanalyse und der Rasterelektronenmikroskopie lassen allerdings keinen Schluss zu, ob Chitosan und die Hyaluronsäure oder nur eines der beiden Polysaccharide im Komposit vorliegen.

7 Audiologische Untersuchungen an organisch-anorganischen Kompositmaterialien

In diesem Kapitel wird die audiologische Charakterisierung der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite, die durch Co-Präzipitation synthetisiert wurden (siehe Kapitel 6.2.1 und 6.2.1), vorgestellt. Die Evaluierung der akustischen Übertragungseigenschaften der Komposite werden mittels funktionellen Messungen wie Laser-Doppler-Vibrometrie (SLDV) und Multifrequenztympometrie (MFT) in einem mechanischen Mittelohrmodell und in frischen humanen Felsenbeinpräparaten durchgeführt. Die Messungen wurden von Herrn Dipl.-Ing. H. Mojallal und Herrn Dr. med. M. Stieve an der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Medizinischen Hochschule Hannover (Leitung Prof. Dr. T. Lenarz) vorgenommen. In Abbildung 7-1 ist das von Mojallal konzipierte Mittelohrmodell gezeigt [MSKM05] [Moj06]. Dieses Mittelohrmodell ermöglicht eine schnelle und reproduzierbare Evaluierung von kommerziell erhältlichen Mittelohrprothesen und den im Rahmen dieser Doktorarbeit synthetisierten Kompositmaterialien. Mit Hilfe von MFT können die Einflüsse der physikalischen Parameter des Systems (Masse und Steifigkeit) nach Platzierung des Interponats auf die Übertragungseigenschaften bestimmt werden. Dies dient zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse von verschiedenen Implantaten. In Abbildung 7-2 sind die Übertragungsfunktionen unterschiedlicher Materialien mittels LDV-Messung im mechanischen Mittelohrmodell wiedergegeben. Es zeigt sich, dass die synthetisierten Kompositmaterialien ähnlich gute Schallübertragungseigenschaften wie kommerzielle Mittelohrprothesen aufweisen. Eine Gegenüberstellung der kommerziellen Prothesen und der Chitosan-Hydroxylapatite liefert Abbildung 7-3.

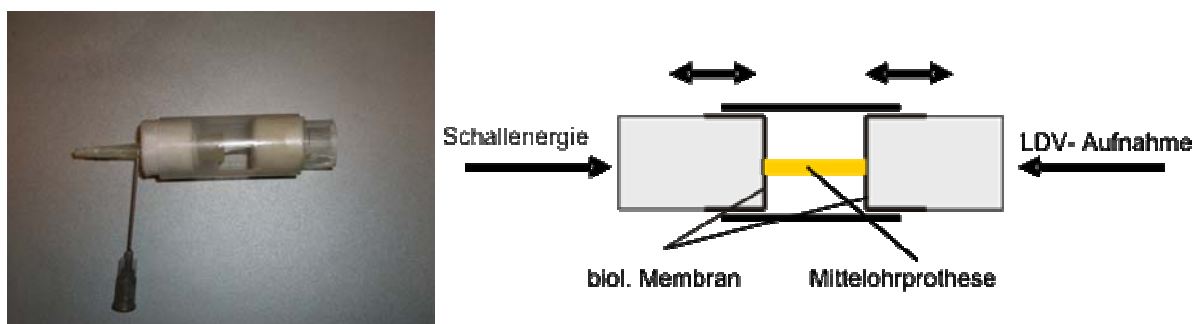


Abbildung 7-1: Foto und Schema des von Mojallal konzipierten Mittelohrmodells ([MSKM05] [Moja]).

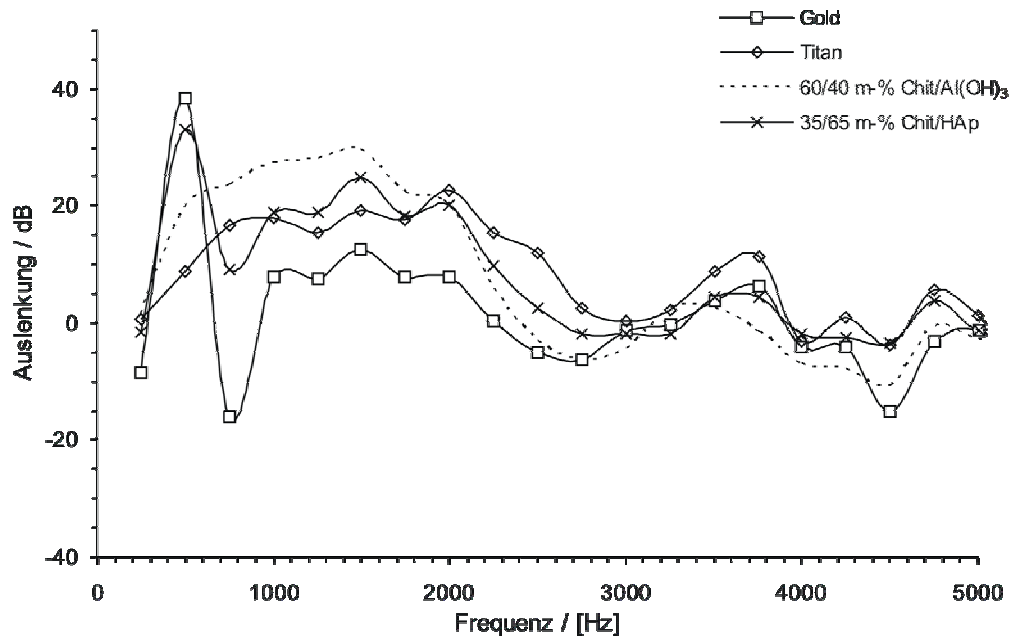


Abbildung 7-2: Übertragungsfunktionen kommerzieller Mittelohrprothesen aus Gold und Titan im Vergleich zu einem Chitosan-Aluminiumhydroxid-Komposit¹ (60/40 m-% Chit/Al(OH)₃) und zu einem Chitosan-Hydroxylapatit-Komposit (35/65 m-% Chit/HAp) im Mittelohrmodell. Anregung mit Periodic Chirp, 100 mV (nach [MSKM05]).

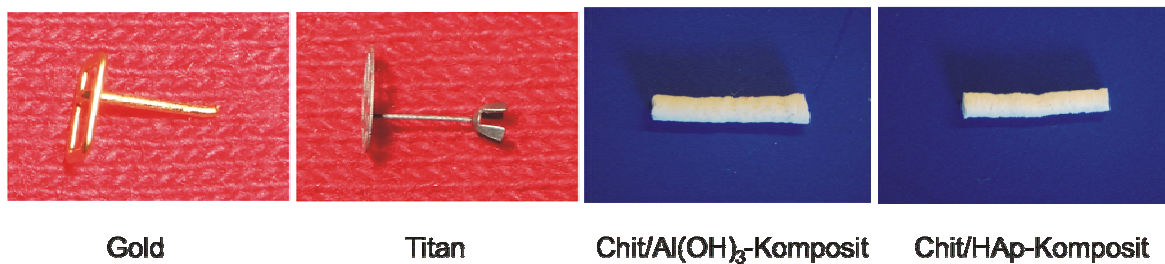


Abbildung 7-3: Fotos der vermessenen kommerziellen Mittelohrprothesen aus Gold und Titan im Vergleich zu einem Chitosan-Aluminiumhydroxid-Komposit (60/40 m-% Chit/Al(OH)₃) und zu einem Chitosan-Hydroxylapatit-Komposit (35/65 m-% Chit/HAp).

¹ Die Synthese und Charakterisierung des Chitosan-Aluminiumhydroxid-Komposites wird im Anhang beschrieben.

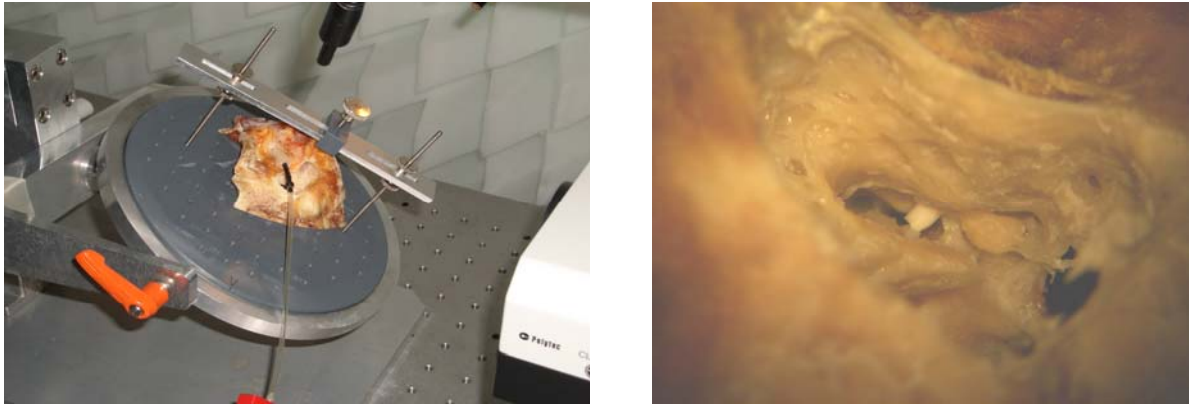


Abbildung 7-4: Messverfahren für die Laser-Doppler-Vibrometrie im Mittelohr mit der akustischen Stimulation im äußeren Gehörgang (links). Rechts: Ausschnitt aus dem Felsenbein mit einer Chitosan-Hydroxylapatit-Komposit-Prothese.

Der Messaufbau für die LDV-Messungen an humanen Felsenbeinen ist in Abbildung 7-4 gezeigt. Das Mittelohr wird durch einen Miniaturlautsprecher im äußeren Gehörgang akustisch stimuliert und die Schwingungsanalyse wird mittels LDV an verschiedenen Punkten des Mittelohrs durchgeführt. Die Übertragungsfunktionen verschiedener Materialien, gemessen in humanen Felsenbeinpräparaten, sind in Abbildung 7-5 wiedergegeben. Es zeigt sich, dass mit den Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen annähernd die gleichen Ergebnisse wie mit den herkömmlichen Mittelohrprothesen erreicht werden können. Deutlich zu erkennen ist aber auch, dass die Übertragungseigenschaften des intakten / gesunden Mittelohrs durch die Implantation von Mittelohrprothesen nicht wieder hergestellt werden konnten. Dieses deutet darauf hin, dass nicht nur die materialspezifischen Eigenschaften der Implantate, sondern auch die besondere Konstruktion der Gehörknöchelchenkette eine wichtige Rolle bei der Schallübertragung spielt. Weitere – detaillierte – Ergebnisse werden zukünftig von Mojallal im Rahmen seiner Dissertation veröffentlicht [Moja].

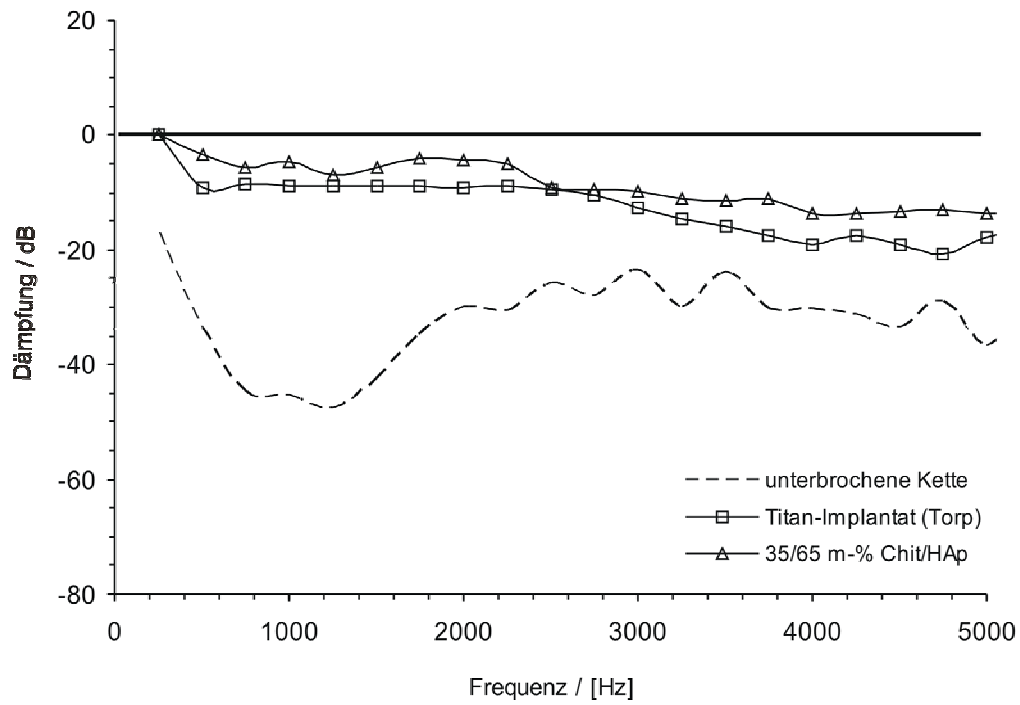


Abbildung 7-5: Übertragungsfunktionen des Mittelohrs in Felsenbeinpräparaten. Die Dämpfung bei dB = 0 entspricht der Übertragungsfunktion des normalen Mittelohrs. Akustische Stimulation: chirp Signal, 90 dB SLP, n=5. (Nach [MSKM05]).

8 *In-vivo*-Untersuchungen im Tierversuch

Im Rahmen von Tierversuchen wurden kommerziell erhältliche Bioverit®II-Prothesen, mit nanoporösen Silica-Filmen beschichtete Bioverit®II-Prothesen (siehe Kapitel 3.1 und 3.2.2) sowie Prothesen aus Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen (25/75 wt% Chitosan/Hydroxylapatit, siehe Kapitel 6.1.1 und 6.2.1) jeweils auf einer Seite in das Mittelohr der Kaninchen implantiert. Zusätzlich wurden Chitosan-Hydroxylapatit-Komposit-Plättchen unter die Bauchdecke der Kaninchen implantiert. Die Tiere wurden in drei Gruppen mit unterschiedlicher Verweildauer des Implantates (28, 84 bzw. 300 Tage) unterteilt. Die akustischen Übertragungseigenschaften wurden prä- und postoperativ unter anderem mittels Multifrequenztympanometrie analysiert. Die Tierversuche und die anschließenden Untersuchungen wurden von Herrn Dipl.-Ing. Hamidreza Mojallal, Herrn Dr. med. Martin Stieve, Frau Dipl.-Biol. Birte Süß und Frau Christina Turck an der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

Die ersten Ergebnisse von funktionellen Messungen zeigen für alle Prothesen eine verminderte Schallübertragung und eine erhöhte Resonanzfrequenz aufgrund der erhöhten Steifigkeit bei den implantierten Kaninchenohren [Moja06]. Dies entspricht dem Vorliegen einer Mittelohrschwerhörigkeit in Folge der Implantation. Ausführliche Ergebnisse werden von Herrn Hamidreza Mojallal im Rahmen seiner Dissertation veröffentlicht [Moja].

Nach der Euthanasie der Kaninchen wurden die Felsenbeine entnommen, die Paukenhöhle geöffnet und die Präparate in Glutaraldehyd fixiert. Histologische Untersuchungen wurden für die Beurteilung der Mukosabildung, Narbengewebsbildung, Ossifikation, Stabilität und Oberflächenbeschaffenheit durchgeführt. Erste Ergebnisse dieser Untersuchung weisen auf eine gute Biokompatibilität der unbehandelten und der mit nanoporösen Silica-Filmen beschichteten Bioverit®II-Prothesen hin [Turc06]. Eine vermehrte Bildung eines dem ortständigen Mittelohrepithel ähnlichen Zellüberzugs konnte beobachtet werden. Vereinzelt trat eine Spongiosaneubildung auf. Dabei zeigte sich tendenziell an den beschichteten Prothesen im Vergleich zu den unbeschichteten eine vermehrte Mucosabildung, also eine erwünschter Effekt. Genauere Unterschiede in der Gewebereaktion, d. h. der

Material-Zellinteraktion bei den unbehandelten und beschichteten Prothesen, müssen aber noch in weiteren Untersuchungen noch verifiziert werden. Die Prothesen aus Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen waren bis auf eine Ausnahme in allen Fällen disloziert, d. h. aus ihrer ursprünglichen Position verschoben. Es zeigte sich, dass die Biokompatibilität dieser Materialien deutlich geringer ist als die der Bioverit®II-Prothesen. Weiterführende Untersuchungen hierzu sind noch nicht abgeschlossen. Allerdings könnten die mangelhaften Eigenschaften der eigentlich als biokompatibel beschriebenen Materialkombination Chitosan-Hydroxylapatit auf die mangelhafte Reinheit des hier verwendeten Chitosan zurückzuführen sein. Detaillierte Angaben zu der Durchführung und Auswertung der histologischen Untersuchung werden von Frau Christina Turck im Rahmen ihrer Doktorarbeit veröffentlicht [Turck].

Für festkörperanalytische Untersuchungen mittels Röntgendiffraktometrie, Infrarot-Spektroskopie und Rasterelektronenmikroskopie werden die beschichteten Bioverit®II-Plättchen und die plättchenförmigen Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite nach der Euthanasie aus der Bauchdecke entfernt. Vorläufige Ergebnisse dieser Untersuchung liegen bislang noch nicht vor; die Ergebnisse werden zukünftig von Frau Birte Süß im Rahmen ihrer Doktorarbeit veröffentlicht [Süß].

9 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Kooperation mit der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig und der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) grundlegende Untersuchungen zum Einfluss von Nanostrukturen im unteren Nanometerbereich (< 100 nm) auf die Zelladhäsion, das Zellwachstum und die Zellproliferation durchgeführt. Hierzu wurden mittels strukturdirigierender Synthese nanostrukturierte Silica-Materialien mit Abmessungen zwischen 5 und 12 nm dargestellt. Üblicherweise entstehen bei der strukturdirigierenden Synthese nanostrukturierte Silica-Materialien in Form von Pulvern, die allerdings für *in-vitro* und *in-vivo* Untersuchungen nicht geeignet sind. Um für zellbiologische Studie geeignete Probenformen zu erhalten, wurden durch Tauchbeschichtung (*dip-coating*) dünne Filme des nanostrukturierten Silicas auf Standard-Glasobjektträger und auf dem gängigen Implantatmaterial Bioverit®II aufgebracht. Mit den Röntgenbeugungsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Silica-Filme, die unter Verwendung der amphiphilen Blockcopolymere Pluronic® 103, Pluronic® P123 bzw. Pluronic® F127 hergestellt wurden, aus unregelmäßig angeordneten runden Kanälen aufgebaut sind. Diese Kanäle, die alle einen ähnlichen Durchmesser besitzen, weisen weder eine Vorzugsorientierung zum Objektträger noch untereinander auf, was durch die ungleichmäßige Verteilung der Kanal- bzw. Porenmünder in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt wird. Die Anordnung der Kanäle kann als „wurmartig“ oder „Makkaroni-ähnlich“ beschrieben werden. Die Nanostrukturierungen liegen im Bereich von 5 bis 12 nm. Die Röntgendiffraktogramme und die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Silica-Filme, die mit dem nicht-ionischen Tensid Octaethylenglycolmonododecylether als strukturdirigierendem Agens synthetisiert wurden, weisen auf eine wohlgeordnete Porenstruktur hin, bei der die Kanäle parallel zur Substratoberfläche verlaufen.

Wichtige Kriterien für die Beurteilung der Biokompatibilität und Bioaktivität eines Biomaterials sind die Ausbildung einer knochenähnlichen Apatitschicht auf der Materialoberfläche sowie die Anheftung, das Wachstum und die Differenzierung von

Zellen. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit waren deshalb *in-vitro*-Untersuchungen zur Bioaktivität in *simulated body fluid* (SBF), einer Lösung, die nahezu die gleiche Ionenkonzentration und den gleichen pH-Wert wie menschliches Blutplasma aufweist. Nach 14-tägiger Aufbewahrung in SBF zeigen die Silica-Filme, die auf die Standard-Objektträger aufgebracht wurden, einen deutlichen Apatitüberzug aus sphärischen Partikeln, deren Morphologie von der Nanostrukturierung beeinflusst wird. Nach 21 Tagen haben sich die sphärischen Aggregate zu einer durchgehenden Apatitschicht zusammengeschlossen. Aus dieser Untersuchung lässt sich schließen, dass die nanostrukturierten Silica-Filme eine sehr gute *in-vitro*-Bioaktivität besitzen.

Um den Einfluss der Nanostrukturen auf das Zellverhalten zu charakterisieren, wurden an der GBF zellbiologische Untersuchungen mit epithel-ähnlichen Nierenkrebszellen der Linie HEK29 und mit murinen mesenchymalen Vorläuferzellen der Linie C3H10T1/2 durchgeführt. Die mit nanostrukturiertem Silica beschichteten Standard-Glasobjektträger weisen eine sehr gute *in-vitro*-Biokompatibilität auf. Ein signifikanter Einfluss der Nanostrukturen auf das Zellverhalten konnte bei den qualitativen und quantitativen Experimenten aber nicht festgestellt werden. Die Nanostrukturen im Bereich von 5 – 12 nm legen somit einen unteren Grenzwert hinsichtlich der Größe von Nanostrukturen für die Einflüsse auf die Zelladhäsion und die Zellproliferation fest. Diese Ergebnisse korrelieren mit den zellbiologischen Untersuchungen an mit nanostrukturiertem Silica beschichtetem Bioverit®II. Ein Unterschied in der Adhäsion und dem Wachstum der mesenchymalen Vorläuferzellen – und somit auch in der *in-vitro*-Biokompatibilität – konnte auf den verschiedenen strukturierten Oberflächen nicht beobachtet werden. Es zeigte sich, dass die beschichteten Bioverit®II-Proben eine gute *in-vitro*-Biokompatibilität besitzen, die jedoch deutlich geringer als die des unbehandelten Bioverit®II ist. Bioverit®II ist ein bioaktives Knochenersatzmaterial, das eine hohe Bioaktivität zu den mesenchymalen Vorläuferzellen, die in Knochen- oder Knorpelzellen differenzieren können, aufweist. Zukünftig ist es somit interessant, die Differenzierung der mesenchymalen Vorläuferzellen auf diesen Materialien zu untersuchen. Die durch die Beschichtung verminderte Adhäsion und das reduzierte Wachstum der mesenchymalen Vorläuferzellen könnten für den geplanten Einsatz im Mittelohr von Vorteil sein, da bei Untersuchungen von humanen Mittelohrexplantaten häufig ein überschießendes Gewebewachstum zu beobachten war. Bei der Rekonstruktion des

Kontaktes zwischen Trommelfell und Innenohr ist es wünschenswert, dass das Implantatmaterial mit einer Mucosaschicht überzogen wird und ein Wachstum von knochenähnlichen Strukturen nur begrenzt stattfindet.

Im Rahmen von Tierversuchen wurden die mit nanoporösen Silica-Filmen beschichteten Bioverit®II-Prothesen und die in dieser Arbeit synthetisierten Chitosan-Hydroxylapatit-Komposit jeweils einseitig in Kaninchenohren bzw. unter die Bauchdecke implantiert. Als Referenz dienten kommerziell erhältliche Bioverit®II-Prothesen. Erste histologische Untersuchungen zeigen, dass die mit nanoporösen Silica beschichteten Bioverit®II-Prothesen gegenüber dem unmodifizierten Bioverit®II eine geringfügig vermehrte Mucosabildung aufweisen [Turc06]. Dies ist ein erwünschter Effekt. Erste Ergebnisse der prä- und postoperativen audiologischen Messungen zeigen eine Mittelohrschwerhörigkeit an, die durch die Mittelohrimplantation hervorgerufen wurde [Moja06]. Detaillierte Auswertungen der Tierversuche werden von Herrn Hamidreza Mojallal [Moja], Frau Christina Turck [Turc] und Frau Birte Süß [Süß] im Rahmen ihrer Doktorarbeiten vorgestellt.

Obwohl die Silica-Filme mit Abmessungen unterhalb von 12 nm keinen signifikanten Einfluss auf das Zellverhalten zeigten, sind diese nanoporösen Silica-Filme dennoch sehr interessant für potentielle Anwendungen in der Medizin. Aufgrund ihrer guten *in-vitro* Biokompatibilität ist ein Einsatz als *Drug-Delivery-System* denkbar. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass sich die nanoporösen Silica-Materialien mit ihrer hohen spezifischen Oberfläche sehr gut modifizieren lassen; die Modifizierung kann hierbei durch physikalische (Adsorption) oder chemische (kovalente) Anbindung erfolgen. Die Adsorption von Molekülen spielt bei *Drug-Delivery-Systemen* eine entscheidende Rolle: So können Medikamente auf der Materialoberfläche adsorbiert und nach der Implantation direkt im Körper freigesetzt werden. Durch eine chemische Modifizierung können synthetische oder biologische Moleküle (Polymere oder Proteine wie Wachstumsfaktoren) auf die Materialoberfläche aufgebracht werden, die die Biokompatibilität des Materials beeinflussen. Dies ist besonders interessant bei Implantaten, die zur Rekonstruktion der Gehörknöchelchenkette eingesetzt werden, da dort auf eine angepasste Biokompatibilität zu achten ist.

Erste Versuche zur chemischen Modifizierung der Silica-Oberfläche mit einfachen funktionellen Gruppen wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Anhand der

durchgeführten zellbiologischen Untersuchungen mit mesenchymalen Vorläuferzellen können allerdings keine gesicherten Aussagen über den Einfluss der funktionellen Gruppen getroffen werden. Hierfür sind weiterführende Versuchsreihen notwendig.

Im Rahmen der Untersuchungen zum Einfluss von Nanostrukturen auf die Material-Zellinteraktionen wurden auch nanoporöse Gläser (CPG[®]) mit nominellen Porenweiten von 50 nm, 70 nm bzw. 100 nm in die Studien einbezogen. Diese wurden von der Firma CPI Bitterfeld bezogen. Die nanoporösen Gläser zeigen eine gute *in-vitro* Biokompatibilität, die jedoch gegenüber dem nicht nanostrukturierten Glas normaler Deckgläschen oder gegenüber Bioverit[®]II reduziert ist. Aufgrund ihrer Porosität, die den Transport und die Anlieferung auch großer Biomoleküle wie Proteine erlaubt, für ein Einwachsen von Zellen aber zu klein ist, dürften die nanoporösen Gläser in jedem Fall als Biomaterialien interessant sein.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung organisch-anorganischer Kompositmaterialien auf Basis von Hydroxylapatit. Als organische Komponenten wurden Chitosan bzw. Hyaluronsäure gewählt. Die Synthese von Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen bzw. Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Kompositen mit verschiedenen theoretischen Massenverhältnissen erfolgte u. a. durch Co-Präzipitation aus wässriger Lösung. Für audiologische Messungen und *in-vivo* Untersuchungen im Tierversuch wurden die Kompositmaterialien in Form dünner Stäbchen und Plättchen hergestellt. Die strukturanalytischen Charakterisierungen mittels Infrarot-Spektroskopie und Röntgendiffraktometrie zeigen, dass jeweils ein carbonathaltiger nanokristalliner Hydroxylapatit gebildet wurde, dessen Kristallinität vergleichbar mit einer menschlichen Knochenprobe ist. Die aus den thermogravimetrischen Analysen ermittelten Massenverhältnisse stimmen im Rahmen der Messungenauigkeiten gut mit den theoretisch berechneten Massenverhältnissen überein, so dass auf eine vollständige Fällung beider Komponenten geschlossen werden kann. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen verdeutlichen den Kompositcharakter der Materialien.

Im Rahmen der Kooperation wurden an der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der MHH die akustischen Übertragungseigenschaften der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite, der Hyaluronsäure-Hydroxylapatit-Komposite und der Komposite aus quervernetztem Chitosan und Hydroxylapatit analysiert. Die Ergebnisse der funktionellen Messung mittels Laser-Doppler-Vibrometrie und Multifrequenztympanometrie in einem von Mojallal konzipierten mechanischen Mittelohrmodell zeigen keine signifikanten Unterschiede zur kommerziellen Mittelohrprothese [MSKM05] [Moja]. Die synthetisierten Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite weisen mit herkömmlichen Prothesen vergleichbare Schallübertragungsfunktionen auf. Ähnliche Ergebnisse liefern die audiologischen Untersuchungen in humanen Felsenbeinpräparaten. Ferner zeigte es sich, dass die Übertragungseigenschaften eines intakten Mittelohres durch eine Implantation nicht wieder hergestellt werden konnte. Die besondere Konstruktion der Gehörknöchelchenkette mit Hammer, Amboss und Steigbügel scheint neben den materialspezifischen Eigenschaften der Implantate eine große Rolle bei der Schallübertragung zu spielen, so dass audiologische Untersuchungen zum Einfluss der geometrischen Implantatform auf die Schallleitungseigenschaften für die weitere Entwicklung von Implantaten wichtig sein könnten.

10 Literaturverzeichnis

- [AHLL88] S. Anderson, S. T. Hyde, K. Larsson, S. Lidin, *Chem. Rev.*, **1988**, 88, 221-242.
- [AHYZ96] I. A. Aksay, M. Trau, I. Homma, N. Yao, L. Zhou, P. Fenter, P. M. Eisenberger, S. M. Gruner, *Science*, **1996**, 273, 892.
- [AJ02] V. Antochshuk, M. Jaroniec, *Chem. Commun.*, **2002**, 258-259.
- [Altm03] S. Altmaier, *Modifizierung und Funktionalisierung geordneter mesostrukturierter Materialien*, Dissertation, Universität Hannover, **2003**.
- [AKM94] V. Alfredsson, M. Keung, A. Monnier, G. D. Stucky, K. K. Unger, F. Schüth, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 921.
- [AKMS94] V. Alfredsson, M. Keung, A. Monnier, G. D. Stucky, K. K. Unger, F. Schüth, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 921-92.
- [AO95] G. Abatangelo, M. O'Regan, *Eur. J. Rheumatol Inflammation*, **1995**, 15, 9-16.
- [AT99] K. Aiedeh, M. O. Taha, *Arch. Pharm.*, Weinheim, **1999**, 332, 103-107.
- [ATMH96] I. Aksay, M. Trau, S. Manne, I. Homma, N. Yao, L. Zhou, P. Fenter, P. Eisenberger, S. Gruner, *Science*, **1996**, 273, 892.
- [AW00] G. Abatangelo, P. H. Weigel, (Hrgs.), *New Frontiers in Medical Sciences, Redefining Hyaluronan, Proceedings of the Symposium in Padua*, Elsevier, **2000**.
- [BBKM94] G. Borchardt, S. Brandriss, J. Kreuter, S. Margel, *J. Drug Targeting*, **1994**, 2, 61.
- [BC76] W. E. Brown, L. C. Chow, *Annu. Rev. Mater. Sci.*, **1976**, 6, 213-236.
- [BCDP87] A. Bragantini, M. Cassini, G. DeBastiani, A. Perbellini, *Clin. Trials J.*, **1987**, 24, 333-340.
- [BD89] E. A. Balazs, J. L. Denlinger, *Ciba Foundation Symposium*, **1989**, 143, 265-275.
- [BDDH99] S. Busch, H. Dolhaine, A. DuChesne, S. Heinz, O. Hochrein, F. Laeri, O. Podebrad, U. Vietze, Th. Weiland, R. Kniep, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **1999**, 1643-1653.
- [Behr93] P. Behrens, *Adv. Mater.*, **1993**, 5, 127-132.
- [BER92] T. Brendel, A. Engel, C. Rüssel, *J. Mater. Sci.: Mater. in Med.*, **1992**, 3, 175-179.
- [BFHA91] C. J. Brinker, G. C. Frye, A. J. Hurd, C. S. Ashley, *Thin Solid Films*, **1991**, 201, 97.
- [BGHB02] D. Becker, U. Geissler, U. Hempel, S. Bierbaum, D. Scharnweber, H. Worch, K. W. Wenzel, *J. Biomed. Mater. Res.*, **2002**, 59, 516-527.
- [BHRM02] T. Brennan, A. V. Hughes, S. J. Roser, S. Mann, K. J. Edler, *Langmuir*, **2002**, 18, 9838-9844.

- [BL05] H.-G. Boenninghaus, T. Lenarz, *Hals-Nasen-Ohrenheilkunde*, Springer-Verlag, 12. Auflage, **2005**, XIV, 401.
- [BLDK00] S. Baskaran, J. Liu, K. Domansky, N. Kohler, X. Li, C. Coyle, G. E. Rfyll, S. Thevuthasan, R. E. Williford, *Adv. Mater.*, **2000**, 12, 291-294.
- [BLS01] J. L. Blin, A. Léonard, B. L. Su *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 105, 6070-6079]
- [BLSF99] C. J. Brinker, Y. Lu, A. Sellinger, H. Fan, *Adv. Mater.* **1999**, 11, 579-585.
- [BMWLO1] M. C. Burtleigh, M. A. Markowitz, E. M. Wong, J.-S. Lin, B. P. Gaber; *Chem. Mater.*, **2001**, 13, 4411-4412.
- [BP96] S. A. Bagshaw, T.J. Pinnavaia, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, 10, 1102.
- [BPP95]: S.A. Bagshaw, E. Prouzet, T. J. Pinnavaia, *Science*, **1995**, 269, 1242.
- [BRGJ00] S. Besson, C. Ricolleau, T. Gacoin, C. Jacquiod, *J. Phys. Chem. B.*, **2000**, 104, 12095-12097.
- [Bru99] D. Brunel, *Microporous and Mesoporous Mater.*, **1999**, 27, 329-344.
- [BS90] C. J. Brinker, G. W. Scherrer in *Sol-Gel Science – The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing* (Hrsg.: Hartcourt, Brace, Jovanovich), 1. Auflage, Academic Press, New York, **1990**, 506.
- [BSH99] D. Bakoš, M. Soldán, I. Hernández-Fuentes, *Biomaterials*, **1999**, 20, 191-195.
- [BSHS97] P. Behrens, G. D. Stucky, C. Haggemüller, G. Schechner, *Solid State Ionics*, **1997**, 101-103, 255-260.
- [BSM96] S. L. Burkett, S. D. Sims, S. Mann, *Chem. Comm.*, **1996**, 1367.
- [BSZ91] C. J. Brine, P. A. Sandford, J. P. Zikakis, *Advances in Chitin and Chitosan, London: Ellsevier Applied Science, eds*, **1991**, 1-491.
- [Busch98] S. Busch, *Selbstorganisation und Morphogenese von Apatit-Gelatine-Kompositen unter biomimetischen Bedingungen*, Dissertation, Technische Universität Darmstadt, **1998**.
- [BVRL92] J. S. Beck, J. C. Vartuli, W.J. Roth, M. E. Leoniwcz, C.T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T. W. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard, S. B. McCullen, J. B. Higgins, J. L. Schlenker, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 10834-10843.
- [BZHH99] M. Bornitz, Th. Zahnert, H.-J. Hardtke, K. B. Hüttenbrink, *Audiol. Neurootol.*, **1999**, 4, 163-169.
- [C03] A. A. Campbell, *Mater.Today*, **2003**, 26-30.
- [CA99] W. Y. Chen, G. Abatangelo, *Wound Repair Regen.*, **1999**, 7, 79-89.
- [CCK95] C.-F. Cheng, Z. Chan, J. Klinowski, *Langmuir*, **1995**, 11, 2815.
- [CGSC03] F. Cagnol, D. Grosso, G. J. de A. A. Soler-Illia, E. L. Crepaldi, F. Babonneau, H. Amenitsch C. Sanchez, *J. Mater. Chem.*, **2003**, 13, 61.
- [CIK84] S. R. Culler, H. Ishida, J. K. Koenig, *Appl. Spectrosc.*, **1984**, 38, 1.

- [CNKS95] S. B. Cho, K. Nakanishi, T. Kokubo, N. Soga, C. Ohtsuki, T. Nakaura, T. Kitsugi, T. Yamamuro, *J. Am. Ceram. Soc.*, **1995**, *78*, 1769.
- [CPSD00] E. Cooper, L. Parker, C. A. Scotchford, S. Downes, G. J. Leggett, T. L. Parker, *J. Mater. Chem.*, **2000**, *10*, 133-139.
- [CR01] A. Curtis, M. Riehle, *Phys. Med. Biol.*, **2001**, *46*, R47-R65.
- [CS99] U. Ciesla, F. Schüth, *Microporous Mesoporous Mater.*, **1999**, *27*, 131-149.
- [CV64] A.S.G. Curtis, M. Varde, *J. Nat. Cancer Res Inst*, **1964**, *33*, 15-26
- [DB96] J. F. Diaz, K. J. Balkus Jr., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **1996**, *2*, 115.
- [DBBK97] J. F. Díaz, K. J. Balkus Jr., F. Bedioui, V. Kurshev, L. Kevan, *Chem. Mater.*, **1997**, *9*, 61-67.
- [DBL97] G. Dalcusi, J. M. Bouler, R. Z. LeGeros, *Int. Rev. Cytol.*, **1997**, *172*, 129-191.
- [DCZF00] C. Du, F. Z. Cui, W. Zhang, Q. L. Feng, X. D. Zhu, K. de Groot, *J. Biomed. Mater. Res.*, **2000**, *55*, 518-527.
- [DE02] S. V. Dorozhkin, M. Epple, *Angew. Chem.*, **2002**, *114*, 3260-3277.
- [dG80] K. de Groot, *Biomater.*, **1980**, *1*, 47-50
- [DHW01] X. Deng, J. Hao, C. Wang, *Biomater.*, **2001**, *22*, 2867-2873.
- [DMWH02] J. Deere, E. Magner, J. G. Wall, B. K. Hodnett, *J. Phys. Chem. B.*, **2002** *106*, 7340.
- [DRJA02] M.J. Dalby, M.O. Riehle, H. Johnstone, S. Affrossman, A.S.G. Curtis, *Biomater.*, **2002**, *23*, 2945-54
- [DX94] R. Davidson, Y. Xue, *J. Soc. Dyers Col.*, **1994**, *110*, 24.
- [EJS03] D. Enke, F. Janowski, W. Schwieger, *Microporous Mesoporous Mater.*, **2003**, *60*, 19-30.
- [Elliott94] J. C. Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, Elsevier, Amsterdam-London-New York-Tokyo, **1994**.
- [EMY73] J. C. Elliot, P. E. Mackie, R. A. Young, *Science* ,**1973**, *180*, 1055-1057.
- [Epp03] M. Epple, *Biomaterialien und Biomineralisation*, B. G. Teubner Verlag Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden, 1. Auflage, **2003**.
- [ER01] K. J. Edler, S. J. Roser, *Int. Rev. Phys. Chem.*, **2001**, *20*, 387-466.
- [Ever72] D.H. Everett, *Pure Appl. Chem.*, **1972**, *31*, 578.
- [FAOS97] A. Firouzi, F. Atef, A. G. Oertli, G. D. Stucky, B. F. Chmelka, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *199*, 3596-3610.
- [FBM97] C. E. Fowler, S. L. Burkett, S. Mann, *Chem. Commun.*, **1997**, 1769.
- [FFWK97] X. Feng, G. E. Fryxell, L.-Q. Wang, A. Y. Kim, J. Liu, K. M. Kemmer, *Science*, **1997**, *276*, 923.

- [FKBB95] A. Firouzi, D. Kumar, L. M. Bull, T. Besier, P. Sieger, Q. Huo, S. A. Walker, J. A. Zasadzinski, C. Glinka, J. Nicol, D. Margolese, G. D. Stucky, B. F. Chmelka, *Science*, **1995**, 267, 1138-1143.
- [Fowl74] B. O. Fowler, *Inorg. Chem.*, **1974**, 13, 194-207.
- [FYGL03] J. Fan, C. Z. Yu, T. Gao, J. Lei, B. Z. Tian, L. M. Wang, Q. Luo, B. Tu, W. Z. Zhou, D. Y. Zhao, *Angew. Chem.*, **2003**, 115, 3254.
- [GBAA02] D. Grosso, F. Babonneau, P. A. Albouy, H. Amenitsch, A. R. Balkenende, A. Brunet-Bruneau, J. Rivory, *Chem. Mater.*, **2001**, 2, 931.
- [GCSC04] D. Grosso, F. Cagnol, G. J. de A. A. Soler-Illia, E. L. Crepaldi, H. Amenitsch, A. Brunet-Bruneau, A. Bourgeois, C. Sanchez, *Adv. Funct. Mater.*, **2004**, 14, 309-322.
- [GDRT98] R. J. Green, M. C. Davies, C. J. Roberts, S. J. B. Tendler, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1998**, 42, 165-171.
- [Gey00] G. Geyer, *Biomater.*, **2000**, 1 54-60;
- [Gey99] G. Geyer, *Materialien zur Rekonstruktion des Schalleitungsapparates, HNO*, **1999**, 47, 77-91.
- [GHST01] J. M. Gomez-Vega, A. Hozumi H. Sugimura, O. Takai, *Adv. Mater.*, **2001**, 13, 822-825.
- [GIKH01] J.M. Gomez-Vega, M. Iyoshi, K.Y. Kim, A. Hozumi, H. Sugimura, O. Takai, *Thin Solid Films* , **2001**, 398-399, 615-620.
- [GKM04] N. Griep-Raming, M. Karger, H. Menzel, *Langmuir*, **2004**, 20, 11811-11814.
- [GLU97] M. Grün, I. Lauer, K. K. Unger, *Adv. Mater.*, **1997**, 9, 254-257.
- [Glyco] <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan>, (Stand 24.05.2005).
- [Gme34] *Gmelins Handbuch der Anorganischen Chemie, Die Verbindungen des Aluminiums*, 8. Auflage, Verlag Chemie, Berlin, **1934**, S. 98.
- [GMT98] E. Guibal, C. Milot, J. M. Tobin, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1998**, 37, 1454-1463.
- [GONM91] D. B. Glasser, D. C. Osborn, J. F. Nordeen, Y. Min, *Arch. Ophthal.*, **1991**, 109, 1438-1440.
- [GSTH01] J. M. Gomez-Vega, H. Sugimura, O. Takai, A. Hozumi, *J. Mater. Sci.: Mater. in Med.*, **2001**, 12, 923-927.
- [HDRV97] S. M. Hudson, in A. Domard, G. A. F. Roberts, K. Varum, Eds., *Advances in Chitin Science II, Proceedings of the 7th International Conference on Chitin and Chitosan*, Lyon, France, **1997**, 590-599.
- [Hench88] L.L. Hench, in *Bioceramics: Material Characterstics versus in vivo Behavior*, Hrsg: P. Ducheybe, J.E. Lemons, The New York Academy of Science, New York, **1988**, 523, 54-71.
- [Hench91] L.L. Hench, *J. Am. Ceram. Soc.*, **1991**, 74, 1487-510.
- [HH99] A. Hesse, D. Heimbach, *World J. Urol.*, **1999**, 17, 308-315.

- [HL65] D. Horton, D. R. Lineback, *N- Deacetylation: Chitosan from Chitin*, in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Hrsg: R. L. Whistler, J. N. BeMiller, M. L. Wolfrom, Academic Press, New York, London, **1965**, S. 403-406.
- [HL93] K. B. Hüttenbrink, H. W. Lindörfer, *HNO*, **1993**, *41*, 440-445.
- [HLED00] J. He, X. Li, D. G. Evans, X. Duan, C. Li, *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, **2000**, *11*, 45.
- [HLPS95] Q. Huo, R. Leon, P.N. Petroff, G.D. Stucky, *Science*, **1995**, *268*, 1324-1327.
- [HMCD94] Q. Huo, D. Margolese, U. Ciesla, D. G. Demuth, P. Feng, T. E. Gier, P. Sieger, A. Firouzi, B. F. Chmelka, F. Schüth, G. D. Stucky, *Chem. Mater.*, **1994**, *6*, 1176.
- [HMCF94] Q. Huo, D. I. Margolese, U. Ciesla, P. Feng, T.E. Gier, P. Sieger, R. Leon, P.M. Petroff, F. Schüth, G.D. Stucky, *Nature*, **1994**, *368*, 317-321
- [HMS96] Q. Huo, D. I. Margolese, G. D. Stucky, *Chem. Mater.*, **1996**, *8*, 1147.
- [HSK03] J.H. Hamman, C. M. Schultz, A.F. Kotze, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **2003**, *29*, 161-172.
- [Hütt92a] K. B. Hüttenbrink, *Laryngol-Rhinol-Otol.*, **1992**, *71*, 545-551.
- [Hütt92b] K. B. Hüttenbrink, *Laryngol-Rhinol-Otol.*, **1992**, *71*, 626-631.
- [HW95] A. F. Holleman, E. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, 101. Auflage, de Gruyter, New York, **1995**.
- [HYNI86] S. Higashi, T. Yamamuro, T. Nakamura, Y. Hyon, S. H. Ikada, K. Jamshidi, *Biomater.*, **1986**, *7*, 183-187.
- [HZFW97] Q. Huo, D. Zhao, J. Feng, K. Weston, S. K. Buratto, G. D. Stucky, S. Schacht, F. Schüth, *Adv. Mater.*, **1997**, *9*, 974-978.
- [IKY00] K. Inumaru, J. Kiyoto, S. Yamanaka, *Chem. Commun.*, **2000**, 903-904.
- [Ile79] R. K. Iler, *The chemistry of silica*, Wiley, New York, **1979**.
- [III98] L. Illum, *Pharm. Res.*, **1998**, *15*, 1326-1331.
- [IMT01] T. Ikoma, T. Muneta, J. Tanaka, *Key Engineering Mater.*, **2001**, *192-195*, 487-490.
- [INKY04] M. Inzuka, S. Nakamura, S. Kishi, K. Yoshida, K. Hashimoto, Y. Toda, K. Yamashita, *Solid State Ionics*, **2004**, *172*, 509.
- [INMY94] M. Ito, T. Niuro, K. Mori, K. Yokoyama, Y. Nakayama, T. Yamagishi, *J. Jpn. Soc. Dent. Mater. Dev.*, **1994**, *3*, 351-357.
- [Isra85] J. N. Israelachvili, in: *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press London, 1. Auflage, **1985**.
- [Jäge97] R. Jäger, *Mesoporöse Materialien vom M41S-Typ: Die Synthese großer Mengen, die Extraktion der Strukturdirektoren und die Modifikation der Porenoberfläche*, Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, **1997**.
- [Jan05] U. Janosovits, *Dissertation*, Universität Bayreuth, **1995**.

- [JDCA98] C. R. Jenney, K. M. DeFife, E. Colton, J. M. Anderson, *Biomed. Mater. Res.*, **1998**, *41*, 171-184.
- [JE02] F. Janowski, D. Enke, *Porous Glasses*, in Handbook of porous solids, Hrsg.: F. Schüth, K. S. W. Sing, J. Weitkamp, Wiley, Weinheim, **2002**.
- [JH82] F. Janowski, W. Heyer, *Poröse Gläser*, in VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, **1982**.
- [JRSM99] B. F. G. Johnson, S. A. Raynor, D. S. Shephard, T. Maschmeyer, J. M. Thomas, G. Sankar, S. Bromley, R. Oldroyd, L. Gladden, M. D. Mantle, *Chem. Commun.*, **1999**, 1167-1168.
- [JST92] H. N. Joshi, V. J. Stella, E. M. Topp, *J. Control Release*, **1992**, *20*, 109-122.
- [KATN80] P. Koutsoukos, Z. Amjad, M. B. Tomson, G. H. Nancollas, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 1553-1557.
- [KCC97] C. Kim, H. Choi, H. Cho, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1997**, *63*, 725.
- [KG99] P. Kingshott, H. J. Griesser, *Current Opinium in Solid State and Mater. Science*, **1999**, *4*, 403-412.
- [KHC99] J. Z. Knaul, S. M. Hudson, K. A. M. Creber, *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.*, **1999**, *37*, 1079.
- [KHSK87] T. Kokubo, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, M. Takagi, T. Shibuya, in *Ceramics in Clinical Applications*, Hrsg: P. Vincenzi, Elsevier, Amsterdam, **1987**, S. 175-184.
- [KIH90] T. Kokubo, S. Ito, Z. T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1990**, *24*, 331-343.
- [KITH90] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1990**, *24*, 331-343.
- [KJSP05] A. Katiyar, L. Ji, P. G. Smirniotis, N. G. Pinto, *Microporous Mesoporous Mater.*, **2005**, *80*, 311.
- [KKKN00] T. Kokubo, H.-M. Kim, M. Kawashita, T. Nakamura, *J. Aust. Ceram. Soc.*, **2000**, *36*, 37.
- [KKSK90] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1990**, *24*, 721-734.
- [KL03] E. Khor, L. Y. Lim, *Biomater.*, **2003**, *24*, 2339-2349.
- [KL88] B. Kasemo, J. Lausmaa, *Appl. Biomater.*, **1988**, *22*, 145-158.
- [KLRV92] C.T. Kresge, M.E. Leonowicz, W.J. Roth, J.C. Vartuli, J.S. Beck, *Nature*, **1992**, *359*, 710-712.
- [Koku03] T. Kokubo, in *Bioceramics*, edited by B. Ben-Nissan, D. Sher, W. Walsh, *Trans Tech. Publications*, Uetikon-Zurich, **2003**, 523.
- [KOKU91] T. Kokubo, *Biomaterials*, **1991**, *2*, 155-163.
- [KPCK05] R. Kumar, K. H. Prakash, P. Cheang, K. A. Khor, *Acta Materialia*, **2005**, *53*, 2327.

- [LBPS03] J. B. Leach, K. A. Bivens, Ch. W. Patrick, Jr., Ch. E. Schmidt, *Biotechnol. Bioeng.*, **2003**, *82*, 578-589.
- [LBS97] M. H. Lim, C. F. Blanford, A. Stein, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 4090.
- [LBS98] M.H. Lim, C. F. Blanford, A. Stein, *Chem. Mater.*, **1998**, *10*, 467.
- [LeGe74] R. Z. LeGeros, *J. Dent. Res.* **1974**, *53*, 45-50.
- [LeGe91] R. Z. LeGeros, *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*, Karger, Basel, **1991**.
- [LeGero01] R. Z. LeGeros, *Z.Kardiol.*, **2001**, *90*, III/116-III125.
- [LF92] T. C. Laurent, J. R. Fraser, *FASEB J.*, **1992**, *6* (7), 2397-2404.
- [LFFW98] J. Liu, X. Feng, G. E. Fryxell, L.-Q. Wang, A. Y. Kim, M. Gong, *Adv. Mater.*, **1998**, *10*, 161.
- [LFHM99] B. Lebeau, C.E. Fowler, S.R. Hall, S. Mann, *J. Mater. Chem.*, **1999**, *9*, 2279-2281.
- [LG91] R. Z. LeGeros, *Calcium Phosphates in Oral biology and Medicine*, Karger, Basel, **1991**.
- [LG94] R. Z. LeGeros in *Hydroxyapatite and Related Materials*, Hrgs.: P. W. Brown, B. Constantz, CRC, Boca Raton, **1994**, 3-28.
- [LGDA97] Y.Lu, R. Ganguli, C.A. Drewien, M. Anderson, C.J. Brinker, W. Gong, Y. Guo, H. Soyas, B. Dumn, M. Huang, J. Zink, *Nature*, **1997**, *389*, 364.
- [LGGM86] F. Liebau, H. Gies, R. P. Gunarwardane, B. Marler, *Zeolites*, **1986**, *6*, 373-377.
- [LGLG97] R. Z. LeGeros, J. P. LeGeros, in *Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren*, Hrgs.: R. Schnettler, E. Markgraf, Thieme, Stuttgart, **1997**, S.180.
- [LKP00] Y. Luo, K. R. Kirker, G. D. Prestwich, *J. Controlled Release*, **2000**, *69*, 169-184.
- [LLPB91] N. E. Larsen, E. A. Leshchiner, E. G. Parent, E. A. Balazs, *Cosmetic and Pharmaceutical Applications of Polymers*, Hrsg: C. G. Gebelein et al., Plenum Press, New York, **1991**, 147-157.
- [LML00] H.-P. Lin, C.-Y. Mou, S.-B. Liu, *Adv. Mater.*, **2002**, *12*, 103-106.
- [LNKG93] P. Li, K. Nakanishi, T. Kokubo, K. deGroot, *Biomater.*, **1993**, *14*, 963-968.
- [LOKNS92] P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Nakanishi, N. Soga, T. Nakamura, T. Yamamuro, *J. Am. Ceram. Soc.*, **1992**, *75*, 2094.
- [LPLS00] W. Linhart, F. Peters, W. Lehmann, K. Schwarz, A. F. Schilling, M. Amling, J. M. Rueger, M. Epple, *J Biomed. Mater. Res.*, **2001**, 162-171.
- [LRM02] I. Lévêque, K. H. Rhodes, S. Mann, *J. Mater. Chem.*, **2002**, *12*, 2178-2180.
- [LS04] J. B. Leach, C. E. Schmidt, *Mat. Res. Soc. Sym. Proc.*, **2004**, *EXS-1*, F4.7.1.
- [LW89] H. A. Lowenstam, S. Weiner, *On Biomineralisation*, Oxford University Press, New York, Oxford, **1989**.

- [Man95] S. Mann, *Biomimetic Materials Chemistry*, Wiley/VCH, New York, Weinheim, **1995**.
- [Mann86] S. Mann, *Chem. unserer Zeit*, **1986**, 20, 69-76.
- [MBDF97] S. Mann, S. L. Burkett, S. A. Davis, Ch. E. Fowler, N. H. Mendelson, S. D. Walsh, N. T. Whilton, *Chem. Mater.*, **1997**, 9, 2300-2310.
- [MDFP01] N. A. Melosh, P. Davidson, P. Feng, D. J. Pine, B. F. Chmelka, *J. Am. Chem. Com. Soc.*, **2001**, 123, 1240.
- [MI96] M. Maruyama, M. Ito, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1996**, 32, 527-532.
- [MM02] C. Muzzarelli, R. A. A. Muzzarelli, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 92, 89-94.
- [MMKH96] W. F. Maier, J. A. Martens, M. Klein, J. Heilmann, R. Parton, K. Vercruyse, P. A. Jacobs, *Angew. Chem.*, **1996**, 108, 222-224.
- [Moja] Hamidreza Mojallal, geplante *Dissertation*, Medizinische Hochschule Hannover.
- [Moja06] Hamidreza Mojallal, *mündliche Mitteilung*, Medizinische Hochschule Hannover, März **2006**.
- [MP34] K. Meyer, J. W. Palmer, *J. Biol. Chem.*, **1934**, 107, 629-634
- [MPJW04] I. Manjubala, I. Ponomarev, K. D. Jandt, I. Wilke, P. Fratzl, *Eur. Cells Mater.*, **2004**, 1.
- [MQS99] H. A. Marauf, A. A. Quayle, P. Sloan, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, **1990**, 5, 48-54.
- [MR88] G. G. Maghami, G. A. Roberts, *Makromol. Chem.*, **1988**, 189, 2239.
- [MRF74] M. S. Masari, F. W. Reuter, M. Friedmann, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1974**, 18, 675-681.
- [MRST95] T. Maschmeyer, F. Rey, G. Sankar, J. M. Thomas, *Nature*, **1995**, 378, 159-162.
- [MSHK93] A. Monnier, F. Schüth, Q. Huo, D. Kumar, D. Margolese, R. S. Maxwell, G. D. Stucky, M. Krishnamurty, P. Petroff, A. Firouzi, M. Janicke, B. F. Chmelka, *Science*, **1993**, 261, 1299.
- [MSMK05] H. Mojallal, M. Stieve, P. P. Müller, I. Krueger, N. Witteck, B. Borisov, C. Turck, P. Behrens, T. Lenarz, *Biomedizinische Technik*, Fachverlag Schiele & Schön, **2005**, 50.
- [MSR05] A. D. Martino, M. Sittinger, M. V. Rsibud, *Biomater.*, **2005**, 26, 5983-5990.
- [MTW83] D. J. Mitchell, G. J. T. Tiddy, L. Waring, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **1983**, 79, 975-1000.
- [MTWK93] W. F. Maier, I.-C. Tilgner, M. Wiedorn, H.-C. Ko, *Adv. Mater.*, **1993**, 5, 730-735.
- [MTWK93-2] W. F. Maier, I.-C. Tilgner, M. Wiedorn, H.-C. Ko, A. Ziehfrend, R. Sell, *Adv. Mater.*, **1993**, 5, 726-730.
- [Muso04] O. Musolf, *Chemisches Schalten in Compositen aus Siliciumdioxid und Azobenzol-Gruppen tragenden Tensiden*, Dissertation, Universität Hannover, **2004**.
- [Muzz73] R. A. A. Muzzarelli, *Natural Chelating Polymers*; Pergamon Press: New York, **1973**.

- [Muzz90] R. A. Muzzarelli, *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, **1990**, 3, 430.
- [MVFW93] S. Margel, E. A. Vogler, L. Firment, T. Watt, S. Haynie, D. Y. Sogah, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1993**, 27, 1463.
- [MWHC01] J. Ma, H. Wang, B. He, J. Chen, *Biomater.*, **2001**, 22, 331-336.
- [NA92] S. Nakatsuka, A. L. Andrady, *J. Appl. Polym. Sci*, **1992**, 44, 17.
- [NN58] W. Neumann, M. Neumann, *The Chemical Dynamics of Bone Material*, University of Chicago, Chicago, IL, **1958**, 34.
- [NSch96] U. Nackenhorst, U. Schröder, *Numerische Simulation des beanspruchungsadaptiven Knochenumbaus endoprothetisch versorgter Femura*, Bericht aus dem Institut für Mechanik, Universität der Bundeswehr Hamburg Fachbereich Maschinenbau, Sept. **1996**.
- [Ogaw96] M. Ogawa, *Chem. Commun.*, **1996**, 1149.
- [OM00] M. Ogawa, N. Masukawa, *Microporous Mesoporous Mater.*, **2000**, 38, 35-41.
- [Onso91] E. P. Onsoyen, *Cosmet. Aromes*, **1991**, 97, 85.
- [OTIH98] M. Okumura, S. Tsubota, M. Iwamoto, M. Haruta, *Chem. Lett.*, **1998**, 315.
- [OTMO97] S. O'Brien, J. Tudor, T. Maschmeyer, D. O'Hare, *Chem. Commun.*, **1997**, 1905-1906.
- [PCH95] M.M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench, *J. Am. Ceram. Soc.*, **1995**, 78, 2463.
- [Pete01] F. Peters, *Biologische Kristallisation von Calciumphosphaten – Untersuchung und Simulation*, Dissertation, Universität Hamburg, **2001**.
- [PH96] M.M. Pereira, L.L. Hench, *J. Sol-gel Sci. Technol.*, **1996**, 7, 59.
- [Pic01] C. Piconi, *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, 6595.
- [PJRL98] T. Peltola, M. Jokinen, H. Rahiala, E. Levanen, J. B. Rosenholm, I. Kangasniemi, A. U. Yli-Urpo, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1998**, 44, 12.
- [PLH91] H.-W. Pau, H. Leitner, H. Hartwein, *Laryngol-Rhinol-Otol.*, **1991**, 70, 10-13.
- [PP97]: E. Prouzet, T.J. Pinnavaia, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1997**, 36, 516.
- [PS94] D. Presti, J. Scott, *Cell Biochem. Function*, **1994**, 12, 281-288.
- [PSND89] G. Partsch, Ch. Schwarzer, J. Neumüller, A. Dunky, P. Petera, H. Bröll, G. Ittner, S. Jantsch, *Zeitschrift für Rheumatologie*, **1989**, 48, 123-128.
- [QWA00] X. Qu, A. Wirsén, A.-C. Albertson, *Polymer*, **2000**, 4841-4847.
- [RAB96]: N. K. Raman, M. T. Anderson, C. J. Brinker, *Chem. Mater.*, **1996**, 8, 1682-1701.
- [RAFE94] J. Rouquérol, D. Avnir, C. W. Fairbridge, D. H. Everett, J. H. Haynes, N. Pericone, J. D. F. Ramsay, K. S. W. Sing, K. K. Unger, *Pure and Applied Chemistry*, **1994**, 66, 1739-1759.

- [RBSW01] S. Rössler, R. Born, D. Scharnweber, H. Worch, A. Sewing, M. Dard, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **2001**, *12*, 871-877.
- [Rege96] O. Regev, *Langmuir*, **1996**, *12*, 4940-4944.
- [RH94] T. D. Rathke, S. M. Hudson, *JMS – Rev. Macromol. Chem. Phys.*, **1994**, *C34 (3)*, 375.
- [RHW93] G. L. Rorrer, T.-Y. Hsien, J. D. Way, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1993**, *32*, 2170-2178.
- [RMPV03] A. Rámila, B. Munnoz, J. Pérez-Pariente, M. Vallet-Regi, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, **2003**, *26*, 1199 -1202.
- [RNWT05] V. M. Rusu, C.-H. Ng, M. Wilke, B. Tiersch, P. Fratzl, M. G. Peter, *Biomater*, **2005**, *26*, 5414-5426.
- [RO00] R. N. Rosier, R. J. O’Keefe, *Instr. Course Lect.* **2000**, *49*, 495-502.
- [RSG00] M. Ruiz, A. M. Sastre, E. Guibal, *Reactive Functional Polymers*, **2000**, *45*, 155-173.
- [RSPP04] A. Rapacz-Kmita, A. Slosarczyk, Z. Paszkiewicz, C. Paluszkiwicz, *J. Mol. Struct.*, **2004**, *704*, 333.
- [Rueg98] J. M. Rueger, *Orthopädie* **1998**, *27*, 72-79.
- [RWBS00] S. Rössler, C. Wolf, R. Born, D. Scharnweber, H. Worch, *Biomaterialien*, **2000**, *1*, 32-36.
- [SC92] S. I. Stupp, G.W. Ciegler, *J. Biomed. Mater. Res.* **1992**, *26*, 169-183.
- [Sche00] G. Schechner, *Über die festkörperchemischen Eigenschaften biomineralisierter Kieselsäuren und über die biomimetische Synthese mesostrukturierter Alkylsaccharid-Kieselsäure-Komposite*, Dissertation, Universität Hannover, Logos Verlag, Berlin, **2000**.
- [SchM99] F. Schön, J. Müller, *Audiol. Neurotol.*, **1999**, *4*, 142-149.
- [Schr69] H. Schroeder, *Formation and Inhibition of Dental Calculus*, Hubert, Vienna, **1969**.
- [SCT99] S.-G. Shyu, S.-W. Cheng, D. L. Tzou, *Chem. Commun.*, **1999**, 2337-2338.
- [SDS02] A. Sakthivel, S. E. Dapurkar, P. Selvam, *Catal. Lett.*, **2002**, *80*, 73-76.
- [SHAG04] T. Sato, Md. K. Hossain, D. P. Acharya, O. Glatter, A. Chiba, H. Kunieda, *J. Phys. Chem. B.*, **2004**, *108*, 12927-12939.
- [SK01] V. R. Sinha, R. Kumria, *Int. J. Pharm.* **2001**, *224 (1-2)* 19-38]
- [SKYY98] S. Shio, A. Kimura, M. Yamaguchi, K. Yoshida, K. Kuroda, *Chem. Commun.*, **1998**, 2461-2462.
- [SM86] B. G. Sparkes, D. G. Murray, *Chitosan based wound dressing materials*. U. S. Patent, **1986**, 4572906.
- [SMS00] A. Stein, B.J. Melde R.C. Schrodin, *Adv. Mater.* **2000**, *12 (19)*, 1403-1419.
- [SMTc94] M. F. Saettone, D. Monti, M. T. Torracca, P. Chetoni, *J. Ocular Pharm.*, **1994**, *10*, 83-92.
- [SP97] N. Shahnaz, L. Polka, *Ear Hear*, **1997**, *18(4)*, 326-341.

- [SPLG99] R. A. Schoonheydt, T. Pinnavaia, G. Lagaly, N. Gangas, *Pure and Applied Chemistry*, **1999**, *71*, 2367-2371.
- [SRNT50] H. C. Stumpf, A. S. Russel, J. W. Newsome, C. M. Tucker, *Industr. and Engin. Chem.*, **1950**, *42* (7), 1398.
- [SRV02] M.C. Sunny, P. Ramesh, H. K. Varma, *J. Mater. Sci. Mater Med.*, **2002**, *13*, 623-632.
- [SSAT85] R. Schmidt, M. Stöcker, D. Akporiaye, E. H. Torstad, A. Olsen, *Microporous Mater.*, **1985**, *5*, 1-7.
- [Süß] Birte Süß, geplante *Dissertation*, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- [TABM03] A. I. Teixeira, G. A. Abrahams, P. J. Bertics, C. J. Murphy, P. F. Nealey, *J. Cell Sci.*, **2003**, *116*, 1881-1892.
- [TFSC97] S. H. Tolbert, A. Firouzi, G. D. Stucky, B. F. Chmelka, *Science*, **1997**, *278*, 264.
- [Thom99] J. M. Thomas, *Angew. Chem.*, **1999**, *11*, 3800-3843.
- [Tidd80] G. J. T. Tiddy, *Physics Reports No. 1*, **1980**, *57*, 1.
- [TKGK96] A. Takahara, K. Kojio, S. Ge, T. Kajiyama, *J. Vac. Sci. Technol.*, **1996**, *14*, 1747-1754.
- [TKMK89] B. P. Toole, C. B. Knudson, S. I. Munaim, W. Knudson, S. Welles, G. Chi-Rosso, in *Cutaneous Development, Aging and Repair, Fidia Research Series*, Hrsg.: G. Abatangelo, J. M. Davidson, *Liviana Press, Padova*, **1989**, *18*, 41-50.
- [TMK90] S.D. Troster, U. Müller, J. Kreuter, *Int. J. Pharm.*, **1990**, *61*, 85.
- [Tool81] B. P Toole, in *Cell Biology of Extracellular matrix*, Hrsg.: E. D. Hay, Plenum Press, New York, **1981**, 259-294.
- [TP93] G. A. Truskey, T. L. Proulx, *Biomater.*, **1993**, *14*, 243-254.
- [Turc] Christina Turck, geplante *Dissertation*, Medizinische Hochschule Hannover.
- [Turc06] Christina Turck, *mündliche Mitteilung über die vorläufigen Ergebnisse einer Untersuchung zur Biokompatibilität von Gehörknöchelchenprothesen im Kaninchenmittelohr an der Medizinische Hochschule Hannover*, März **2006**.
- [TYKX97] M. Trau, N. Yao, E. Kim, Y. Xia, G. M. Whitesides, I. A. Aksay, *Nature*, **1997**, *370*, 674.
- [UNK89] T. Umegaki, G. H. Nancollas, T. Kanzawa, *Memoirs of Faculty of Tech., Tokyo Metropolitan University* **1989**, *39*, 151-156.
- [UYYO99] H. Ueno, H. Yamada, I. Tanaka, N. Kaba, M. Matsuura, M. Okumura, T. Fujinaga, *Biomater.*, **1999**, *20*, 1407-1414.
- [VKRM96] J. C. Vartuli, C. T. Kresge, W. J. Roth, S. B. McCullen, J. S. Beck, K. D. Schmitt, M. E. Leonowics, J. D. Lutner, E. W. Sheppard, in: *Advanced catalysts and nanostructured materials*, Hrsg. W. R. Moser, Academic Press, San Diego, **1991**.
- [Volk99] D. Volkmer, *Chem. unserer Zeit*, **1999**, *33*, 6-19.
- [VP98] K. P. Vercruyse, G. D. Prestwich, *Therapeutic Drug, Carrier, Systems*, **1998**, *15*, 5, 513-555.

- [VRRP01] M. Vallet-Regi, A. Rámila, R.P. del Real, J. Pérez-Pariente, *Chem. Mater.*, **2001**, *13*, 308-311.
- [VSKR94] J. S. Vartuli, K. D. Schmitt, C. T. Kresge, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, S. B. McCullen, S. D. Hellring, J. S. Beck, J. L. Schlenker, D. H. Olson, E. W. Sheppard, *Chem. Mater.*, **1994**, *6*, 2317-2326.
- [W45] P. Weiss, *J. Exp. Zool.*, **1945**, *100*, 353-386.
- [WA97] S. Weiner, L. Addadi, *J. Mater. Chem.*, **1997**, *7*, 689-702.
- [WAST97] S. Weiner, T. Arad, I. Sabanay, W. Traub, *Bone*, **1997**, *20*, 509-514.
- [WB94] C.-G. Wu, T. Bein, *Chem. Mater.*, **1994**, *6*, 1109.
- [WCLW95] R. Z. Wang, F. Z. Cui, H. B. Wen, C. L. Ma, H. D. Li, *J. Mater. Sci. Letters*, **1995**, *14*, 490-492.
- [WCNW01] M. Wang, L. J. Chen, J. Ni, J. Weng, C. Y. Yue, *J. Mater. Sci: Mater.in Med.* **2001**, *12*, 855-860.
- [WEDS00]: T.-J. Webster, C. Ergung, R.H. Doremus, R.W. Siegel, R. Bizios, *Biomater.*, **2000**, *21*, 1803-1810;
- [WEDS01] T.J. Webster, C. Ergun, R.H. Doremus, R.W. Siegel, R. Bizios, *Biomater.*, **2001**, *22*, 1327-1333.
- [Weit98] Barbara Weitz, *Atlas der Anatomie*, Weltbild Verlag, **1998**, S.142.
- [WFL86] P. H. Weigel, G. M. Fuller, R. D. LeBoeuf, *J. Theor. Biol.*, **1986**, *119*, 219-234.
- [WGA97] M.C. Weißenberger, C.G. Göltner, M. Antonietti, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **1997**, *101*, 1679-1682.
- [WGZ05] Q. Wang, S. Ge, D. Zhang, *Wear*, **2005**, *259*, 952.
- [WHAK85] D. C. West, R. N. Hampson, F. Arnold, S. Kumar, *Science*, **1985**, *228*, 1324-1326.
- [WHU94] G. Wanka, H. Hoffmann, W. Ulbricht, *Macromolecules*, **1994**, *27(15)*, 4145-4159.
- [Will99] D. F. Williams, *The Williams dictionary of biomaterials*, Liverpool Univ. Press, 1. Auflage, **1999**, S. 40.
- [WIT93] S. Wada, H. Ichikawa, K. Tatsumi, *Biotechnol. Bioeng.*, **1993**, *42*, 854.
- [Witt05] N. Witteck, *Präparation von Metalloxiden im Hinblick auf die Anwendung als Implantatmaterial*, Diplomarbeit, Universität Hannover, **2005**.
- [WJ88] T. Wörnheim, A. Jönsson, *J. Coll. Inter. Sci.*, **1988**, *125*, 627.
- [WJPH03] D. Wang, X. Ji, J.-B. Pang, Q. Hu, H. Xu, Y. Lu, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2003**, *5*, 4070-4072.
- [WSB00] T. J. Webster, R.W. Siegel, R. Bizios, *Biomater.*, **2000**, *21*, 1803-1810.
- [WW98] S. Weiner, H. D. Wagner, *Annu. Rev. Mater. Sci.*, **1998**, *28*, 271-298.

- [XS04] J. M. Xue, M. Shi, *J. Controlled Release*, **2004**, *98*, 209-217.
- [YBBW01] H. H. P. Yiu, C. H. Botting, N. P. Botting, P. A. Wright, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2001**, *3*, 2983.
- [YISO03] I. Yamaguchi, S. Itoh, M. Suzuki, A. Osaka, J. Tanaka, *Biomater.*, **2003**, *24*, 3285-3292.
- [YKCM96] H. Yang, A. Kuperman, N. Coombs, S. Mamiche-Afara, G. A. Ozin, *Nature*, **1996**, *379*, 703.
- [YMW99] J. Y. Ying, C. P. Mehnert, M. S. Wong, *Angew. Chem.*, **1999**, *38*, 58-82.
- [YSIF96] T. Yamamoto, T. Shido, S. Inaga, Y. Fukushima, M. Ichikawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 5810.
- [YSKK90] T. Yanagisawa, T. Shimizu, K. Kuroda, C. Kato, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1990**, *63*, 988.
- [YTFO01] I. Yamaguchi, K. Tokuchi, H. Fukuzaky, Y. Koyama, H. Momna, J. Tanaka, *J. Biomed. Mater. Res.*, **2001**, *55*, 20-27.
- [YYZT04] X. Yan, C. Yu, X. Zhou, J. Tang, D. Zhao, *Angew. Chem.*, **2004**, *116*, 6106-6110.
- [YZSD00] Y. J. Yin, F. Zhao, X. F. Song, K. de Yao, W. W. Lu, J. C. Leong, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2000**, *77*, 2929-2938.
- [Zahn03] Th. Zahnert, *Laryngol-Rhinol-Otol*, **2003**, *82*, 157-180.
- [ZFH01] D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G.H. Fredrickson, B. F. Chmelka, G.D. Stucky, *Science*, **2001**, *279*, 548-552.
- [ZGFJ02] J. Zhao, F. Gao, Y. Fu, W. Jin, P. Yang, D. Zhao, *Chem. Commun.*, **2002**, 752-753.
- [ZHFC98] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 6024.
- [ZKSN86] S. J. Zawacki, P. B. Koutsoukos, M. H. Salimi, G. H. Nancollas, *The growth of calcium phosphates, ACS Symposium Series* **1986**, *322*, 650-660.
- [ZNZR03] Y. Zhang, M. Ni, M. Zhang, B. Ratner, *Tissue Eng.*, **2003**, *9*, 337-345.
- [ZYHL99] X.-G. Zhou, X.-Q. Yu, J. S. Huang, S.-G. Li, L.-S. Li, C.-M. Che, *Chem. Commun.*, **1999**, 1789-1790.
- [ZYLL02] F. Zhao, Y. Yin, W. W. Lu, J. C. Leong, W. Zhang, J. Zhang, M. Zhang, K. Yao, *Biomater.*, **2002**, *23*, 3227-3234.
- [ZYMF98] D. Zhao, P. Yang, N. Melosh, J. Feng, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, *Adv. Mater.*, **1998**, *10*, 1380-1385.
- [ZZ01] Y. Zhang, M. Zhang, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, **2001**, *662*, LL1.4.1-LL1.4.7.
- [ZZ02] Y. Zhang, M. Zhang, *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *61*, 1-8.

11 Anhang

11.1 Synthese und Charakterisierung von Chitosan-Aluminiumhydroxid-Kompositen

In diesem Kapitel wird zunächst die Synthese der in den audiologischen Untersuchungen (Kapitel 7) verwendeten Chitosan-Aluminiumhydroxid-Komposite und anschließend deren strukturanalytische Charakterisierung vorgestellt. Es werden Komposite mit verschiedenen Massenanteilen an organischer und anorganischer Komponente hergestellt. Wie bereits bei den Kompositen auf Basis von Hydroxylapatit, handelt es sich bei den angegebenen Massenverhältnissen um theoretische Massenverhältnisse, die unter der Voraussetzung einer vollständigen Fällung beider Komponenten berechnet wurden. Ausführliche Informationen zu den Vorkommen, Eigenschaften und strukturellen Aufbau der Aluminiumhydroxid-, Aluminiumoxidhydroxid- und Aluminiumoxid-Modifikationen finden sich in der Literatur.¹

11.1.1 Synthese der Chitosan-Aluminiumhydroxid-Komposite

Die Chitosan-Aluminiumhydroxid-Komposite werden durch eine Co-Präzipitation aus einer essigsäuren Lösung hergestellt. Die Fällung erfolgt durch eine Erhöhung des pH-Wertes mit konzentriertem Ammoniak. Das hierzu verwendete Verfahren wird exemplarisch an einem Komposit mit einem Massenverhältnis von 40/60 m-% Chitosan/Aluminiumhydroxid erläutert. Eine ähnliche Herstellungsmethode wurde in unserem Arbeitskreis von Frau Witteck [Witt05]² beschrieben.

¹ [Gme34] *Gmelins Handbuch der Anorganischen Chemie, Die Verbindungen des Aluminiums*, 8. Auflage, Verlag Chemie, Berlin **1934**, 98. [HW95] A. F. Holleman, E. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, 101. Auflage, de Gruyter, New York, **1995**. [SRNT50]. H. C. Stumpf, A. S. Russel, J. W. Newsome, C. M. Tucker, *Industr. and Engin. Chem.*, **1950**, 42 (7), 1398.

² [Witt05] N. Witteck, *Präparation von Metalloxiden im Hinblick auf die Anwendung als Implantatmaterial*, Diplomarbeit, Universität Hannover, **2005**.

1.96 g Aluminiumtriisopropylat werden in 20 mL destilliertem Wasser sowie 0.5 g Chitosan in 40 mL 2 %-iger Essigsäure gelöst. Beide Lösungen werden bei Raumtemperatur gerührt und nach 4 Stunden vereinigt. Der pH-Wert der Reaktionslösung wird mit 25 %-igem Ammoniak auf einen Wert von 10 eingestellt. Nach 12 Stunden Alterung wird der Niederschlag abzentrifugiert, dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und zunächst mittels einer Druckfiltration (1 bar Argon, 3 Minuten) getrocknet. Der Niederschlag wird in Glasröhrchen unterschiedlichen Durchmessers gefüllt, verdichtet und an der Luft getrocknet. In Abbildung 11-1 ist ein getrocknetes stäbchenförmiges Präparat dargestellt.

Für die Herstellung von Präparaten mit einem Massenanteil von 50/50 m-% bzw. 60/40 m-% Chitosan/Aluminiumhydroxid werden 1.31 g bzw. 0.864 g Aluminiumtriisopropylat in 20 mL Wasser gelöst. Die Menge an Chitosan wird nicht variiert.



Abbildung 11-1: Foto eines getrockneten Chitosan-Aluminiumhydroxid-Komposites mit einem Massenverhältnis von 40/60 m-% Chitosan/Aluminiumhydroxid.

11.1.2 Charakterisierung der Chitosan-Aluminiumhydroxid-Komposite

In diesem Abschnitt wird die strukturanalytische Charakterisierung der synthetisierten Chitosan-Aluminiumhydroxid-Komposite mittels Infrarot-Spektroskopie, Röntgendiffraktometrie und Rasterelektronenmikroskopie erläutert. Die Aufnahme der Infrarot-Spektren erfolgt mit einem Spektrometer des Typs *Tensor 27* der Firma *BRUKER*. Die Proben werden als Kaliumbromid-Pressling in Transmission gemessen. Die Röntgendiffraktogramme werden an einem *StadiP*-Diffraktometer mit $\theta/2\theta$ -Geometrie aufgenommen. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung wird an einem Rasterelektronenmikroskop des Typs *XL30 ESEM* der Firma *Philips* durchgeführt.

Die Infrarot-Spektren (Abb. 11-2) und die Röntgendiffraktogramme (Abb. 11-3) der Chitosan-Aluminiumhydroxid-Komposite lassen auf den Kompositcharakter der Präparate schließen. Die Infrarot-Spektren der Komposite sind sich sehr ähnlich. Eine Intensitätszunahme der Chitosan-Absorptionsbanden bei steigendem Chitosananteil im Komposit ist nicht zu beobachten. Ein typisches Infrarot-Spektrum eines Komposites mit einem Massenverhältnis von 40/60 m-% Chitosan/Aluminiumhydroxid ist stellvertretend in Abb. XX gezeigt. Die breite Bande im Bereich von $3100\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$ ist sowohl auf die (O–H)- und (N–H)-Valenzschwingungen des Chitosans als auch auf die (AlO–H)-Valenzschwingungen des Aluminiumhydroxids sowie möglicherweise auf Wasser zurückzuführen. Die symmetrische (AlO–H)-Schwingung und die (AlO–H)-Kombinationsschwingung deuten sich bei 3066 cm^{-1} und 2093 cm^{-1} an. Die (C–H)-Valenzschwingung des Polysaccharids sind bei etwa 2900 cm^{-1} deutlich zu erkennen. Im *finger-print*-Bereich unterhalb 1600 cm^{-1} ist eine Zuordnung der Absorptionsbanden sowohl zu Schwingungen des Aluminiumhydroxids als auch des Chitosans möglich. Eine Übersicht und einen Vergleich der gemessenen Wellenzahlen mit Literaturdaten liefert Tabelle 11-1.

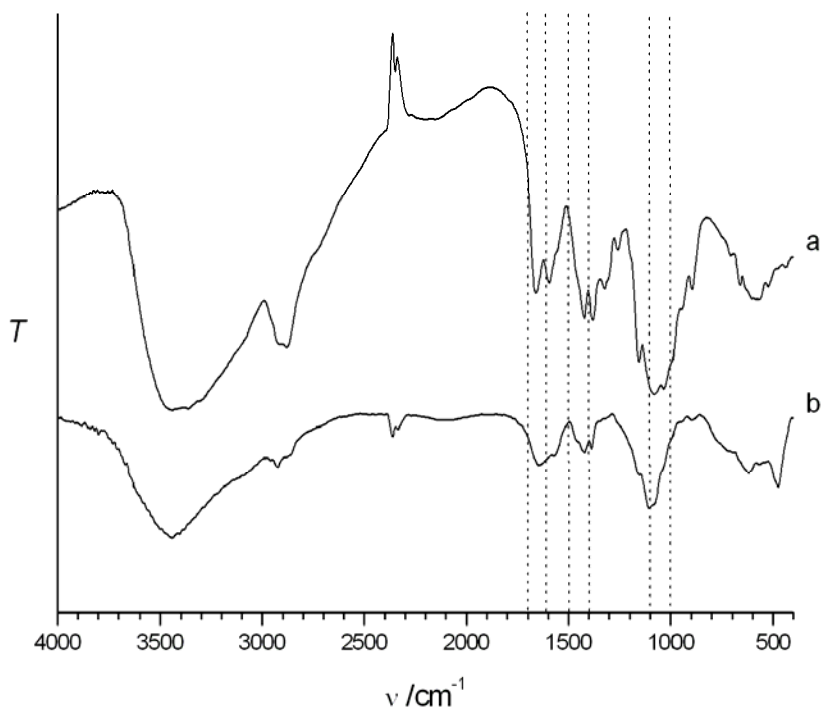


Abbildung 11-2: Infrarot-Spektren des reinen Chitosans (a) und eines Chitosan-Aluminiumhydroxid-Komposits mit einem Massenanteil von 40/60 m-% Chitosan/Aluminiumhydroxid.

Tabelle 11-1: Ausgewählte Absorptionsbanden eines Chitosan-Aluminiumhydroxid-Komposites im Vergleich zu den reinen Komponenten und zu Literaturdaten. Al(OH)₃: Aluminiumhydroxid, Chit: Chitosan, sh: Schulter.

Chit/Al(OH) ₃ [Witt05] ² ν / cm ⁻¹	Chit/Al(OH) ₃ 40/60 m-% ν / cm ⁻¹	Chit/Al(OH) ₃ 100/0 ν / cm ⁻¹	Al(OH) ₃ [Witt05] ² ν / cm ⁻¹	Al(OH) ₃ [Jan05] ³ ν / cm ⁻¹	Schwingungstyp
3287	~ 3420	~ 3400	3300	3450	ν(AIO-H)
2922	3066	-	-	3075	ν _s (AIO-H)
2864	2914, 2848	~ 2900	-	-	ν(C-H)
2144	2093	-	2156	2100	(AIO-H)
1742	1623	1655	-	-	ν(C=O), Amid I
1645	-	1594	-	-	δ(N-H)
1411	1555	1536	-	-	δ(N-H), Amid II
1063	1137 (sh)	-	-	1150	δ _{as} (AIO-H)
1030	1137, 1080	1147, 1062	-	-	Zuckerstruktur [YZFD00]
1030	1080	-	1020	1060	δ _s (AIO-H)
897	873	-	915	870	ν(Al-OH)
660	-	-	744	740	ν(Al-O-Al)

Die Röntgendiffraktogramme in Abbildung 11.3 zeigen scharfe Beugungsreflexe des α-Al(OH)₃-Bayerit bei 18.8, 27.9, 40.6 bzw. 53.2 °2θ und breite Reflexe des γ-AlOOH-Böhmits (bei etwa 14, 28, 38.5 bzw. 49 °2θ). Der breite Reflex des Chitosans im Bereich zwischen 19 und 23 °2θ ist nicht eindeutig zu erkennen. Trotz gleicher Alterungszeiten kann bei einigen Kompositen auch nur eine der Aluminiumhydroxid-Modifikationen bestimmt werden, wobei kein Zusammenhang zwischen der gebildeten Modifikation und dem Chitosananteil der Komposite festgestellt werden kann. Röntgenbeugungsuntersuchungen von Brinker et al. haben gezeigt, dass zunächst γ-AlOOH-Böhmit gebildet wird, welche sich in α-Al(OH)₃-Bayerit und anschließend in γ-Al(OH)₃-Bayerit umwandelt.⁴ Das Auftreten beider bzw. nur einer dieser Aluminiumhydroxid-Phasen konnte auch bei Witteck festgestellt [Witt05]², wobei bei der Herstellung der Chitosan-Aluminiumhydroxid-Komposite ebenfalls auf eine etwa gleiche Alterungszeit von 22 bis 26 Stunden geachtet wurde. Witteck vermutet, dass weitere Faktoren, wie der pH-Wert oder die Aluminium- und die

³ [Jan05] U. Janosovits, *Dissertation*, Universität Bayreuth, 1995.

⁴ [BS02] C. J. Brinker, G. W. Scherrer, *Sol-Gel Science*, The Physics and Chemistry of Sol-Gel-Processing, Academic Press, San Diego, 2002.

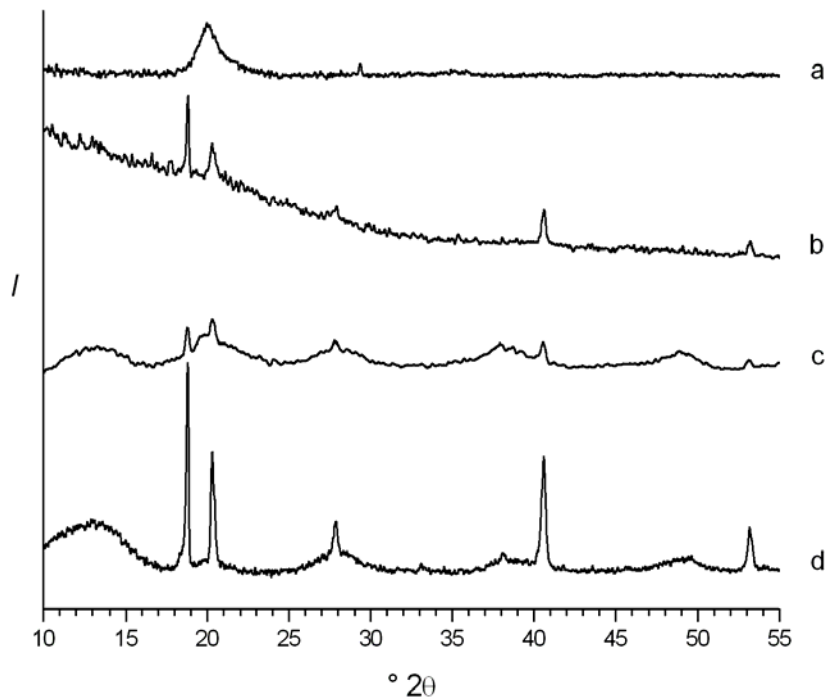


Abbildung 11-3: Röntgendiffraktogramme von reinem Chitosan (a) und Chitosan-Aluminiumhydroxid-Kompositen mit einem Massenverhältnis von (b) 60/40 m-% Chitosan/ Aluminiumhydroxid; (c) 50/50 m-% Chitosan/Aluminiumhydroxid; (d) 40/60 m-% Chitosan/ Aluminiumhydroxid.

Ammoniakkonzentration einen Einfluss auf die Ausbildung der Modifikation ausüben. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 11-4 liefern einen Eindruck in die Morphologie der Komposite. Die Komposite zeichnen sich durch Bereiche aus, die als „wulstartig“ oder „hügelig“ beschrieben werden können. Diese Morphologie unterscheidet sich von jenen des reinen Chitosans und des reinen Aluminiumhydroxids, die unter analogen Bedingungen gefällt wurden (Abb. 11-5). Die auftretenden Morphologien sind vergleichbar zu den von Witteck vorgestellten [Witt05]².

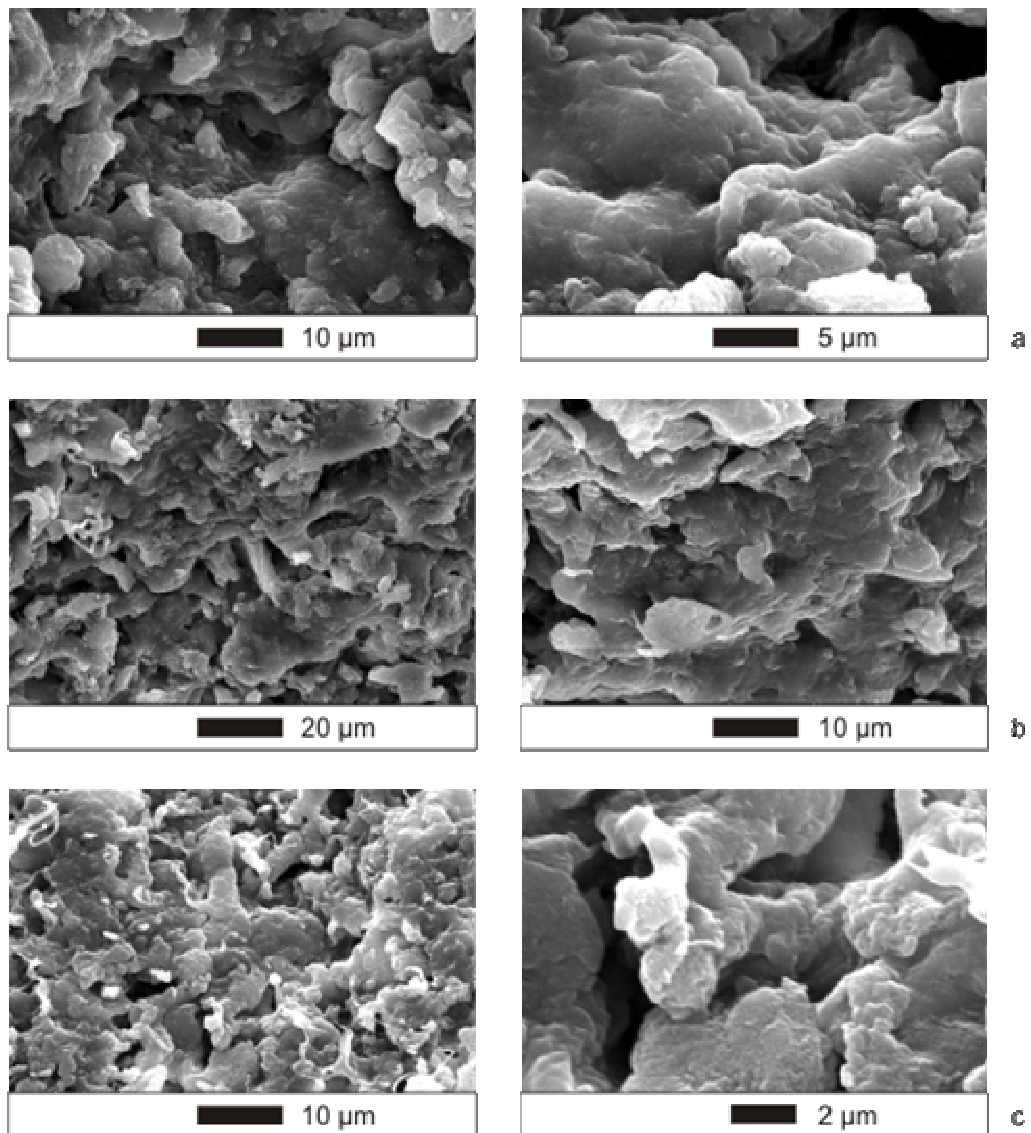


Abbildung 11-4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Chitosan-Aluminiumhydroxid-Kompositen. a) 60/40 m-% Chitosan/Aluminiumhydroxid; b) 50/50 m-% Chitosan/Aluminiumhydroxid; c) 40/60 m-% Chitosan/Aluminiumhydroxid.

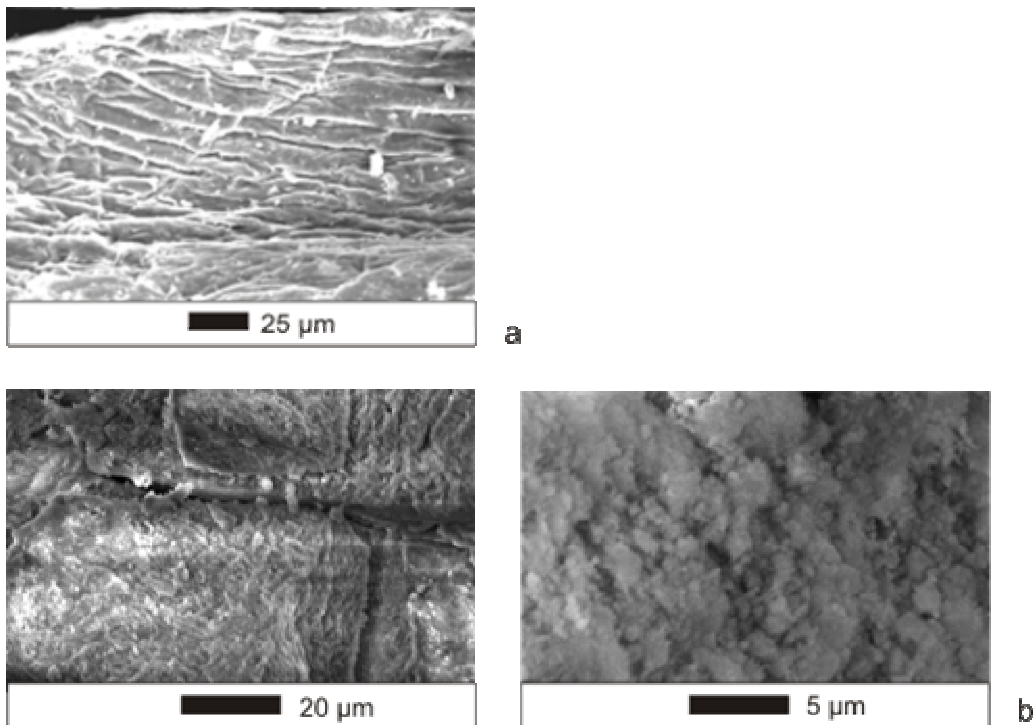


Abbildung XX: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von reinem Chitosan und reinem Aluminiumhydroxid.

Zusammenfassend kann aus den strukturanalytischen Charakterisierungen festgestellt werden, dass Chitosan gemeinsam mit Aluminiumhydroxid aus der Lösung ausgefällt wurde. Für die audiologischen Untersuchungen wurden Komposite verwendet, die sowohl Reflexe des α -Al(OH)₃-Bayerits als auch jene des γ -AlOOH-Böhmits aufweisen.

11.2 Analytische Methoden

11.2.1 Infrarot-Spektroskopie

Die Infrarotspektroskopie ist eine etablierte Methode zur strukturanalytischen Charakterisierung von Molekülen und Festkörpern, bei der die Schwingungszustände durch Absorption von Licht im infraroten Bereich angeregt werden⁵. Diese Anregung zu Schwingungen und Rotationen erfolgt, wenn sich das Übergangsdipolmoment beim Übergang in den angeregten Zustand ändert. Die Schwingungsfrequenzen der absorbierten Infrarot-Strahlung sind für die Bindungsverhältnisse bzw. funktionelle Gruppen charakteristisch, so dass eine Zuordnung der Frequenzen zu den entsprechenden Schwingungen möglich ist.

Messmethodik

Die Infrarot-Spektren wurden in Transmission mit einem Spektrometer des Typs *Tensor 27* der Firma *Bruker* gemessen. Die Messungen erfolgten an in Kaliumbromid gepressten Proben mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} . Hierfür wurden die Silica-Filme vom Trägermaterial abgekratzt bzw. die getrockneten organisch-anorganischen Komposite fein gemörsert und mit Kaliumbromid zu einer Tablette gepresst. Für die Bestimmung des Hintergrundes wurde ein reiner Kaliumbromid-Pressling gemessen und von dem Spektrum der Probe subtrahiert. Zur Auswertung der Spektren wurde das Programm OPUS 5.0 verwendet.

⁵ [HMZ02] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart, New York, 6. Auflage, **2002**.

11.2.2 Röntgendiffraktometrie

Eine weit verbreitete Methode zur Identifizierung und strukturanalytischen Charakterisierung von Festkörpern stellt die Röntgendiffraktometrie dar.⁶ Das Prinzip der Röntgendiffraktometrie basiert auf der Beugung von monochromatischer Röntgenstrahlung an den periodisch geordneten Netzebenen eines Kristalls. Durch die Interferenz der gestreuten Röntgenstrahlen wird ein für die vorliegende Struktur charakteristisches Beugungsmuster erzeugt. Eine Bedingung für das Auftreten eines gebeugten Röntgenstrahls ist eine konstruktive Interferenz, die bei den Winkeln zu beobachten ist, die die *Bragg'sche* Gleichung erfüllen:

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin \theta \quad (1)$$

Die *Bragg'sche* Gleichung stellt eine Verbindung zwischen der Beugungsordnung n , der Wellenlänge λ der verwendeten Röntgenstrahlung, dem Netzebenenabstand d und dem Beugungswinkel θ her.

Messmethodik

Die Röntgenbeugungsuntersuchungen wurden an zwei Diffraktometern der Firma *STOE* mit unterschiedlicher Beugungsgeometrie durchgeführt. Bei beiden Geräten wurde Cu-K α_1 -Strahlung mit einer Wellenlänge $\lambda = 1.540598 \text{ \AA}$ verwendet. Die Röntgendiffraktogramme der nanostrukturierten Silica-Filme wurden – auch nach der Behandlung mit *simulated body fluid* – an einem StadiP-Diffraktometer mit θ/θ -Geometrie, einem Graphit-Sekundärmonochromator, einer variablen Divergenzblende aufgenommen. Die Detektion der Röntgenstrahlen erfolgte mit einem Scintillationszählrohr. Für die Messungen wurden die mit Silica-Filmen beschichteten Trägermaterialien flach auf einen Probenträger gelegt und mit einer Schrittweite von $0.02 \text{ }^\circ 2\theta$ bei einer Messzeit von 3.3 Sekunden in Reflexion gemessen. Nach der Behandlung in *simulated body fluid* wurde eine Schrittweite von $0.014 \text{ }^\circ 2\theta$ und eine Messzeit von 10.5 Sekunden pro Schritt gewählt.

⁶ [DGM94] K. Doerffel, R. Geyer, H. Müller, *Analytikum*, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, Stuttgart, 9. Auflage, **1994**. [SM97] Smart, Moore, *Einführung in die Festkörperchemie*, Vieweg, Braunschweig, Wiesbaden, 1. Auflage, **1997**.

Für die Messungen der organisch-anorganischen Komposite wurde ein StadiP-Diffraktometer mit $\theta/2\theta$ -Geometrie, einem Germanium-[111]-Kristallmonochromator und einem positionssensitiven Detektor (*position sensitive detector*, PSD) verwendet. Hierzu wurden die fein gemörsterten Proben zwischen zwei amorphen Polyacetatfolien in einem Probenträger befestigt und mit einer Schrittweite von $0.1^\circ 2\theta$ bei einer Messzeit von 60 Sekunden in Transmission gemessen.

Die erfassten Daten wurden mit dem Programmpaket *WinXPow* der Firma *STOE* ausgewertet.

11.2.3 Thermoanalyse

Thermogravimetrische Messungen geben Auskunft über chemische Reaktionen oder physikalische Vorgänge einer Probe, die mit einer Massenänderung verbunden sind.⁵ Als Beispiele seien thermische Zersetzungen, Änderungen des Aggregatzustandes oder Reaktionen innerhalb einer Probe genannt, bei denen Gase freigesetzt werden. Bei der Thermogravimetrie (TG) wird der Massenverlust der Probe in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen. Bei der Differenzthermoanalyse (DTA) werden dagegen Temperaturdifferenzen zwischen der Probe und einer Referenzsubstanz aufgezeichnet, wobei die Referenzsubstanz in dem Messbereich keine thermischen Effekte zeigen darf. Mithilfe der Differenzthermoanalyse kann zwischen einer endothermen und einer exothermen Reaktionen unterschieden werden oder auch die Temperatur einer Phasenumwandlung bestimmt werden.

Messmethodik

Für die Thermoanalyse wurde eine Thermowaage vom Typ *Simultaneous Thermal Analyser 429* der Firma *NETZSCH* verwendet. Die Messungen erfolgten im Luftstrom mit einer Aufheizrate von 5°C pro Minute. $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ -Korund diente als Referenzmaterial. Die erhaltenen Thermoanalysediagramme wurden mit dem Programm *Proteus Thermal Analysis* ausgewertet.

11.2.4 Rasterelektronenmikroskopie

Bei den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen handelt es sich um konstruierte Abbilder der Probenoberfläche, die auf den zwischen einem Elektronenstrahl und der Probenoberfläche stattfindenden Wechselwirkungen basieren.⁷ Die Probe wird mit einem energiereichen, gebündelten Primärelektronenstrahl abgerastert, wobei niederenergetische Sekundärelektronen aus der Oberfläche austreten. Diese Photoelektronen werden an einem positiv geladenen Sekundärelektronendetektor detektiert. Das Signal des Sekundärelektronendetektors wird mit einem Photomultiplier verstärkt. Aufgrund unterschiedlicher Austrittsenergien entsteht ein kontrastreiches Abbild der Probenoberfläche.

Messmethodik

Für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung wurde sowohl ein Rasterelektronenmikroskop (REM) mit einer Wolfram-Haarnadelektrode als auch ein hochauflösendes Feldemissionsrasterelektronenmikroskop (FE-REM) verwendet.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der organisch-anorganischen Komposite und der mit nanostrukturierten Silica-Filmen beschichteten Standard-Glasobjektträger nach der Behandlung in *simulated body fluid* wurden an dem Rasterelektronenmikroskop des Typs *XL30 ESEM* der Firma *Philips* gemacht. In diesem Gerät wird der Elektronenstrahl über eine dünne haarnadelförmig gebogene Wolframdrahtschleife erzeugt, an der eine Spannung angelegt wird.

Die Proben wurden auf einem mit einem selbstklebenden Kohlenstoff-Pad versehenen Probenträger aus Aluminium befestigt und anschließend im Vakuum mit Gold bedampft. Aus den Glasobjektträgern wurden hierfür jeweils kleine Stücke heraus gebrochen. Zur Erhöhung der Leitfähigkeit wurde – zusätzlich zu der Goldbedampfung – an den Rändern der Bruchstücke ein leitfähiger Klebestreifen aus Graphit befestigt, der die Probenoberfläche mit dem selbstklebenden Kohlenstoff-Pad verbindet. Die Aufnahmen erfolgten bei einer Beschleunigungsspannung zwischen 10 kV und 15 kV sowie einem Arbeitsabstand von etwa 10 mm.

⁷ [FHK95] S. L. Flegler, J. W. Heckmann, K. L. Klomparens, *Elektronenmikroskopie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, New York, 1. Auflage, 1995.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen mit einer deutlich höheren Auflösung können bei dem Feldemissionselektronenmikroskop des Typs *JSM-6700F* der Firma *JEOL* erzielt werden. Bei einer Beschleunigungsspannung von 1 kV und einem Arbeitsabstand von 4 mm beträgt die Auflösung 2.2 nm.⁸ Diese hohe Auflösung ist für die Untersuchung der nanostrukturierten Silica-Filme notwendig. Der Elektronenstrahl wird in diesem Gerät durch eine Kaltmissions-Elektronenquelle (*cold field emission electron gun*) erzeugt, die das Prinzip der Feldemission basiert. Bei der Feldemission werden in einem Hochvakuum durch ein hohes elektrisches Feld aus einem Wolframkristall Elektronen herausgezogen. Hierbei wird ein kohärenter Elektronenstrahl erzeugt, der eine höhere Auflösung ermöglicht. Im Gegensatz zu der Wolfram-Haarnadelkathode wird das Wolfram bei dieser Methode nicht aufgeheizt.

Die Aufnahmen wurden von Frau Dipl.-Chem. Christin Menneking und Herrn Dr. Armin Feldhoff an einem Feldemissionsmikroskop des Typs *JSM-6700F* der Firma *JEOL* bei einer Beschleunigungsspannung von 1 kV und einem Arbeitsabstand von 2 mm gemacht. Zum einen wurde hierfür jeweils ein kleines Stück aus dem mit nanostrukturierten Silica beschichteten Standard-Glasobjektträger heraus gebrochen und mit einer leitfähigen Paste auf einen Messingblock, der hier als Probenträger verwendet wurde, geklebt. Zum anderen wurden die Silica-Filme vom Objektträger abgekratzt und auf einen plan polierten Graphitblock verteilt. Ein Bedampfen der Probe mit Gold ist nicht erforderlich.

⁸ <http://www.JEOL.com>

11.3 Chemikalienverzeichnis

Substanz	Hersteller	Reinheit
1,2,7,8-Diepoxyoctan	Lancaster Synthesis	97 %
3-Aminopropyltrimethoxysilan	ABCR	97 %
Aluminiumtriisopropylat	Aldrich	98+ %
Calciumacetat	Fluka	puriss.
Calciumchlorid	Riedel	puriss.
Chitosan	Acros Organics	
Glutardialdehyd (50 % in Wasser)	Riedel de Haën	
Hyaluronsäure-Natriumsalz von Streptococcus equi sp.	Biochemika (Fluka)	Protein < 1%
Kaliumcarbonat	Riedel de Haën	p.a.
Kaliumchlorid	Riedel de Haën	puriss.
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka	p.a.
Kaliumhydroxid	Fluka	chemisch rein
Magnesiumchlorid	Fluka	p.a.
<i>N</i> -2-(Aminoethyl)-3-amino propyltrimethoxysilan	ABCR	97 %
Natriumhydrogencarbonat	Merck	p.a.
Natriumchlorid	Merck	p. a.
Natriumsulfat	Merck	p. a.
Octaethylenglycolmonododecylether	Fluka	≥ 98 %
Pluronic [®] F127	BASF Corp.	
Pluronic [®] P103	BASF Corp.	
Pluronic [®] P123	BASF Corp.	
Tetraethoxysilan	Fluka	purum
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Fluka	purum
Ureidopropyltrimethoxysilan	ABCR	97 %

11.4 Abkürzungsverzeichnis

3-AP	3-Aminopropyltrimethoxysilan
Abb.	Abbildung
BMP2	bone morphogenetic protein 2
calc	calciniert
Chit	Chitosan
CPG [®]	controlled pore glass
CQ	quervernetztes Chitosan
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium (Firma BRL/Difco)
eGFP	enhanced Green fluorescent protein
FCS	fötale Kälberserum
G418	Gentamycin
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig
HAp	Hydroxylapatit
HEK293	human embryonic kidney carcinoma cell line 293
HMDS	Hexamethyldisilazan
Hya	Hyaluronsäure
LDV	Laser-Doppler-Vibrometrie
m-%	Massenprozent
MFT	Multifrequenztympanometrie
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
mod	modifiziert
<i>N</i> -2A-3-AP	<i>N</i> -2-(Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan
PBS	phosphate buffered saline
SBF	simulated body fluid
SDA	strukturdirigierendes Agens
sh	Schulter
UP	Ureidopropyltrimethoxysilan
ZK	Zellkulturplastik

11.5 Liste der Veröffentlichungen

Originalarbeiten

H. Menzel, S. Horstmann, P. Behrens, P. Bärnreuther, I. Krueger, M. Jahns, *Chemical properties of polyamines with relevance to the biomineralization of silica*, *Chem. Commun.*, **2003**, 2994–2995.

I. Krueger, P.P. Müller, H. Mojallal, M. Stieve, T. Lenarz, P. Behrens, *On the way to novel nanostructured bone replacement materials: First cytological investigations of mesoporous solids*, Posterbeitrag zur ECM V The Cell Biomaterial Reaction, 28. – 30. Juni 2004, Davos, Schweiz; Abstract veröffentlicht in *European Cells & Materials*, **2004**, **7** (1), 60.

P. Bärnreuther, M. Jahns, I. Krueger, P. Behrens, * S. Horstmann, H. Menzel, *Investigations into the Kinetics of the Polyamine-silica system and its Relevance to Biomineralization*, in *Organosilicon Chemistry VI*, Hrsg.: N. Auner, J. Weis, Wiley-VCH, Weinheim, 2005, 949-954.

H. Mojallal, M. Stieve, P. P. Müller, I. Krueger, N. Witteck, B. Borisov, C. Turck, P. Behrens, T. Lenarz, *Application of Laser Doppler Vibrometry (LDV) in Middle Ear Diagnostics and Surgeries*, *Biomedizinische Technik*, Fachverlag Schiele & Schön, **2005**, 50.

I. Krueger, P. Behrens, P.P. Müller, M. Stieve, H. Mojallal, T. Lenarz, *In-vitro bioactivity of nanoporous silica tested in simulated body fluid*, in Vorbereitung

P. Behrens, I. Krueger, P.P. Müller, M. Stieve, H. Mojallal, T. Lenarz, *Cytological investigations of nanostructured solids: Nanoporous silica materials with small nanostructures*, in Vorbereitung

Konferenzbeiträge

I. Krueger, P. Behrens, *Biominerale als Vorbild für Biomaterialien*, 1. Interdisziplinärer Kongress JUNGE NATURWISSENSCHAFT UND PRAXIS, 11.- 13. Juni 2003, München, Thesenpapier, veröffentlicht im „Almanach für junge Wissenschaftler“

P.P. Mueller, I. Krueger, S. Gratz, T. Bargaen, M. Stieve, T. Lenarz, P. Behrens, *Synthesis and characterization of novel nanocomposite bone replacement materials*, Posterbeitrag zur 18th European Conference on Biomaterials, 1.- 4. Oktober 2003, Stuttgart;

M. Stieve, S. Gratz, T. Bargaen, R. Heermann, P.P. Mueller, I. Krueger, T. Lenarz, P. Behrens, *Entwicklung einer Gehörknöchelchenprothese aus Siliziumkeramik unter funktionellen Gesichtspunkten*, Posterbeitrag zum 5. Jülicher Werkstoffsymposium: Poröse Biomaterialien - von der Idee zur klinischen Anwendung; 30. – 31. Oktober 2003, Jülich

I. Krueger, P.P. Müller, S. Gratz, T. Bargaen, M. Stieve, T. Lenarz, P. Behrens, *Synthesis and characterization of novel nanocomposite bone replacement materials*, Posterbeitrag zur 16. Deutschen Zeolith-Tagung, 3.–5. März 03, Dresden.

H. Mojallal, M. Stieve, P.P. Müller, I. Krueger, R. Heermann, P. Behrens, T. Lenarz, *Funktionelle Evaluierung einer neuartigen Gehörknöchelchenprothese aus Siliziumdioxidkeramik*, Vortrag von H. Mojallal auf der 38. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik, 22.- 24. September 2004, Ilmenau; Abstract veröffentlicht in Biomedizinische Technik, **2004**, 49,900-901.

P. Behrens, I. Krueger, P.P. Müller, M. Stieve, H. Mojallal, T. Lenarz, *Zum Einfluss nanometerstrukturierter und nanoporöser Materialien auf das Zellwachstum*, Posterbeitrag zur Jahrestagung 2004 der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien DGBM, 8. - 9. Oktober 2004, Berlin

H. Mojallal, M. Stieve, P. P. Müller, I. Krueger, R. Heermann, P. Behrens, T. Lenarz, *Funktionelle Evaluierung neuartiger Gehörknöchelchenprothesen aus Nanomaterialien*, Posterbeitrag zur ADANO-Herbsttagung, 14.-16. Oktober 2004, Heidelberg.

N. Witteck, I. Krueger, H.Mojallal, M. Stieve, T. Lenarz, P. P. Müller, P. Behrens, *Herstellung und Untersuchung von Biomaterialien für den Einsatz im Mittelohr*, Posterbeitrag zur Jahrestagung der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), 11.-14.09.2005, Düsseldorf.

I. Krueger, F. Dimpfel, P.P. Mueller, H. Mojallal, M. Stieve, T. Lenarz, P. Behrens, *Chemische und zellbiologische Untersuchungen an mit nanostrukturiertem Siliciumdioxid beschichtetem Bioverit®II*, Posterbeitrag zur Jahrestagung 2005 der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), 7. -8. Oktober 2005, Würzburg.

P. Behrens, I. Krueger, F. Dimpfel, P.P. Mueller, H. Mojallal, M. Stieve, T. Lenarz, *Chemische und zellbiologische Untersuchungen an kommerziellen nanoporösen Gläsern im (CPG®) Hinblick auf ihren möglichen Einsatz als Biomaterial*, Posterbeitrag zur Jahrestagung 2005 der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), 7. -8. Oktober 2005, Würzburg.

H. Mojallal, M. Stieve, I. Krueger, P.P. Mueller, P. Behrens, T. Lenarz, *Funktionelle Evaluierung neuer Gehörknöchelchenprothesen aus biomimetischen Materialien*, Posterbeitrag zur Jahrestagung 2005 der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), 7. -8. Oktober 2005, Würzburg.

N. Witteck, I. Krueger, P. Behrens, H. Mojallal, M. Stieve, T. Lenarz, P. P. Müller, *Herstellung und Untersuchung von Biomaterialien für den Einsatz im Mittelohr*, angenommener Posterbeitrag zur 77. Jahresversammlung 2006 der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., 24.-28. Mai 2006, Mannheim

P. Behrens, P.P. Mueller, M. Stieve, T. Lenarz, I. Krueger, H. Mojallal, F. Dimpfel, C. Turck, N. Witteck, B. Süß, *Biomimetische Synthese von Keramiken zum Einsatz als Knochenersatzstoffe*, angenommener Posterbeitrag zum Innovationsforum Grenzflächenfunktionalisierung/Biointerfaces, 16.-17. März 2006

11.6 Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Name: Ilka Krueger
Geburtsdatum, -ort: 09.08.1978, Alfeld (Leine)
Familienstand: ledig

■ Schulbildung

1985 – 1989 Grundschole Delligsen
1989 – 1991 Orientierungsstufe Duingen
1991 – 1998 Gymnasium Alfeld (Leine)
Abschluss: Abitur

■ Hochschulstudium

10/1998 – 01/2003 Universität Hannover, Fachbereich: Chemie
Abschluss: Diplom-Chemiker

06/2000 Diplomvorprüfung in den Fächern Anorganische,
Organische und Physikalische Chemie sowie Physik

07/2000 – 10/2000 Auslandspraktikum an der San Diego State University,
San Diego (USA)

06/2002 Diplomprüfung in den Fächern Anorganische,
Organische, Physikalische sowie Technische Chemie

07/2002 – 01/2003 Diplomarbeit zum Thema „Biomimetische Synthese von
Siliciumdioxid an organisch-anorganischen
Grenzflächen“, angefertigt am Institut für Anorganische
Chemie, Universität Hannover

seit 01/2003 Anfertigung der Doktorarbeit am Institut für
Anorganische Chemie, Universität Hannover

11.7 Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und alle verwendeten Hilfsmittel angegeben habe.

Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Weiterhin erkläre ich, dass die Dissertation nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Ilka Krueger

Hannover, den 27. April 2006

