

ORGANISCH-ANORGANISCHE KOMPOSITE AUF DER  
BASIS VON POLYSACCHARIDEN FÜR DIE  
ANWENDUNG ALS BIOMATERIALIEN UNTER  
BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER  
POLYSIALINSÄURE

---

VON DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT DER  
GOTTFRIED WILHELM LEIBNIZ UNIVERSITÄT HANNOVER

ZUR ERLANGUNG DES GRADES

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN  
DR. RER. NAT.

GENEMIGTE DISSERTATION VON

DIPL.-CHEM. CHRISTIN MENNEKING, GEB. RÖGGE

GEBOREN AM 13. SEPTEMBER 1979 IN HERFORD

2008

Referent: Prof. Dr. Peter Behrens  
Koreferentin: Prof. Dr. Carla Vogt  
Tag der Promotion: 27. März 2008

ORGANISCH-ANORGANISCHE KOMPOSITE AUF DER  
BASIS VON POLYSACCHARIDEN FÜR DIE  
ANWENDUNG ALS BIOMATERIALIEN UNTER  
BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER  
POLYSIALINSÄURE

---

VON DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT DER  
GOTTFRIED WILHELM LEIBNIZ UNIVERSITÄT HANNOVER

ZUR ERLANGUNG DES GRADES

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN  
DR. RER. NAT.

GENEMIGTE DISSERTATION VON

DIPL.-CHEM. CHRISTIN MENNEKING, GEB. RÖGGE  
GEBOREN AM 13.09.1979 IN HERFORD



## ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation:

„Organisch-anorganische Komposite auf der Basis von Polysacchariden für die Anwendung als Biomaterialien unter besonderer Berücksichtigung der Polysialinsäure“

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

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

Hannover, den 7. Januar 2008

---

(Unterschrift)

Christin Menneking



# DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Behrens bedanke ich mich herzlich für die Betreuung während dieser Arbeit. Darüber hinaus möchte ich mich für die Freiräume bedanken, die er mir gelassen hat. Ich danke Frau Prof. Dr. Carla Vogt für die Übernahme des Zweitgutachtens und dafür, immer ein offenes Ohr für wissenschaftliche Fragen gehabt zu haben. Herrn Prof. Dr. Jürgen Caro möchte ich für die Bereitschaft danken, als Prüfer des Nebenfachs zu fungieren.

Den Mitgliedern der Forschergruppe Polysia danke ich für die gute Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn von der Medizinischen Hochschule Hannover für ihre engagierte Leitung und das Bemühen, auch Chemikern einen Zugang zur Biochemie zu ermöglichen. Ihren Mitarbeitern Herrn Dipl.-Biochem. David Schwarzer und Herrn Dipl.-Biochem. Friedrich Freiberger möchte ich für die Messungen zur Abbaubarkeit der Polysialinsäure sowie ihre Hilfsbereitschaft und Geduld danken. Bei Frau Dipl.-Chem. Yvonne Stark und Frau Dipl.-Pharm. Stephanie Bruns vom Institut für Technische Chemie dieser Universität danke ich für die Durchführung des TBA-Assays. Herrn Dipl.-Chem. Bastian Rode vom gleichen Institut danke ich für die Bereitstellung der Polysialinsäure. Frau Dipl.-Chem. Silke Berski vom Institut für Organische Chemie ist für die Bereitstellung der Hydrogele sowie für ‚organischen Rat‘ zu danken. Für die Durchführung der mechanischen Messungen und der Mikro-Computertomographie bedanke ich mich bei Herrn Dr.-Ing. Dirk Bormann und Herrn Dipl.-Ing. Christian Klose vom Institut für Werkstoffkunde.

Herrn Dr. Armin Feldhoff vom Institut für Physikalische Chemie danke ich für die Durchführung der Transmissionselektronenmikroskopie und für die Geduld, die er aufgebracht hat. Für die Durchführung der Statischen Lichtstreuexperimente bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Huber vom Institut für Physikalische Chemie der Universität Paderborn. Frau Stella Kittel möchte ich für die Bestimmung des Natriumgehaltes danken.

Ich danke dem Arbeitskreis Behrens für die gute Zeit. Besonders möchte ich dabei Frau Dipl.-Chem. Olga Kufelt danken, die mich mit guten Worten, thermogravimetrischen Messungen und dem Korrekturlesen unterstützt hat. Zudem danke ich Herrn Dipl.-Chem. Falk Heinroth und Frau Birgit Beiße für weitere thermogravimetrische Messungen. Den Herren vom IT-Service: Kay Schaper, Michael

Jahns und Reimar Münnekhoff danke ich für die Geduld mit einem DAU. Herrn Dr. Michael Wiebcke danke ich für die Unterstützung bei allen Belangen der Röntgen-Diffraktometrie. Meinen fleißigen studentischen Hilfskräften danke ich für unermühtliches Stopfen, Tropfen und Messen.

Der letzte und wichtigste Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden. Herrn Ingfried Menneking danke ich für das eine oder andere Komma. Bei Frau Dipl.-Ing. Yvonne Galling bedanke ich mich für einen formatierenden Blick. Meiner Mutter danke für einen festen Glauben an ihre Töchter. Jens – Dir danke ich für Alles.



# KURZZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Herstellung und Charakterisierung organisch-anorganischer Kompositmaterialien auf der Basis von Polysacchariden für die Anwendung als Biomaterialien. Der Schwerpunkt liegt dabei auf den Einsatzmöglichkeiten der Polysialinsäure, einem körpereigenen Polysaccharid. Polysialinsäure spielt in der embryonalen Entwicklung eine entscheidende Rolle, kommt aber auch in pathogenen Bakterien wie *Escherichia coli* vor.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit den physiko-chemischen Eigenschaften der Polysialinsäure. Dabei wird insbesondere auf das Verhalten in Lösung eingegangen. Der Einfluss verschiedener Salze auf das Aggregationsverhalten von Polysialinsäure wird diskutiert. Ferner werden Rückschlüsse auf ihr Verhalten im Körper getroffen.

In weiteren Abschnitten werden die Einsatzmöglichkeiten der Polysialinsäure auf dem Gebiet der Biomaterialien untersucht. Ein Beispiel ist die Oberflächenfunktionalisierung von Nanopartikeln. Als Modellsubstanz wurden hier Silica-Nanopartikel verwendet, an die über einen Linker Polysialinsäure angebunden wird. Mögliche Anwendungsgebiete für so funktionalisierte Partikel sind das *drug delivery* im Gehirn und die künstliche Hyperthermie zur Krebstherapie.

Ein weiteres Beispiel ist die Verwendung von Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen als Knochenersatzmaterial. Im Rahmen dieser Arbeit werden solche Materialien hergestellt und charakterisiert. Die Cytotoxizität und die enzymatische Abbaubarkeit der Komposite werden überprüft. Ihre mechanischen Eigenschaften werden getestet und mit denen von Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen verglichen. Auf der Grundlage dieser Untersuchungen erfolgt eine Bewertung der Einsatzmöglichkeiten als biodegradables Knochenersatzmaterial.

Im Rahmen der Arbeiten auf dem Gebiet der Knochenersatzmaterialien entstand die Idee zur Entwicklung von Kombiimplantaten. Dabei handelt es sich um eine neuartige Form biodegradabler Implantate. Die Kombiimplantate bestehen aus einer Magnesiumhülle und einem Kompositkern. Als potentielles Einsatzgebiet kommt primär die Anwendung als Knochennagel in Frage.

Schlagwörter: Biomaterialien, Polysialinsäure, *drug delivery*, Knochenersatzmaterialien, Komposite

# ABSTRACT

The present work deals with organic-inorganic composites based on polysaccharides for the application as biomaterials. It focuses on polysialic acid, which is a polysaccharide produced by the human body. Polysialic acid plays a major part in the embryonic development of the nervous system. It also occurs in some pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*.

The first part of this work addresses the physico-chemical properties of polysialic acid. Particular attention is devoted to its behaviour in solution. The influence of different salts on the aggregation behaviour of polysialic acid is discussed. Furthermore, conclusions are drawn regarding its behaviour within the body.

Further parts of this thesis deal with possible applications of polysialic acid in the field of biomaterials, for instance by way of modifying the surface of nanoparticles. Experimental studies were carried out using silica nanoparticles as a model substance to which polysialic acid was covalently attached via a linker. Potential applications for the particles thus functionalised are drug delivery to the brain and artificial hyperthermia for cancer therapy.

Polysialic acid–hydroxylapatite-composites may be used as bone replacement materials. Such materials are produced and characterised as part of this thesis. The cytotoxicity and enzymatic degradation of the composites is assessed. Their mechanical stability is tested and compared with the stability of chitosan-hydroxylapatite-composites. An assessment of possible applications as biodegradable bone replacement materials is carried out based on the results of these tests.

During the course of research activities on bone replacement materials, the idea of ‘combined implants’ was conceived. These are a new type of biodegradable implants. ‘Combined implants’ consist of a magnesium shell filled with composite material. The most likely field of application is the use as bone nails.

Keywords: biomaterials, polysialic acid, drug delivery, bone replacement, composites





# INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG.....	1
2.	ALLGEMEINER TEIL .....	7
2.1	Biomaterialien – Vorbilder aus der Natur.....	7
2.2	Polysaccharide – vielfältige Materialien in der Natur und der Medizin.....	12
2.2.1	Chitosan .....	12
2.2.2	Hyaluronsäure.....	15
2.2.3	Polysialinsäure.....	17
2.2.4	Kristallisation von Polysacchariden.....	23
2.3	Polyelektrolyte.....	25
2.3.1	Polyelektrolyte in salzhaltigen Lösungen.....	26
2.4	Knochenersatzmaterialien.....	29
2.4.1	Autogener Knochenersatz.....	31
2.4.2	Permanente Implantate.....	32
2.4.3	Biodegradable Knochenimplantate.....	35
2.4.3.1	Polymere.....	35
2.4.3.2	Keramiken.....	35
2.4.3.3	Kompositmaterialien.....	37
2.4.3.4	Magnesium.....	40
2.5	Nanopartikel in der Medizin.....	42
2.5.1	Magnetische Nanopartikel.....	42
2.5.2	Silica-Nanopartikel.....	43
3.	ANALYTHISCHE METHODEN.....	47
3.1	Rasterelektronenmikroskopie.....	47
3.1.1	Rasterelektronenmikroskop.....	47

3.1.2	Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop.....	48
3.2	Transmissionselektronenmikroskopie.....	48
3.2.1	Transmissionselektronenmikroskop.....	50
3.3	Röntgen-Diffraktometrie.....	50
3.4	Infrarot-Spektroskopie.....	51
3.5	Dynamische Lichtstreuung.....	51
3.6	Statische Lichtstreuung.....	52
3.7	Simultane Thermoanalyse.....	54
3.8	Mikrocomputertomographie.....	54
3.9	ICP-OES.....	57
3.10	Mechanische Messungen.....	58
4.	PHYSIKO-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DER POLYSIALINSÄURE.....	59
4.1	Aggregationsverhalten im wässrigen Medium.....	59
4.1.1	Aggregationsverhalten in reinem Wasser.....	59
4.1.2	Aggregationsverhalten in wässrigen Lösungen von Alkali- und Erdalkalisalzen.....	64
4.1.3	Diskussion.....	91
4.2	Polysialinsäure im festen Zustand.....	94
4.2.1.1	Herstellung von Polysialinsäurekristallen.....	94
4.2.1.2	Charakterisierung der Polysialinsäurekristalle.....	94
4.2.1.3	Diskussion.....	102
4.2.2	Selbstorganisation von Polysialinsäure.....	102
5.	FUNKTIONALISIERUNG VON SILICA-NANOPARTIKELN.....	105
5.1	Synthese der beschichteten Silica-Nanopartikel.....	105
5.2	Charakterisierung der beschichteten Silica-Nanopartikel.....	107
5.3	Diskussion.....	116

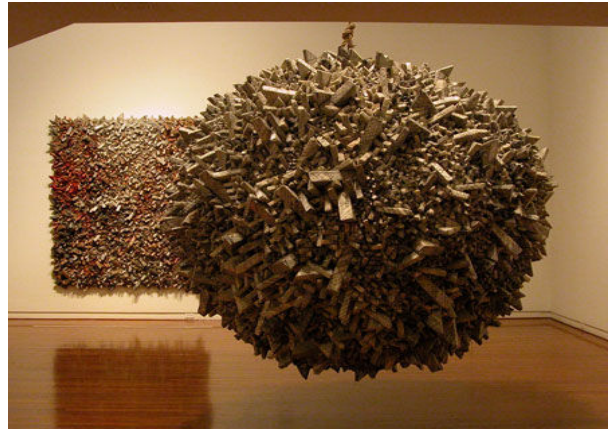
6.	ORGANISCH-ANORGANISCHE KOMPOSITE AUF DER BASIS VON POLYSACCHARIDEN.....	119
6.1	Co-Präzipitation.....	119
6.1.1	Organisch-anorganische Komposite auf Chitosanbasis.....	120
6.1.1.1	Herstellung.....	120
6.1.1.2	Charakterisierung.....	122
6.1.1.3	Mechanische Prüfung.....	132
6.1.2	Organisch-anorganische Komposite auf Polysialinsäurebasis.....	133
6.1.2.1	Herstellung.....	134
6.1.2.2	Charakterisierung.....	135
6.1.2.3	Biochemische Abbaubarkeit .....	141
6.1.2.4	Cytotoxizität .....	146
6.1.2.5	Mechanische Prüfung.....	148
6.1.3	Diskussion der Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposite im Vergleich mit Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen.....	150
6.2	Hydrogele.....	156
6.2.1	Mineralisation von Polysialinsäure-Hydrogelen in simulierter Körperflüssigkeit.....	156
6.2.1.1	Versuchsdurchführung.....	156
6.2.1.2	Charakterisierung der Hydrogele.....	157
6.2.2	Mineralisation eines Polysialinsäure-Hydrogels.....	159
6.2.2.1	Versuchsdurchführung.....	159
6.2.2.2	Charakterisierung der Hydrogele.....	159
6.2.3	Diskussion der Mineralisation von Polysialinsäure-Hydrogelen.....	161
6.3	Calciumcarbonat-Präzipitate.....	161
6.3.1	Synthese der Calciumcarbonat-Präzipitate .....	161
6.3.2	Charakterisierung der Calciumcarbonat-Präzipitate.....	162
6.3.3	Diskussion der Calciumcarbonat-Präzipitate.....	165
6.4	Diskussion.....	165

7.	ENTWICKLUNG VON KOMBIIMPLANTANTEN.....	169
7.1	Herstellung der Implantate.....	169
7.2	Diskussion.....	172
8.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	175
9.	ANHANG.....	179
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	179
9.2	Abbildungsverzeichnis.....	180
9.3	Tabellenverzeichnis .....	188
9.4	Chemikalienliste.....	189
9.5	Literaturverzeichnis .....	191
9.6	Tabellarischer Lebenslauf.....	205
9.7	Publikationsliste.....	207









*Aggregation 001-MY056* von Chun Kwang-Young [1].

## 1. EINLEITUNG

Polysaccharide besitzen in der Natur eine immense Bedeutung. Die Cellulose ist das häufigste Polysaccharid und gleichzeitig auch die häufigste organische Verbindung auf der Erde. Polysaccharide besitzen auch für den Menschen eine große Bedeutung. Einerseits erfüllen sie physiologisch wichtige Funktionen und spielen in der Biochemie des Körpers eine bedeutende Rolle. Andererseits finden sie in den unterschiedlichsten technischen Bereichen Verwendung. Neben großtechnischen Anwendungen, zum Beispiel in der Papierindustrie und der Abwasserreinigung, haben sich in den letzten Jahren auch viele hochspezialisierte Anwendungen ergeben. Auch im Bereich der Biomaterialien finden sie mehr und mehr Verwendung. Biomaterialien ersetzen im Körper Funktionen, die aufgrund von Krankheit oder Unfällen ausgefallen sind. Darüber hinaus werden sie in der Medizin zu therapeutischen Zwecken eingesetzt. In letzter Zeit wurde eine Vielzahl neuer Materialien entwickelt, die in den unterschiedlichsten Bereichen des Körpers Anwendung finden. Als Beispiel sind biodegradierbare Implantate zu nennen. Diese haben die Aufgabe, Körperfunktionen temporär zu ersetzen und sich anschließend auflösen. Biodegradierbare Materialien kommen unter anderem im Bereich des Knochenersatzes oder als Stents zum Einsatz. Auf dem Gebiet der Knochenersatzmaterialien wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer Materialien entwickelt. Neben Keramiken, Polymeren und Metallen werden auch Kompositmaterialien erprobt. Der Einsatz all dieser bisher entwickelten Materialien ist jedoch problematisch, da sie im Körper unkontrolliert und somit häufig

zu schnell abgebaut werden. Das hat zur Folge, dass diese ausschließlich an Stellen eingesetzt werden können, die keiner mechanischen Belastung unterliegen. Die Kontrolle des Abbauprozesses von biodegradablen Biomaterialien stellt eine zentrale Anforderung an die nächste Generation von Implantatmaterialien dar. Darüber hinaus ist die Verbesserung der derzeit häufig unzureichenden mechanischen Eigenschaften der eingesetzten Materialien anzustreben. Besitzen diese ein zu hohes Elastizitätsmodul, kann das durch „stress shielding“ zum Auflösen des umgebenden Knochens führen: Die Belastung wird überwiegend vom Implantat getragen, der ungenügend belastete Knochen wird abgebaut. Ist das Elastizitätsmodul zu niedrig, halten die Materialien den auftretenden mechanischen Belastungen nicht stand. Darüber hinaus muss es Ziel sein, die Knochenneubildung anzuregen und die Einheilung der Implantate zu verbessern.

Ein weiteres Einsatzgebiet für Biomaterialien ist das *drug delivery*. Dabei werden Wirkstoffe kontrolliert über einen längeren Zeitraum im Körper freigesetzt. Typischerweise werden dazu Nanopartikel eingesetzt, die mit Wirkstoffen beladen wurden. In diesem Zusammenhang stellt der Wirkstofftransport ins Gehirn eine besondere Herausforderung dar. Das Gehirn ist durch die Blut-Hirn-Schranke speziell geschützt. Diese Barriere gilt es auch für die Nanopartikel zu überwinden. Eine Verbesserung des Transports der Nanopartikel kann in der Medizin von großem Nutzen sein. So ist neben dem *drug delivery* auch die künstliche Hyperthermie ein potentielles Anwendungsfeld [2].

Polysialinsäure ist ein körpereigenes Polysaccharid. Es besitzt eine sehr gute Bioverträglichkeit und ist daher für die Herstellung von Biomaterialien besonders gut geeignet. Im menschlichen Körper nimmt Polysialinsäure eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung des zentralen Nervensystems ein. Sie ist an der Regulation der Zell-Zell-Interaktion im Gehirn beteiligt [3]. Ihr hoher Raumbedarf führt zu einer Erweiterung des Zell-Zell-Abstandes. Polysialinsäure ist ein Polyelektrolyt. Diese Polymerklasse wird dadurch charakterisiert, dass ihre Monomereinheiten ionisierbare Gruppen tragen. Durch die daraus resultierende Abstoßung der gleichnamigen Ladungen der einzelnen Monomereinheiten ergibt sich der hohe Raumbedarf. Anders als viele andere Biopolymere wie Chitosan oder Hyaluronsäure gibt es für Polysialinsäure im adulten Körper keinen Metabolismus. Dies stellt einen zusätzlichen Vorteil für die Anwendung als Biomaterial dar. Polysialinsäure lässt sich allerdings durch das aus einem Phagen stammende Enzym Endosialidase abbauen. So sollte Polysialinsäure im Körper stabil sein, sich aber durch die Gabe von Endosialidase

gezielt abbauen lassen. Die Forschergruppe 548 der DFG „Polysia“ erforscht die Herstellung, die Eigenschaften und Funktion sowie die medizinische Anwendbarkeit der Polysialinsäure. In diesen Rahmen ordnet sich auch diese Arbeit ein. Zum einen wird auf die physiko-chemischen Eigenschaften der Polysialinsäure eingegangen und zum anderen werden potentielle Anwendungen der Polysialinsäure im Bereich der Biomaterialien erörtert.

Bei den Untersuchungen zu den physiko-chemischen Eigenschaften gilt ein besonderes Augenmerk dem Verhalten der Polysialinsäure in Lösung. Mit Hilfe von Lichtstreuungsmethoden wird in dieser Arbeit das Aggregationsverhalten von Polysialinsäure in wässrigen Lösungen in Gegenwart verschiedener Salze untersucht, um dadurch Rückschlüsse auf das Verhalten im Körper treffen zu können.

Neben dem Aggregationsverhalten stehen in dieser Arbeit aber potentielle Anwendungen der Polysialinsäure als Biomaterial im Vordergrund. Ein Ansatz zu medizinischen Anwendungen lässt sich der Natur entlehnen. Die Bakterien *Escherichia coli* K1 und *Neisseria meningitidis* besitzen beide eine umgebende Schutzhülle, auch Glycocalix genannt, die in diesen Fällen aus Polysialinsäure besteht [4, 5]. Diese Hülle ermöglicht es den Bakterien, in das durch die Blut-Hirn-Schranke speziell geschützte menschliche Gehirn einzudringen und dort Entzündungen zu verursachen [6]. Dies gelingt, weil die die Bakterien umgebende Polysialinsäure vom Immunsystem nicht als Fremdkörper erkannt wird, so dass die Bakterien nicht bekämpft werden. Die Fähigkeit der Bakterien, mittels einer Polysialinsäurehülle die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, wird als Anregung genommen, auch Nanopartikel mit einer Polysialinsäurehülle auszustatten (Abb. 1-1). Dazu wird Polysialinsäure über einen Linker chemisch an Silica-Nanopartikel gebunden. Ziel ist es, auf diese Weise ein neues System zum Transport von Wirkstoffen ins Gehirn zu entwickeln, welches dort eine kontinuierliche Abgabe des Wirkstoffs ermöglicht. Eine weitere denkbare Anwendung ist der Transport von magnetischen Nanopartikeln in das Gehirn. Dort könnten diese zur Krebstherapie mittels künstlicher Hyperthermie eingesetzt werden.

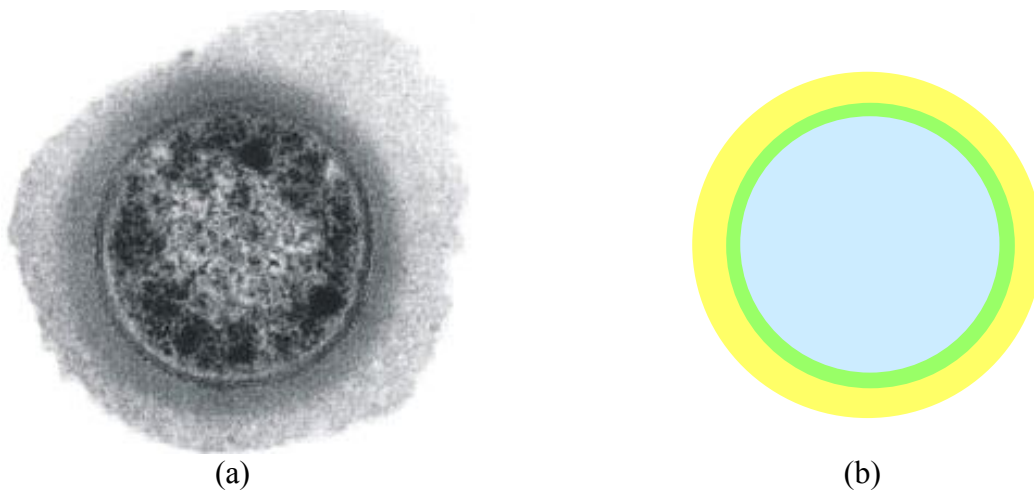


Abb. 1-1. (a) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines *Escherichia coli*-Bakteriums. Der diffuse äußere Rand ist die Glycocalix aus Polysialinsäure. (b) Schema eines funktionalisierten Nanopartikels. Der Kern des Nanopartikels ist in hellblau, der Linker in grün und die Polysialinsäure in gelb dargestellt.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Weiterentwicklung von Knochenersatzmaterialien. Es gibt eine Vielzahl von medizinischen Indikationen, die einen Ersatz des natürlichen Knochens erforderlich machen. Typische Beispiele sind komplizierte Frakturen sowie der Knochenersatz nach der Explantation von Knochentumoren. Oft wird das Implantatmaterial im Körper nur für einen bestimmten Zeitraum benötigt. In solchen Fällen ist der Einsatz von biodegradierbaren Implantatmaterialien sinnvoll. Diese Materialien lösen sich mit der Zeit auf und werden dann durch natürlichen Knochen ersetzt. In diesem Bereich werden, wie schon erläutert, unterschiedliche Werkstoffe eingesetzt. Ein Beispiel sind Kompositmaterialien. Bei Kompositen handelt es sich wie beim natürlichen Knochen um organisch-anorganische Verbundwerkstoffe. Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit Polysaccharid-Hydroxylapatit-Kompositen. Dabei werden hier unter anderem Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite vorgestellt. Diese wurden schon in der Literatur beschrieben [7, 8]. Im Rahmen dieser Arbeit werden ihre mechanischen Eigenschaften getestet und mit den Eigenschaften des natürlichen Knochens sowie anderer Komposite verglichen. Chitosan ist die zweithäufigste organische Verbindung der Erde. Neben einer guten Verfügbarkeit besitzt es eine gute Bioverträglichkeit und wird vom menschlichen Körper abgebaut. Dieser Abbau erfolgt allerdings unkontrolliert, so dass Chitosanwerkstoffe schon nach vergleichsweise kurzer Zeit vom Körper resorbiert

werden. In diesem Zeitraum kann der Körper das Implantat nicht durch natürlichen Knochen ersetzen. Das führt dazu, dass die Chitosan–Hydroxylapatit-Komposite nicht an mechanisch beanspruchten Stellen im Körper eingesetzt werden können.

Auch im Bereich der Knochenersatzmaterialien wird in dieser Arbeit die Möglichkeit zum Einsatz von Polysialinsäure in Form von Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositmaterialien diskutiert, die ja als körpereigenes Material eine optimale immunologische Verträglichkeit besitzt und dort stabil ist, andererseits aber auch gezielt abgebaut werden kann. Polysialinsäure besitzt damit gegenüber anderen Polysacchariden wie Chitosan oder Hyaluronsäure entscheidende Vorteile, da diese unkontrolliert durch einen körpereigenen Metabolismus abgebaut werden. In dieser Arbeit wird die Herstellung und Charakterisierung dieser neuen Art von Kompositmaterialien vorgestellt.

Organisch-anorganische Kompositmaterialien sind zwar bioresorbierbar und ahmen die Eigenschaften des natürlichen Knochens nach, jedoch halten sie den mechanischen Belastungen bei der Implantation und im Körper meist nur unzureichend stand. Darüber hinaus bedarf es einer zusätzlichen Fixierung der Implantate. Metallische Implantate besitzen im Vergleich dazu bessere mechanische Eigenschaften. Die meisten als Implantatmaterialien einsetzbaren Metalle sind jedoch nicht biodegradierbar. Neben Eisen weist lediglich Magnesium diese Eigenschaft auf und fördert zudem die Knochenneubildung [9]. Bei seiner Korrosion entstehen jedoch große Mengen an Wasserstoff im Körper. Um die Vorteile von metallischem Magnesium mit denen der organisch-anorganischen Komposite zu verbinden, wurde hier im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 599 „Biomedizintechnik“ eine neue Form der biodegradierbaren Implantate entwickelt: die Kombiimplantate. Diese bestehen aus einer Magnesiumhülle, die ein organisch-anorganisches Komposit als Kern umgibt. Die Erfindung wurde zum Patent angemeldet.





## 2. ALLGEMEINER TEIL

In diesem Teil sollen die theoretischen Grundlagen der Arbeit erläutert werden. Darüber hinaus soll der Stand der Technik wiedergegeben werden.

### 2.1 Biomineralien – Vorbilder aus der Natur

Der Begriff ‚Biomineralisation‘ beschreibt die Bildung von anorganischen Substanzen durch Lebewesen. Heute sind über 70 verschiedene Biomineralien bekannt. Sie bestehen zumeist aus einem anorganischen und einem organischen Bestandteil, wobei das Verhältnis der beiden Komponenten sehr stark variieren kann. Biomineralien besitzen oft einen hochgradig hierarchischen Aufbau, der sich in einer geordneten Struktur auf mehreren Größenskalen manifestiert. Dieser Aufbau trägt zu ihren hervorragenden mechanischen Eigenschaften bei [10]. Zu den wichtigsten Biomineralien zählen amorphes Siliciumdioxid, Calciumcarbonat und, wegen seiner großen Bedeutung für den Menschen, Hydroxylapatit [11]. Letzterer ist Hauptbestandteil des Knochens (Abb. 2-1). Im Folgenden soll nun auf den Knochen näher eingegangen werden.



Abb. 2-1. Photographie eines Oberschenkelknochens im Querschnitt aus [12].

Als Knochen bezeichnet man das harte, skelettbildende Stützgewebe der Wirbeltiere. Er besteht zu circa 70 % aus anorganischen und zu 30 % aus organischen Bestandteilen. Der wichtigste organische Bestandteil des Knochens mit etwa 85-90 % ist das Kollagen I, ein Strukturprotein. Seine Polypeptidketten bilden eine Tripelhelixstruktur. Darüber hinaus enthält der Knochen noch ungefähr 200 weitere Proteine, wie Osteocalcin, Knochenproteoglycan und Sialoprotein.

Der anorganische Anteil des Knochens besteht zu 95 % aus Hydroxylapatit (HAP). Hydroxylapatit  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  ist das stabilste Calciumphosphat. Im reinen Zustand handelt es sich um einen weißen Festkörper. Im neutralen Medium ist HAP schwer löslich. Chemisch reiner Hydroxylapatit kristallisiert in monokliner Form. Diese wird aber oberhalb von 250 °C in die hexagonale Form umgewandelt. Die hexagonale Form wird auch durch den Einbau von Fremdionen, wie z.B. Fluorid an Stelle von Hydroxid, stabilisiert, so dass diese Modifikation auch bei Raumtemperatur gebildet werden kann. In Hydroxylapatit können eine Vielzahl von Fremdionen eingebaut werden. Alle Gitterplätze sind so flexibel, dass sie zum Teil substituiert werden können. Das Calcium kann durch Natrium, Kalium, Magnesium oder Strontium, das Phosphat durch Carbonat und das Hydroxid durch Fluorid oder Chlorid ersetzt werden. Der ‚biologische Hydroxylapatit‘ ist immer nichtstöchiometrisch aufgebaut. Er enthält stets zwischen 5-8 Gewichtsprozent Carbonat [13]. Carbonat inhibiert die Hydroxylapatit-Kristallisation [14]. Bei der Knochenneubildung scheint amorphes Silica eine wichtige Rolle zu spielen [15].

Knochen besitzt, wie viele andere Biomineralien auch, einen komplexen hierarchischen Aufbau [16]. Im erwachsenen Körper gibt es zwei verschiedene Knochenformen: die Corticalis und die Spongiosa. Zur Corticalis gehören beim Menschen etwa 80 % des gesamten Knochenvolumens. Sie ist eine kompakte Struktur von hoher Dichte, die vor allem an der Knochenaußenseite zu finden ist. Die grundlegende Struktureinheit ist hierbei das Osteon, auch Haver'sches System genannt (Abb. 2-2). Es besitzt einen zylinderförmigen Aufbau und eine räumliche Ausdehnung von 0.25 mm × 10 – 50 mm. In der Mitte dieses Zylinders verläuft der Haver'sche Kanal, durch den Blut und Nervenbahnen verlaufen. Über seitliche Verzweigungen, die Volkmann'schen Kanäle, sind die einzelnen Osteone miteinander verbunden. Der Zylinder selbst ist aus Knochenlamellen, den Haver'schen Lamellen, aufgebaut. Diese sind etwa 3-7 µm dick. Zwischen diesen Lamellen sind Osteozyten eingebettet, auf die im Folgenden noch einmal eingegangen wird. Die Lamellen selbst bestehen wiederum

aus Kollagenfasern, auch Fibrillen genannt, die etwa 15  $\mu\text{m}$  lang und 50 -70 nm dick sind [17]. In diese ist nanokristalliner, carbonathaltiger Apatit eingelagert. Die Apatitkristalle sind zwischen 2 und 3 nm dick und etwa zehnmal so lang und breit [18]. Die Kristallite sind parallel zur Faser entlang der kristallographischen c-Achse angeordnet. Ihre geringe Größe, die sich im Nanometerbereich bewegt, spiegelt sich auch im Röntgendiffraktogramm wieder. Die Reflexe sind gegenüber synthetischem, kristallinem HAP deutlich verbreitert.

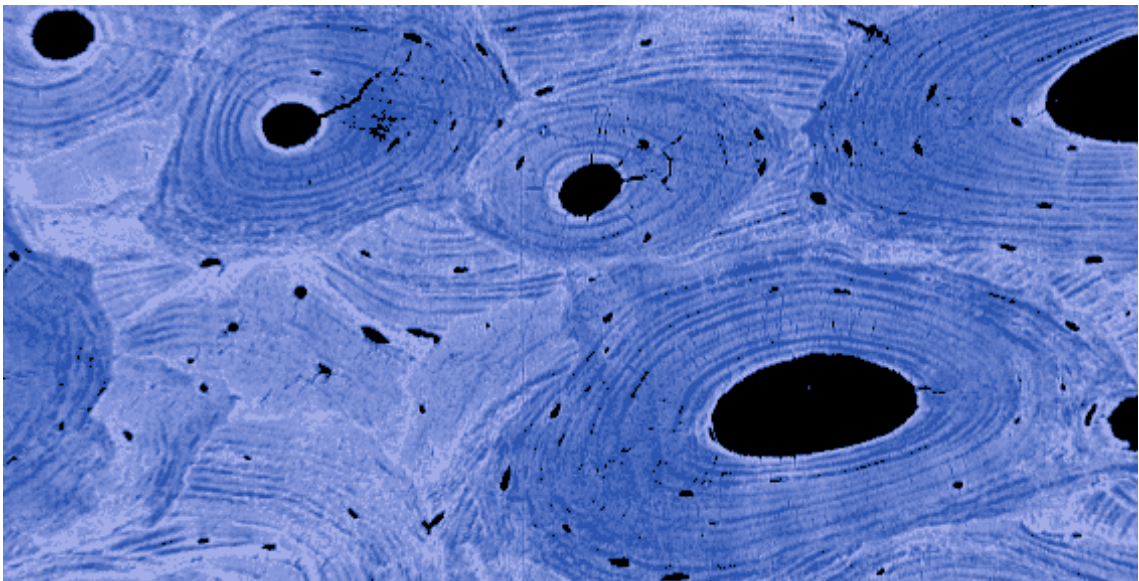


Abb. 2-2. Lichtmikroskopische Aufnahme eines eingefärbten Querschnitts durch ein Osteon aus [12].

Neuere Festkörper NMR-Studien von *Wise et al.* zeigen, dass der Hydroxylapatit nicht direkt mit dem Kollagen verbunden ist, sondern über Polysaccharide angebunden, die den Proteoglycanen und den Glycosaminoglycanen ähnlich sind. Es steht zu vermuten, dass Polysaccharide auch bei der Knochenbildung eine wichtige Rolle spielen und dass dieser Prozess nicht ausschließlich über Proteine gesteuert wird [18].

Die Spongiosa befindet sich im Inneren des Knochens und besitzt eine vergleichsweise geringe Dichte. Sie stellt eine Art Gerüststruktur dar (Abb. 2-3). Die fein verzweigten Knochenstrukturen, auch Trabekel genannt, machen nur etwa 20 % des Knochenvolumens aus. Spongiosa hat aber aufgrund ihrer Porosität ein 10 mal größeres Verhältnis von Oberfläche zu Volumen als Corticalis. Die hohe Porosität ist wichtig für den Stoffaustausch und die Zugänglichkeit der Zellen.

Knochen weist interessante mechanische Eigenschaften auf. Betrachtet man zunächst die einzelnen Komponenten, aus denen der Knochen besteht, so stellt man fest, dass sie für sich genommen nicht den hohen mechanischen Anforderungen an den Knochen gerecht werden. Hydroxylapatit besitzt zwar eine hohe Festigkeit, ist aber gleichzeitig sehr spröde. Bei Belastungen, wie Springen, würde ein Knochen aus reinem HAP sehr schnell zerspringen. Andererseits würde ein Knochen aus reinem Kollagen zwar genügend Flexibilität mitbringen, um nicht sofort zu brechen, aber viel zu weich sein, um die erforderlichen Stützfunktionen zu erfüllen. Diese Probleme treten im Knochen hingegen nicht auf. Er ist ein Verbundwerkstoff oder Kompositmaterial, in dem die positiven Eigenschaften der beiden Ausgangsmaterialien miteinander verknüpft werden bzw. neue Eigenschaften entstehen. Dabei sorgt das Kollagen für eine ausreichende Elastizität und der Hydroxylapatit für die entsprechende Härte. Vergleicht man Knochen mit Materialien entsprechender Elastizität, so besitzen diese eine sehr viel geringere Härte [19]. Zur Vergleichbarkeit von Materialien wird das Elastizitätsmodul (E-Modul) herangezogen. Das E-Modul ist ein Materialkennwert, der den Zusammenhang zwischen Spannung und Dehnung bei der Verformung eines festen Körpers bei linearem Verhalten beschreibt. Spongiosa hat ein E-Modul zwischen 1-0.34 GPa und Corticalis zwischen ein E-Modul 15 und 20 GPa.

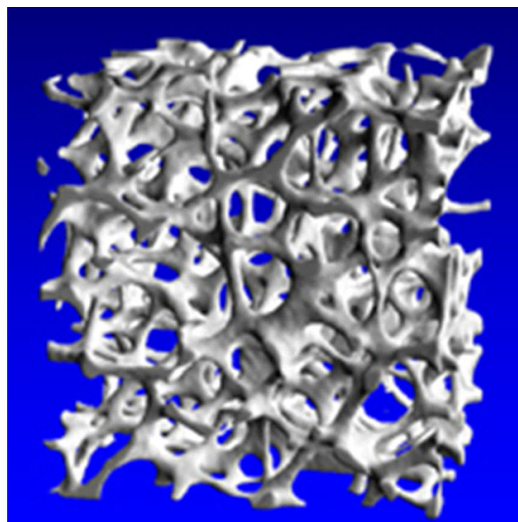


Abb. 2-3. Computertomographie von Spongiosa aus [12].

Neben der Stützfunktion erfüllt der Knochen auch die Aufgabe eines Depots für essentielle Ionen, wie Calcium, Phosphat, Kalium, Natrium, Magnesium, Fluorid, Chlorid und Carbonat [14, 20, 21].

Der Knochen ist kein starres Gebilde. Er unterliegt einem ständigen Ab- und Wiederaufbau. Dieser Prozess wird Remodelling genannt. An diesem Prozess sind vor allem drei Zelltypen beteiligt: Osteoclasten, Osteoblasten und Osteozyten. Die Osteoclasten bauen den Knochen ab. Dazu sitzen sie an der Knochenoberfläche und bilden dort ein Kompartiment aus, in das hinein Säure ausgeschieden wird, die den im Knochen enthaltenen Hydroxylapatit auflöst. Darüber hinaus bauen Kollagenasen das Kollagen ab. Die Osteoblasten bilden ständig neuen Knochen. Zunächst bilden sie den ummineralisierten Osteoid, der vornehmlich aus Kollagen I besteht, anschließend steuern sie dessen Mineralisierung. Mit zunehmendem Knochenwachstum werden die Osteoblasten vom aufgebauten Knochen umhüllt. 20 % dieser Zellen wandeln sich dann in Osteozyten um. Die Aufgabe der Osteozyten ist immer noch Gegenstand der Forschung. Man nimmt an, dass sie das Remodelling steuern. Sie sind durch Plasmakanäle mit den Zellen der Knochenoberfläche verbunden.

Durch Entzündungen im Körper entsteht ebenfalls ein saures Milieu. Das kann zum Knochenabbau führen, da der Hydroxylapatit bei sauren Bedingungen nicht stabil ist. Knochenabbau sowie die Möglichkeit, Knochen durch Krebserkrankungen oder Unfälle zu verlieren, kann den Ersatz des natürlichen Knochens erforderlich machen. Der Stand der Technik in diesem Bereich wird in Abschnitt 2.4 behandelt.

Um die Biomineralisation von Knochen nachzuahmen, wurden von *Busch* Mineralisationsexperimente von Hydroxylapatit in einem Kollagengel durchgeführt. Dabei beobachtete sie unterschiedliche Wachstumsstadien von Kristallen. Beginnend mit einem stäbchenförmigen Kristall kommt es zur Ausbildung von hantelförmigen Kristallen, deren Enden bei weiterem Wachstum zusammenwachsen und kugelförmige Gebilde bilden [22].

## 2.2 Polysaccharide – vielfältige Materialien in der Natur und der Medizin

In der Natur kommt eine große Anzahl von Polysacchariden vor, die dort auf vielfältigste Weise eingesetzt werden. Polysaccharide sind Zuckerpolymere, die in jedem lebenden Organismus vorkommen. Sie erfüllen eine Vielzahl von Funktionen, von der Energiequelle bis zu strukturgebenden Materialien. Darüber hinaus nehmen sie aber auch speziellere Aufgaben wahr, wie z.B. Heparin bei der Blutgerinnung [23]. Das häufigste natürliche Polysaccharid ist die Cellulose, die zugleich die häufigste organische Verbindung der Erde ist. Ihr Anteil an der Biomasse beträgt 50 % [24].

Grundsätzlich lassen sich Polysaccharide in drei Klassen einteilen: die strukturgebenden, die lagerbildenden und die gelbildenden Polysaccharide. Im Vergleich zu anderen Biopolymeren besitzen Polysaccharide eine hohe Anzahl von funktionellen Gruppen und eine hohe konformative Rigidität [25, 26]. Polysaccharide, besonders wenn sie wasserlöslich sind, gehören oft zur Klasse der Polelektrolyte, deren Eigenschaften in Abschnitt 2.3 erläutert werden. Diese ionischen Polysaccharide finden besonders häufig industrielle Anwendung. Sie sind, wenn sie als monovalente Salze vorliegen, gewöhnlich sehr gut löslich. Es gibt auch einige spezifische Wechselwirkungen, wie im Fall von  $\kappa$ -Carragen und Kalium. In Gegenwart divalenter Kationen, wie Calcium, kommt es häufig zur Ausbildung eines Gels [27].

Natürliche Polysaccharide finden schon seit langem Anwendungen in der Medizin. Hierbei sind vor allem Chitosan und Hyaluronsäure zu nennen, deren Eigenschaften im Folgenden erläutert werden. Ein potentiell für den Einsatz in der Medizin hochinteressantes Polysaccharid ist die Polysialinsäure, deren Eigenschaften ebenfalls im Folgenden erläutert werden.

### 2.2.1 Chitosan

Chitin ist ein in der Natur vorkommendes Polysaccharid. Es ist nach Cellulose das zweithäufigste natürliche Polymer und kommt vor allem in Tieren und Pilzen vor. Chitin ist ein Hauptbestandteil der Panzer von Krabben und Krebsen, der festen Bestandteile von Tintenfischen sowie von Insektenpanzern. Dadurch ergibt sich eine

hohe Verfügbarkeit des Materials. Chitin besteht aus  $\beta(1,4)$  verknüpften *N*-Acetylglycosamin-Einheiten [28, 29]. In der Regel gewinnt man es durch Demineralisierung von Krabbenschalen, die als Abfall in der Fischindustrie anfallen. Dazu werden die Schalen zunächst in 5 % Natronlauge gekocht, um eventuell noch vorhandene Fleischreste zu entfernen. Anschließend wird die Schale mit kalter 2 %iger Salzsäure demineralisiert. [30].

Durch die alkalische Deacetylierung von Chitin lässt sich ein im Sauren lösliches Polysaccharid, das Chitosan (Abb. 2-4) gewinnen. Die Deacetylierung verläuft zumeist unvollständig, etwa 10-20 % aller Monomereinheiten tragen noch eine Acetylgruppe [29]. Der Grad der Deacetylierung lässt sich mit Hilfe einer Kombination verschiedener NMR-Spektroskopietechniken (flüssig  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  Festkörper NMR und  $^{15}\text{N}$  CP-MAS Festkörper NMR) feststellen [31]. Chitosan mit einem Deacetylierungsgrad von 100 % lässt sich aus einigen Pilzen gewinnen [26]. Kommerziell erhältliches Chitosan weist große Unterschiede im Molekulargewicht und seiner Kristallinität auf. So unterscheiden sich die Röntgen-Diffraktogramme einer Chitosanprobe aus Krabbenschalen von der einer Chitosanprobe aus Tintenfischen. Chitosan zeigt im Röntgen-Diffraktogramm aber grundsätzlich einen breiten Peak bei  $20^\circ 2\theta$  [32].

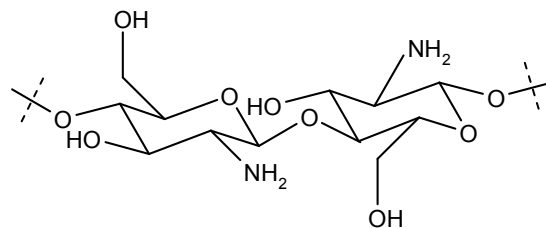


Abb. 2-4. Strukturformel von Chitosan.

Im neutralen wässrigen Medium ist Chitosan unlöslich. Es kann aber durch Derivatisierung in eine auch im Neutralen lösliche Form überführt werden [33, 34]. Chitosan löst sich im sauren wässrigen Medium. Kommerziell erhältliche Chitosane fallen bei einem pH oberhalb von 6 aus [35, 26].

Die Aminogruppe des Chitosans ist stark elektronegatig geladen und kann protoniert werden. Dadurch ist Chitosan einerseits positiv geladen und damit polar, besitzt aber

andererseits durch die noch *N*-acetylierten Aminogruppen auch hydrophobe Eigenschaften. Es hat also einen amphiphilen Charakter [26]. Die Monomere sind durch eine diequatoriale glycosidische Bindung miteinander verknüpft. Dadurch ist die Rotation von Monomereinheiten gegeneinander geometrisch eingeschränkt. Diese Steifigkeit führt zu eher gestreckten Ketten. Daraus resultiert auch eine hohe intrinsische Viskosität von Chitosanlösungen. *Kjøniksen* et al. beschreiben die Bildung von Aggregaten, die mit sinkender Temperatur, steigender Konzentration und steigender Hydrophobizität des Chitosans zunehmen. Die Hydrophobizität nimmt mit der Anzahl der verbliebenen *N*-Acetylgruppen zu [36-40].

Chitosan besitzt ein breit gefächertes Anwendungsspektrum. Es kann durch seine Fähigkeit zur Komplexbildung von Schwermetallionen zur Reinigung von Abwässern eingesetzt werden [41-43]. In Kläranlagen findet es als Flockungsmittel Anwendung. In der Nahrungsmittel- bzw. Diätmittelindustrie wird Chitosan als Fettblocker eingesetzt. Darüber hinaus ist der Einsatz von Chitosannanopartikeln in Zahnpasta als Wirkstofftransporter und -depot möglich [44]. Chitosan kann auch zur Darstellung von porösen Silica-hybridnanopartikeln oder zur Bereitstellung von Palladium in Lösung eingesetzt werden. Das ermöglicht auch den Einsatz als Katalysatorträger [45, 46].

Chitosan ist biokompatibel, biodegradabel, biologisch aktiv und besitzt eine geringe Toxizität [36, 47, 48]. Diese Vorzüge lassen es als gutes Ausgangsmaterial für die Herstellung von Implantatmaterialien erscheinen. In Verbindung mit Hydroxylapatit findet Chitosan als Knochenersatzmaterial Anwendung (siehe Abschnitt 2.4 Knochenersatzmaterialien). Durch chemische Modifizierung lässt es sich zudem als medikamentenhaltige Wundabdeckung und als ‚*drug-release*‘-System einsetzen [49-52].

Chitosan wird im Körper durch Lysozyme enzymatisch abgebaut. Dabei ist zu beachten, dass der Abbauprozess vom Deacetylierungsgrad des Chitosans abhängig ist. Chitosan mit einem hohen Deacetylierungsgrad besitzt eine höhere Verweilzeit im Körper als Chitosan mit einem niedrigen Deacetylierungsgrad [53].



### 2.2.2 Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (Abb. 2-5) ist ein körpereigenes Biopolymer, welches vor allem in Gelenken vorkommt. Dort erfüllt sie vor allem die Aufgabe eines Lubrikationsmittels. Gewonnen wird Hyaluronsäure aus Hahnenkämmen, aus den Glaskörpern in Rinderaugen oder aus Nabelschnüren [54, 55]. Diese Verfahren sind allerdings teuer und die so gewonnene Hyaluronsäure ist oft mit Proteinen verunreinigt. Für die industrielle Anwendung wird Hyaluronsäure heute aus Bakterienkulturen von *Streptococcus zooepidemicus* gewonnen [56]. Dieses Verfahren ermöglicht eine preiswerte Produktion bei hoher Reinheit.

Hyaluronsäure ist ein linearer Polyelektrolyt aus alternierenden  $\beta$ 1,4D-Glucuronsäure- und  $\beta$ 1,3 N-Acetyl-D-glucosamin-Einheiten. Die Kettenlänge kann 10 000 oder mehr Disaccharideinheiten betragen. Ein gestrecktes Polymer besitzt damit eine Länge von 10  $\mu$ m [57]. Im festen Zustand nimmt Hyaluronsäure eine einfach- oder doppelhelicale Struktur ein. Welche Struktur eingenommen wird, ist vom jeweiligen Gegenion abhängig. Ein reines Natriumsalz nimmt eine kompakte helicale Struktur ein. In der Gegenwart von Calcium hat die Hyaluronsäure die Struktur einer einfachen Helix, kann aber unter bestimmten Umständen eine Doppelhelixstruktur einnehmen [55]. Dabei wirken Calciumionen als Brücke zwischen zwei antiparallelen Polymerketten; es werden Carboxyl-Calcium-Carboxyl Koordinationen ausgebildet [58].

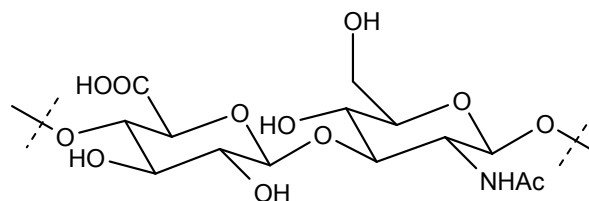


Abb. 2-5. Strukturformel von Hyaluronsäure.

In physiologischer Lösung ist die Struktur von internen Wasserstoffbrückenbindungen und Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel bestimmt. Die axialen Wasserstoffatome bilden eine unpolare, vergleichsweise hydrophobe Oberfläche, während die äquatorialen Seitenketten eine polare hydrophile Fläche bilden. Dadurch wird eine verdrehte bandartige Struktur erzeugt, die auch als Domäne bezeichnet wird

(siehe auch Abschnitt 2.3) (Abb. 2-6 (a)). Diese Domänen bestehen im Falle der Hyaluronsäure aus einer einzelnen Polymerkette. Innerhalb der Domänen ist die Hyaluronsäurekonzentration vergleichsweise gering. Sie nehmen in einer salzarmen Lösung ein großes Volumen ein. Das führt dazu, dass in einer Lösung mit einer Konzentration von 1 g/L sich die Domänen überlappen. Innerhalb dieser Domänen können kleine Moleküle wie Wasser und Elektrolyte frei diffundieren. Die Diffusion von größeren Molekülen, wie Proteinen, ist gehemmt. Allerdings diffundieren solche Hyaluronsäuredomänen selbst durch die Lösung. So bilden sich immer wieder Poren aus, durch die dann auch die Proteine diffundieren können. Das führt dazu, dass zwar alle Moleküle durch ein Hyaluronsäurenetzwerk diffundieren können, sie aber durch ihre unterschiedlichen hydrodynamischen Radien unterschiedliche Diffusionshemmungen erfahren (Abb. 2-6 (b)) [56, 57].

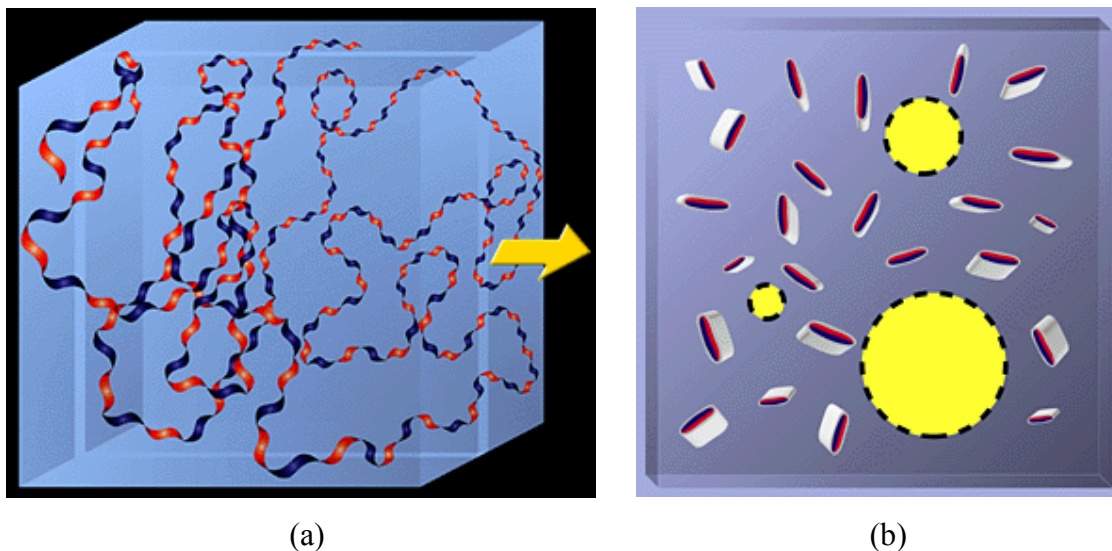


Abb. 2-6. Modell einer Hyaluronsäuredomäne vom Molekül in Lösung. (a) Hyaluronsäuredomäne in salzarmen, verdünnter Lösung. Die blaue Flächen sind hydrophil und die roten hydrophob dargestellt. (b) Querschnitt durch die Domäne. Die Kreise repräsentieren Hohlräume, die zur Diffusion anderer Moleküle zur Verfügung stehen. Die Abbildungen stammen aus [57].

Hyaluronsäure besitzt ein hohes Wasserbindungsvermögen und hat viskoelastische Eigenschaften, die von den jeweiligen auftretenden Scherkräften abhängen. Die Viskoelastizität nimmt bei hohen Scherkräften ab und bei niedrigen zu. Bei geringen Scherkräften liegt Hyaluronsäure in der oben erläuterten Domänenstruktur vor. Durch diese wird die Lösung sehr viskos. Bei starken Scherkräften richten sich die Polymerketten entlang der Fließrichtung aus. Dadurch sinkt der Fließwiderstand und

somit die Viskosität erheblich. Diese Eigenschaft erlaubt eine optimale Dämpfung und Schmierung von Gelenken. Im Körper kommt Hyaluronsäure als deprotoniertes Polyanion vor. Sie ist Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix, in der die meisten Gewebe differenzieren [57, 59]. Darüber hinaus besitzt Hyaluronsäure (HYA) eine antientzündliche Wirkung [60]. Die Hauptanwendungsgebiete für Hyaluronsäure liegen in der Augen Chirurgie, bei der Behandlung von Arthrose und in der Kosmetikindustrie [55]. Hyaluronsäure findet schon seit den 80er Jahren des vorigen Jahrhunderts Anwendung als Material zur Herstellung von Intra-Ocular-Linsen [61]. Die Einsatzmöglichkeiten als Knochenersatzmaterial werden in Abschnitt 2.4 erläutert.

### 2.2.3 Polysialinsäure

Polysialinsäuren (PSAs) sind Zelloberflächenpolysaccharide, die sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten vorkommen. Diese Polysaccharide sind Polymere der Sialinsäure. Sialinsäuren sind die Derivate des C9 Zuckers Neuraminsäure. Sie tragen alle an der C1 Position eine Carboxylgruppe und an Position 5 eine Aminogruppe [62]. Von den über 40 Derivaten bilden aber nur einige Polymerketten [63-65]. Diese linearen Kohlenhydrate werden von *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und 3-Desoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosensäure (KDN) gebildet (Abb. 2-7).

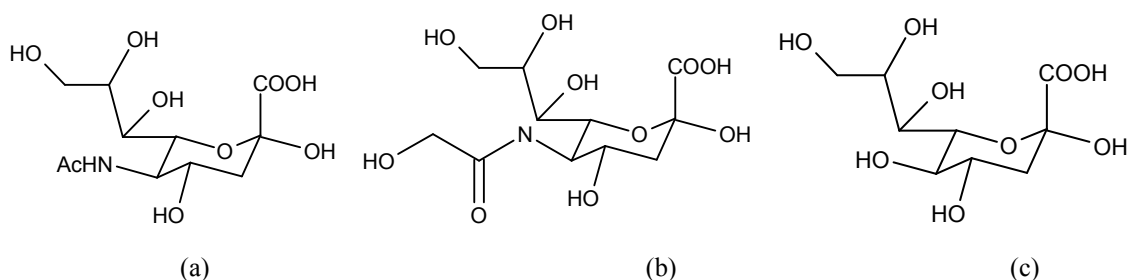


Abb. 2-7. Polymerbildende Derivate der Sialinsäure. (a) *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), (b) *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und (c) 3-Desoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosensäure (KDN).

Bei *N*-Acetylneuraminsäure kann die Verknüpfung der Monomereinheiten auf zwei verschiedene Weisen erfolgen. Die Zuckerketten können entweder  $\alpha$ 2,8- oder  $\alpha$ 2,9-

verknüpft sein. Neben diesen beiden Polymeren gibt es auch die Möglichkeit einer alternierenden Verknüpfung [66]. Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit dem  $\alpha$ 2,8-verknüpften Polymer der Neu5Ac (Abb. 2-8).

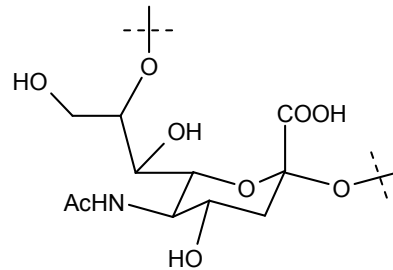


Abb. 2-8. Strukturformel der  $\alpha$ 2,8-verknüpften Polysialinsäure.

Der Polymerisationsgrad variiert zumeist zwischen 8 und 400 Monomereinheiten [66, 67]. Kommerziell erhältlich ist das Natriumsalz der Säure, das auch Colominsäure (CA) genannt wird. Diese wird aus Bakterienkulturen von *Escherichia coli* K1 (Abb. 2-9) gewonnen [4-6].

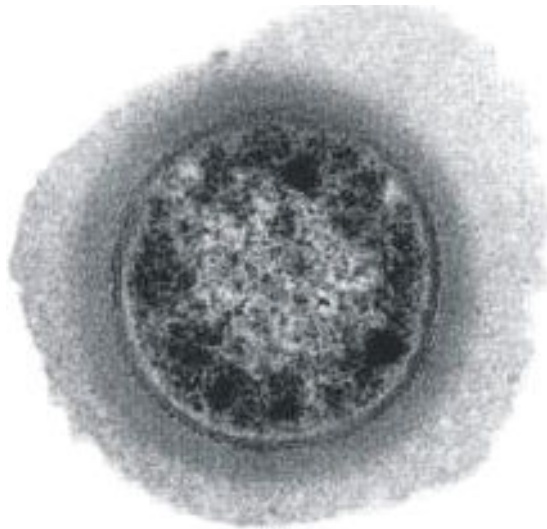


Abb. 2-9. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von *Escherichia coli* aus [68]. Die aus Polysialinsäure bestehende Glycocalix ist als äußerer Rand zu erkennen.

Weitere PSA produzierende Bakterien sind *Neisseria meningitides* und *Pasteurella haemolytica* [67, 69-72]. In allen Fällen befindet sich die PSA vornehmlich an der äußeren Oberfläche der Zellwand. Dort ist sie mit einem Phospholipidanker an die Zellmembran gebunden [66]. Diese Zuckerschicht an der Bakterienoberfläche wird auch Glycocalix genannt und formt eine Art Schutzmantel [73]. *Escherichia coli* bildet einige Stunden nach der Geburt Kolonien im Verdauungstrakt eines Neugeborenen. In der Regel koexistieren *E. coli* und sein Wirt über Jahre hinweg und ziehen gegenseitigen Nutzen voneinander. *E. coli* kann allerdings ernsthafte Erkrankungen wie Diarrhö verursachen, wenn es in die Blutbahn gelangt. Insbesondere bei *E. coli* K1 besteht die Gefahr, dass das Bakterium die Blut-Hirnschranke überwindet. Dabei kann es zu einer Hirnhautentzündung oder einer Sepsis kommen [6]. *Neisseria meningitides* kann als hirninvasives Bakterium ebenfalls diese Erkrankungen verursachen. Der menschliche Körper hat Schwierigkeiten bei der Immunabwehr dieser Bakterien. Die Ursache dafür liegt in deren Glycocalix aus PSA. Da PSA auch bei Säugetieren vorkommt, wird das Bakterium nicht als Fremdkörper erkannt und kann nicht vom Immunsystem bekämpft werden [67, 72].

Wie oben schon erwähnt, kommt PSA nicht nur in Prokaryonten, sondern auch in Eukaryonten vor. Dabei ist besonders die Rolle der PSA in höheren Vertebraten und dabei insbesondere bei Säugetieren zu beachten [66]. PSA ist bei ihnen an bestimmte Proteine gebunden [74]. Eine wichtige Rolle spielt PSA bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems. Die Polysialinsäure ist an das neuronale Zelladhäsionsmolekül (NCAM), ein Zelloberflächenglycoprotein, gebunden [75-77]. Seine polysialysierte Form gilt als Hauptregulator für die Zell-Zell-Interaktion im Nervensystem. Polysialinsäure wirkt als anti-adhäsiver Faktor, der durch das Erlauben von Plastizität die Zell-Zell-Interaktion moduliert [3]. Die anti-adhäsive Funktion von PSA beruht vermutlich auf einer sterischen Hinderung. Polysialinsäure ist ein Polyelektrolyt (vergl. Abschnitt 2.3), der aufgrund seiner sich abstoßenden negativen Ladungen einen großen Platzbedarf besitzt. Dadurch wird die Zelladhäsion verhindert (Abb. 2-10). Der hohe sterische Anspruch der Polysialinsäure lässt sich aber nur bei niedrigen Salzkonzentrationen beobachten. Bei steigenden Salzkonzentrationen bricht die räumliche Ausdehnung zusammen (siehe. Abschnitt 2.3 Polyelektrolyte) [78, 79]. *Yang* et al. bestimmten die Erweiterung des Zell-Zell-Abstandes durch die Polysialisierung von NCAM auf über 10 nm. Zur Bestimmung des Zell-Zell-Abstandes wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen an Neuroblastomen in einer Agar-

Agar Matrix in Gegenwart diverser Salze vorgenommen [80]. Zudem ist der Polymerisationsgrad der PSA für die Regulierung der Funktion von NCAM verantwortlich [81, 82].

Der Einfluss der Polysialinsäure auf die Zelladhäsion ist mit *polyelektrolyte brushes* zu vergleichen (siehe Abschnitt 2.3). Ihr Aufbau kann als künstliche Zellwand verstanden werden. Die an der Oberfläche gebundenen Polyelektrolyte ändern ihre räumliche Ausdehnung mit der sie umgebenden Salzkonzentraion in Lösung. Bei niedrigen Salzkonzentrationen haben sie eine große Ausdehnung und bei höheren Salzkonzentrationen eine geringere. Dieser Effekt lässt sich auch bei polysialisiertem NCAM beobachten [79].

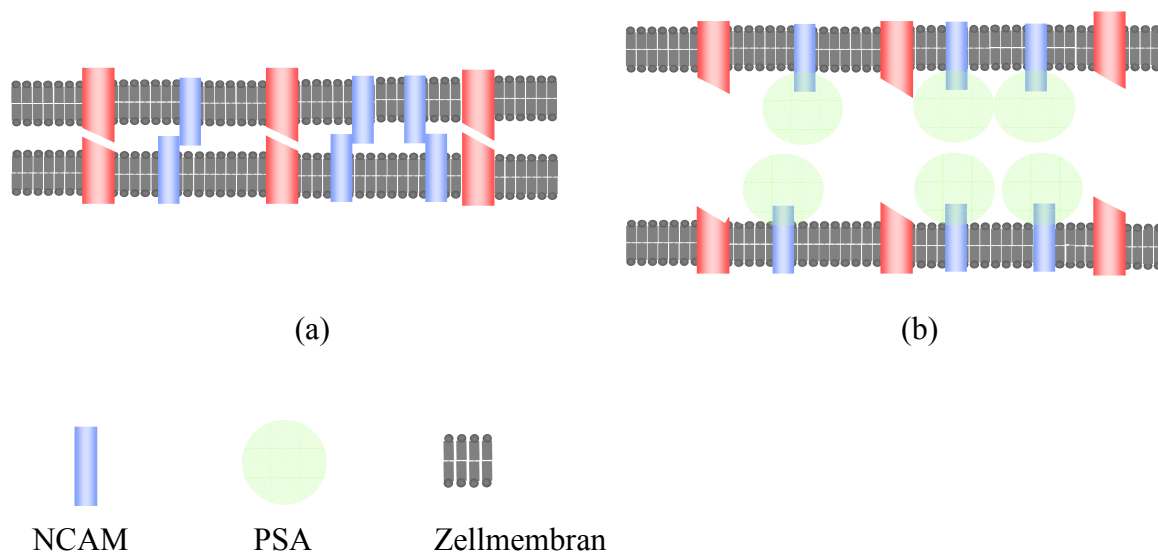


Abb. 2-10. Zell-Zell-Interaktion von NCAM und der polysialisierten Form von NCAM nach [3]. (a) Zell-Zell-Interaktion ohne Polysialinsäure. Die Zellen adhären. (b) Zell-Zell-Interaktion mit Polysialinsäure. Die Zellenadhäsion wird vermieden.

Polysialinsäure nimmt zudem eine wichtige Rolle bei der Zellmigration, der Leitung von Axonen, der Ausbildung von Synapsen und der Verzweigung von Axonen ein [66, 83]. Im menschlichen Körper kommt Polysialinsäure neben der Anbindung an das neurale Zelladhäsionsmolekül auch in humaner Milch, der Niere, dem Herz, der Pankreas und in Natriummembrankanälen vor [84-87].

$\text{Ca}^{2+}$  Ionen treten mit NCAM in Interaktion [88, 89]. Dabei scheint eine Variation der  $\text{Ca}^{2+}$  Ionenkonzentration die Ausrichtung neu gebildeter Axone zu

beeinflussen [90]. Calcium scheint auch für die Steuerung der Zellaggregation an NCAM verantwortlich. Dazu gibt es aber auch widersprüchliche Quellen [91]. Wenn man die Stabilitätskonstanten von Alkali- bzw. Erdalkalimetallkationen mit Neu5Ac betrachtet, fällt auf, dass die Erdalkalimetallkationen im Gegensatz zu den Alkalimetallkationen stärker zur Komplexbildung neigen. Dabei fällt ins Auge, dass die Stabilitätskonstante des  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexes 2.5 mal größer ist als die der entsprechenden  $\text{Mg}^{2+}$  Verbindung [92]. Allerdings zeigen Circular-Dichroismus-Studien (CD) bei der Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  zur Colominsäure über einen weiten Temperaturbereich keine Änderung der Konformation an. Das deutet darauf hin, dass sich im Polymer keine Chelatkomplexe bilden, bei denen sich größere konformative Änderungen ergäben [93]. Die Fähigkeit, Calcium zu binden, ist stark vom Polymerisationsgrad der Polysialinsäure abhängig. Die Affinität zu Calcium ist bei längererkettiger (mehr als 20 Monomereinheiten) Polysialinsäure dreimal höher als bei kürzererkettiger. *Shimoda et al.* weisen eine deutliche Veränderung des CD-Spektrums von längererkettiger Colominsäure in Gegenwart von Calcium nach [94].

Über die strukturellen Eigenschaften von PSA in wässrigen Lösungen existieren widersprüchliche Studien. Aufgrund der ersten 2D-NOE-NMR und DQF-COSY-Untersuchungen wird für eine ausreichend lange Polymerkette eine helicale Sekundärstruktur vorgeschlagen [95]. Nachfolgende Studien definierten eine Neunerhelix als grundlegende Struktureinheit [96]. Eine Neuner-Einheit wird auch von Antikörpern benötigt, um die PSA zu erkennen [97]. Neuere  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -NMR-Untersuchungen zeigen, dass CA in Lösung eher die Form eines zufälligen Knäuels als eine rigide Konformation einnimmt. Die Messungen fanden in Gegenwart von 0.025 M Natriumhydrogenphosphat und 0.0005 M Ethylendiamin statt [67]. *Toikka et al.* zeigten mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie, dass Polysialinsäure-Oligomere dazu neigen, faserartige Strukturen auszubilden (Abb. 2-11). Zur Probenpräparation wurden Polysialinsäure-Oligomere in einer Calciumchloridlösung gelöst und auf einem Probenträger getrocknet. Sie traten ab einer Kettenlänge von zwölf Monomereinheiten auf. Die Ausbildung von Filamenten lässt sich auch an der polysialysierten Form von NCAM beobachten [98].

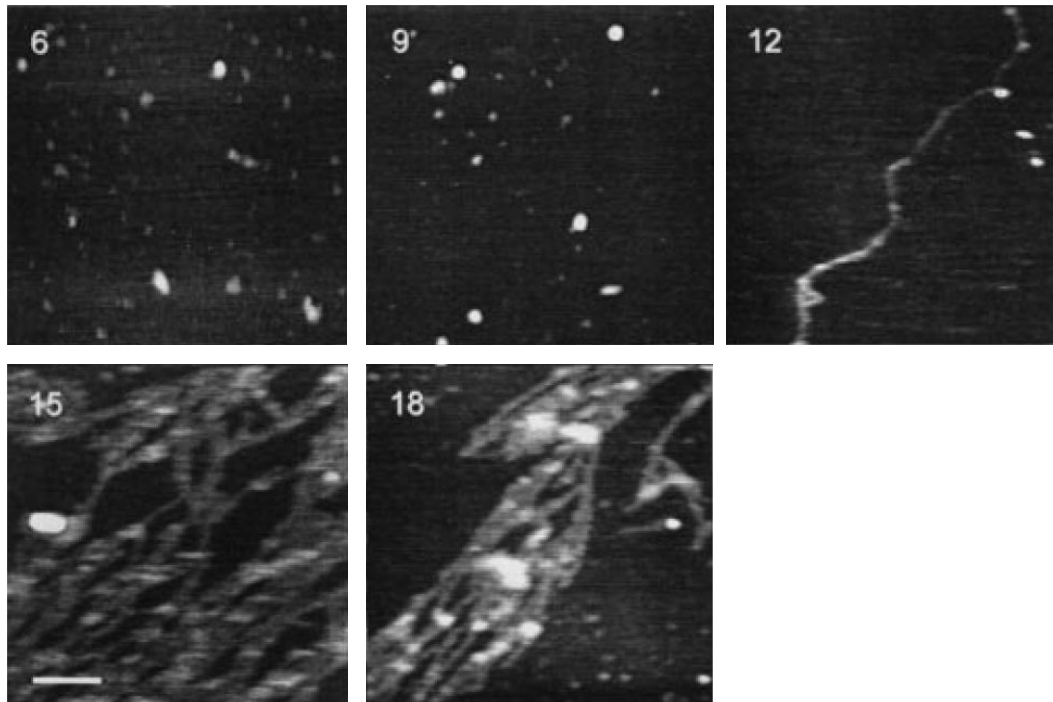


Abb. 2-11. Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von Polysialinsäure-Filamenten. Der Maßstab unten links entspricht 200 nm. Die Zahlen oben links geben den Polymerisationsgrad an. Ab einer Kettenlänge von 12 Monomereinheiten lassen sich Polysialinsäure-Fasern erkennen, aus [98].

Polysialinsäure besitzt mit steigendem Polymerisationsgrad eine sinkende Stabilität. Es wird sogar eine Autoprotolyse für PSA beschrieben. So nimmt auch bei gefrorenen Proben der Polymerisationsgrad mit der Zeit ab [99].

*Gulari et al.* untersuchten das Kapselpolysaccharid von *Neisseria meningitidis* unter anderem mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung. Die Messungen fanden in einer mit Natriumacetat gepufferten Kaliumchlorid Lösung statt. Zum Vergleich wurde reines Wasser herangezogen. Die Autoren bestimmten ein Molekulargewicht von 145 000 g/mol. Darüber hinaus beobachteten sie zwei unterschiedliche Partikelspezies mit einem hydrodynamischen Radius von 5 bzw. 30 nm. Ob vor diesen Untersuchungen der Lipidanker abgetrennt wurde, ist fraglich [100].

Polysialinsäure kann spezifisch vom Enzym Endosialidase abgebaut werden [66]. Endosialidase, die von einem *E. coli* K1 infizierenden Phagen stammt, ist das einzige bekannte spezifisch PSA-abbauende Enzym [101]. Dieses Enzym ist im menschlichen Körper nicht vorhanden. Im adulten Körper gibt es keinen Metabolismus für PSA. Anders als andere Polysaccharide wie Chitosan und Hyaluronsäure wird diese also nicht abgebaut. Diese Tatsache, in Kombination mit der Möglichkeit, PSA mit Endosialidase gezielt abzubauen, macht diese grundsätzlich zu einem interessanten Material für die



Herstellung von Knochenersatzmaterialien, wie in Kapitel 6 dieser Arbeit beschrieben wird. Polysialinsäure besitzt generell ein hohes Anwendungspotential in der Medizintechnik. So ist ein Einsatz für die Nervenregeneration denkbar [102]. *Haile et al.* haben zu diesem Zweck mit *in vitro* Zellkulturversuchen begonnen. Dabei konnte gezeigt werden, dass PSA keinen negativen Einfluss auf die Zellproliferation und Differenzierung hat [103]. Weitere Einsatzmöglichkeiten sind die Hyperthermie zur Behandlung von Hirntumoren oder das *drug delivery*, wie in Kapitel 5 dieser Arbeit beschrieben wird. Die Anwendung als Trägersubstanz für Proteine und andere Pharmazeutika wurde von *Gregoriadis et al.* beschrieben [104]. Darüber hinaus kann Polysialinsäure in der Kapillarelektrophorese zur Trennung von Enantiomeren eingesetzt werden [105].

#### 2.2.4 Kristallisation von Polysacchariden

In den letzten Jahren ist das Interesse an der dreidimensionalen Struktur von Polysacchariden stark angestiegen. Das hängt neben ihrer großen Bedeutung in der Natur und ihres großen Variantenreichtums auch mit der wachsenden Bedeutung als biodegradable Polymere in der Medizin zusammen [25]. Generell lassen sich die Strukturen allein durch ihre sterische Hinderung in vier Klassen unterteilen: Typ A – ausgedehnt und bandartig, Typ B – flexibel mit einem helicalen Aufbau, Typ C - starr und gefaltet und Typ D - sehr flexibel und sehr weit ausgedehnt [106]. Die hohe Anzahl an Funktionen ermöglicht es den Polysacchariden, im festen Zustand eine große Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Diese Tatsache zusammen mit der konformativen Rigidität der Ketten führt zu einer Tendenz zur Selbstanordnung. Diese Selbstanordnung führt zur Ausbildung von geordneten Bereichen im festen Zustand. Die Kristallstrukturen der Polysaccharide zeichnen sich durch ein weit verzweigtes Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen aus. Bei den Polysacchariden ist es besonders schwierig, Einkristalle von ausreichender Größe zu erhalten. Eine Möglichkeit, das Problem zu umgehen, ist das Züchten von Fasern. In ihnen sind die Kristalle alle entlang einer Achse ausgerichtet. So wurden viele Kristallstrukturen, wie die von Chitosan und Hyaluronsäure, gelöst [25]. Hydratisiertes Chitosan kristallisiert in einer orthorhombischen Elementarzelle mit  $a = 8.95(4)$ ,  $b = 16.97(6)$  (Faserachse),  $c = 10.34(4)$  Å in der Raumgruppe  $P2_12_12_1$ . Die Kettenstruktur besteht aus einer

Doppelhelix. Die Elementarzelle enthält 8 Wassermoleküle [107]. Mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie lässt sich auch der Deacetylierungsgrad bestimmen [108]. Für Hyaluronsäure sind mehrere feste Phasen bekannt. Eine Natriumhyaluronat-Phase ist hexagonal mit  $a=1.17$  nm [109]. Eine weitere Phase ist das tetragonale Kaliumhyaluronat mit  $a = b = 1.714$  nm und  $c = 3.28$  nm (Faserachse) [110]. Die Kristallstruktur des dritten in dieser Arbeit behandelten Polysaccharids, der Polysialinsäure, ist unbekannt. Man kennt lediglich die Kristallstruktur des Monomers. Es kristallisiert als Dihydrat in der monoklinen Raumgruppe  $P2_1$  mit  $a = 8.306(4)$ ,  $b = 12.708(7)$   $c = 8.237(4)$  Å und  $\beta = 112.3(1)^\circ$ . In der Elementarzelle befinden sich zwei Zuckermoleküle [111].

Eine weitere Möglichkeit, die Kristallstruktur zu lösen, besteht darin, von einem polykristallinen Pulver ein Röntgen-Pulverdiffraktogramm zu vermessen und dann die Struktur mit Hilfe der Strukturmodellierung zu lösen. Ein Beispiel hierfür ist die Strukturlösung von Arabinan, einem pflanzlichen Polysaccharid [112].

## 2.3 Polyelektrolyte

Polyelektrolyte sind Polymere, deren Monomereinheiten eine ionische Gruppe wie z.B. eine Carboxylatgruppe tragen. Viele Polysaccharide besitzen solche sauren oder auch protonierbare Gruppen. Neben Polysialinsäure und Hyaluronsäure gehört auch Chitosan in diese Verbindungsklasse, da die Aminfunktion in sauren wässrigen Lösungen zum Teil protoniert vorliegt [26]. Das Verhalten der Polyelektrolyte unterscheidet sich stark von dem neutraler Polymere. Die Gegenwart von Ladungen entlang der Polymerkette führt zu komplexen intra- und intermolekularen Wechselwirkungen. Diese wiederum wirken sich stark auf das statische und dynamische Verhalten der Stoffe aus [113]. Ein weiterer wichtiger Unterschied zu ungeladenen Polymeren ist, dass Polyelektrolyte über sehr viel größere Entfernungen über elektrostatische Wechselwirkungen miteinander interagieren als ungeladene Polymere [114]. Zudem sind Polyelektrolytlösungen Multikomponenten-Systeme. Neben dem Polymer sind das Lösungsmittel, Gegenionen, welche die Ladungen abschirmen sollen, sowie gegebenenfalls noch so genannte Co-Ionen zu beachten. Das führt bei der Anwendung von Lichtstreuungsmethoden zu einer Verkomplizierung der Systeme, da mehrere verschiedene Partikel bzw. Streuer zu Lichtstreuungseffekten beitragen [115, 116].

Polyelektrolyte weisen ein spezielles Aggregationsverhalten auf. Man unterscheidet dabei das Verhalten in salzfreien, salzarmen und salzreichen Lösungen. In salzfreien Lösungen herrscht folgendes Verhalten vor: Die entlang der Polymerkette aufgereihten gleichnamigen Ladungen der Monomereinheiten sind bestrebt, einander auszuweichen. Dadurch liegen Polyelektrolyte bei hoher Verdünnung in reinem Wasser in der Regel eher gestreckt vor (Abb. 2-12). In diesem Fall kann man sie als geladene Zylinder betrachten [117, 118]. Es gibt aber auch Modelle, in denen Polyelektrolyte eher durch eine entlang einer unendlichen Kette delokalisierte Ladung oder als flexible Polymerkette mit diskreten Ladungen beschrieben werden. Die Zuordnung zu diesen drei beschriebenen Fällen kann anhand der dimensionslosen Ladungsdichte  $\xi$  erfolgen [119]. Das Aggregationsverhalten in salzhaltigen Lösungen wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

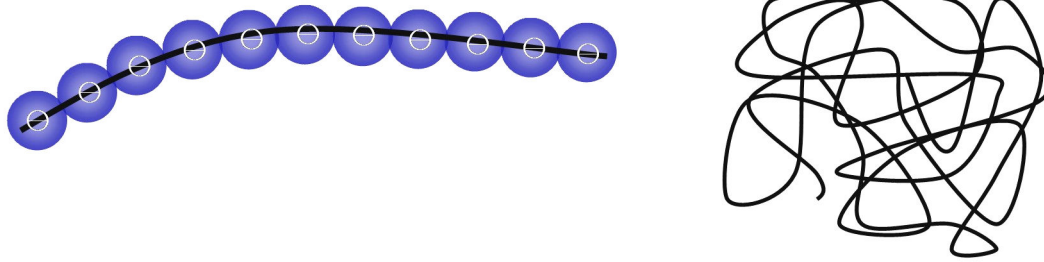


Abb. 2-12. (a) Modell eines gestreckt vorliegenden Polyelektrolyten in salzfreier Lösung. Die negativen Ladungen stoßen sich ab. (b) Modell eines ungeladenen Polymers, das als zufälliges Knäuel vorliegt.

Oberhalb einer bestimmten kritischen Konzentration sind die Polymerketten nicht mehr fähig, sich frei in der Lösung zu bewegen und unabhängig voneinander zu orientieren. Die elektrostatischen Wechselwirkungen führen dann zu einer dreidimensionalen periodischen Anordnung. Wenn die Konzentration noch deutlich weiter erhöht wird, kommt es zu beträchtlichen Überlappungen der Polymerketten und ein flexibles Netzwerk entsteht [120-122].

Hyaluronsäure besitzt im Vergleich zu anderen Polyelektrolyten eine geringere Ladungsdichte [123]. Bei einer kompletten Ionisation trägt nur jede zweite Saccharideinheit eine Ladung. Das entspricht etwa einer Ladung pro Nanometer [119]. Die Struktur von Hyaluronsäure in wässrigen Lösungen ist im Abschnitt 2.2 beschrieben.

### 2.3.1 Polyelektrolyte in salzhaltigen Lösungen

Polyelektrolyte zeigen im Allgemeinen eine Änderung ihres Aggregationsverhaltens, wenn zu einer ihrer wässrigen Lösungen Salze gegeben werden. Durch die Salzzugabe werden die einzelnen Ladungen abgeschirmt. Daher kann das Polymer eine weniger gestreckte Konformation einnehmen und sich nun mehr oder weniger wie ein neutrales Polymer verhalten [120]. An Lösungen von Polyelektrolyten mit geringen Salzgehalten lassen sich mittels Lichtstreuungsmethoden zwei Diffusionskoeffizienten und damit zwei „Partikelgrößen“ messen. Um diese Beobachtung zu erklären, gibt es zwei Ansätze von *Ise* bzw. *Schmitz*. *Ise* entwickelte das ‚zwei-Zustände-drei-Dimensionen‘-Modell. Bei

geladenen Latexpartikeln in Lösung wurde die Ausbildung von geordneten Domänen innerhalb der Lösung beobachtet, während der Rest der Lösung eher ungeordnet vorlag. Nun kann jedes Partikel vom geordneten Zustand (Domäne) zu einem ungeordneten Zustand (frei in der Lösung) übergehen und umgekehrt (daher ‚zwei Zustände‘). Zudem existiert aber auch innerhalb der Domänen ein dreidimensional-periodischer Ordnungszustand. Dieser Ordnungszustand führt zu einem breiten Maximum in den Streukurven. Für den Fall von linearen flexiblen Polyelektrolyten (anstelle der Latexkugeln), die nicht groß genug für eine mikroskopische Beobachtung sind, vermutet der Autor eine kompakte Kettenkonformation, die ähnliche Strukturen bildet. So sollen isolierte Helices eine dreidimensionale Ordnung innerhalb der Domänen bilden. Als Mechanismus für die Domänenbildung werden attraktive Wechselwirkungen zwischen den Polyionen durch die Vermittlung von Gegenionen vermutet [121, 124]. Die resultierenden Wechselwirkungen ergeben sich aus der Balance zwischen den eben beschriebenen attraktiven Wechselwirkungen und der rein repulsiven Coulomb-Wechselwirkung. Unter gewissen Bedingungen überwiegen die attraktiven Wechselwirkungen und ermöglichen so die Ausbildung von Domänen [125]. Diese können zudem über einen gewissen Konzentrationsbereich den gleichen hydrodynamischen Radius besitzen. Mit steigender Konzentration des Polyelektrolyts erhöht sich dann lediglich die Dichte der Polymerketten in der Domäne (Abb. 2-13) [114].

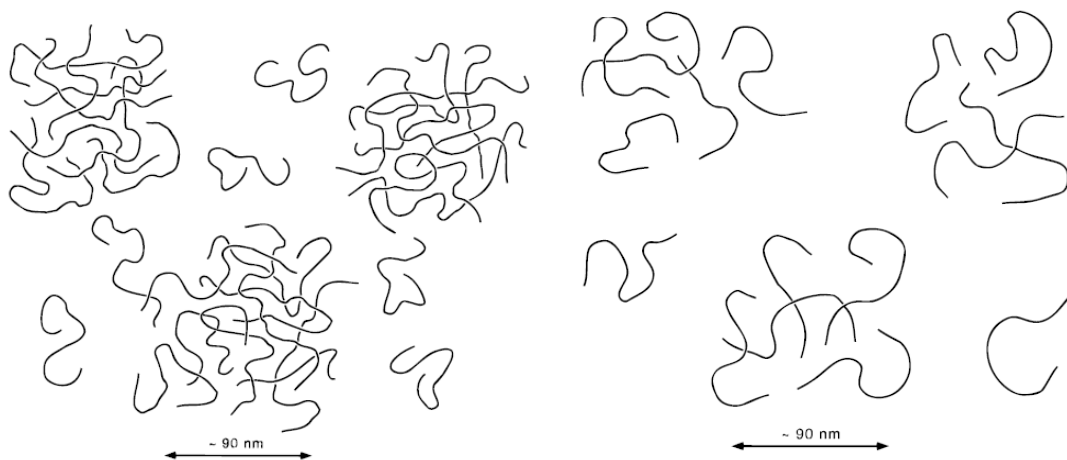


Abb. 2-13. Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Polyelektrolyten mit in den Domänen befindlichen und freien Polymerketten. Unabhängig von der Konzentration des Polyelektrolyten kann die Größe der Domänen konstant bleiben; nach [114].

Das Konzept der Domänen in Lösung wird auch dazu verwandt, die Ergebnisse von DLS-Messungen an Polyelektrolytlösungen mit geringen Salzgehalten zu interpretieren, bei denen sich ein extrem langsamer Diffusionszustand zeigt [121]. Diese langsam diffundierenden Partikel entsprechen den vergleichsweise großen Domänen.

Eine ähnliche Idee wird von *Schmitz* verfolgt [126]: *Schmitz* geht von der Vermutung aus, dass attraktive Wechselwirkungen zwischen den Polyionen durch die Dynamik der Gegenionen vermittelt werden. Die Verteilung der Gegenionen um ein gegebenes Polyion kann zeitweise asymmetrisch werden und so eine weitreichende fluktuierende Dipolwechselwirkung verursachen. Da die Gegenionen sehr schnell diffundieren können, haben sie die Möglichkeit, innerhalb der Zeit, in der eine Fluktuation der Polyionenverteilung relaxiert, verschiedene polyionische Umgebungen „auszuprobieren“. Durch die schnelle Diffusion teilen sich also mehrere Polyionen ein Gegenion. Daraus resultiert eine gekoppelte Polyionen-Polyionen-Dynamik.

In salzreichen Lösungen verhalten sich Polyelektrolyte wie ungeladene Polymere. Die Ladungen werden durch die Gegenionen abgeschirmt. Dadurch lösen sich auch die Domänen auf.

Die Eigenschaften von Polyelektrolyten nutzt man heute beispielsweise, um Mikrokapseln zu erzeugen. Dazu werden auf ein Trägertemplat abwechselnd Lösungen von gegensinnig geladenen Polyelektrolyten gegeben. Die Polyelektrolyte lagern sich in alternierenden Schichten an. Nach dem Entfernen des Templats erhält man hohle Kapseln, die man unter anderem für *drug delivery* einsetzen kann [127]. Ein weiterer Bereich sind die *polymer brushes*. Dabei handelt es sich um mit Polyelektrolyten beschichtete Oberflächen. Die räumliche Ausdehnung der Polyelektrolyte variiert mit der Salzkonzentration des umgebenden Mediums.

## 2.4 Knochenersatzmaterialien

Es gibt eine Vielzahl von medizinischen Indikationen, die einen Ersatz des natürlichen Knochens erforderlich machen. Typische Beispiele sind komplizierte Frakturen, der Einsatz nach der Explantation von Knochentumoren sowie der Knochenabbau durch Infektionen, um Endoprothesen oder um extrahierte Zähne. In solchen Fällen muss der natürliche Knochen durch ein adäquates Material ersetzt werden. Dazu werden seit Jahrzehnten passende Biomaterialien entwickelt. Biomaterialien sind definiert als nicht körpereigene Substanzen, die im Körper vorhandene Strukturelemente, ganze Gewebe und deren Funktionen zum Teil oder vollständig ersetzen [128]. Diese Materialien müssen hohen Anforderungen gerecht werden. Im Wesentlichen sind dies drei Punkte: mechanische Kompatibilität, chemische Kompatibilität und biologische Kompatibilität (Abb. 2-14).

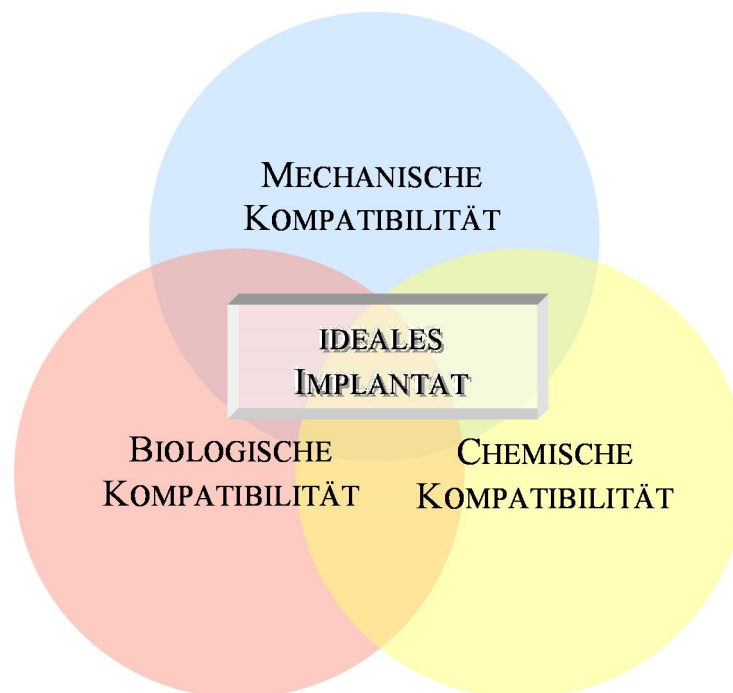


Abb. 2-14. Modell des idealen Implantats. Das ideale Implantat erfüllt alle drei Ansprüche: mechanische, chemische und biologische Kompatibilität.

Ein Material ist mit dem natürlichen Knochen mechanisch kompatibel, wenn es zum einen den mechanischen Belastungen am Einsatzort gerecht wird. Andererseits darf ein

Implantatmaterial auch keine zu große Härte und kein zu großes E-Modul besitzen, da es in diesem Fall in Folge einer Lastabschirmung zu einer Rückbildung des umgebenden Knochens kommen kann [129].

Die chemische Kompatibilität von Biomaterialien beinhaltet, dass diese nicht toxisch wirken dürfen. Auch eventuell entstehende Abbauprodukte, wie sie bei der Degradation der Materialien entstehen, dürfen nicht toxisch sein. Die Biomaterialien müssen zudem mit dem umgebenden Gewebe kompatibel sein und dürfen dort keine Schädigungen hervorrufen. Ebenso sollten keine allergischen Reaktionen auftreten, wie sie beispielsweise bei Nickellegierungen zu befürchten sind.

Biologische Kompatibilität besagt, dass Biomaterialien keine Immunreaktion hervorrufen dürfen. Solche Materialien schaffen eine für die umgebenden Zellen günstige Atmosphäre. Das heißt, dass in ihrer Umgebung ein körperähnlicher pH-Wert vorherrscht und die Oberfläche des Implantats so strukturiert ist, dass sie eine Zellanhaftung ermöglicht.

Implantate lassen sich in zwei Klassen unterteilen: permanente und biodegradierbare Implantate. In die Kategorie der permanenten Implantate fallen Hüft-, Knie- oder Zahnprothesen. Sie werden aber auch zur Knochenbruchbehandlung eingesetzt. Biodegradierbare Implantate können immer dann eingesetzt werden, wenn ihre Funktion nur temporär vonnöten ist oder sie im Laufe der Zeit durch natürlichen Knochen ersetzt werden.

Wichtig für eine gute Einheilung des Implantats ist die Interaktion zwischen dem umgebenden Gewebe und der Implantatoberfläche. Dabei lassen sich zwei unterschiedliche Interaktionen unterscheiden: bioinert und bioaktiv.

Von bioinert spricht man, wenn das Implantat nicht oder nur in sehr geringem Maß mit dem umgebenden Gewebe in Wechselwirkung tritt. Ein typisches Beispiel hierfür ist Gold. Bioinertes Verhalten ist immer dann wünschenswert, wenn eine gewisse Flexibilität des Implantats erhalten bleiben soll, wie z.B. bei Mittelohr-implantaten, um die Schalleitung zu ermöglichen.

Bioaktive Implantate treten in aktive Wechselwirkung mit dem umgebenden Gewebe. Sie können zum Beispiel an der Oberfläche biologisch funktionalisiert werden [130]. Dies kann durch die Anbindung von Wachstumsfaktoren wie BMP-2 erfolgen, welche die Knochenneubildung induzieren.



Die Zielsetzung bei der Entwicklung von neuen Biomaterialien für den Knochenersatz lässt sich in vier Punkte gliedern:

1. Die Menge an neu gebildetem Knochen soll vergrößert werden.
2. Die Qualität des neu gebildeten Knochens soll verbessert werden.
3. Die Zeitdauer der Knocheneinheilung bzw. Knochenneubildung soll verkürzt werden.
4. Das Implantat soll mechanisch stärker belastbar sein als der autogene Knochenersatz (siehe unten).

Eine Verbesserung in den ersten beiden Punkten würde den individuellen Heilungsverlauf des Patienten günstig beeinflussen. Punkt drei weist neben den Vorteilen für den Patienten, auch eine volkswirtschaftliche Bedeutung auf, da so Pflegedauern und Arbeitsausfallkosten minimiert werden. Der vierte Punkt ist vor allem für den implantierenden Chirurgen von großer Bedeutung [128].

#### 2.4.1 Autogener Knochenersatz

Die aus immunologischer Sicht für den Patienten am besten verträgliche Variante ist der Einsatz von körpereigenem (autogenen) Material. Zu diesem Zweck wird ein Stück aus einem großen Knochen wie der Hüfte entnommen und an anderer Stelle im Körper wieder eingesetzt. Die Verpflanzung von körpereigenem Material wird in der Regel gut vertragen und gilt daher immer noch als der ‚Goldstandard‘. Jedoch treten an anderen Stellen Probleme auf. Für die Entnahme ist eine weitere Operation vonnöten, die das Risiko von Komplikationen in sich birgt. Zudem ist autogener Knochenersatz nur begrenzt verfügbar [11, 131]. Er zählt im eigentlichen Sinne nicht zu den Biomaterialien [128].

Darüber hinaus gibt es noch die Möglichkeit, Knochen aus humanem oder tierischem Spendermaterial, so genannten autologen Ersatz, einzusetzen. Dabei besteht aber ein hohes Infektionsrisiko und zudem die Möglichkeit, dass das Material als körperfremd abgestoßen wird [131].

## 2.4.2 Permanente Implantate

Permanente Implantate bestehen zumeist aus Metallen. Die heute am weitesten verbreiteten Implantatmaterialien sind Chrom-Nickel-Stahl und Titan. Der große Vorteil metallischer Implantate liegt in ihren hervorragenden mechanischen Eigenschaften. Sie besitzen eine hohe mechanische Stabilität, weisen im Gegensatz zu Keramiken eine gewisse Elastizität auf und sind nicht spröde. Metallische Implantate lassen sich gut verarbeiten und implantieren. Zudem lassen sie sich vergleichsweise einfach herstellen, sind kostengünstig und gut zu sterilisieren. Da diese Implantate nicht im Körper degradieren, kann eine zweite Operation nötig sein, um diese zu explantieren, wenn sie ihre Aufgabe erfüllt haben. Das kann zu weiteren Komplikationen führen.

Es kann jedoch bei Metallen durch Korrosion oder mechanischen Verschleiß zur Freisetzung von toxischen und allergenen Ionen kommen. Gerade bei nickelhaltigen Legierungen besteht die Möglichkeit einer Sensibilisierung. Ein Problem der permanenten Implantate ist, dass es zu einer Lockerung des Implantats kommen kann (Abb. 2-15). Eine mögliche Ursache ist in den unterschiedlichen Materialeigenschaften von Knochen und Implantat zu sehen [132]. Durch das höhere Elastizitätsmodul des Implantats schirmt dieses die mechanische Belastung auf den Knochen ab. An den nun unbelasteten Stellen ist die Stimulation der Knochenneubildung reduziert. Es kommt zum Knochenabbau und die Prothese lockert sich (Abb. 2-15) [129].



Abb. 2-15.: Röntgenbilder von Hüftendoprothesen. Auf dem linken Bild sieht man das Implantat nach erfolgter Operation. Auf dem rechten Bild hat sich die Prothese gelockert.

Titan und seine Legierungen weisen ein hohes Maß an Biokompatibilität auf. Diese Materialien sind nicht toxisch und rufen keine Immunreaktionen hervor. In der Regel wachsen Titanimplantate gut in das Gewebe ein. Poröse Implantate bzw. Implantatoberflächen werden auch von Zellen durchdrungen. Die derzeit verwendeten Titanimplantate sind in der Regel oberflächenbeschichtet oder zumindest strukturiert. Die Strukturierung gibt den Zellen die Möglichkeit, sich an die Implantatoberfläche anzuhafte. Eine Beschichtung kann beispielsweise mit Hydroxylapatit erfolgen. Unbeschichtete Titanimplantate sind durch eine  $\text{TiO}_2$ -Schutzschicht passiviert. Wird diese Schicht mechanisch beschädigt, bildet sie sich rasch neu aus. Titan besitzt gute mechanische Eigenschaften und eine geringe Dichte. Das E-Modul ist mit 105 GPa deutlich geringer als das von Stahl (200 GPa) und damit schon näher am natürlichen Knochen mit 17 GPa. Dieser Unterschied kann aber trotzdem noch zur Auslösung des Implantats führen.

Darüber hinaus finden auch Cobalt basierte Legierungen immer noch Anwendung [132]. Sie werden als Zahnprothesen, Endoprothesen sowie bei Knochenbrüchen eingesetzt. Ein jüngeres Beispiel sind Formgedächtnislegierungen, die nickelbasiert sind [133]. Sie werden kalt eingesetzt und nehmen dann beim Erwärmen auf Körpertemperatur wieder ihre Ausgangsform an. Sie werden besonders

in der Fußchirurgie verwendet. Metallische Implantate finden aber auch in weichem Gewebe Einsatz, als Beispiel sei hier die Anwendung als Stents in Arterien genannt. Die Stents weiten die Arterien auf und stützen sie zugleich.

Neben permanenten metallischen Implantaten finden auch permanente keramische Implantate in der Medizin ihren Einsatz. Die prominentesten Beispiele hierbei sind Aluminiumoxid (Alumina) und Zirkoniumdioxid (Zirconia) (Abb. 2-16). Ihr Anwendungsfeld liegt im Bereich der Gelenkpfannen und Gelenkköpfe von Endoprothesen und im Zahnersatz. Alumina und Zirconia zählen zu den bioinerten Stoffen. Das macht sie besonders interessant für die Anwendung als Mittelohrimplantat. Alumina (400 GPa) und Zirconia besitzen beide ein hohes E-Modul. Das kann die oben beschriebenen Probleme verursachen und zum Auslösen des Implantats führen. Zudem sind Keramiken spröde und zerbrechen.



Abb. 2-16. Zirconia Zahnersatz, aus [134].

Es gibt auch permanente Polymerimplantate, die als Sehnen- und Bandersatz, als künstliche Adern oder in der kosmetischen Chirurgie eingesetzt werden. Für den Einsatz als Knochenersatzmaterial sind diese aber in der Regel zu weich. Eine Ausnahme bildet Polymethylmethacrylat (PMMA), das als Knochenzement zum Einsatz kommt.

### 2.4.3 Biodegradable Knochenimplantate

Biodegradable Implantate sollen ihre Funktion im Körper erfüllen und sich anschließend auflösen, so dass an ihrer Stelle eine Knochenneubildung ermöglicht wird. Diese Art des Knochenersatzes hat den entscheidenden Vorteil, dass keine zweite Operation zur Explantation notwendig ist. Im Folgenden werden die verschiedenen eingesetzten Materialien vorgestellt.

#### 2.4.3.1 Polymere

Biodegradable Polymere lassen sich in zwei Klassen unterteilen: biologisch-basierte Polymere, wie Polysaccharide oder Proteine, und synthetische Polymere [135]. Die in dieser Arbeit relevanten biologisch-basierten Polymere wurden im Abschnitt 2.2 ausführlich erläutert. Hier soll nun kurz die zweite Klasse von Polymerimplantaten vorgestellt werden.

Biodegradable synthetische Polymere, wie die Polyester Polylactid (PLA) und Polyglycolid (PGA), besitzen eine hohe Elastizität. Sie lassen sich leicht bearbeiten und dem individuellen Einsatzort gut anpassen. Darüber hinaus ist eine zusätzliche Funktionalisierung mit Wirkstoffen möglich, welche das Knochenwachstum fördern oder Entzündungen hemmen sollen. Die Abbaugeschwindigkeit ist von der Kettenlänge des Polymers abhängig [8]. Die Abbauprodukte der gängigen biodegradablen synthetischen Polymere sind Carboxylsäuren. Sie schaffen in der Umgebung des Implantats ein saures Milieu, das zu Beschädigungen des umgebenden Gewebes führen kann [135]. Ihre E-Module sind sehr gering, so dass diese Materialien keinen großen mechanischen Belastungen standhalten können. Aufgrund ihrer schlechten mechanischen Eigenschaften und den problematischen Abbauprodukten sind biodegradable synthetische Polymere nur bedingt als Knochenersatz geeignet.

#### 2.4.3.2 Keramiken

Als resorbierbare keramische Biomaterialien finden zumeist Calciumphosphate Anwendung. Durch die Kombination von Calcium mit den Salzen der

Orthophosphorsäure ergibt sich bei variierenden Wassergehalten eine Vielzahl von Calciumphosphaten. Diese sind in Tabelle 2-1 dargestellt. Die Löslichkeit von Calciumphosphaten ist pH-Wert abhängig. Generell sind sie im Sauren leichter löslich als im Neutralen. Brushit und Dicalciumphosphat-Anhydrat lösen sich auch im Basischen.

Tabelle 2-1. Übersicht über die als Biomaterialien verwendeten Calciumphosphate.

Abkürzung	Name	Formel	Ca / P	Verwendung
MCPM	Monocalcium-phosphat-Monohydrat	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5	Knochenzement
DCPD	Dicalciumphosphat-Dihydrat (Brushit)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0	Knochenzement
DCPA	Dicalciumphosphat-Anhydrat	$\text{CaHPO}_4$	1.0	Knochenzement
OCP	Octacalcium-phosphat	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33	
TCP	Tricalciumphosphat	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	Knochenersatz
ACP	Amorphes Calciumphosphat	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1.2-2.2	Knochenzement
HAP	Hydroxylapatit	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	1.67	Knochenersatz

Das als Biomaterial wichtigste Calciumphosphat ist Hydroxylapatit (HAP). Hydroxylapatit zählt zu den bioaktiven Materialien, da dieser *in vivo* dazu fähig ist, sich an das umgebende Gewebe anzupassen [13]. Hydroxylapatit, der bei sehr hohen Temperaturen calciniert wurde, weist jedoch nur geringe Resorptionsraten auf [136]. Diese Implantate bilden mit dem Knochen einen osteoimplantären Verbund aus. Das bedeutet, dass sie in den Knochen eingebaut werden, jedoch nicht oder nur sehr langsam

resorbiert werden. Eine Ursache dafür kann in der guten Kristallinität von calciniertem HAP gesucht werden [128]. Die Stabilität von Hydroxylapatit nimmt mit sinkender Qualität der Kristallisation ab. Nanokristalliner HAP kann vergleichsweise leicht resorbiert werden [135]. Um die Einheilung zu verbessern, sollten poröse keramische Implantate verwendet werden [128]. HAP kann auch mit Silica funktionalisiert werden, um die Knochenmineralisation anzuregen [137]. HAP wird zudem als Oberflächenbeschichtung verwendet, um die Einheilung anderer Implantate zu verbessern [138]. Ein weiteres Problem besteht darin, dass zusätzlich zum Keramikimplantat meist noch eine Fixierung angebracht werden muss, die später wieder entfernt werden muss.

Tricalciumphosphat ist das zweite wichtige Calciumphosphat, das als Knochenersatz eingesetzt wird. Seine Löslichkeit ist aber höher als die von HAP, so dass die Implantate oft zu schnell abgebaut werden.

#### 2.4.3.3 Kompositmaterialien

Kompositmaterialien sind Verbundwerkstoffe aus zwei unterschiedlichen Komponenten. Sie sollen die positiven Eigenschaften der beiden Komponenten vereinen oder aber durch den Verbund neue Eigenschaften herausbilden.

Als Biomaterialien werden hauptsächlich organisch-anorganische Komposite eingesetzt. Diese sollen den natürlichen Knochen nachahmen, der ebenfalls als Komposit aus Kollagen und Hydroxylapatit verstanden werden kann. Die generellen Vorteile von Kompositmaterialien aus Polymeren und Nanopartikeln sind die neuen Eigenschaften, die sich aus diesem Verbund ergeben. Es kann z.B. simultan eine hohe mechanische Belastbarkeit und eine große Flexibilität der Materialien erreicht werden [139].

Die anorganische Komponente ist zumeist ein Calciumphosphat. Die hierbei am häufigsten verwendeten Stoffe sind Tricalciumphosphat und Hydroxylapatit. Es werden auch Gemische aus beiden eingesetzt. Die organische Komponente kann aus Kollagen, synthetischen Polymeren oder aber auch aus Polysacchariden bestehen. Um die Oberflächenanbindung zu unterstützen, ist es von Vorteil, polare Polymere zu verwenden [140].

Eine Möglichkeit, ein Komposit herzustellen ist die Copräzipitation. Dabei werden beide Komponenten gleichzeitig aus einer Lösung gefällt. Diese Art der Herstellung

lässt sich auf das System Chitosan/Hydroxylapatit gut anwenden, da beide im Sauren löslich sind und im Basischen ausfallen [141]. *Rusu et al.* beschreiben, dass Hydroxylapatitkristalle, die durch Copräzipitation mit Chitosan entstanden sind, 7 bis 18 nm groß sind und sich in Clustern im Größenbereich von 200 bis 400 nm anordnen. Es wird auch noch ein zweite Partikelgröße mit 25 bis 45 nm Größe beobachtet, die in ihrer Ausdehnung dem natürlichen Knochen schon sehr nahe kommt [142]. *Li et al.* geben für Chitosan–Hydroxylapatit-Komposite unterschiedlicher Zusammensetzung Druckfestigkeiten an (Tab. 2-2) [141]. *Hu et al.* nennen dagegen nur einen Wert von 19 MPa und ein E-Modul von 1 GPa [143].

Tab. 2-2. Druckfestigkeiten von Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen nach *Li et al.* [141].

Theoretisches CHI/HAP Verhältnis <i>m</i> %	Druckfestigkeit MPa
20/80	102
30/70	120
40/60	109
50/50	87
60/40	85
70/30	67

Eine weitere Möglichkeit der Darstellung von Chitosan–Hydroxylapatit-Kompositen ist das Ausfrieren. Auf diese Weise kann man poröse Komposite erhalten [144, 145].

Chitosan–Hydroxylapatit-Komposite und Hyaluronsäure–Hydroxylapatit-Komposite wurden von *Krueger* chemisch charakterisiert und für den Einsatz als Mittelohrprothesen vorgeschlagen [7]. Hyaluronsäure eignet sich aufgrund ihrer geringen Verweilzeit im Körper nur bedingt als Knochenersatzmaterial. Die



durchschnittliche Verweilzeit eines Hyaluronsäuremoleküls in der Knorpelschicht beträgt nur 2-3 Wochen [146].

Ähnlich wie bei den Keramiken ist bei Kompositen im Rahmen der Implantation oft eine zusätzliche Fixierung nötig. Diese muss anschließend wieder entfernt werden. Da sich die meisten der bioresorbierbaren Kompositmaterialien unkontrolliert abbauen, kann eine lang andauernde mechanische Belastbarkeit nicht unbedingt gewährleistet werden. Die Suche nach neuen Materialien, deren Abbau besser kontrolliert werden kann, ist somit Gegenstand der Forschung.

Neben organisch-anorganischen Kompositmaterialien kommen in den letzten Jahren auch Metall–Matrix-Komposite auf. Sie bestehen aus einer metallischen und einer anorganischen Komponente (oft HAP). Ein Beispiel ist hierfür ein Magnesium–Hydroxylapatit-Komposit, das gute mechanische Eigenschaften aufweist [147].

#### 2.4.3.4 Magnesium

Die Idee, Magnesium als Implantatmaterial einzusetzen, ist schon sehr alt. Schon in den 30er Jahren des vorigen Jahrhunderts wurden erste Versuche unternommen. Die Ergebnisse zur Biokompatibilität des Magnesiums waren gut. Es zeigte sich jedoch, dass das Magnesium im Körper zu schnell korrodierte und so Gasblasen entstanden (Abb. 2-17) [148].

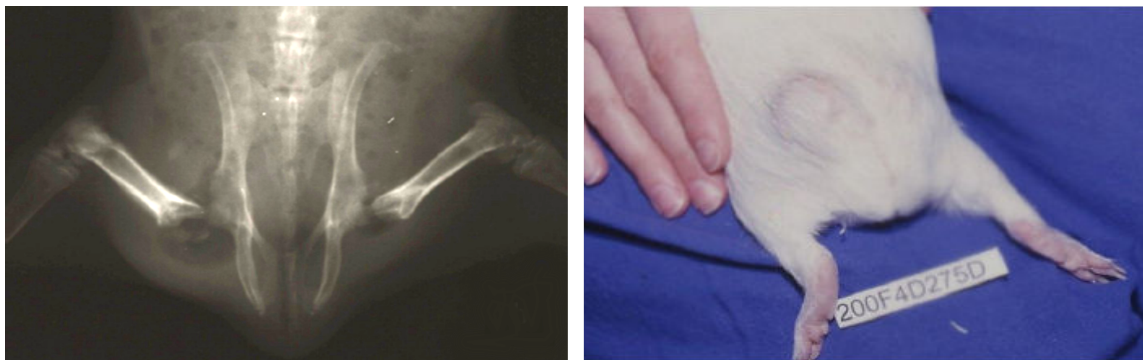


Abb. 2-17. (a) Röntgenbild eines Meerschweinchens mit Wasserstoffgasblase; (b) Photographie eines Meerschweinchens mit Wasserstoffgasblase [149].

Das Problem der Korrosion lässt sich auf unterschiedliche Weise angehen. Ein wichtiger Faktor für die Korrosion ist die Zusammensetzung der Legierung. Für die Anwendung als Biomaterial unterliegt die Auswahl der Legierungskomponenten aber gewissen Beschränkungen, da die Legierung und deren Korrosionsprodukte nicht toxisch oder allergen sein dürfen. Als mögliche Kandidaten sind Lithium, Calcium, Aluminium, Zink und Seltenerdmetalle zu nennen. Auch Fluoride werden den Legierungen beigemischt, um ihren Korrosionswiderstand zu erhöhen [150]. Um die Korrosionsraten zu verringern, ist es von Vorteil, wenn sich eine stabile Deckschicht auf dem Implantat bildet. Denkbare stabile Korrosionsprodukte sind dabei Magnesiumfluorid oder auch, bei aluminiumhaltigen Legierungen, der Spinell  $MgAl_2O_4$ . Diese Deckschicht kann auch künstlich aufgebracht werden und so den Korrosionswiderstand erhöhen. Eine große Rolle spielen auch die Probengeometrie und die mechanische Vorbehandlung der Proben [151].

Um die Gesamtmenge an entstehendem Wasserstoff zu mindern, wird auch über den Einsatz von porösen Magnesiumschwämmen nachgedacht. Poröse Strukturen sind beim Einheilen des Implantats von Vorteil. Auf diese Weise lässt sich zwar die Menge des verwendeten Magnesiums reduzieren, allerdings wird gleichzeitig die Oberfläche des Implantats drastisch erhöht. Das führt zu zusätzlichen Korrosionsproblemen.

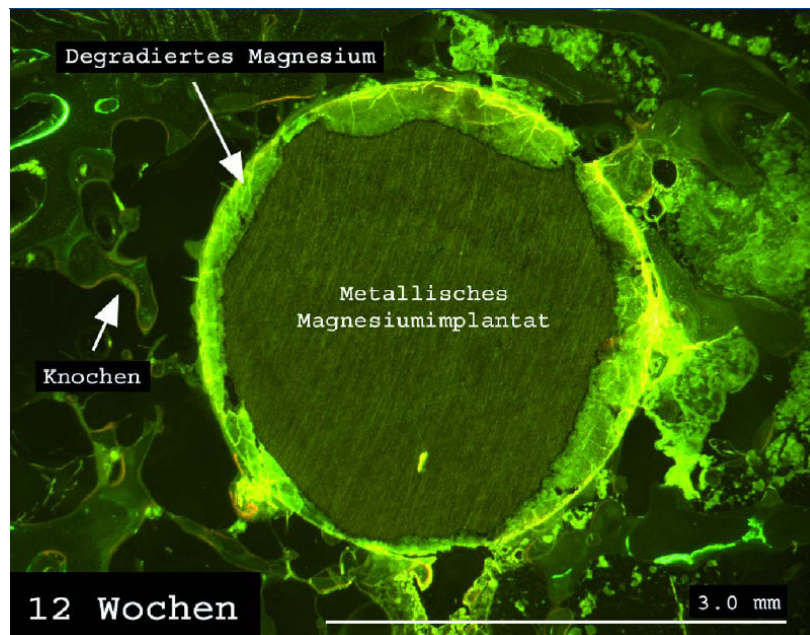


Abb. 2-18. Mit Calcein grün eingefärbte Implantatprobe 18 Wochen nach der Implantation aus [152].

Bei in vivo Versuchen an Meerschweinchen konnten *Witte* et al. nachweisen, dass sich an der Implantatoberfläche eine stark calcium- und phosphathaltige Deckschicht ausbildete (Abb. 2-18). Sie wurde als amorphes Calciumphosphat beschrieben [148]. Zudem scheint auch die Knochenneubildung in der Umgebung angeregt zu werden.

Im Vergleich zu den bisher beschriebenen metallischen Werkstoffen besitzt Magnesium ein relativ geringes E-Modul, das aber mit 45 GPa schon vergleichsweise nah an dem von Corticalis mit 17 GPa liegt. Magnesium gehört zu den Leichtmetallen und hat eine Dichte von  $1.74 \text{ g/cm}^3$ .

Im ausgewachsenen menschlichen Körper ist etwa 1 mol Magnesium enthalten. Davon befinden sich wiederum etwa 60 % im Knochen, 39 % sind in der Skelettmuskulatur vorhanden und das verbleibende Prozent ist im Blutserum zu finden. Die Konzentration beträgt dort  $0.73\text{-}1.06 \text{ mmol/L}$ . Oberhalb von  $2.5 \text{ mmol/L}$  kann Magnesium toxisch wirken.

## 2.5 Nanopartikel in der Medizin

In den letzten Jahren haben sich in der Medizin eine Vielzahl von Anwendungen für Nanopartikel eröffnet. Es wurde eine große Bandbreite an organspezifischen *drug delivery* Systemen entwickelt. Weitere Anwendungen liegen auf dem Gebiet der Krebstherapie und dem *gene delivery* [153]. Nanopartikel haben zum Teil andere Eigenschaften als die entsprechenden Festkörpermaterialien [154]. Ihre Oberfläche ist im Verhältnis zur Masse wesentlich größer, so dass die Oberflächeneigenschaften in den Vordergrund treten.

Die Materialien, aus denen die Nanopartikel hergestellt werden, sind so vielfältig wie ihre Anwendungsgebiete. Grundsätzlich lassen sie sich in organische und anorganische Nanopartikel unterteilen. Allerdings weisen organische Nanopartikel oft nur eine geringe thermische und chemische Stabilität auf. Darüber hinaus sollten diese eine hydrophile Oberfläche besitzen, um keine Immunabwehr zu provozieren [155]. Andernfalls können Makrophagen die Nanopartikel aufnehmen und sie so an ihrer Aufgabe hindern [156]. In dieser Arbeit werden nur anorganische Nanopartikel vorgestellt.

### 2.5.1 Magnetische Nanopartikel

In der Natur kommen magnetische Nanopartikel in einigen Bakterien, wie *Magnetospirillum magnetotacticum* und *Gallionella* vor (Abb. 2-19) [157, 158]. Dort dienen sie der passiven Orientierung im Erdmagnetfeld.



Abb. 2-19. *Magnetospirillum magnetotacticum*, aus [159].

Synthetisch hergestellte magnetische Nanopartikel haben heute ein breites Anwendungsspektrum. Sie können zur Separation von markierten Zellen, für Medikamenten-, Gen- oder Radionuklidtransport, zur Hyperthermie sowie als Röntgenkontrastmittel eingesetzt werden. Die Hyperthermie ist eine Möglichkeit, Krebszellen an schwer zugänglichen Stellen im Körper, wie beispielsweise im Gehirn, zu zerstören. Dazu werden magnetische Nanopartikel aus Magnetit oder Maghemit in die Nähe des Tumors gebracht. Durch das Anlegen eines magnetischen Feldes einer bestimmten Stärke und Frequenz werden die Partikel angeregt, sich zu bewegen. Dabei wird durch die entstehende Wärme ein künstliches Fieber (Hyperthermie) erzeugt. Wird dabei lokal eine Temperatur von 42 °C erzeugt, werden die Krebszellen zerstört [2]. Das Einbringen von größeren Nanopartikeln oder Proteinen ins Gehirn kann gewissen Schwierigkeiten unterliegen, da dieses durch die Blut-Hirnschranke speziell geschützt ist [160]. Die Blut-Hirnschranke reguliert durch die Kontrolle der selektiven und spezifischen Aufnahme sowie des Metabolismus den Transport von endogenen und exogenen Verbindungen in und aus dem Gehirn [161]. Zur Überwindung dieser Schranke ist eine Funktionalisierung der Oberfläche mit barrieregängigen Molekülen von Vorteil. Zusätzlich ist es möglich, die Partikel mit Antikörpern zu beschichten, die spezifisch am zu behandelnden Hirntumor binden. Dadurch kann sehr viel genauer und kontrollierter behandelt werden. Dieser Prozess wird im Allgemeinen auch *targeting* genannt [162, 163].

Die Oberflächenfunktionalisierung von magnetischen Nanopartikeln kann durch Aufbringen einer Silicadeckschicht erfolgen [2]. Wie diese dann weiter funktionalisiert werden kann, wird im folgenden Kapitel beschrieben.

### 2.5.2 Silica-Nanopartikel

Silica-Nanopartikel sind sehr gut als *drug delivery* Systeme geeignet. Sie sind biokompatibel, chemisch genügend stabil und werden nicht vorzeitig durch das Immunsystem eliminiert. Zudem zeigen silicabasierte Nanopartikel eine sehr viel geringere Neigung zur Aggregation als Nanopartikel auf Polymerbasis [164]. Als *drug delivery* bezeichnet man die örtlich und zeitlich gezielte Freisetzung von Medikamenten im Körper. Eine kontrollierte Freisetzung ist vorteilhaft, da weniger Wirkstoff benötigt

wird, unerwünschte Nebenwirkungen vermieden werden und die Genesung beschleunigt wird [155].

Monodisperse Nanopartikel lassen sich über die Stöbersynthese darstellen [165]. Dabei handelt es sich um ein Sol-Gel-Verfahren, das die Herstellung großer Mengen von Nanopartikeln in einheitlich guter Qualität ermöglicht. Diese Partikel tragen jedoch keinen Wirkstoff bzw. keine Poren, die mit Wirkstoffen dotiert werden können, und lassen sich in dieser Form nicht für *drug delivery* einsetzen. Für den inneren Aufbau der mit Wirkstoff dotierten Nanopartikel gibt es verschiedene Möglichkeiten. So kann der Wirkstoff während einer Sol-Gel-Synthese eingebracht werden. Auf diese Weise erhält man ein System, bei dem die Freisetzung des Wirkstoffs sehr langsam erfolgt [155]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Herstellung mesoporöser Nanopartikel. Mesoporen sind definiert als Poren, deren Durchmesser zwischen 2 und 50 nm liegen. In der Regel werden mesoporöse Materialien mit Hilfe eines strukturdirigierenden Agens (SDA) unter hydrothermalen Bedingungen hergestellt (Abb. 2-20). Nach dem Entfernen des SDA können Wirkstoffmoleküle in die Poren eingebracht werden [166]. Diese Trägersubstanz ist insbesondere für größere Biomoleküle interessant [167]. Ein weiteres Anwendungsgebiet von mesoporösen Silica-Nanopartikeln besteht in der Markierung von Zellen [168].

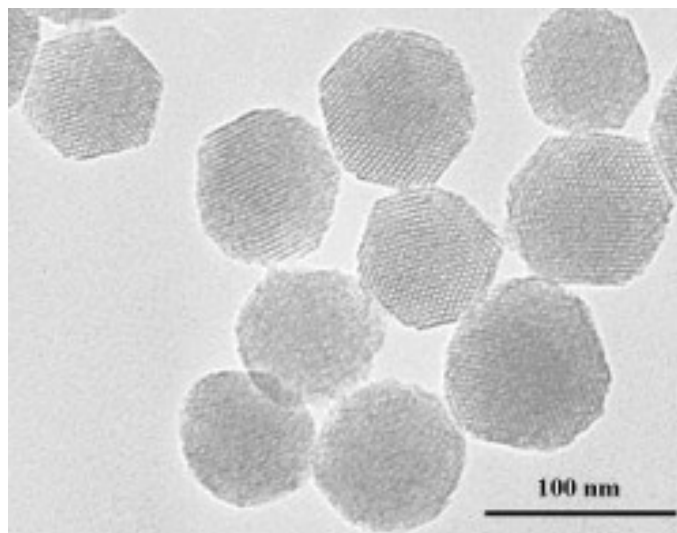


Abb. 2-20. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von mesoporösen Silica-Nanopartikel, aus [169].

Eine dritte Variante für *drug delivery* Systeme stellen Hohlkugeln aus Silica dar, die ebenfalls mit Wirkstoffen beladen werden können [170]. Sie werden durch Abscheidung von Silica auf Polystyrolnanopartikeln und anschließende Calcination hergestellt [171].

Durch die gezielte Funktionalisierung der Nanopartikel ist es zudem möglich, *targeting* zu betreiben [155]. Für die Anbindung funktioneller Gruppen an die Silicaoberfläche ist die Anzahl der Hydroxylgruppen von entscheidender Bedeutung [172, 173]. Kondensierte Oberflächen, wie sie durch Reaktionen in der Gasphase entstehen, sind weniger reaktiv als Partikel, die aus einer wässrigen Lösung entstanden sind.

Oberflächen von Silica-Partikeln lassen sich auf die unterschiedliche Weisen chemisch modifizieren und ermöglichen so, den Charakter der Oberfläche genau einzustellen. Darüber hinaus lassen sich an eine solche Oberfläche eine Vielzahl von Biomolekülen, wie Proteine oder Polysaccharide, chemisch binden. Die Anbindung erfolgt zumeist über ein Kupplungsagenz, das auch Linker genannt wird. Oft werden dazu Epoxysiloxane verwandt. So lässt sich beispielsweise Dextran über einen 3-Glycidoxypropyltrimethylethoxysilan (GOPTMS) Linker an Silica anbinden [174]. Dieser Linker ist vielseitig einsetzbar. Er bildet auf einer Silicaoberfläche eine Monoschicht von 8.5 Å Dicke aus. Die GOPTMS-Schicht ist mechanisch stabil und lässt sich nicht durch Abkratzen entfernen. Die Epoxidfunktion befindet sich hauptsächlich an der äußeren Oberfläche und steht somit weiteren Reaktionen offen. Die Hydrolyse der Epoxidgruppe an der Luft ist ein vergleichsweise langsamer Prozess. Dennoch sollten diese Substrate möglichst schnell weiterverarbeitet werden [175].

DNA lässt sich gut über Thiole an eine Silicaoberfläche anbinden [176]. Eine weitere Möglichkeit, Biomoleküle auf die Oberfläche zu bringen, ist die Chemisorption. Darüber lässt sich Hyaluronsäure auf eine Oberfläche aufbringen [177].

Eine Silicabeschichtung kann auch die chemische Stabilität anderer Nanopartikel immens verbessern. Diese Beschichtung anderer oxidischer Nanopartikel kann über eine Sol-Gel-Route oder in der Gasphase erfolgen [178]. An der so entstandenen Silicaoberfläche lässt sich die oben schon beschriebene Chemie betreiben.





### 3. ANALYTISCHE METHODEN

In diesem Kapitel werden die verwandten Charakterisierungen und Messgeräte kurz vorgestellt. Die grundlegenden Messprinzipien werden erklärt und die Messparameter beschrieben.

#### 3.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie ermöglicht es mit Hilfe von Elektronen die Oberfläche einer Probe abzubilden. Eine Probe wird mit einem fokussierten Elektronenstrahl abgerastert. Dabei werden Sekundärelektronen emittiert, die mit Hilfe eines Sekundärelektronendetektors detektiert werden. Für die vorliegende Arbeit wurden zwei verschiedene Geräte verwandt: Ein Rasterelektronenmikroskop (REM) mit einer Wolframhaarnadelglühkathode und ein Feldemission-Rasterelektronenmikroskop (FE-REM) mit einer kalten Feldemissions-Elektronenquelle.

##### 3.1.1 Rasterelektronenmikroskop

Für die Messungen wurde ein Gerät der Firma Philips vom Typ 30 XL ESEM verwandt, mit dem maximal eine 100.000-fache Vergrößerung zu erreichen ist. Die Beschleunigungsspannung kann zwischen 2 und 25 kV gewählt werden. Die Proben wurden auf einem Kohlenstoffleitpad auf einen Aluminiumträger aufgebracht und nicht weiter vorbehandelt oder bedampft. Die Messungen fanden bei einem Arbeitsabstand von 10 mm und einer Beschleunigungsspannung von 5 kV statt.

### 3.1.2 Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop

Für die Messungen wurde ein Gerät der Firma JEOL vom Typ JSM-6700F eingesetzt. Die maximale Auflösung bei 1 kV Beschleunigungsspannung und bei einem Arbeitsabstand von 4 mm beträgt 2.2 nm. Die Beschleunigungsspannung kann zwischen 0.5 und 30 kV gewählt werden [179]. Die Aufnahmen wurden bei 2 kV und einem Arbeitsabstand von 8 mm gemacht. Dabei wurde ein seitlich zur Probe angebrachter Sekundärelektronendetektor verwandt. Die trockenen Proben wurden mit Hilfe eines Kohlenstoffpads auf einen Messingblock aufgebracht und ohne weitere Behandlung vermessen.

## 3.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wird die Probe mit Elektronen durchstrahlt. Dabei wird ein Teil der Elektronen an der Probe gestreut, so dass diese ihre Bewegungsrichtung ändern. Aus den verbliebenen ungestreuten Elektronen wird ein Bild erzeugt. Dabei handelt es sich um Hellfeld-Abbildungen.

Für die Bilderzeugung im Transmissionselektronenmikroskop sind mehrere Wechselwirkungen der Elektronen mit der Probe wichtig: Absorption, Beugung, elastische und inelastische Streuung. So können Elektronen insbesondere von dicken Proben mit Elementen höherer Ordnungszahlen absorbiert werden. Es wird nur ein sehr kleiner Teil der Elektronen absorbiert. Dennoch kann die Absorption von Elektronen zum Aufheizen der Probe führen, was zur Zerstörung der Probe führen kann. Die Absorption der Probe leistet nur einen geringen Beitrag zur Bilderzeugung im TEM. Elastisch gestreute Elektronen resultieren aus am Atomkern gestreuten Primärstrahlelektronen. Sie haben keinen Energieverlust und werden stark von ihrer Bahn abgelenkt. Sie tragen sowohl zum Amplituden- als auch zum Beugungscontrast im Bild bei. Die inelastisch gestreuten Elektronen werden durch Wechselwirkungen zwischen der Elektronenhülle der Atome einer Probe und den Primärstrahl erzeugt. Sie verlieren dabei an Energie und werden eher schwach gestreut. Inelastisch gestreute Elektronen sind besonders wichtig für die Abbildung von Elementen mit niedrigen Ordnungszahlen. Wie stark die unterschiedlichen Wechselwirkungen zur Streuung

beitragen, hängt von der Massendicke der Probe ab. Die Massendicke ergibt sich aus der Ordnungszahl der Elemente in der Probe und der Dicke der Probe.

Bei kristallinen Proben kann eine Streuung gemäß der Bragg'schen Gleichung (siehe Abschnitt 3.3) erfolgen. Abhängig von der Orientierung des Kristalls können auch die gestreuten Elektronen die Aperturblende der Objektivlinse passieren und einen hellen Punkt erzeugen. Die meisten Elektronen werden jedoch von der Aperturblende absorbiert und erzeugen so ein dunkles Gebiet. Aus dem so entstehenden Punktmuster lässt sich die Kristallstruktur einer Probe bestimmen. Der Beugungscontrast wird auch zur Erzeugung von Dunkelfeldaufnahmen verwandt. Bei sehr dünnen Proben mit Elementen niedriger Ordnungszahlen kommt es zum Phasencontrast. Durch die inelastische Streuung von Elektronen tritt eine Phasenverschiebung gegenüber den Elektronen des Primärstrahls auf. Sie erzeugen den Phasencontrast im Bild.

Bei der energiegefilterten Transmissionselektronenmikroskopie (EFTEM) werden zur Bilderzeugung nur Elektronen einer bestimmten Energie zugelassen. Dabei wird nur ein Ausschnitt der inelastisch gestreuten Elektronen verwendet. Die Methode ermöglicht es, Energieunterschiede in hoher lateraler Auflösung abzubilden. Abbildungen können sowohl im Bereich der Plasmonenanregung als auch im Bereich der Ionisationsenergien der Elemente erfolgen. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden die Plasmonen betrachtet. Bei Plasmonen handelt es sich um eine kollektive Anregung des Elektronengases. Sie haben einen Energieverlust von 10 – 30 eV gegenüber den Primärstrahlelektronen. Durch die Betrachtung eines kleinen Abschnittes der Energie kann es zu Unterschieden in der bildlichen Abbildung kommen, wodurch Probendetails hervorgehoben werden können. Rückschlüsse über die Elementverteilung lassen sich mit dieser Technik jedoch nicht treffen.

Die Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS) stellt eine analytische Methode bei der Transmissionselektronenmikroskopie dar. Der auf die Probe treffende Primärelektronenstrahl wird inelastisch an den Elektronen der Probe gestreut. Dabei kommt es zu einem Energieverlust der Primärelektronen. Die daraus resultierende Energieverteilung wird detektiert und stellt das EELS-Spektrum dar. EELS ist eine sehr empfindliche Methode zur Detektion von leichten Elementen mit einer hohen räumlichen Auflösung [180]. Die Auflösungsgrenze liegt im Bereich von wenigen einzelnen Atomen. Die Lage der einzelnen Peaks ergibt sich aus den für ein Element charakteristischen Ionisationskanten. Dabei lässt sich auch die elektronische Struktur

der Elemente bestimmen. Dadurch kann Aufschluss über die Bindungsverhältnisse der einzelnen Elemente gewonnen werden.

### 3.2.1 Transmissionselektronenmikroskop

Für die Messungen wurde ein Gerät der Firma JEOL vom Typ JEM-2100F-UHR verwandt. Das Gerät besitzt einen Schottky-Feldemitter (ZrO/W(100)). Die Punktauflösung beträgt 0.19 nm. Die Beschleunigungsspannung beträgt 200 kV [179]. Es wurden zudem energiegefilterte Aufnahmen (EFTEM) gemacht. Der Offset wurde von 5 eV bis 24 eV variiert, dabei betrug die Bandbreite 2 eV.

Für die TEM-, EELS- und EFTEM-Messungen wurde die Probe in Ethanol dispergiert. Die Probe wurde für die TEM- und EFTEM-Aufnahmen in 10 µL Tropfen auf ein Kohlenstoffnetz aufgebracht (*continous carbon film* auf 300 mesh Cu-Grid, Quantafoil). Für die EELS-Messungen wurde die Probe auf Siliciumnitridgrids aufgetropft. Zur Untergrundkorrektur wurde die Drei-Fenster-Methode verwandt. Die Aufnahmen wurden von Dr. Armin Feldhoff vom Institut für Physikalische Chemie der Leibniz Universität Hannover gemacht.

## 3.3 Röntgen-Diffraktometrie

Die Röntgen-Diffraktometrie (XRD) ermöglicht die Strukturaufklärung und Identifizierung von Festkörpern. Sie beruht darauf, dass Röntgenstrahlen an den Netzebenen von Kristallen gebeugt werden. Wenn diese die Bedingungen der Braggschen Gleichung erfüllen, kommt es zu konstruktiver Interferenz.

$$n \cdot \lambda = 2 d \cdot \sin \theta$$

Für eine kristalline Struktur ergibt sich so ein charakteristisches Beugungsmuster.

Gemessen wurden gemörserte Proben, die zwischen zwei amorphen Polyacetatfolien in einem Probenträger befestigt wurden. Die Schrittweite betrug 0.1

$2\theta$  bei einer Messzeit von 30 Sekunden pro Schritt. Im Falle der kristallinen Polysialinsäure betrug die Messzeit 120 Sekunden pro Schritt.

Die Messungen erfolgten mit einem Diffraktometer der Firma STOE, Typ StadiP. Dabei wurde mit  $\text{CuK}\alpha_1$  Strahlung in  $2\theta$ -Transmissionsgeometrie gemessen. Es wurden ein Germanium-[111]-Kristallmonochromator und ein positionssensitiver Detektor (PSD) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der Software WinXPow der Firma STOE.

### 3.4 Infrarot-Spektroskopie

Die Infrarot-Spektroskopie (IR) ist eine Standardmethode zur chemischen Charakterisierung einer Probe. Dabei werden Moleküle oder auch Festkörper durch die Absorption von Licht im infraroten Bereich zu Schwingungen und Rotationen angeregt. Gemessen wird die Wellenlänge und die Intensität der Absorption einer mit infrarotem Licht durchstrahlten Probe. Daraus lassen sich Rückschlüsse auf die funktionellen Gruppen und den Aufbau einer Probe ziehen [181].

Die Messungen wurden an einem Fourier-Transformation Infrarotspektrometer (FT-IR) der Firma Bruker von Typ Tensor 27 durchgeführt. Die Messungen erfolgten an Kaliumbromid-Presslingen in Transmissionsoptik im Bereich von  $4000$  bis  $400\text{ cm}^{-1}$ . Für die Herstellung des Presslings wurde die fein gemörserte Probe mit trockenem Kaliumbromid verrieben. Die homogenisierte Probe wurde bei 10 bar zu einer Tablette gepresst und vermessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software OPUS 5.0 der Firma Bruker.

### 3.5 Dynamische Lichtstreuung

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) ist ein Messverfahren zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius von Partikeln in einer Lösung oder Suspension. Das Messprinzip beruht auf der Brownschen Molekularbewegung. Eine Dispersion wird mit einem Laserstrahl durchstrahlt. Dabei kommt es durch die unterschiedlichen Brechungsindices von Lösungsmittel und Partikel zu Streuercheinungen. Durch die

Brownsche Molekularbewegung ändert sich die Intensität des Streulichtes. Große Partikel oder Domänen führen zu einer langsameren Fluktuation der Intensität, als dies bei den sich vergleichsweise schnell bewegenden kleinen Partikeln der Fall ist. Aus der Korrelation zwischen zwei an aufeinander folgenden Zeiten aufgenommenen Streuverläufen, lässt sich der hydrodynamische Radius der Partikel bestimmen.

Die Messungen fanden bei Raumtemperatur statt. Vor jeder Messung wurde die Probelösung durch einen Spritzenfilter (Sartorius Minisart NML, Zelluloseacetatmembran, 0.8  $\mu\text{m}$  Porengröße) gefiltert. Die Messungen wurden mit Polystyrolküvetten vom Typ DTS0012 der Firma Sarstedt durchgeführt, die zuvor mit der Probelösung vorgespült und anschließend mit 1.2 mL der zu untersuchenden Probe befüllt wurden. Für die Analyse wurde ein Brechungsindex von 1.5 für die vermessenen Polysaccharide angenommen.

Die Dynamische Lichtstreuung wurde mit einem Gerät der Firma Malvern Instruments vom Typ Zetasizer Nano ZS mit einem 633-nm-Laser durchgeführt. Das gestreute Licht wurde im Rückstreuwinkel von  $173^\circ$  detektiert. Für die Auswertung wurde die Dispersion Technologie Software 4.0 von Malvern Instruments Ltd. benutzt.

### 3.6 Statische Lichtstreuung

Bei der statischen Lichtstreuung (SLS) wird die über den Messzeitraum gemittelte Streuintensität bei verschiedenen Streuwinkeln betrachtet. Diese Technik ermöglicht unter anderem die Bestimmung des Gyrationradius ( $R_g$ ), der Molmasse ( $M_w$ ) und des zweiten Virialkoeffizienten ( $A_2$ ) des osmotischen Drucks. Darüber hinaus lassen sich mit Hilfe des Formfaktors Aussagen über die Form des Polymermoleküls in Lösung treffen.

Bei der Beugung des einfallenden Laserlichtes durch einen Partikel kommt es zu einer Phasendifferenz der Streuwellen. Ab einer bestimmten Größe lassen sich Partikel nicht mehr als Punktstreuer beschreiben, sondern als ob sie mehrere Streuzentren enthalten. Das führt zu einer Winkelabhängigkeit des Streuvermögens. Daraus ergibt sich der so genannte Formfaktor, der Rückschlüsse auf die statische Form der Partikel erlaubt.

Um die Messdaten auszuwerten, gibt es verschiedene Arten der Auftragung. Der Zimm-Plot kann für Systeme von Partikeln mit kleinem oder mittlerem Durchmesser angewandt werden. Aufgetragen wird hier  $K \cdot c$  gegen  $\Delta R_g$ . Dabei ist  $K$  eine Materialkonstante, die das Brechungsinkrement  $dn/dc$  enthält,  $c$  die Konzentration und  $R_g$  der Gyrationradius. Aus dem y-Achsenabschnitt erhält man das Gewichtsmittel des Molekulargewichts. Das z-Mittel des Gyrationradius lässt sich aus der Extrapolation der Messwerte auf  $c = 0$  ermitteln. Der zweite Virialkoeffizient ergibt sich aus der Extrapolation der Messwerte  $\theta = 0$ .

Der Kratky-Plot wird vor allem für die Konformationsanalyse von Proteinen eingesetzt. Bei ihm wird  $u^2 \cdot P(u)$  gegen  $u$  aufgetragen. Wobei  $u$  die Länge des Streuvektors  $q$  multipliziert mit dem Gyrationradius  $R_g$  ( $u = q \cdot R_g$ ) und  $P(u)$  der statische Formfaktor ist. Ein kompaktes Molekül zeigt im Kratky-Plot einen ausgeprägten Peak bei niedrigen  $q$  bzw.  $u$  Werten.

Beim Holtzer-Plot wird  $u \cdot P(u)$  gegen  $u$  aufgetragen. Für ein starres Stäbchen, dessen Querschnitt kleiner als  $l / q$  ist, ergibt sich ein kontinuierlicher Anstieg der Kurve im Bereich niedriger  $q$ - bzw.  $u$ -Werte. Für höhere  $q$ -Werte folgt der Verlauf dann einer horizontalen Asymptote. Die Höhe des Plateaus ergibt  $\pi \cdot M_L$ , wobei  $M_L = (M / L)$  die Masse pro Länge beschreibt. Dieser Wert ist unabhängig von einer Polydispersität. Der Formfaktor für flexible Polymere führt in dieser Auftragung zunächst zu einem Maximum. Bei höheren  $q$  Werten tritt auch hier ein Plateau auf. Das ist darauf zurückzuführen, dass mit steigendem  $q$  immer kleinere Abschnitte betrachtet werden, die dann eher Stäbchengestalt annehmen. Die Höhe dieses Maximums ist von der Flexibilität der Polymerkette abhängig und die Position des Maximums von der Polydispersität. Bei einer monodispersen Probe tritt das Maximum bei  $u = 1.4$  auf, in polydispersen Systemen mit einer Schulz-Flory-Verteilung bei  $u = 1.73$ .

Für die Messungen wurde ein Gerät der Firma ALV Langen vom Typ ALV 5000e *compact goniometer system* mit einem YAG Laser der Wellenlänge 532 nm verwendet. Die durch einen Spritzenfilter gefilterte Probelösung wurde in eine zylindrische Glasküvette gegeben und vermessen. Die Messungen wurden an der Universität Paderborn im Arbeitskreis von Herrn Prof. Huber durchgeführt.

### 3.7 Simultane Thermoanalyse

Bei der Thermogravimetrie (TG) können aufgrund von Massenänderungen der Probe in Abhängigkeit von der Temperatur Rückschlüsse auf die Prozesse innerhalb der Probe gezogen werden. So lassen sich unter anderem der Wassergehalt einer Probe, thermische Zersetzungsprozesse sowie Änderungen des Aggregatzustandes bestimmen. Bei der Differenzthermoanalyse (DTA) vergleicht man die Temperatur der Probe mit einer Referenzsubstanz, die im Messbereich keinerlei thermische Effekte ausweisen darf. Die DTA ermöglicht eine Unterscheidung von endothermen und exothermen Reaktionen. So ist beispielsweise das Verdampfen von Wasser ein endothermer Prozess. Dagegen ist die Verbrennung von organischen Substanzen ein exothermer Prozess. Die Kombination der Methoden erleichtert die Zuordnung der einzelnen Vorgänge.

Thermogravimetrische Untersuchungen wurden mit der Thermowaage Simultaneous Thermal Analyser 429 der Firma Netzsch durchgeführt. Die Daten wurden mit der Software Proteus Thermal Analysis ausgewertet. Die Probe wurde in einen Korundtiegel gegeben. Die Aufheizrate betrug  $5\text{ °C} / \text{min}$ . Der Temperaturbereich der Messung erstreckte sich von Raumtemperatur bis  $1000\text{ °C}$ . Als Referenzmaterial diente  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ -Korund. Die Messungen wurden von Herrn Dipl. Chem. Falk Heinroth, Frau Dipl. Chem. Olga Kufelt und Frau Birgit Beiße durchgeführt.

### 3.8 Mikrocomputertomographie

Die Computertomographie (griechisch *τομή* = Schnitt und *γραφειν* = schreiben) hat sich seit den siebziger Jahren zu einer Standardmethode in der medizinischen Diagnostik entwickelt. Mit ihrer Hilfe können röntgenographische Schnittbilder des menschlichen Körpers angefertigt werden. Aus diesen lässt sich dann der dreidimensionale Aufbau des menschlichen Inneren rekonstruieren und jedem Volumenelement des Körpers eine Dichte zuordnen. Neben den diagnostischen Anwendungen ergeben sich auch in der zerstörungsfreien Materialprüfung Anwendungsmöglichkeiten. So gibt es heute Anwendungsgebiete im Bereich der Technik, Archäologie, Forensik und Paläontologie. Das Auflösungsvermögen von neuen klinischen Computertomographen liegt heute bei  $0.6\text{ mm}$ . Um den oben



genannten Herausforderungen gerecht zu werden, sind aber oft höhere Auflösungen vonnöten. Diese lassen sich mit Hilfe der Mikrocomputertomographie ( $\mu$ -CT) erzielen, welche eine Auflösung im Mikrometerbereich ermöglicht. Damit wird sie auch zu einem interessanten Werkzeug für Materialchemiker, die so Aussagen über die Homogenität und Porosität ihrer Proben treffen können. Auch medizinische Fragestellungen, wie die Trabekelstruktur von Knochen oder das Korrosionsverhalten von Magnesiumimplantaten, lassen sich so untersuchen. Zudem ermöglicht diese Methode die *in-vivo*-Bildgebung an Kleintieren.

Die heute kommerziell erhältlichen  $\mu$ -CTs basieren zumeist auf einem Kegelstrahl-Computertomographen. Grundlegend ist hier, wie auch bei allen anderen CT-Methoden, die Verwendung von Röntgenstrahlen. Der prinzipielle Aufbau eines CT ist in Abb. 3-1 gezeigt.

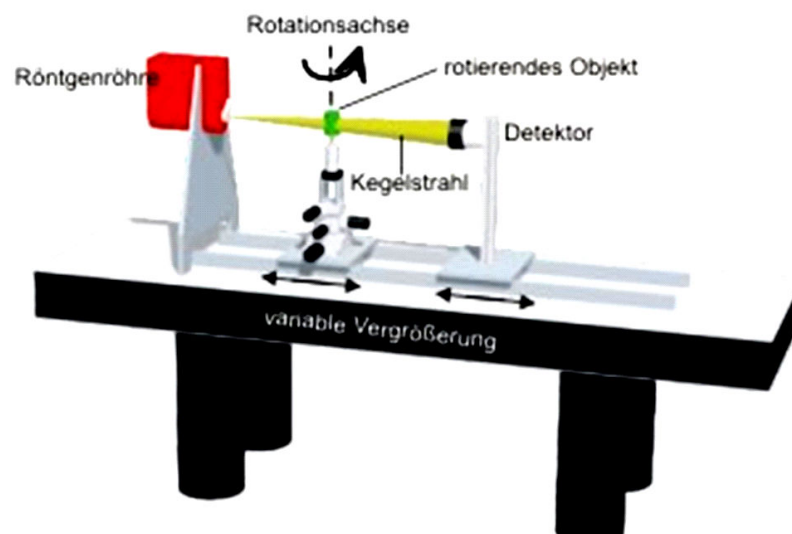


Abb. 3-1. Aufbau eines  $\mu$ -CTs mit Kegelstrahlgeometrie [182].

Röntgenstrahlen sind elektromagnetische Wellen mit einer Wellenlänge zwischen  $10^{-9}$  m und  $10^{-11}$  m. Sie werden mit Hilfe einer Röntgenröhre erzeugt. Dazu wird die Glühkathode thermisch erhitzt, so dass Elektronen austreten, die dann im elektrischen Feld zwischen Kathode und Anode beschleunigt werden. Treffen die Elektronen auf die Wolframanode auf, können diese Elektronen aus tieferen Schalen des Anodenmaterials

schlagen und diese ionisieren. Anschließend gehen Elektronen aus höheren Energieniveaus in tiefere Zustände über und emittieren dabei charakteristische Röntgenstrahlung. Allerdings tritt viel häufiger die so genannte Bremsstrahlung auf, bei der die Elektronen unspezifisch und inelastisch gestreut werden. Dabei kommt es in der Röntgenanode zu einer starken Wärmeentwicklung. Das Durchdringungsvermögen der Röntgenstrahlung hängt zum einen von der Dicke der durchstrahlten Materie ab und zum anderen vom Schwächungskoeffizienten  $\mu$  der durchdrungenen Materie ab. Für die Intensitätsverringern sind im Wesentlichen vier Arten der Wechselwirkung zwischen Materie und Röntgenstrahlen verantwortlich: die Rayleigh-Streuung, der Photoeffekt, die Compton-Streuung und die Paarerzeugung. Die elastische Rayleighstreuung tritt auf, wenn die Wellenlänge der Strahlung im Verhältnis zum Durchmesser des Streuteilchens groß ist. Der Photoeffekt beschreibt die Absorption der Röntgenstrahlung durch ein Atom. Dadurch wird ein Elektron aus einer der inneren Schalen des Atoms herausgeschlagen und das Atom so ionisiert. Der Comptoneffekt tritt auf, wenn ein Röntgenquant mit einem Valenzelektron zusammenstößt. Dabei verliert der Röntgenquant einen Teil seiner Energie (inelastische Streuung). Die Paarbildung tritt bei Energien von  $> 1.022$  MeV auf. Dabei bildet sich durch einen Röntgenquant ein Elektron-Positron-Paar. Welcher der letzten drei Prozesse tatsächlich abläuft, hängt neben der eingestrahelten Energie auch vom absorbierenden Material ab. Bei Wasser, dem Hauptbestandteil des menschlichen Körpers, überwiegt bei den typischen Beschleunigungsspannungen der Compton-Effekt. Beim Blei ist es unter vergleichbaren Bedingungen die Paarbildung.



Abb. 3-2. CT-Aufnahme eines Hirntumors [182].

In der  $\mu$ -CT wird der Röntgenstrahl in einer Kegelstrahlgeometrie auf die Probe gerichtet. Die heute genutzten Detektoren sind Flächendetektoren. Durch die dreidimensionale Kegelstrahlgeometrie sind zur Berechnung der Bilder dreidimensionale Rekonstruktionsverfahren erforderlich. Diese benötigen eine hohe Rechnerleistung und auch einen hohen Zeitaufwand. Zudem kann es bei der Rekonstruktion zu Bildfehlern (Artefakten) kommen. Zum Beispiel kann bei der Aufsummierung von Schichtstapeln eine Treppenbildung auftreten. Dabei erscheint eine eigentlich gekrümmte Fläche in Form treppenartiger Strukturen. Zu Teil- oder Partialvolumenartefakten kommt es durch das begrenzte Auflösungsvermögen des Detektors. Es kommt dadurch gerade bei scharfen Kanten zu einer Unschärfe. Bewegungsartefakte treten bei den untersuchten Proben naturgemäß nicht auf.

Mit Hilfe des CT lassen sich auch Dichten bzw. Knochendichten bestimmen. Sie werden in Hounsfield-Einheiten (HU) gemessen. Die Skala besitzt zwei Fixpunkte: Luft = -1000 HU und Wasser = 0 HU. Anhand dieser beiden Punkte werden die Geräte kalibriert. Spongiosa besitzt eine Dichte von unter 300 HU und Corticalis kann eine Dichte von über 1000 HU besitzen [182, 183].

Für die Messungen in dieser Arbeit wurde ein  $\mu$ CT80 der Firma Scanco Medical verwendet. Die maximalen Probenabmessungen betragen  $75 \times 140$  mm und die maximale Auflösung bei 20 mm Probendurchmesser  $10 \mu\text{m}$ . Die Beschleunigungsspannung kann zwischen 40-70 kV gewählt werden. Die zylindrischen Proben (ca.  $10 \times 8$  mm) wurden in ein Plexiglasröhrchen gegeben und mit etwas Schaumstoff fixiert. Der für die Auswertung benutzte Computer ist eine HP AlphaStation: CPU  $2 \times 1$  GHz, RAM 12 GB, HD 2 TB. Für die Auswertung wurde die FE Analysis Software der Firma Scanco Medical verwendet. Die Messungen fanden am Institut für Werkstoffkunde der Leibniz Universität Hannover statt und wurden unterstützt von Herrn Dipl.-Ing. Christian Klose und Herrn Dr.-Ing. Dirk Bormann.

### 3.9 ICP-OES

Um die Elementgehalte in einer Probelösung zu bestimmen, wurde die optische Emissionsspektrometrie mit einem induktiv gekoppelten Hochfrequenz-Plasma (ICP-OES) verwendet. Sie beruht auf der Eigenschaft der Atome, durch die Aufnahme von

Energie in einen elektronisch angeregten Zustand übergehen zu können. Die Elektronen gehen dann, unter der Abgabe einer charakteristischen Strahlung, wieder in den Grundzustand über. Diese kann detektiert und quantifiziert werden.

Die in Millipore Wasser gelöste Probe wird als Aerosol in eine Plasmafackel gegeben und dort elektronisch angeregt. Die Untersuchungen wurden an einem Spectroflame M der Firma Spectro Analytical Instruments durchgeführt. Die Messungen wurden von Frau Stella Kittel durchgeführt.

### 3.10 Mechanische Messungen

Die mechanischen Messungen sollen Aufschluss über die Belastbarkeit der verwandten Materialien geben und gegebenenfalls zeigen, inwieweit die Materialien mit natürlichem Knochen zu vergleichen sind.

Die Proben wurden an einer Drehbank in eine zylindrische Form gebracht (6-10 mm im Durchmesser und 8-12 mm hoch) und die flachen Enden anschließend plan geschliffen. Es wurden Druckversuche unternommen. Dazu wurden die Probenstücke in die Prüfmaschine eingespannt und dann der Druck mit einer Geschwindigkeit von 0.003 m/s erhöht. Die Messungen fanden an einer ZWICK Z010 Universal-Prüfmaschine statt. Die mechanischen Messungen wurden von Dr.-Ing. Dirk Bormann am Institut für Werkstoffkunde durchgeführt.

## 4. PHYSIKO-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DER POLYSIALINSÄURE

Während in den letzten Jahren wesentliche Erkenntnisse über die biologische Funktion und die Biochemie der Polysialinsäure gewonnen wurden, weiß man verhältnismäßig wenig über die physiko-chemischen Eigenschaften dieses Polysaccharides. Aus diesem Grund wurden grundlegende Untersuchungen zum Verhalten von Polysialinsäuren in Lösung und zur Struktur im festen Zustand unternommen, die in diesem Kapitel beschrieben werden. Einen Schwerpunkt bildet dabei die Untersuchung des Aggregationsverhaltens in wässrigen Lösungen. Dabei wird insbesondere auf den Einfluss unterschiedlicher Kationen und Anionen eingegangen.

### 4.1 Aggregationsverhalten im wässrigen Medium

Für die biologische Funktion der Polysialinsäure ist ihr Zustand im wässrigen Medium von Bedeutung. Um diesen zu untersuchen, wird der Einfluss von Anionen und Kationen auf Colominsäure (CA) mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung betrachtet. Darüber hinaus wird mit künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit der Ionengehalt im Gehirn simuliert, um die natürliche Umgebung besser nachahmen zu können. Des Weiteren fanden an der Universität Paderborn im Institut für Physikalischen Chemie im Arbeitskreis von Herrn Prof. Huber Experimente zur Statischen Lichtstreuung (SLS) statt.

#### 4.1.1 Aggregationsverhalten in reinem Wasser

Das Verhalten von Colominsäure in reinem Wasser wurde mit der Dynamischen Lichtstreuung untersucht. Die Abbildungen 4-1 und 4-2 zeigen DLS-Messungen unterschiedlicher Chargen von Colominsäure in Millipore-Wasser. Bei der Charge

Z4P4565 (Abb. 4-1) tritt über einen weiten Konzentrationsbereich ein konstantes Verhalten auf. In allen Kurven tritt lediglich bei etwa 160 nm ein Peak auf. Das Auftreten dieses Peaks lässt sich über drei Größenordnungen der Konzentration nachverfolgen, er ist also konzentrationsunabhängig. Die geringe Drift hin zu größeren Durchmessern sollte ob der geringen Anzahl der Messpunkte in diesen Bereich nicht berücksichtigt werden. Eine mögliche Erklärung für das beobachtete Verhalten ist die Bildung von Aggregaten. Bei einer mittleren Kettenlänge von 100 Monomereinheiten ist es unwahrscheinlich, dass auch in einer absolut gestreckten Konformation eine Partikelgröße von 160 nm erreicht wird. Da CA neben der Carboxylgruppe über Hydroxylgruppen und eine Amidfunktion verfügt, ist die Ausbildung von inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen wahrscheinlich. Zusätzlich lässt sich eine Schulter bei 35 nm beobachten. Dieser hydrodynamische Radius entspricht vermutlich einer frei in der Lösung vorliegenden gestreckten Polymerkette.

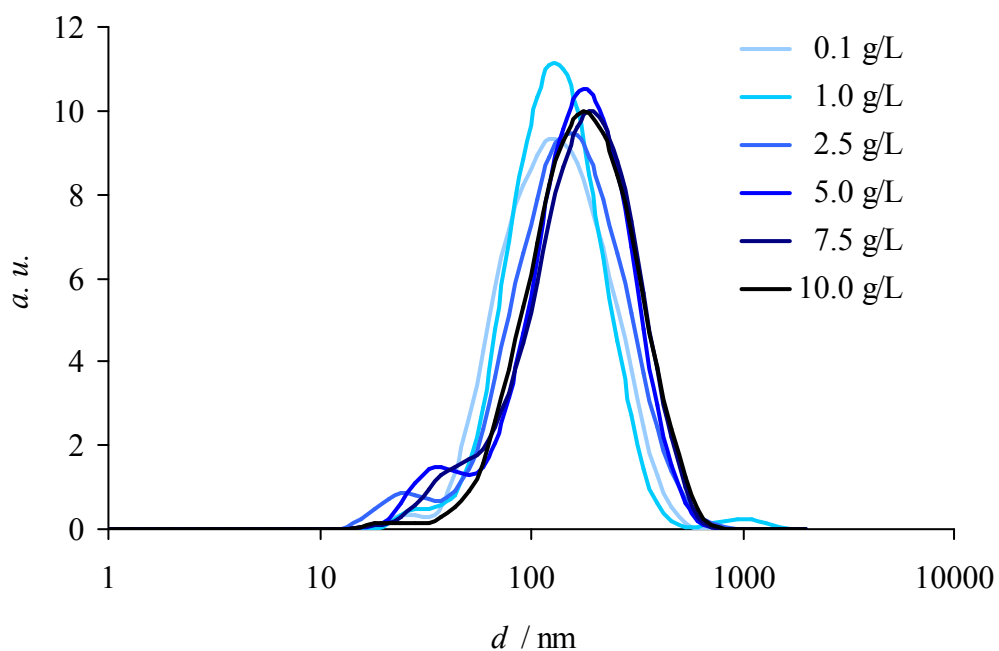


Abb. 4-1. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von Colominsäure (Charge Z4P4565) in Millipore-Wasser bei verschiedenen Konzentrationen.

Im Fall von Charge Z6R2470 (Abb. 4-2) tritt neben einem sehr intensiven Peak bei 160 nm ein zusätzlicher Peak bei 10-20 nm auf. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass sich die Colominsäure durch unsachgemäßen Transport oder Lagerung autokatalytisch zersetzt hat. Das ist aber unwahrscheinlich, da auch innerhalb einer Charge eine Größenverteilung der Colominsäure anzunehmen ist. Ein weiterer

Erklärungsansatz ist eine mögliche höhere Salzkonzentration in der Probe. Die Effekte einer Salzzugabe werden im anschließenden Abschnitt erläutert.

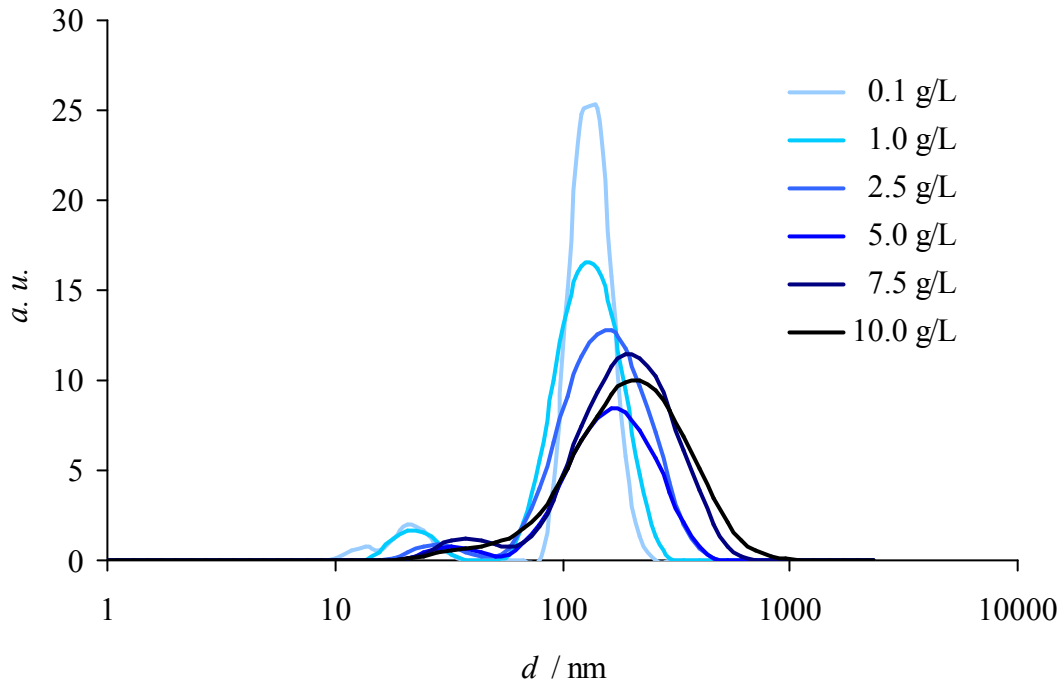


Abb. 4-2. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von Colominsäure (Charge Z6R2470) in Millipore-Wasser bei verschiedenen Konzentrationen.

Zum Vergleich des Aggregationsverhaltens mit anderen polyelektrolytischen Polysacchariden wurde Hyaluronsäure herangezogen. Da hier nur jede zweite Monomereinheit eine Carboxylgruppe trägt, besitzt diese eine Ladungsdichte, die in etwa halb so groß ist wie die der Colominsäure.

Die in Abb. 4-3 gezeigten DLS-Messungen von Hyaluronsäure zeigen ein sehr uneinheitliches Verhalten. Bei geringen Konzentrationen von 0.01 g/L tritt ein breiter doppelter Peak mit zwei Spitzen bei 78 nm und 225 nm auf. Bei einer Konzentration von 0.1 g/L hat sich dieser doppelte Peak stark verbreitert und hat seine Maxima nun bei 28 nm und 190 nm. Bei noch höheren Konzentrationen erstrecken sich die Signale über den gesamten Messbereich. Letzteres ist dadurch zu erklären, dass Hyaluronsäure in sehr viel stärkerem Maße zur Gelbildung neigt als Polysialinsäure. Das ist vor allem auf den um den Faktor 1000 höheren Polymerisationsgrad zurückzuführen. Für Gele ist die einfache Auswertung von Daten aus der Dynamischen Lichtstreuung nicht mehr anwendbar. Es bleibt aber festzustellen, dass das äußerst homogene Verhalten der Colominsäure hier nicht auftritt.

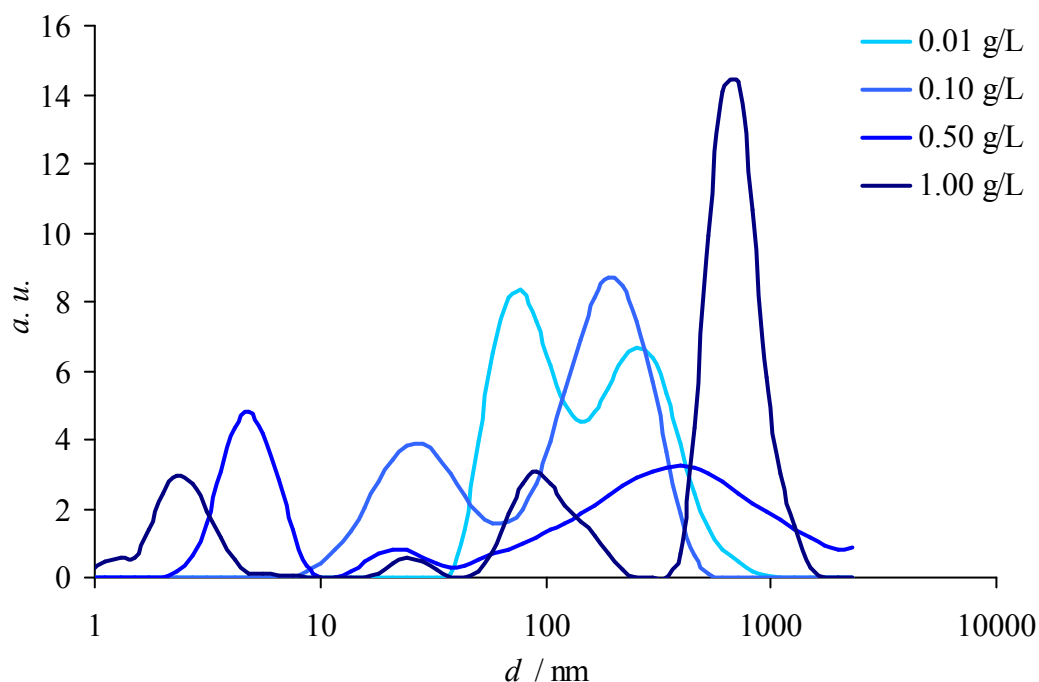


Abb. 4-3. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilungen von Hyaluronsäure in Millipore-Wasser bei verschiedenen Konzentrationen.

Über die Form dieser Aggregate der Colominsäure lassen sich mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung keine weiteren Aussagen treffen. Die statische Lichtstreuung liefert hier auch keine zuverlässigen Ergebnisse und wurde daher nicht hinzugezogen.



Über Polyelektrolytlösungen in reinem Wasser lassen sich mit Hilfe von Lichtstreuungsmethoden nur schwierig Aussagen treffen [121]. Es treten hier vor allem Coulomb-Wechselwirkungen innerhalb der Polymerkette auf. Das führt dazu, dass sich die einzelnen Kettenglieder abstoßen. Polyelektrolyte in Lösungen ohne beziehungsweise mit nur geringer Salzzugabe neigen daher eher zu einer gestreckten Konformation. Schwer zu beurteilen sind in diesen hochgeladenen Systemen die interpartikulären Interaktionen. Die DLS-Messungen zeigen aber, dass sich im Falle der Polysialinsäure ein Aggregat mit einem hydrodynamischen Radius von 160 nm ausbildet. Diese Aggregatgröße ist über einen weiten Konzentrationsbereich stabil.

## 4.1.2 Aggregationsverhalten in wässrigen Lösungen von Alkali- und Erdalkalisalzen

Das Aggregationsverhalten von Colominsäure in wässrigen salzhaltigen Lösungen wurde mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung untersucht. Eine Übersicht der untersuchten Lösungen gibt Tabelle 4-1. Die Lösungen ausgewählter Salze wurden zudem mit der statischen Lichtstreuung untersucht.

Tabelle 4-1: Bei den DLS-Messungen verwendete Salzkonzentrationen.

Salz	0.001 mol/L	0.01 mol/L	0.1 mol/L	1 mol/L
Lithiumchlorid	✓	✓	✓	✓
Natriumchlorid	✓	✓	✓	✓
Natriumnitrat	✓	✓	✓	✓
Kaliumchlorid	✓	✓	✓	✓
Rubidiumchlorid	✓	✓	✓	✓
Magnesiumchlorid	✓	✓	✓	✓
Calciumchlorid		✓	✓	✓
Calciumnitrat		✓	✓	✓

Die Abbildungen 4-4 bis 4-7 zeigen DLS-Messungen von Colominsäure unter dem Einfluss von Alkalichloriden. Es lässt sich grundsätzlich immer der gleiche Effekt beobachten: Neben dem schon im vorangegangenen Abschnitt für salzfreie CA-Lösungen beschriebenen Aggregatpeak bei 160 nm kommt es mit steigender Salzkonzentration zur Ausbildung eines neuen Peaks bei ca. 7 nm. Dieser Umstand ist auf das Auflösen von Aggregaten zurückzuführen. Dennoch bleiben auch Aggregate in der Lösung unverändert erhalten. Darüber hinaus ist auch hier bei niedrigen Salzkonzentrationen eine Schulter an Aggregatpeak bei etwa 30 nm zu beobachten. Diese Schulter ist in höher konzentrierten Lösungen nicht mehr zu beobachten. Die

Ladungen des Polyelektrolyten können durch die Salzzugabe abgeschirmt werden. Das Polymer muss dann nicht mehr gestreckt vorliegen. Die Größe von 7 nm kann sehr gut mit einzelnen, geknäuelten Polymerketten in Einklang gebracht werden.

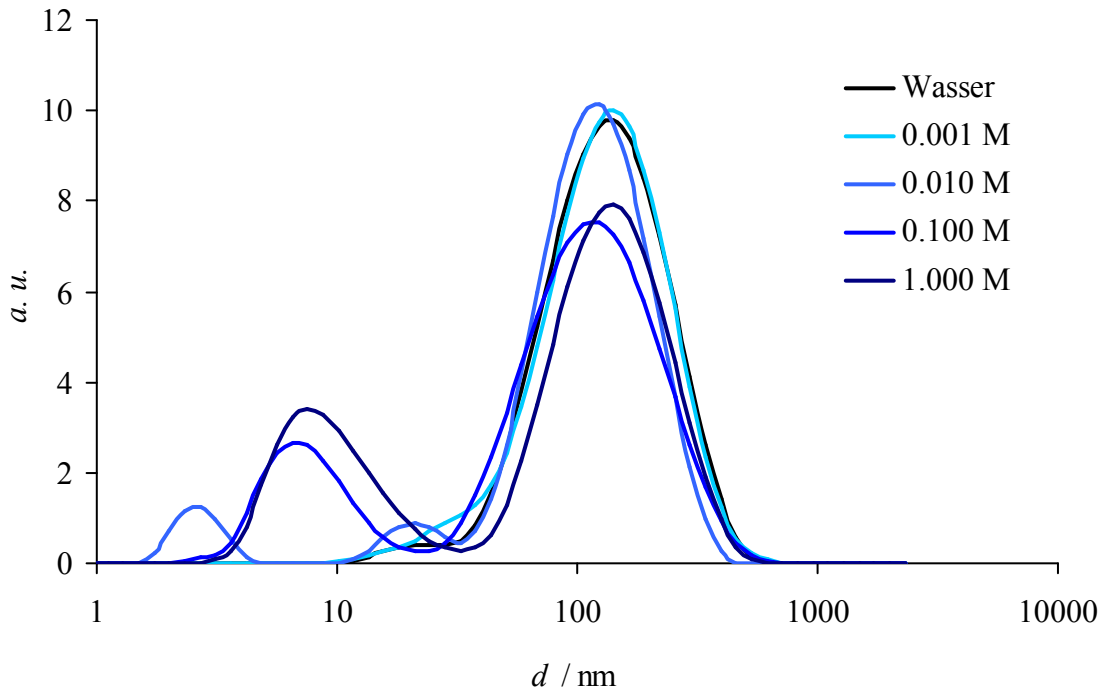


Abb. 4-4. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in LiCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentration im Vergleich mit einer Lösung von 5 g/L CA in Millipore-Wasser.

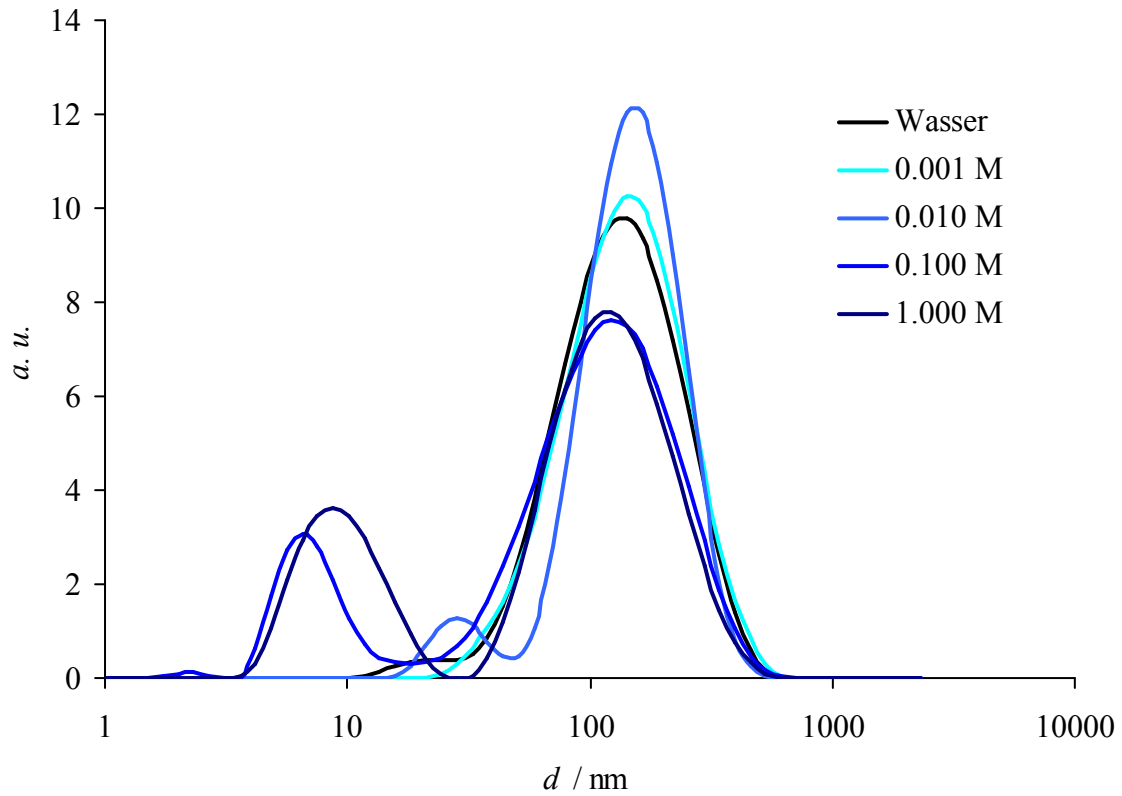


Abb. 4-5. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in NaCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentration im Vergleich mit einer Lösung von 5 g/L CA in Millipore-Wasser.

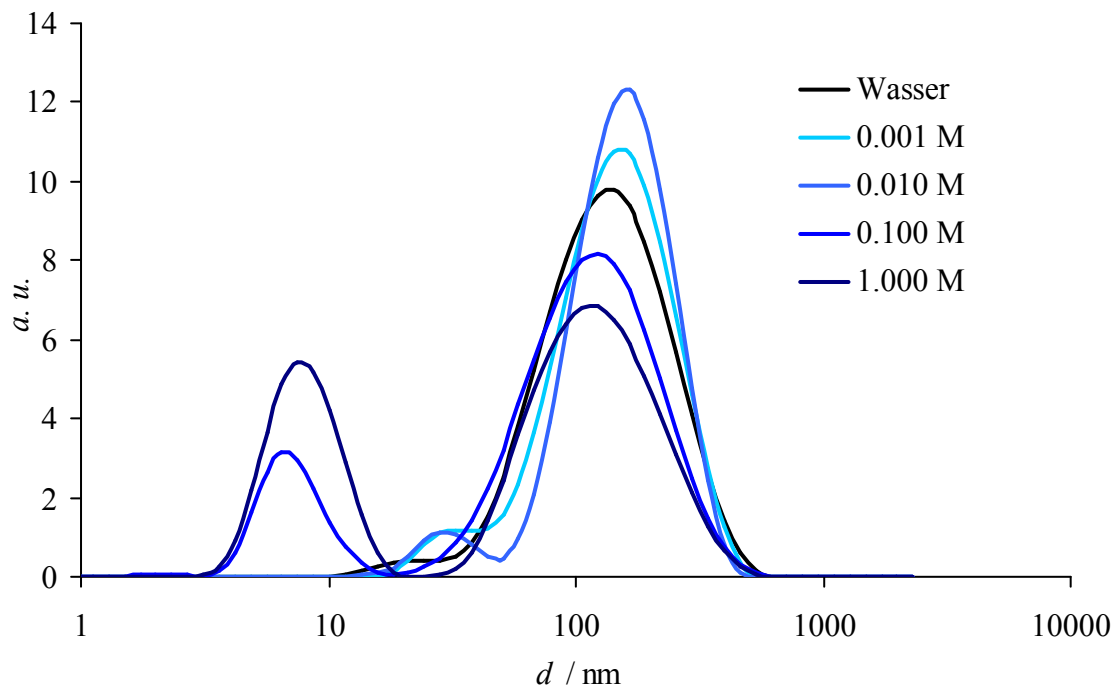


Abb. 4-6. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in KCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentration im Vergleich mit einer Lösung von 5 g/L CA in Millipore-Wasser.

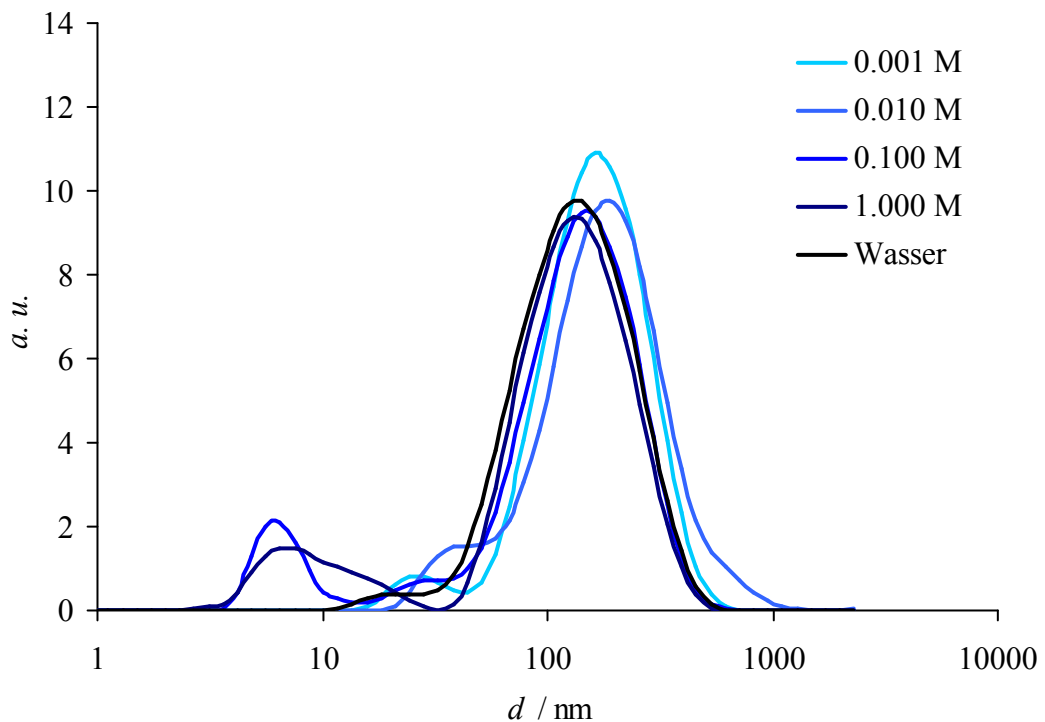


Abb. 4-7. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in RbCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentration im Vergleich mit einer Lösung von 5 g/L CA in Millipore-Wasser.

Beim Vergleich zwischen den einzelnen Alkalichloriden fallen jedoch einige Unterschiede auf (Abbildungen 4-8 bis 4-10): Bei einer Konzentration von 0.01 M zeigt sich nur bei Natriumchloridzugabe ein Effekt. Hier bildet sich ein Peak bei 3 nm aus. Keine der anderen Alkalichloridlösungen dieser Konzentration zeigen diesen Effekt. Bei einer Konzentration von 0.1 M zeigen alle Proben einen zweiten Peak bei 7 nm. Die Intensität dieses Peaks nimmt mit steigender Konzentration zu. Allerdings verschwinden auch bei einer Konzentration von 1 M die Aggregate bei 160 nm nicht vollständig. Das deutet darauf hin, dass diese sehr stabil sind. Diese Stabilität geht über die typische Aggregatbildung, die auf den Polyelektrolyteffekt zurückzuführen ist, hinaus. Solche Aggregate müssen sich über zusätzliche Interaktionen, wie Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren. Bei einer 1 M Rubidiumchloridlösung ist ein sehr breiter Peak zu beobachten. Die Wechselwirkungen scheinen bei diesem sehr großen Kation nicht mehr so genau definiert zu sein. Der Einfluss fällt insgesamt vergleichsweise schwach aus. Die Wechselwirkungen von Lithiumchlorid und Natriumchlorid scheinen in konzentrierteren Lösungen etwa gleich stark zu sein. Kaliumchlorid zeigt in 1 M Lösung den stärksten Effekt.

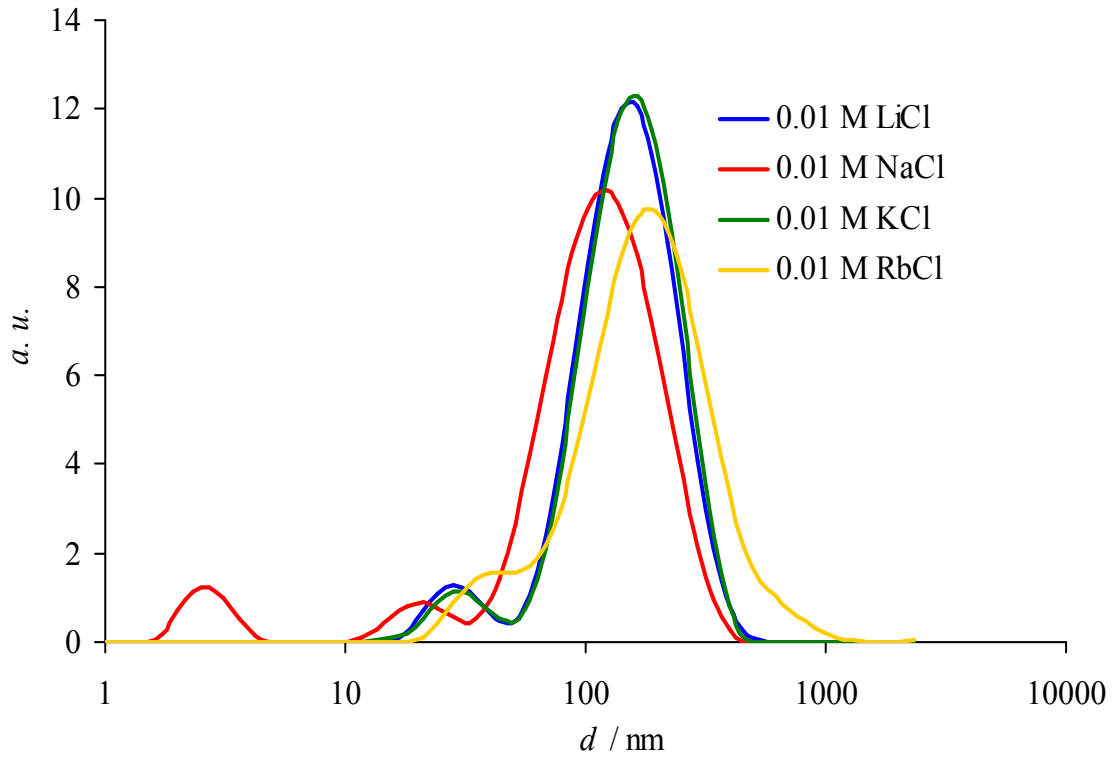


Abb. 4-8. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.01 M Alkalichlorid-Lösungen.

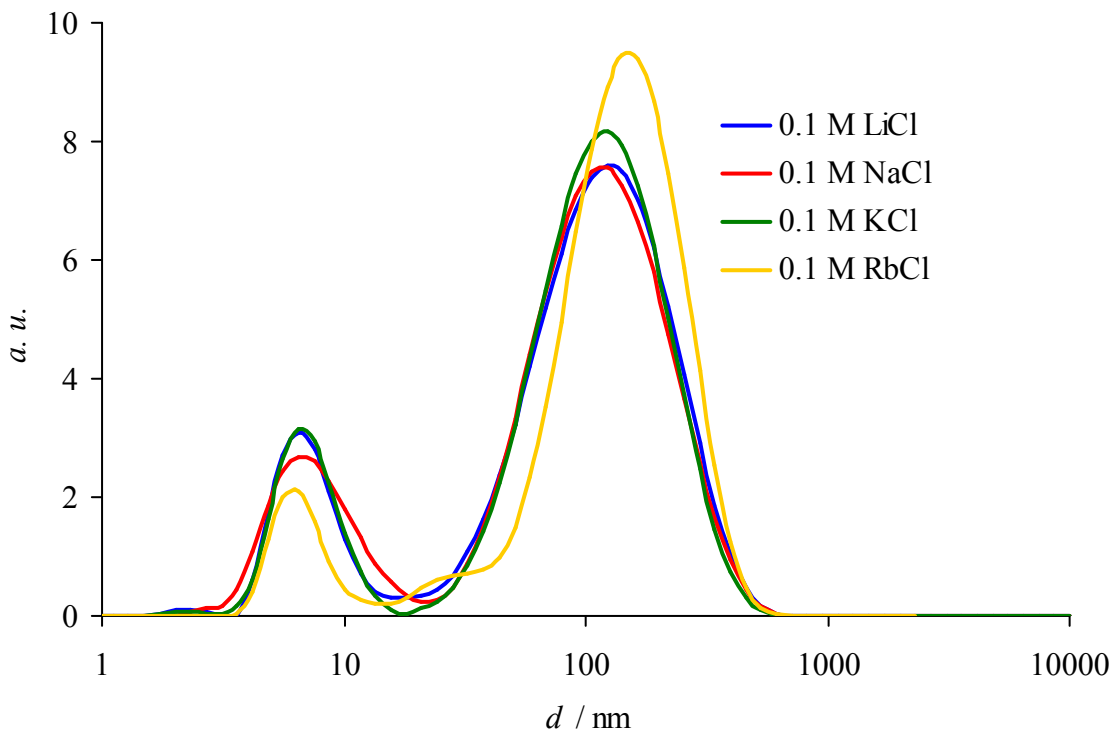


Abb. 4-9. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.1 M Alkalichlorid-Lösungen.

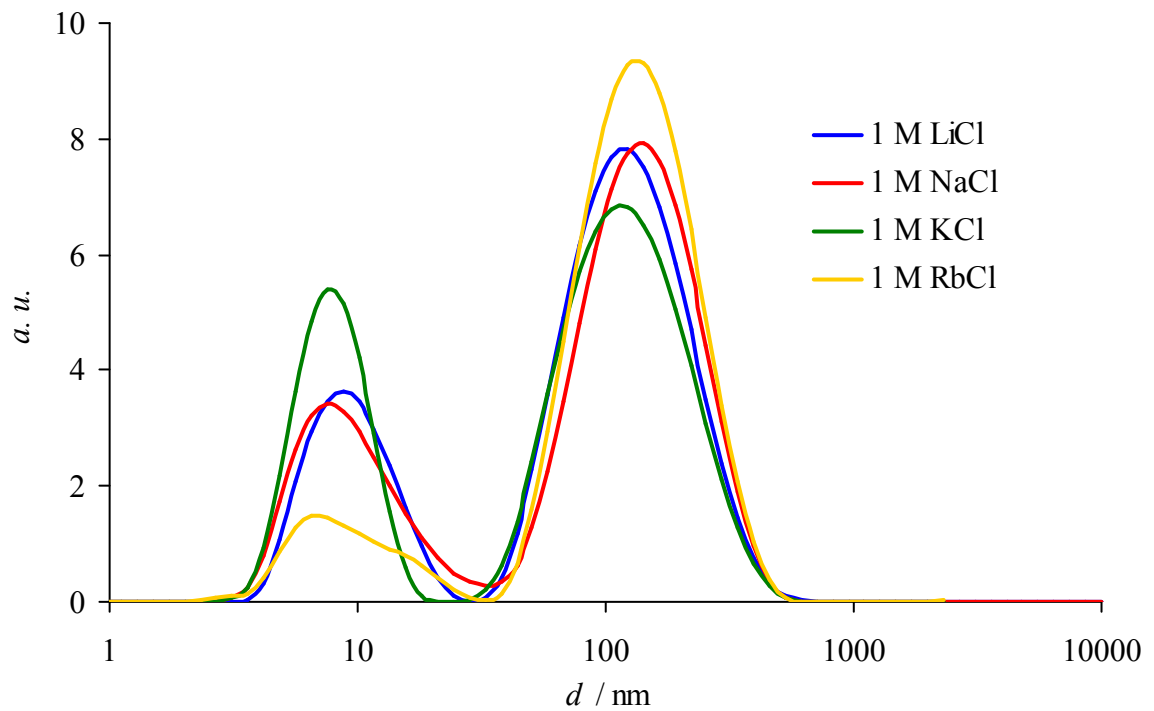


Abb. 4-10. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 1 M Alkalichlorid-Lösungen.

Neben Alkalichloriden wurde auch der Einfluss von Alkalibromide, Natriumiodid und Natriumnitrat auf das Aggregationsverhalten von Colominsäure in wässrigen Lösungen untersucht.

Abb. 4-11 zeigt DLS-Messungen von Colominsäure in Natriumbromidlösungen unterschiedlicher Konzentration. Wie bei den vorangegangenen Proben tritt bei 160 nm ein breiter Peak auf. Dieser weist zudem in 0.001 M Lösung eine Schulter bei 28 nm auf. Steigt die Salzkonzentration, verschwindet diese Schulter. Darüber hinaus zeigt Natriumbromid ebenfalls ab einer Konzentration von 0.1 M einen zweiten Peak bei 7 nm. In einer 1 M Natriumbromidlösung ist eine Peakverbreiterung bei 160 nm zu beobachten.

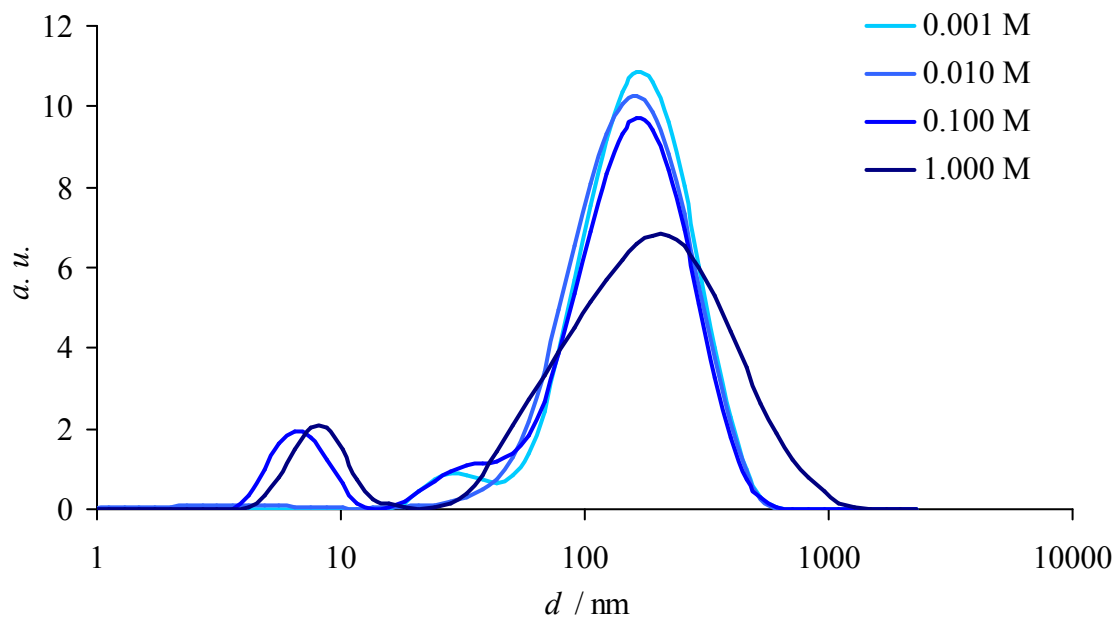


Abb. 4-11. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in NaBr-Lösungen unterschiedlicher Konzentration.



Abb. 4-12 zeigt DLS-Messungen von Colominsäure in Kaliumbromidlösungen unterschiedlicher Konzentration. Wie bei den vorangegangenen Proben tritt bei 160 nm ein breiter Peak auf. Dieser weist zudem bei einer Konzentration von 0.001 M eine Schulter bei 28 nm auf. Bei steigenden Salzkonzentrationen schwächt sich diese Schulter ab, verschwindet aber nicht vollständig. Darüber hinaus zeigt die Colominsäurelösung mit Kaliumbromid ebenfalls ab einer Konzentration von 0.1 M einen zweiten Peak bei 7 nm. In Gegenwart von Kaliumbromid in den Colominsäurelösungen kommt es generell zu einer Peakverbreiterung. Das führt so weit, dass sich in einer 1 M Kaliumbromidlösung über den gesamten Messbereich Signale beobachten lassen. Die Wechselwirkungen scheinen sehr viel weniger definiert zu sein als bei den anderen Lösungen.

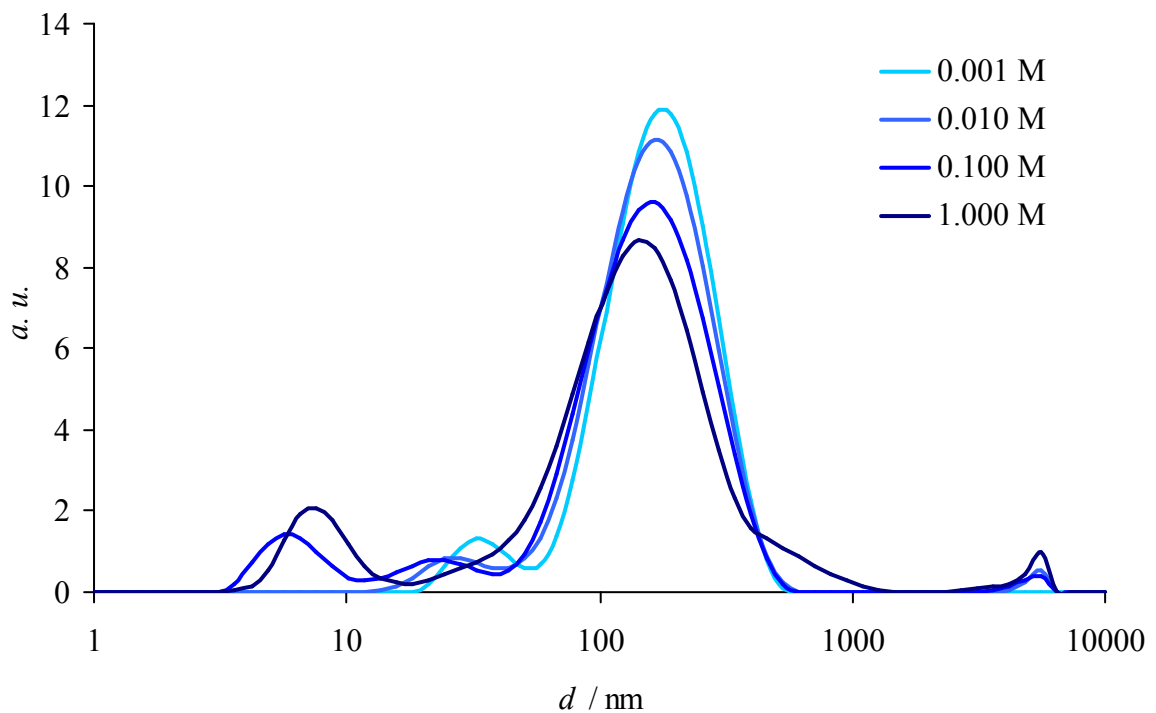


Abb. 4-12. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in KBr-Lösungen unterschiedlicher Konzentration.

In den Abbildungen 4-13 bis 4-15 ist ein Vergleich des Einflusses auf das Aggregationsverhalten von Colominsäure in wässrigen Lösungen von Natriumbromid und Kaliumbromid bei unterschiedlichen Konzentrationen zu sehen. Dabei fällt auf, dass die Gegenwart beider Salze sehr breite Peaks verursacht. Die Schulter bei 28 nm ist bei einer 0.01 M Kaliumbromid-Konzentration deutlich zu erkennen. Diese tritt in der Größenverteilungskurve, die an einer Lösung mit einem Gehalt von 0.01 M Natriumbromid bestimmt wurde, nicht auf. Beim Vergleich der beiden 0.1 M Salzlösungen lassen sich beim Aggregationsverhalten der Colominsäure kaum Unterschiede erkennen. Die Aggregatpeaks der Colominsäure in den beiden 1 M Bromidlösungen sind sehr breit. Dabei ist der Peak, der in der Natriumbromidlösung beobachtet wird, leicht zu größeren Aggregaten hin verschoben.

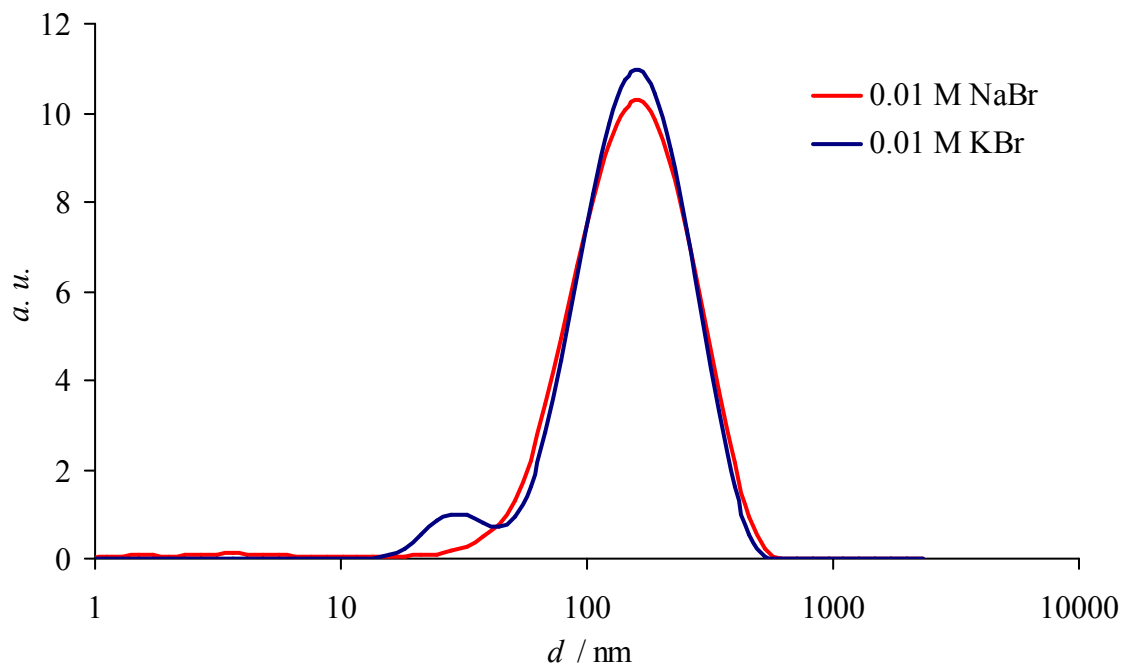


Abb. 4-13. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.01 M Alkalibromid-Lösungen.

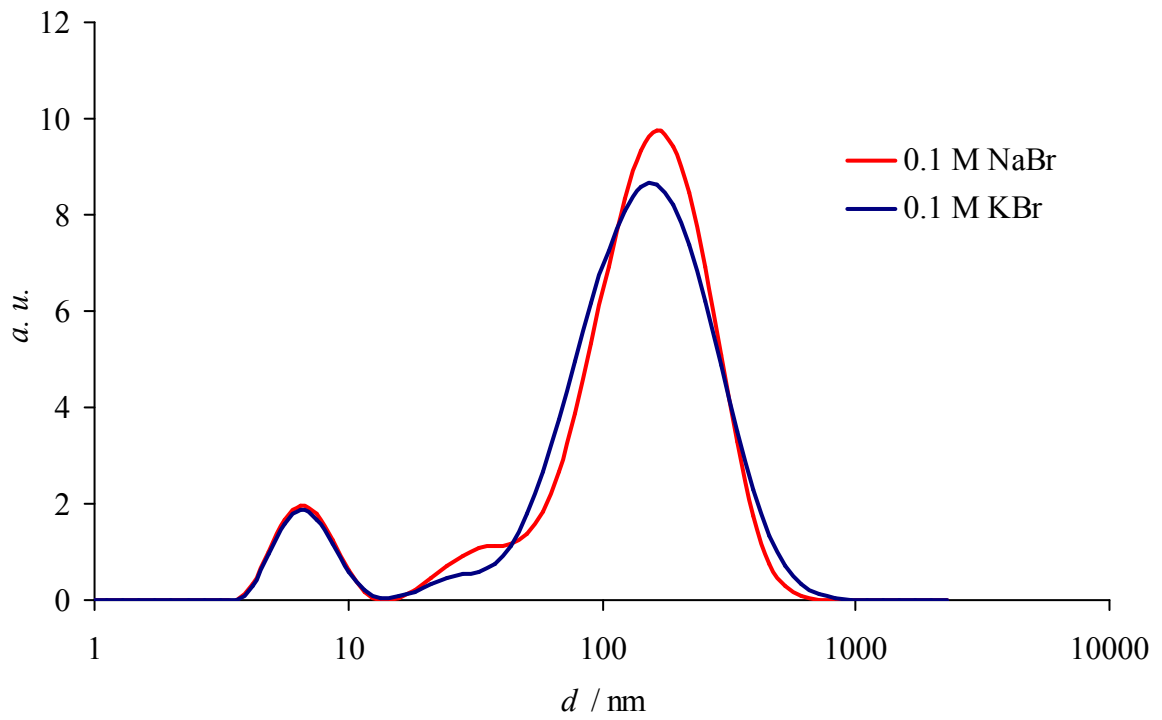


Abb. 4-14. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.1 M Alkalibromid-Lösungen.

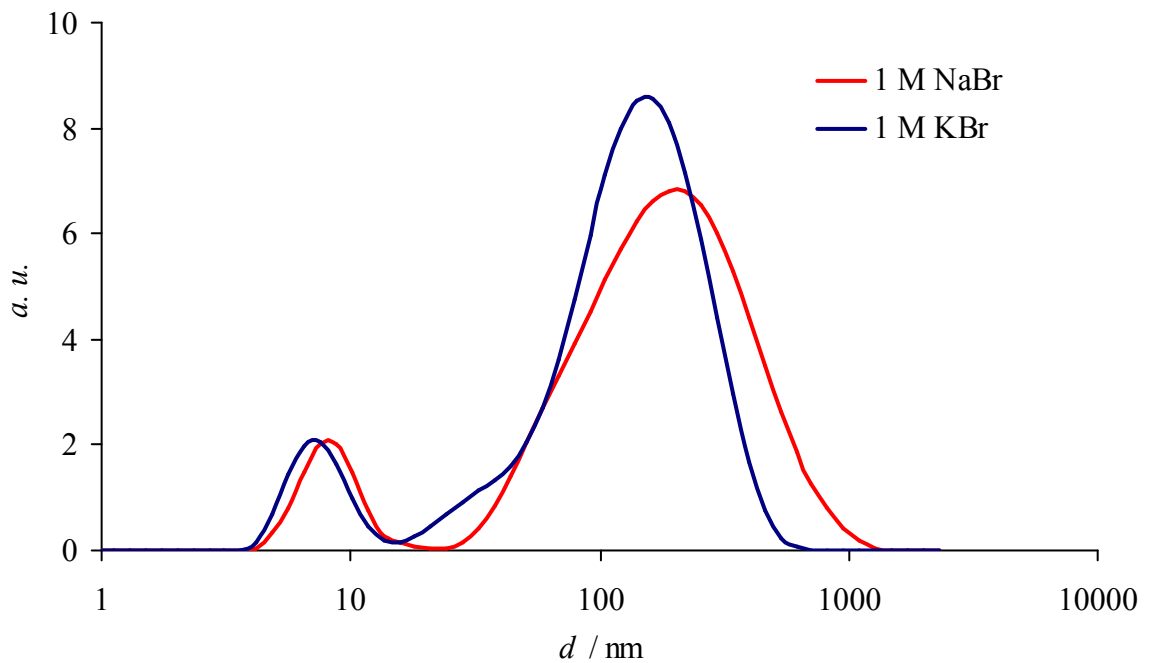


Abb. 4-15. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 1 M Alkalibromid-Lösungen.

Abb. 4-16 zeigt DLS-Messungen von Colominsäure unter dem Einfluss von Natriumiodid. Dabei lassen sich wiederum die beiden Peaks bei 160 nm und 7 nm beobachten, wobei letzterer erst ab einer Konzentration von 0.1 M Natriumiodid auftritt. Der Peak bei 160 nm weist eine Schulter auf, die bei steigender Konzentration erhalten bleibt.

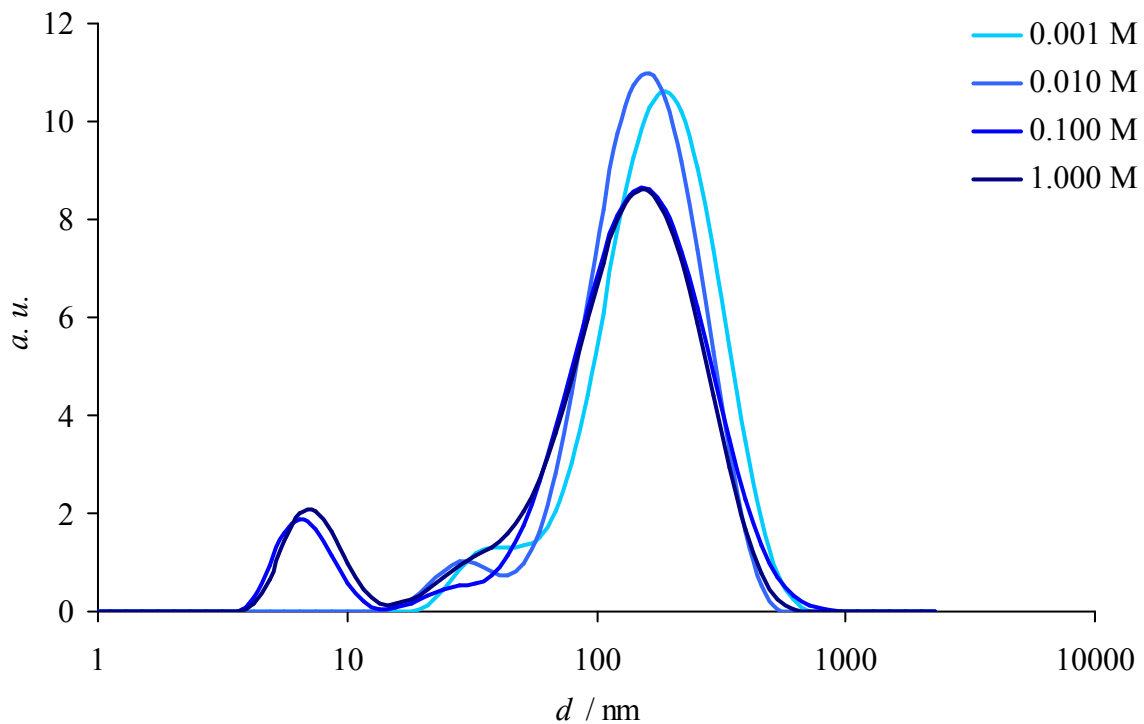


Abb. 4-16. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in NaI-Lösungen unterschiedlicher Konzentration.

Die Abb. 4-17 bis 4-19 zeigen DLS-Messungen der unterschiedlichen Natriumhalogenide im Vergleich. Die Colominsäurelösung mit 0.01 M Natriumchlorid weist im Unterschied zu allen anderen Salzlösungen ein Peak bei 3 nm auf. Bei einer Salzkonzentration von 0.01 M in der Lösung ist, im Falle der Gegenwart von Natriumchlorid bzw. Natriumiodid, am Aggregationspeak einer Schulter bei 30 nm zu beobachten. Bei der Lösung mit Natriumbromid ist dies nicht der Fall. In 0.1 M Lösungen in Abb. 4-18. zeigt Natriumchlorid das stärkste Deaggregationsverhalten. Ähnliches gilt für die 1 M Lösungen. Dabei zeigt Colominsäure in Gegenwart von Natriumbromid einen sehr breiten Aggregationspeak.

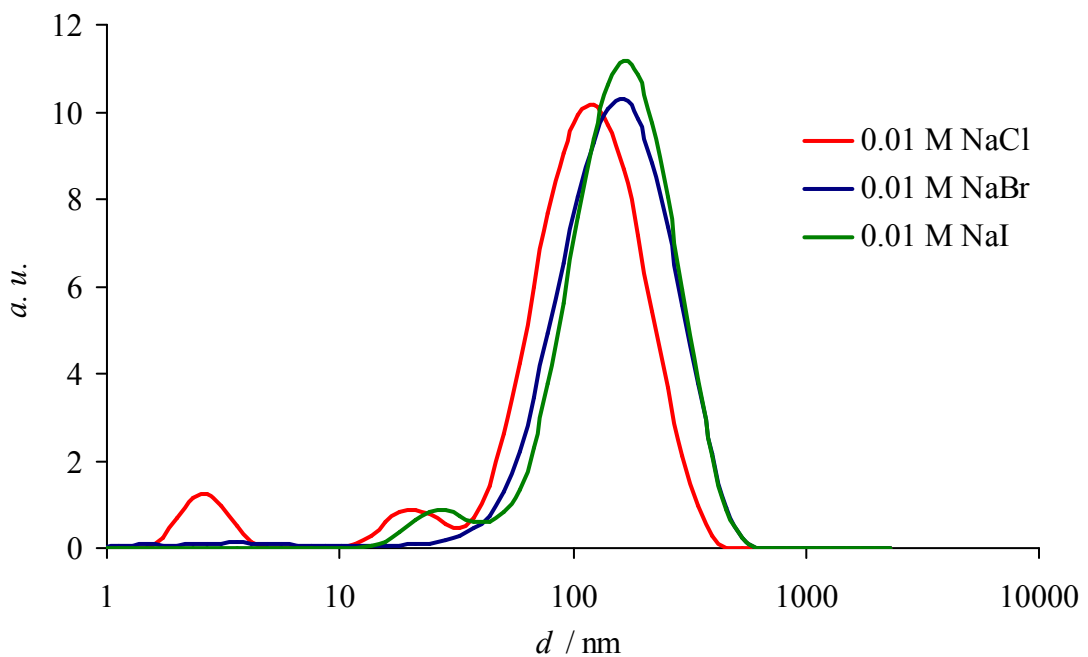


Abb. 4-17. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.01 M Natriumhalogenid-Lösungen.

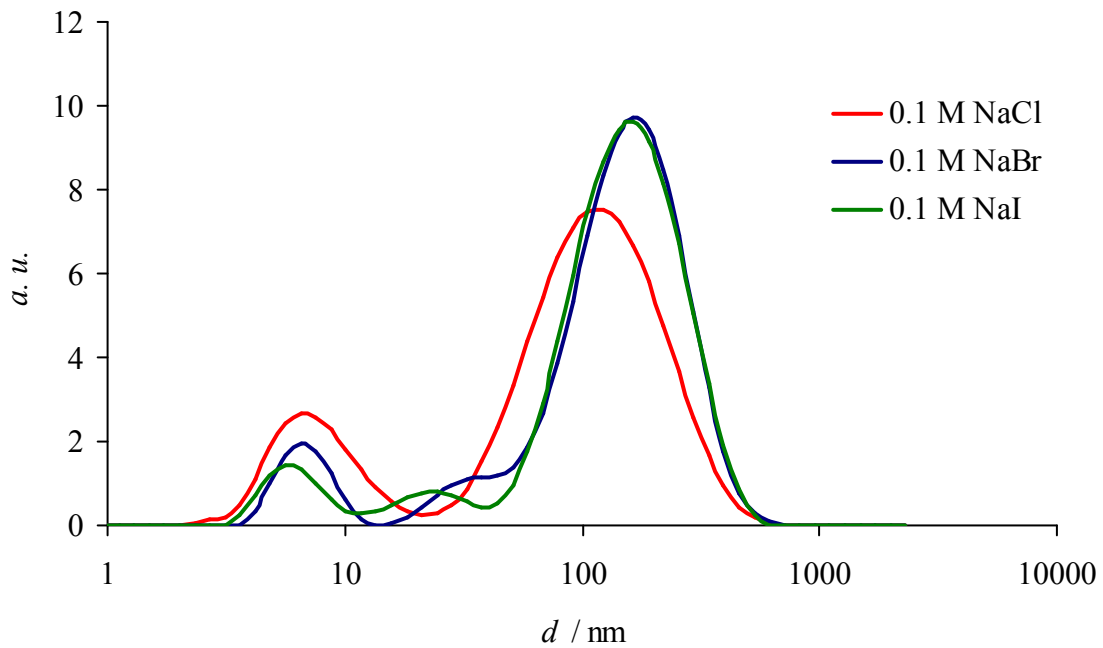


Abb. 4-18. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.1 M Natriumhalogenid-Lösungen.

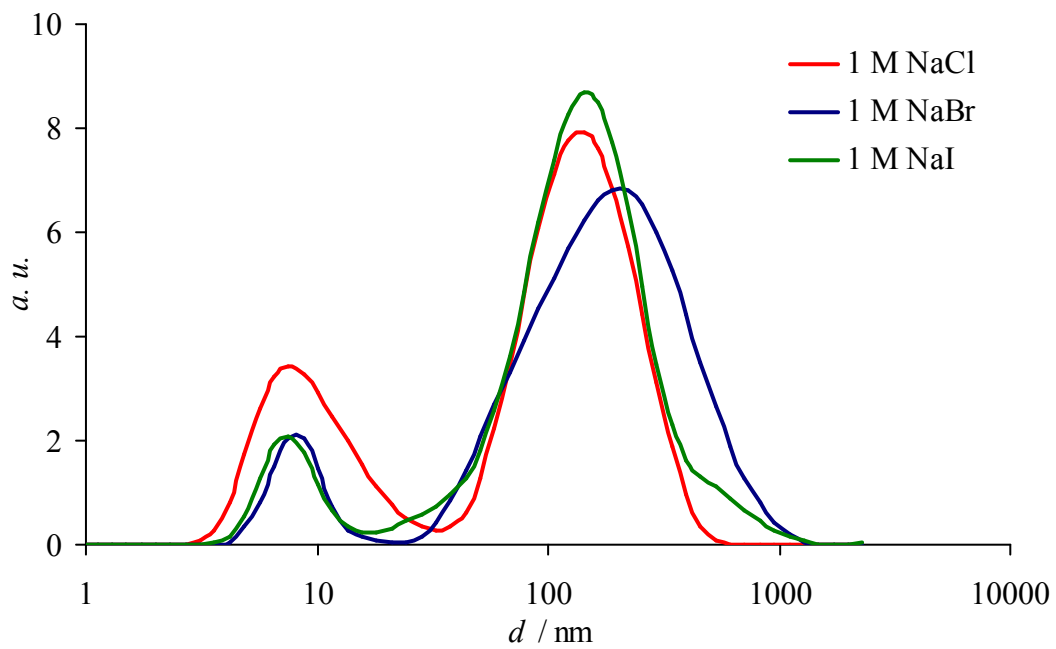


Abb. 4-19. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 1 M Natriumhalogenid-Lösungen.

Die Abb. 4-20 bis 4-22 zeigen den Vergleich der Partikelgrößenverteilung von Colominsäure in wässrigen Lösungen von Kaliumchlorid und Kaliumbromid bei unterschiedlichen Konzentrationen. Bei einer Konzentration von 0.01 M unterscheidet sich der Einfluss der beiden Salze nicht. Bei höheren Konzentrationen von Kaliumchlorid in der Lösung zeigen die Aggregate eine wesentlich stärkere Tendenz zur Deaggregation. In Gegenwart von Kaliumbromid bleibt die Schulter des Aggregationspeaks auch bei höheren Konzentrationen erhalten.

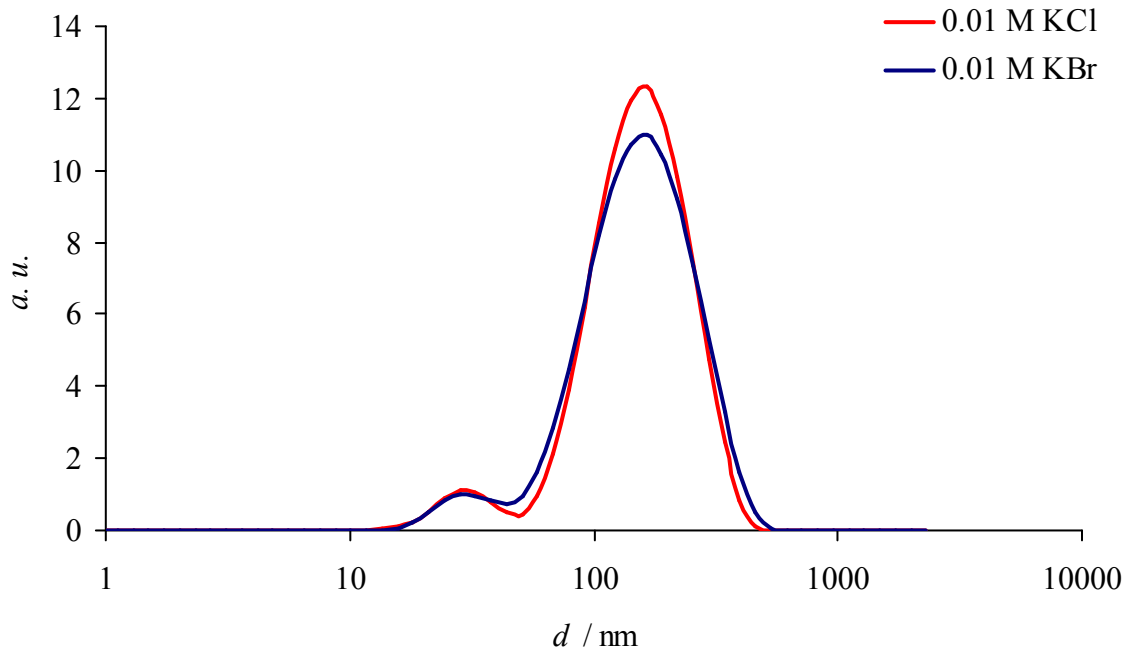


Abb. 4-20. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.01 M Kaliumhalogenid-Lösungen.

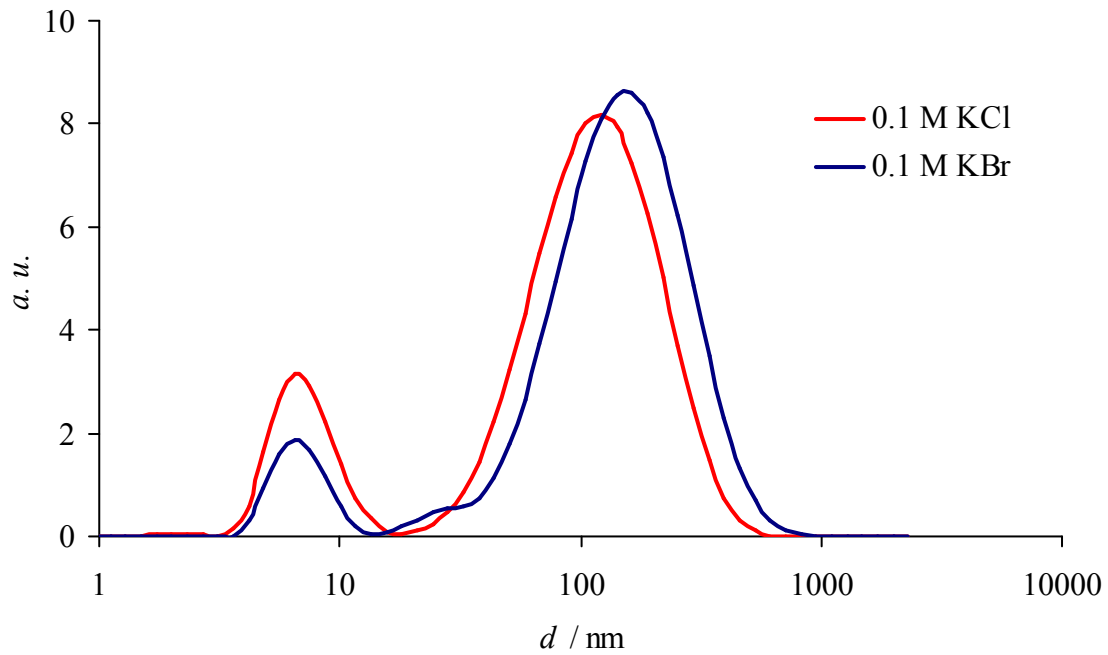


Abb. 4-21. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.1 M Kaliumhalogenid-Lösungen.

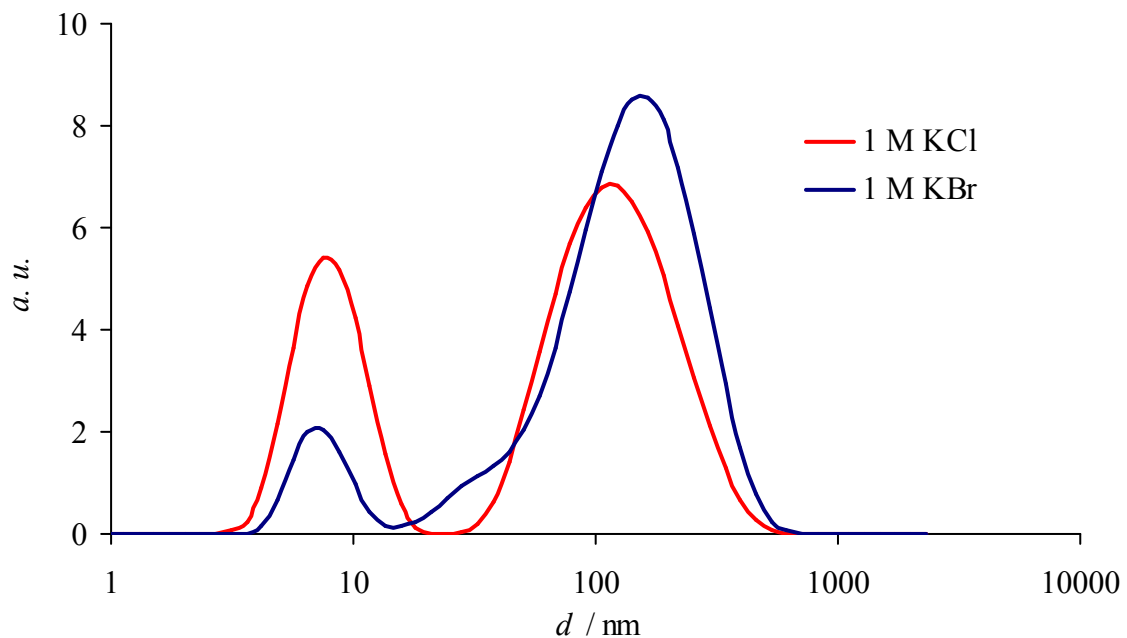


Abb. 4-22. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 1 M Kaliumhalogenid-Lösungen.



Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Kaliumchlorid einen besonders starken Einfluss auf das Verhalten von Colominsäure in Lösung hat. Das scheint nicht nur auf die Wechselwirkungen des Kaliums mit dem Polysaccharid zurückzuführen zu sein, sondern auch auf den Einfluss des Chlorids. Diese These wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Unterschiede im Aggregationsverhalten von Colominsäure in Gegenwart von Natriumbromid und Kaliumbromid wesentlich kleiner ausfallen. Besonders große Kationen wie Rubidium führen zu einer Peakverbreiterung. Die Wechselwirkungen mit großen Kationen scheinen weniger spezifisch als bei kleineren Kationen zu sein. Ähnliche Beobachtungen über den Einfluss der Anionen auf das Aggregationsverhalten von Colominsäure lassen sich nicht machen. Hier fällt lediglich auf, dass Bromid zu einer Signalverbreiterung führt. Dieser Effekt kann jedoch in Gegenwart von Iodid nicht im gleichen Ausmaß beobachtet werden. Um noch ein weiteres Anion zum Vergleich hinzuzuziehen, wurde zudem der Einfluss von Natriumnitrat untersucht.

In Abb. 4-23. sind DLS-Messungen von Colominsäure unter dem Einfluss von unterschiedlichen Natriumnitratkonzentrationen zu sehen. Auch hier kommt es bei einer Konzentration von 0.1 M zur Ausbildung eines zusätzlichen Peaks bei 7 nm. Darüber hinaus führt die Natriumnitratzugabe aber zu einer Verbreiterung der Schulter bei 30 nm. Bei hohen Salzkonzentrationen gehen sämtliche Peaks ineinander über. Die Wechselwirkungen scheinen nicht sehr spezifisch zu sein.

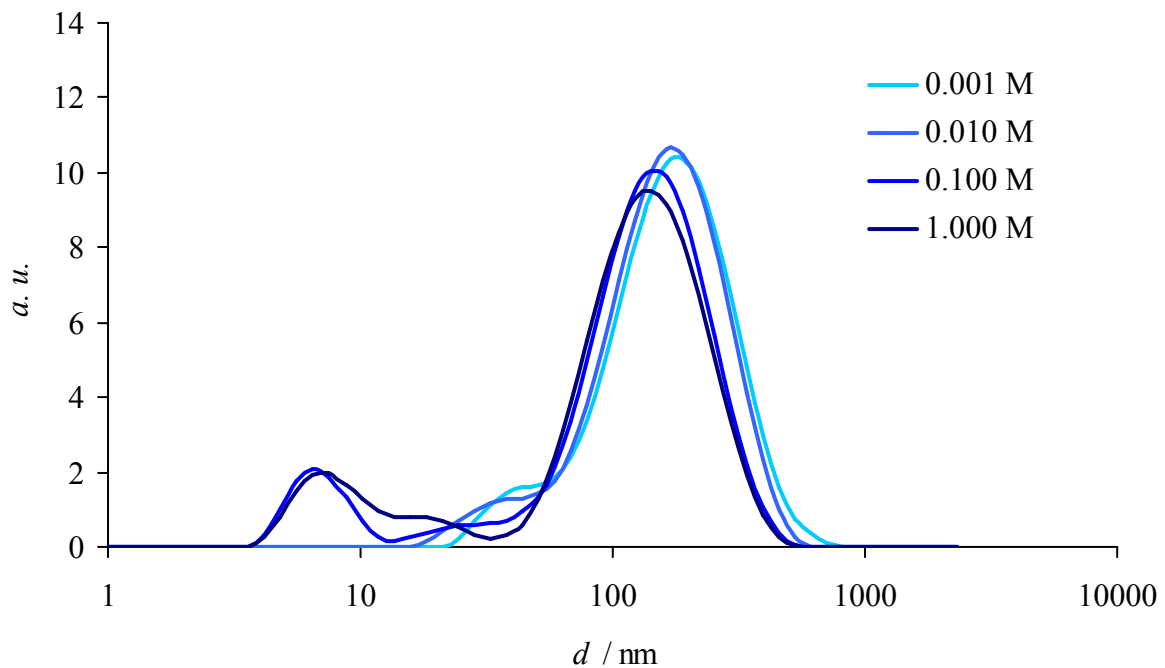


Abb. 4-23. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in  $\text{NaNO}_3$ -Lösungen unterschiedlicher Konzentration.

Der Einfluss zweiwertiger Kationen auf das Aggregationsverhalten muss gesondert betrachtet werden, da sie eine andere Ionenstärke als einwertige Kationen besitzen. Colominsäurelösungen mit zweiwertigen Kationen werden im Folgenden untersucht.

In Abb. 4-24. sind die DLS-Messungen an Colominsäure in Gegenwart von Magnesiumchlorid dargestellt. Grundsätzlich lassen sich hier ähnliche Wechselwirkungen wie bei den vorangegangenen Messungen beobachten. Die Aggregate bei etwa 160 nm treten auch hier auf. Ihr Peak besitzt eine Schulter bei circa 30 nm. Diese Schulter bleibt auch bei höheren Konzentrationen bestehen. Der Aggregatpeak bei einer Konzentration von 0.1 M  $\text{MgCl}_2$  ist auffällig breit. Der kleine Peak bei 7 nm entsteht hier schon bei einer Konzentration von 0.01 M. Das kann auf die höhere Ionenstärke zurückgeführt werden. Der Peak verschiebt sich aber mit steigender Konzentration nach rechts. Das bedeutet, dass der hydrodynamische Radius steigt an.

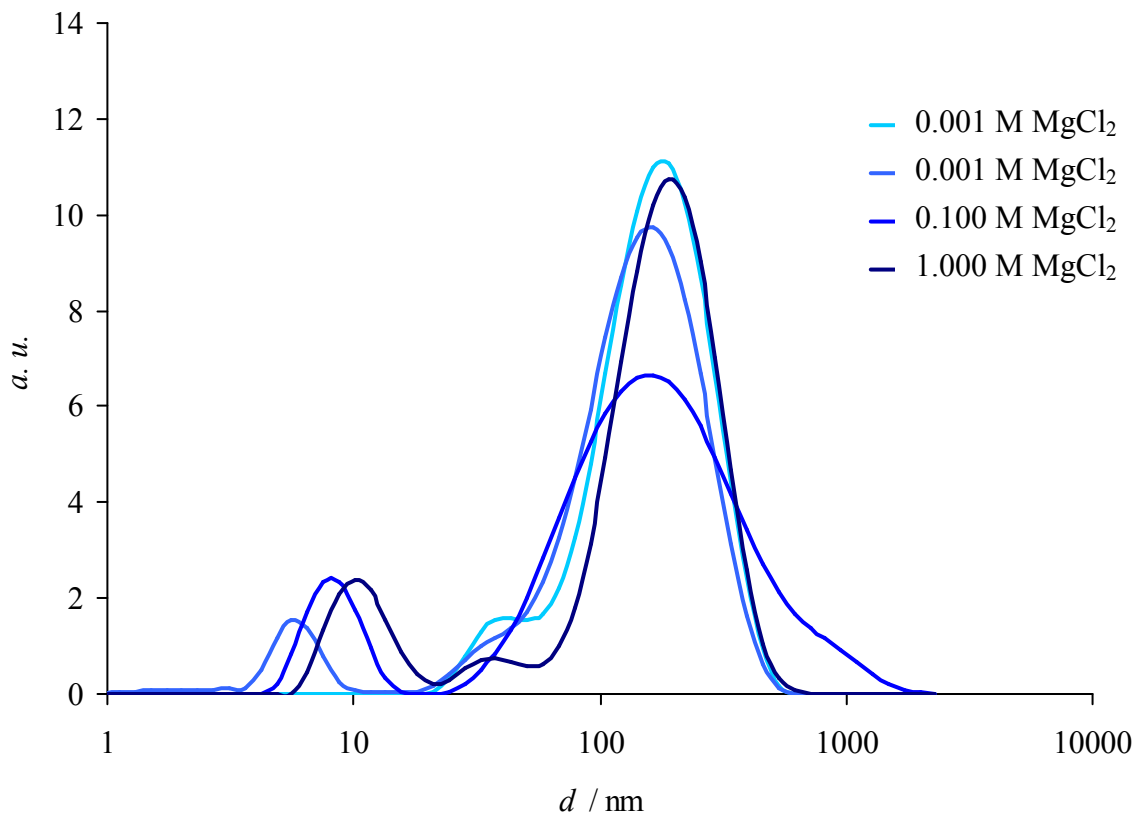


Abb. 4-24. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in  $\text{MgCl}_2$ -Lösungen unterschiedlicher Konzentration.

Die in Abb. 4-25 gezeigten DLS-Messungen an Colominsäure in Gegenwart von Calciumchlorid zeigen vergleichsweise breite Peaks. Auch hier lässt sich schon bei 0.01 M ein zusätzlicher Peak bei 5 nm beobachten. Bei höheren Konzentrationen wächst dieser auf die typischen 7 nm an. Bei Colominsäure in einer 1 M Calciumchloridlösung ist der Peak bei 7 nm intensiver als der Aggregatpeak. Calciumchlorid scheint folglich einen besonders starken Einfluss auf das Aggregationsverhalten zu haben.

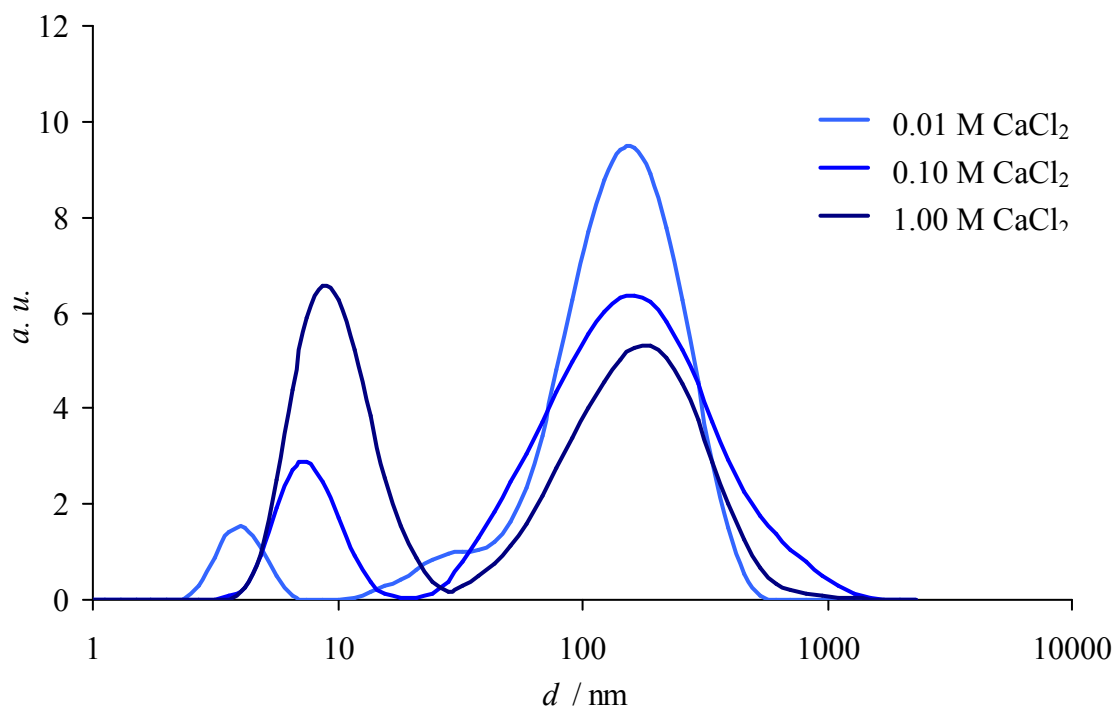


Abb. 4-25. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in  $\text{CaCl}_2$ -Lösungen unterschiedlicher Konzentration.

Die in Abb. 4-26 gezeigten DLS-Messungen von Colominsäure in Gegenwart von Calciumnitrat weisen ebenfalls vergleichsweise breite Peaks auf. Während hier eine 0.01 M Salzlösung nur geringe Auswirkungen auf das Aggregationsverhalten von Colominsäure hat, haben höhere Konzentrationen einen sehr starken Einfluss. Wiederum bildet sich ein Peak bei 7 bzw. 9 nm aus, der sehr intensiv ist. Im Falle der 1 M Lösung ist dieser intensiver als der Aggregatpeak.

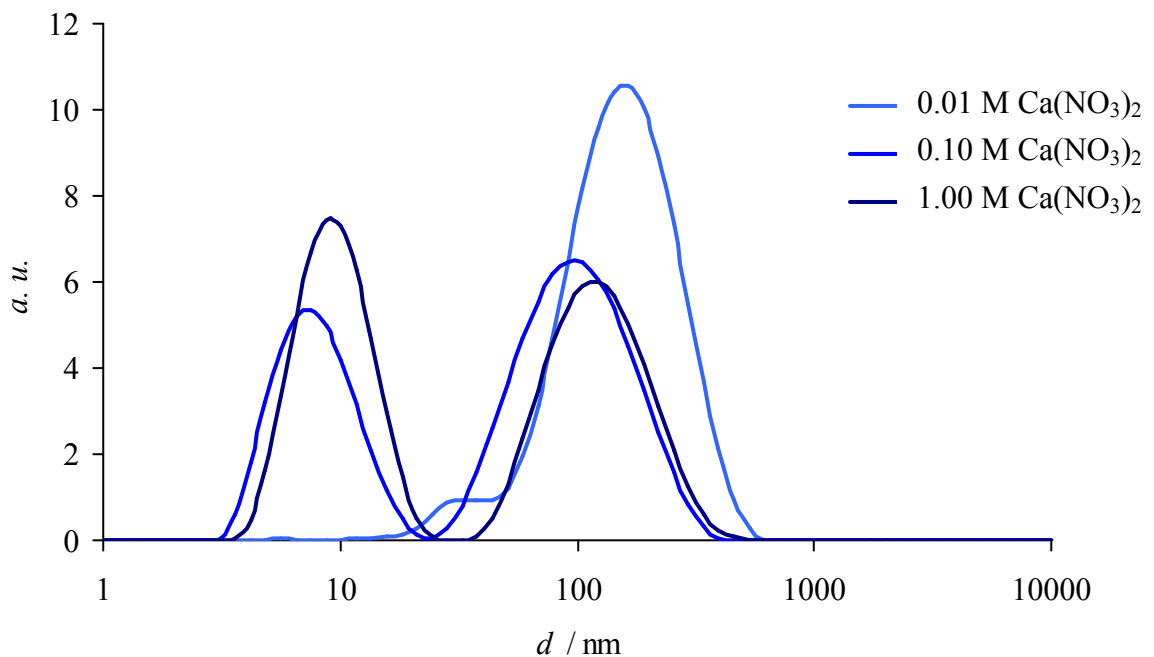


Abb. 4-26. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen.

In Folgenden werden nun die Einflüsse der beiden vermessenen Erdalkalichloride auf das Aggregationsverhalten von Colominsäure miteinander verglichen.

In Abb. 4-27 bis 4-29 sind die DLS-Messungen an Colominsäure in Erdalkalichlorid-Lösungen im Vergleich dargestellt. Bei 0.01 M Lösungen führt nur die Gegenwart des Calciumsalzes zur Auflösung des Aggregats. Calciumionen scheinen einen stärkeren Einfluss auf das Aggregationsverhalten der Colominsäure zu haben als Magnesiumionen. Diese Beobachtung fällt insbesondere bei den 1 M Lösungen ins Auge, da das Calciumchlorid in diesem Fall dazu führt, dass der Peak bei 7 nm intensiver ist als der Aggregationspeak.

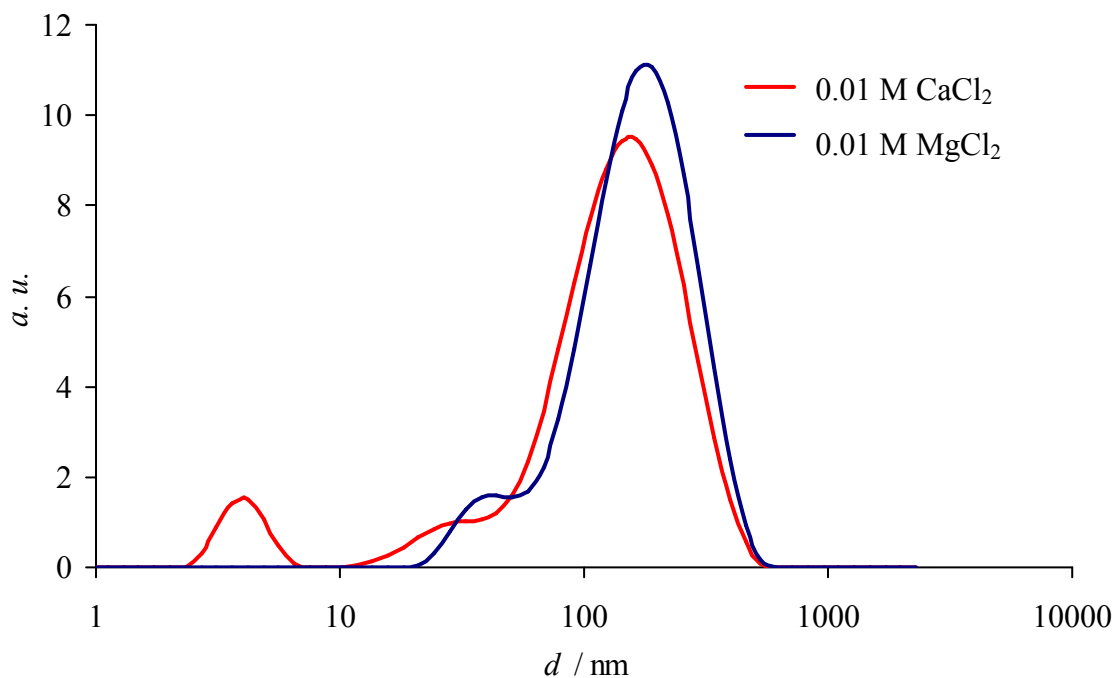


Abb. 4-27. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.01 M Erdalkalichlorid-Lösungen.

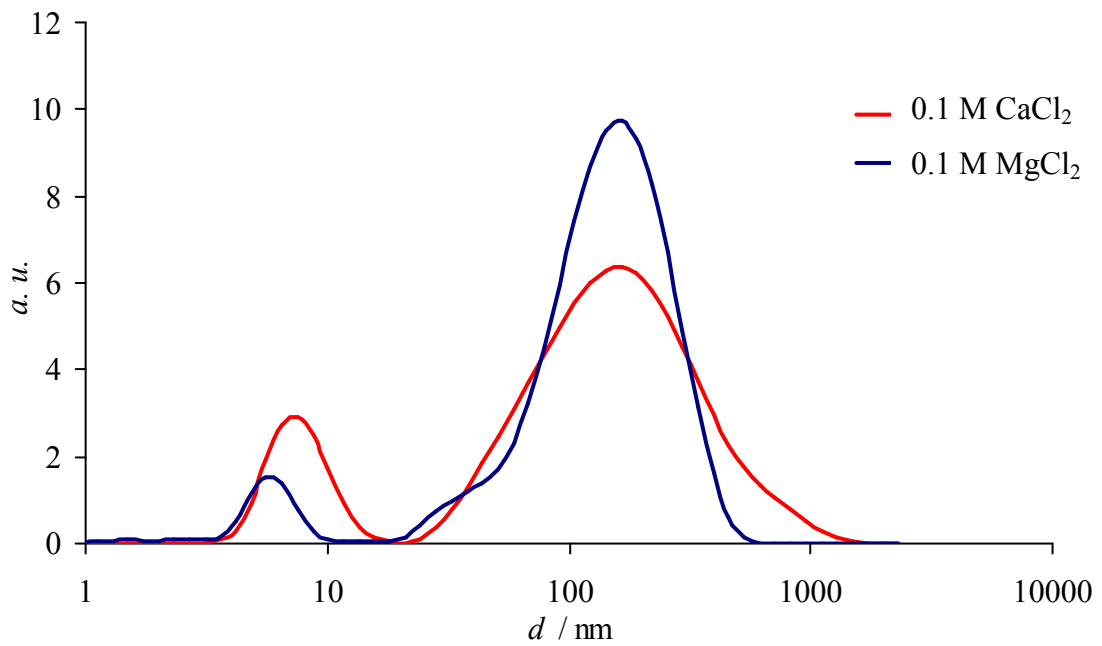


Abb. 4-28. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.1 M Erdalkalichlorid-Lösungen.

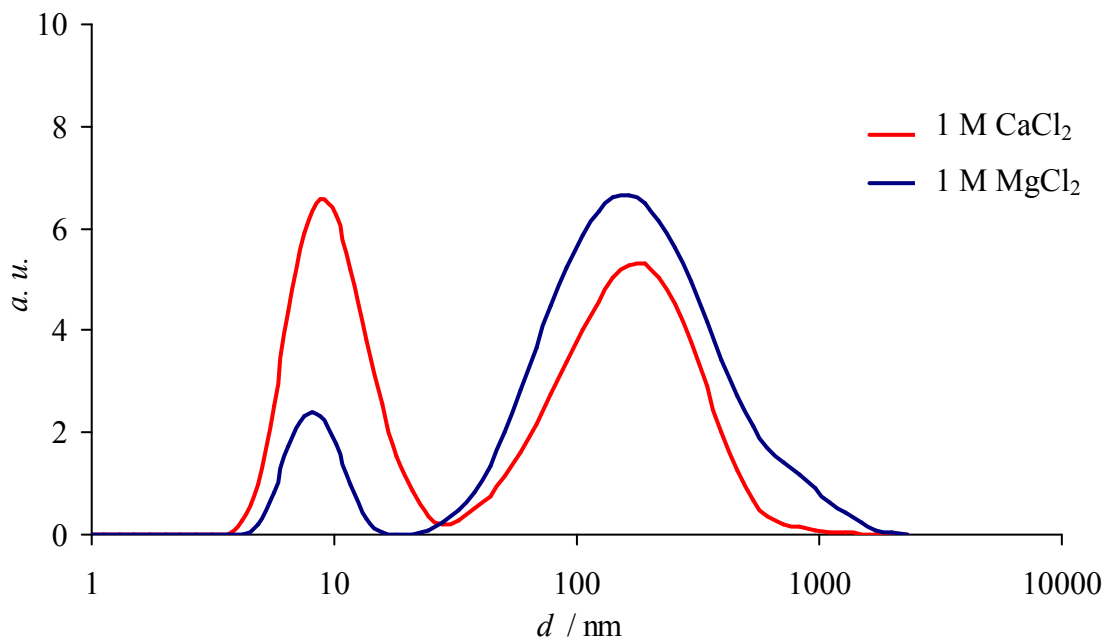


Abb. 4-29. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 1 M Erdalkalichlorid-Lösungen.

In Abb. 4-30 bis 4-32 sind die DLS-Messungen an Colominsäure in Calciumnitrat- bzw. Calciumchloridlösungen im Vergleich dargestellt. Nur im Falle der Gegenwart von Calciumchlorid kommt es schon bei 0.01 M zu einem Auflösen der Aggregate. Bei höheren Konzentrationen zeigt Calciumnitrat einen stärkeren Einfluss auf das Aggregationsverhalten von Colominsäure. Im Vergleich zu Natriumnitrat scheint das Calciumnitrat einen sehr viel deutlicheren und somit stärkeren Einfluss zu besitzen.

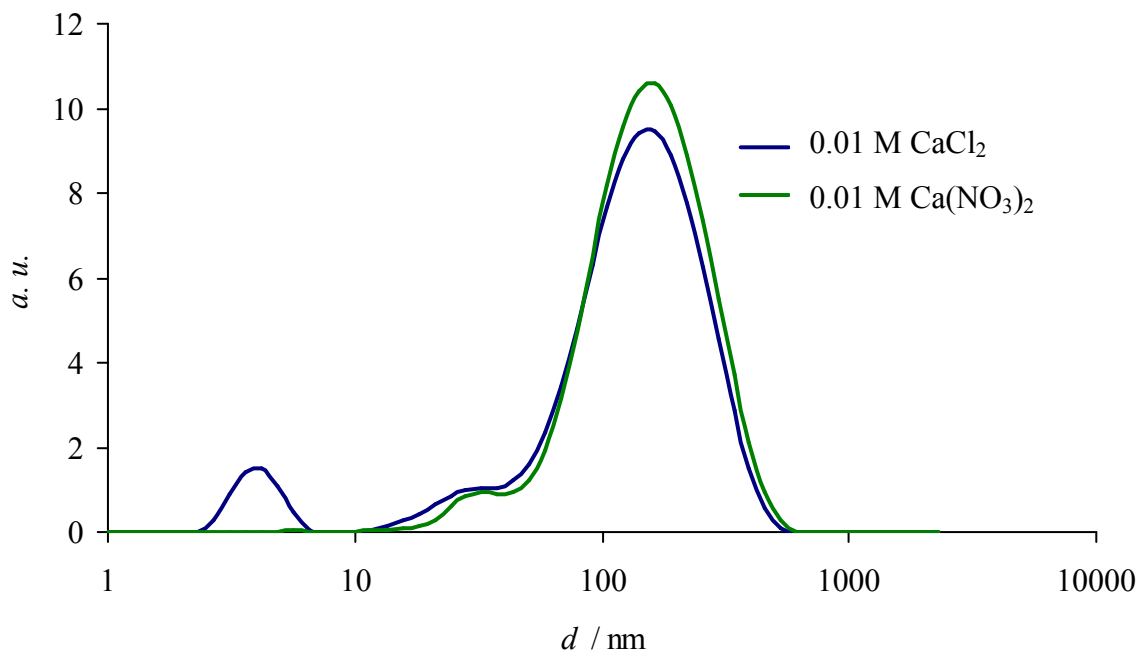


Abb. 4-30. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.01 M Calciumsalz-Lösungen.



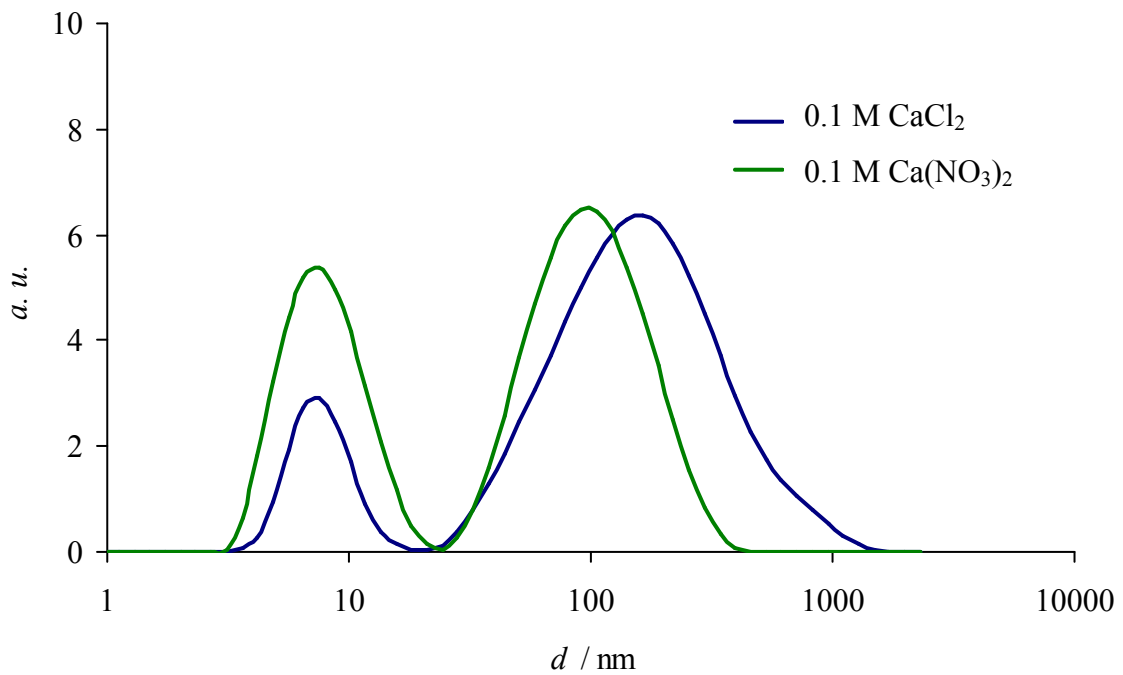


Abb. 4-31. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.1 M Calciumsalz-Lösungen.

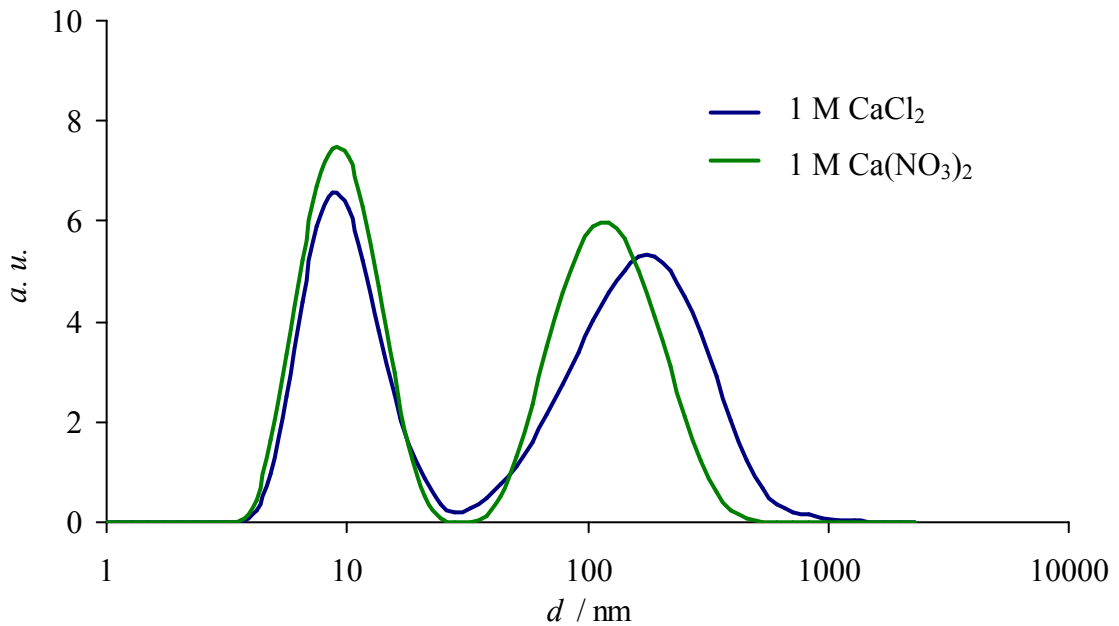


Abb. 4-32. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 1 M Calciumsalz-Lösungen.

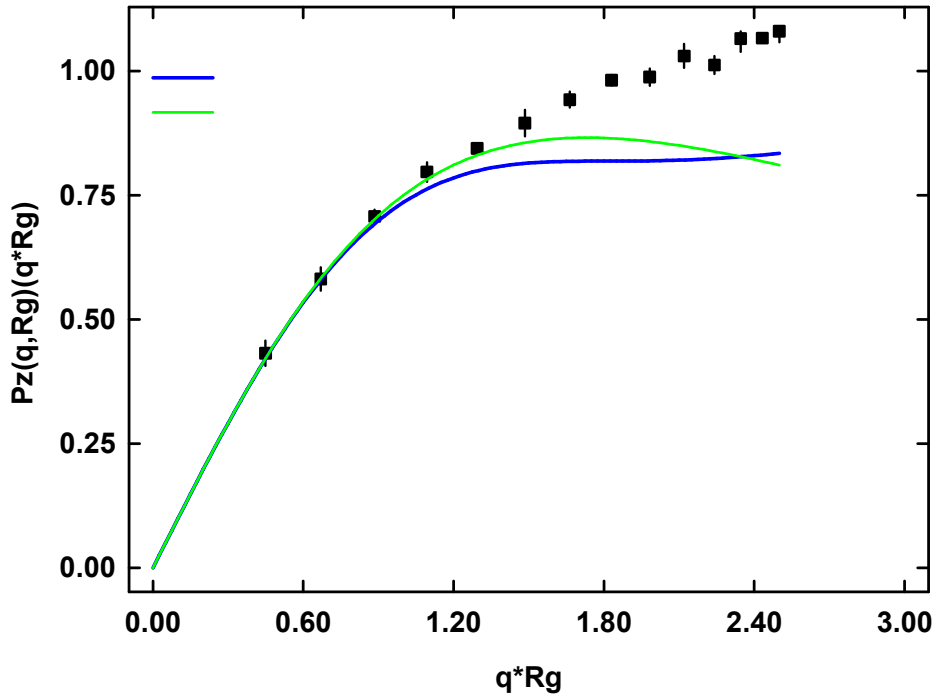
Die Wechselwirkungen von Natriumchlorid bzw. Calciumchlorid mit Colominsäure wurden auch mit Hilfe der statischen Lichtstreuung untersucht. Die Messungen fanden

am Institut für Physikalische Chemie der Universität Paderborn im Arbeitskreis von Prof. Huber statt. Je 1 g/L Colominsäure wurde in 0.1 M Natriumchlorid- bzw. 0.033 M Calciumchloridlösung aufgelöst und anschließend vermessen.

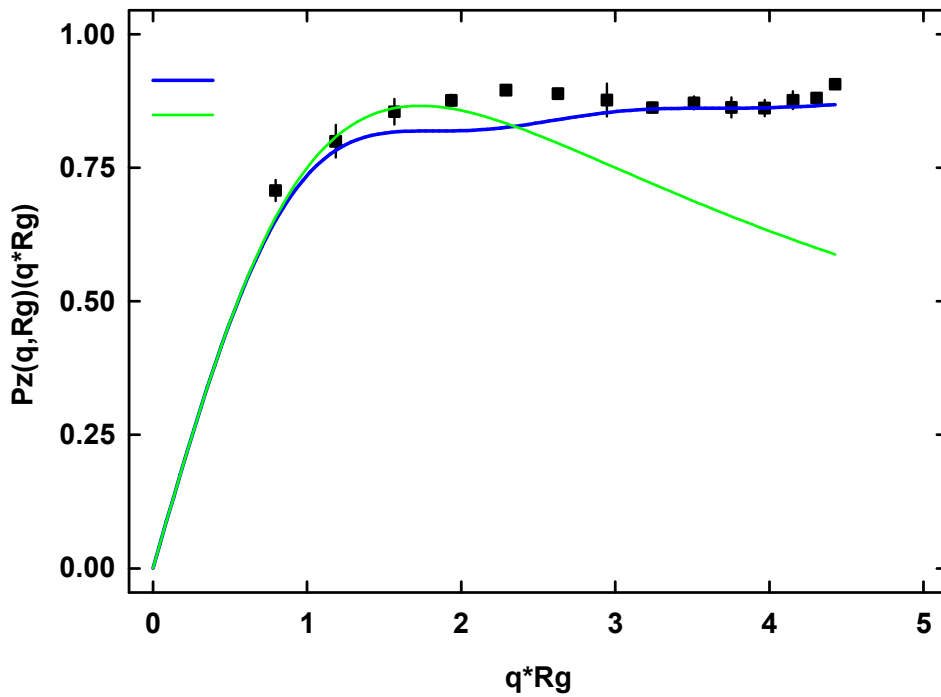
Die SLS-Messungen von Colominsäure in der Gegenwart von Natriumchlorid in Abb. 4-33 (a) zeigen beim Holtzer-Plot einen steilen Anstieg der Kurve auch bei großem  $q$ . Das kann auf eine Polydispersität hindeuten, also beispielsweise darauf, dass die Teilchen sowohl als Knäuel als auch als Stab vorliegen. Eine zweite Interpretation ist, dass zwei unterschiedlich große Partikel in der Lösung vorliegen. Das kann heißen, dass zum einen eine Fraktion mit großen Partikeln, die winkelabhängig streut und zum anderen eine Fraktion mit kleineren kompakten Partikeln, die winkelunabhängig streut, vorliegen. Letztere Interpretation der Daten passt gut zu den Beobachtungen aus der dynamischen Lichtstreuung. Dort treten ebenfalls zwei Partikelgrößen auf. Nimmt man diese Ergebnisse zusammen, kann angenommen werden, dass in Lösung zwei Partikelgrößen vorliegen: Es existiert eine Fraktion größerer Aggregate, die aus mehreren Polymerketten zusammengesetzt sind. Durch die Salzzugaben beginnen sich diese Aggregate aufzulösen, und es kommt zur Ausbildung von kleineren Partikeln, die aus einer einzelnen gefalteten Polymerkette bestehen. Die Salzzugabe bewirkt eine Abschirmung der Ladung, so dass die Polymere nicht mehr gestreckt vorliegen müssen. Über die Form der Partikel lässt sich anhand dieser Daten keine Aussage treffen.

Die Ergebnisse der SLS-Messungen von Colominsäure in Gegenwart von Calciumchlorid in Abb. 4-33 (b) deuten auf eine Stäbchenform hin, da die Messdaten einem Plateau entgegen gehen. Wenn hier, wie aufgrund der DLS-Messungen zu vermuten ist, zwei Partikelgrößen vorliegen, ist anzunehmen, dass hier eine Fraktion großer, relativ starrer Stäbchen neben einer kleineren Fraktion kleiner Kugeln vorliegt. Das lässt sich auch im Holtzer-Plot nachvollziehen. Eventuell würde ein Fit für wurmförmige Partikel noch näher an den Messdaten liegen. Der Holtzer-Plot ergibt eine durchschnittliche Länge der Stäbchen von 500 nm. Berücksichtigt man die Länge der Polymerkette, so ist davon auszugehen, dass es sich um ein stäbchenförmiges Aggregat aus mehreren Polymerketten handelt. Die Calciumionen könnten in diesen Aggregaten verbrückend wirken.

Der beobachtete starke Einfluss des Calciums deutet auf eine spezifische Wechselwirkung hin. Das wird von der Tatsache gestützt, dass Calcium bei der Regulation von NCAM eine entscheidende Rolle spielt [88, 89].



(a)



(b)

Abb. 4-33. SLS-Messungen von Colominic acid in 0.1 M Natriumchloridlösung (a) bzw. in 0.033 M Calciumchloridlösung (b) als Holtzer-Plot. Die blaue Linie entspricht dem Formfaktor für ein Stäbchen. Die grüne Linie entspricht dem Formfaktor für ein Gaußknäuel.

Zur Simulation der Ionenkonzentration im Gehirn wurden auch DLS-Messungen von Colominsäure in künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit (CBF) durchgeführt. Diese füllt den Zwischenraum von Schädel und Cortex. Dabei handelt es sich um eine Salzlösung, die als Puffer für den Cortex fungiert. Die künstliche CBF enthält 0.124 mM Natriumchlorid, 0.005 mM Kaliumchlorid, 0.0013 mM wasserfreies Calciumchlorid, 26 mM Natriumhydrogencarbonat und 10 mM D-Glycose [184].

Die in Abb. 4-34 dargestellten Messungen von Colominsäure in CBF zeigen ein differenziertes Verhalten. Ist die CA niedrig konzentriert (0.01 g/L), zeigt sich ein großes Aggregat bei 225 nm und ein kleineres bei 50 nm. Steigt die Konzentration auf 0.1 g/L an, nimmt die Intensität der beiden Aggregatpeaks ab. Zusätzlich bildet sich aber ein neuer Peak bei 120 nm aus. Des Weiteren deaggregiert auch ein Teil und es entsteht bei 9 nm ein zusätzlicher Peak. Steigt die Colominsäurekonzentration weiter auf 1 g/L an, setzt sich die Entwicklung fort. Bei noch höheren Konzentrationen lassen sich nur noch zwei breite Peaks bei 6 nm und bei 120 nm beziehungsweise 140 nm beobachten. Das könnte auf eine Art Selbstregulation der Colominsäure hindeuten. In Gegenwart von wenig Colominsäure nehmen die einzelnen Polymerketten einen hohen Platzbedarf ein (50 nm). Bei höheren Polymerkonzentrationen bricht dieser zusammen. Für die Nervenbildung ist die sterische Abschirmung durch die Polysialinsäure sehr wichtig. Sie ermöglicht die Zellproliferation und vermeidet die Zelladhäsion. Ist nun der Abstand der Zellen zu klein, überwiegt die Zelladhäsion und die Proliferation stoppt. Das Wachstum lässt sich so steuern. Inwieweit die Beobachtungen in Lösung auf das Verhalten im Körper übertragen werden können, muss noch anhand weitere Experimente überprüft werden.

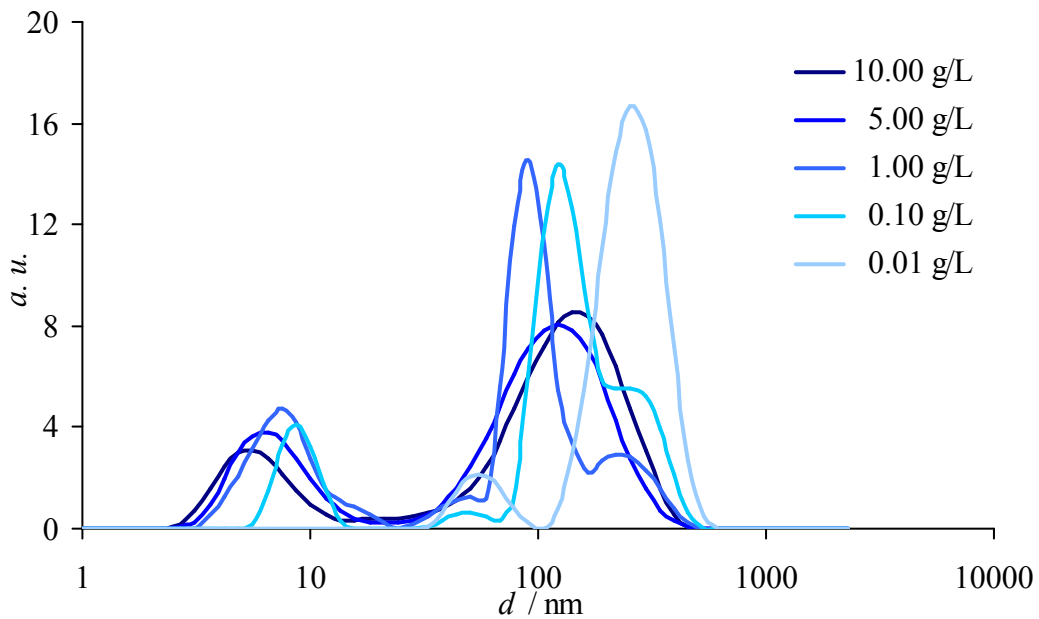


Abb. 4-34. Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von CA in künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit.

#### 4.1.3 Diskussion

Die Lichtstreuuntersuchungen an Colominsäure haben gezeigt, dass diese eine deutliche Tendenz zur Aggregatbildung aufweist. Inwieweit die Aggregate den für Polyelektrolyte beschriebenen Domänen entsprechen, wird im Folgenden diskutiert [121]. Ihr hydrodynamischer Radius bewegt sich stets im Bereich von 160 nm. Inwieweit innerhalb der Lösungen ein dreidimensionaler Ordnungszustand der Aggregate beziehungsweise Partikel vorherrscht, konnte mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung nicht geklärt werden. Hierüber könnten Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente Auskunft geben. Zuweilen ist eine Schulter am Aggregatpeak zu beobachten, die den frei in der Lösung schwimmenden, ungeordneten Polyelektrolytketten zugeordnet werden kann. Diese liegen in einer gestreckten oder wurmartigen Konformation vor und besitzen einen hydrodynamischen Radius von circa 30 nm. Unter Salzzugabe beginnen sich die Aggregate in der Lösung aufzulösen. Es bildet sich eine weitere Partikelgröße mit einem hydrodynamischen Radius von 7 nm aus. Diese Partikel bestehen vermutlich ebenfalls aus einzelnen Polymerketten. Da durch die Salzzugabe die Ladungen besser abgeschirmt werden, liegen die einzelnen

Polyelektrolytketten nun in einer geknäuelten Konformation vor. Dadurch verringert sich der hydrodynamische Radius. *Yang et al.* konnten zeigen, dass eine Polysialisierung vom neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM zu einer Aufweitung des Abstandes um 10 bis 15 nm führt. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen fanden in Gegenwart von Ferritin und verschiedenen Salzen statt [80]. Die Aufweitung des Abstandes entspricht etwa dem zweifachen des hydrodynamischen Radius der kleineren, in der dynamischen Lichtstreuung gemessenen Partikel. Es liegen aber auch in einer 1 M, also sehr hoch konzentrierten, Salzlösung neben den einzelnen geknäuelten Polymerketten weiterhin Aggregate vor. Das zeigt, dass die Aggregatbildung nicht ausschließlich auf den Polyelektrolyteffekt zurückgeführt werden kann. In diesem Fall sollten sich die Aggregate unter Salzzugabe komplett auflösen, und der Polyelektrolyt verhielte sich wie ein ungeladenes Polymer. Da dies nicht der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass weitere Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen von entscheidender Bedeutung für die Stabilität der Aggregate sind. Neben dieser generellen Beobachtung lassen sich aber auch Unterschiede zwischen den einzelnen Salzen feststellen. Im Vergleich der Alkalichloride untereinander ist der Einfluss von Kalium auf die Deaggregation am größten. Im Vergleich der Natriumhalogenide zeigt das Chlorid den stärksten Einfluss. Gleiches gilt für die Kaliumhalogeniden.

Für eine Zugabe von Natriumnitrat lässt sich im Wesentlichen ein ähnlicher Effekt wie bei den Natriumhalogeniden beobachten. Bei steigenden Konzentrationen lösen sie die Aggregate auf und es bilden sich kleinere Partikel mit einem hydrodynamischen Radius von 7 nm aus. *Johnson et al.* beschreiben die repulsiven Wechselwirkungen von polysialisierten NCAM-Monoschichten in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen von Natriumnitrat. Sie konnten zeigen, dass eine höhere Natriumnitratkonzentration zu einer Verringerung der Abstoßung und damit zu einer Verringerung des hydrodynamischen Radius führt [79]. Diese Beobachtungen lassen sich auch anhand der Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung nachvollziehen, da die Salzzugabe hier zur Ausbildung kleinerer Partikel und damit auch zur Verringerung des durchschnittlichen hydrodynamischen Radius führt. Die Verringerung der räumlichen Ausdehnung bei zunehmenden Salzkonzentrationen stimmt mit dem typischen Verhalten für Polyelektrolyte überein. Durch die Gegenwart von Gegenionen in der Lösung können die Ladungen des Polyelektrolyten besser abgeschirmt werden. Das erlaubt es ihm, eine eher geknäuelte Konformation einzunehmen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl das Kation als auch das Anion einen Einfluss auf das Aggregationsverhalten haben. Die Form der in Lösung auftretenden Partikel wurde exemplarisch am Natriumchlorid mit Hilfe der statischen Lichtstreuung untersucht. Da es sich um ein polydisperses System handelt, lässt sich der Formfaktor, also die Form der Partikel in Lösung, nur schwer bestimmen.

Vergleicht man den Einfluss verschiedener Erdalkalisalze miteinander, fällt auf, dass der Einfluss des Calciums wesentlich stärker ist als der des Magnesiums. Für eine spezifische Wechselwirkung sprechen auch die Daten der statischen Lichtstreuung. Sie lassen vermuten, dass ein 500 nm langes, starres Stäbchen in der Lösung vorliegt. Bei einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 100 Monomereinheiten muss es sich bei dem stäbchenförmigen Gebilde um ein Aggregat aus mehreren Ketten handeln. Die Calciumionen könnten in diesen Aggregaten verbrückend wirken. Die beobachteten Stäbchen lassen sich mit den von *Toikka* beschriebenen Polysialinsäure-Filamenten vergleichen. Deren Präparation erfolgte in Gegenwart von Calciumchlorid [98]. Die Größe der Filamente stimmt mit der Größe der in der statischen Lichtstreuung beobachteten Aggregate überein. Die Fähigkeit von Polysialinsäure, Calcium zu binden, ist stark von ihrem Polymerisationsgrad abhängig. Längerkettige Polysialinsäure kann Calcium besser binden als kurzkettige [94]. Da es sich beim eingesetzten Polymer mit durchschnittlich 100 Monomereinheiten um eine vergleichsweise lange Polysialinsäure handelt, ist von einer hohen Calciumaffinität auszugehen. Zudem ist bekannt, dass die Calciumkonzentration die Ausrichtung neugebildeter Axone steuert. An diesem Prozess ist auch das neurale Zelladhäsionsmolekül beteiligt. Daran ist wiederum Polysialinsäure gebunden. Vor dem Hintergrund der vorgestellten Ergebnisse deutet diese Beobachtung darauf hin, dass Calcium mit Polysialinsäure spezifisch wechselwirkt.

Um den natürlichen Salzgehalt im Gehirn nachzubilden, wurde das Aggregationsverhalten von Colominsäure in CBF untersucht. Dabei zeigte sich ein konzentrationsabhängiges Aggregationsverhalten. Bei niedrigen Konzentrationen treten sehr große Aggregate mit einem hydrodynamischen Radius von 225 nm auf. Bei höheren Konzentrationen der Colominsäure lösen sich die Aggregate auf. Dieser Umstand kann eine wichtige Rolle in der Zellproliferation und Adhäsion spielen. Eine sterische Hinderung fördert die Zellproliferation und vermeidet die Zelladhäsion. Um konkretere Aussagen treffen zu können, sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich. Untersuchungen mit der statischen Lichtstreuung können in diesem Zusammenhang besonders hilfreich sein.

## 4.2 Polysialinsäure im festen Zustand

Über Polysialinsäure bzw. deren Natriumsalz Colominsäure im festen Zustand ist wenig bekannt. Hier wird die Herstellung von Colominsäurekristallen vorgestellt. Zudem wird die kristallisierte Colominsäure charakterisiert. Des Weiteren wird im Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover hergestellte Colominsäure auf ihre Morphologie hin untersucht. Dabei wird der Einfluss eines eventuell vorhandenen Lipidankers diskutiert.

### 4.2.1 Kristallisation von Polysialinsäure

#### 4.2.1.1 Herstellung von Polysialinsäurekristallen

In 5 mL Millipore-Wasser wird 1 g Colominsäure gelöst. Um die Kristallisation herbeizuführen, wird die Lösung in einen Exikkator mit einer gesättigten Acetonatmosphäre gestellt. Der Exikkator wird bei Raumtemperatur gelagert. Nach einigen Tagen bildet sich ein feinkristalliner Niederschlag aus. Die Kristalle werden an der Luft getrocknet. Sie sind farblos und machen einen grobkörnigen Eindruck.

#### 4.2.1.2 Charakterisierung der Polysialinsäurekristalle

Um die Morphologie der Probe zu untersuchen, wurden rasterelektronische Aufnahmen angefertigt. Dabei wird die unbehandelte Probe mit der kristallinen Probe verglichen.



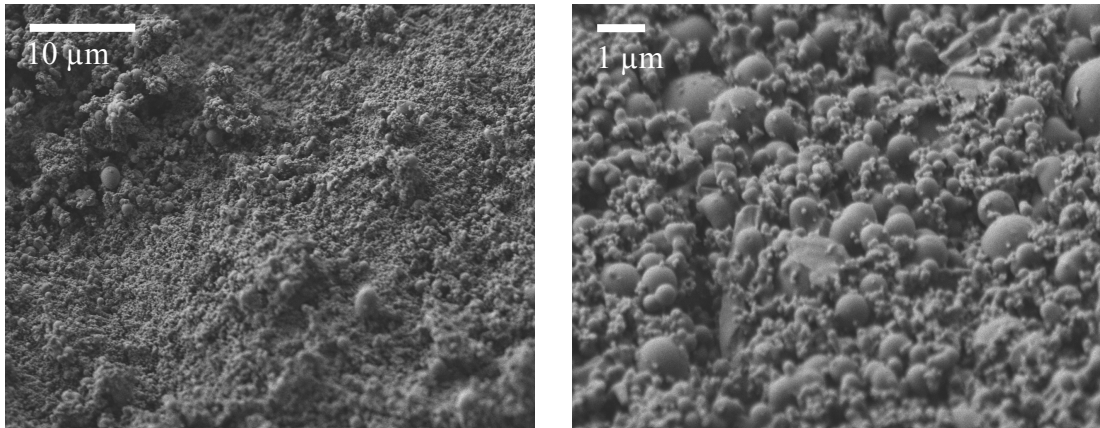


Abb. 4-35. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von unbehandelter Colominsäure.

Auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der käuflich erworbenen Probe (Abb. 4-35) lassen sich Kugeln unterschiedlicher Größe erkennen. Sie haben einen Durchmesser zwischen 1 µm und 50 nm. Regelmäßige kristalline Strukturen lassen sich nicht identifizieren.

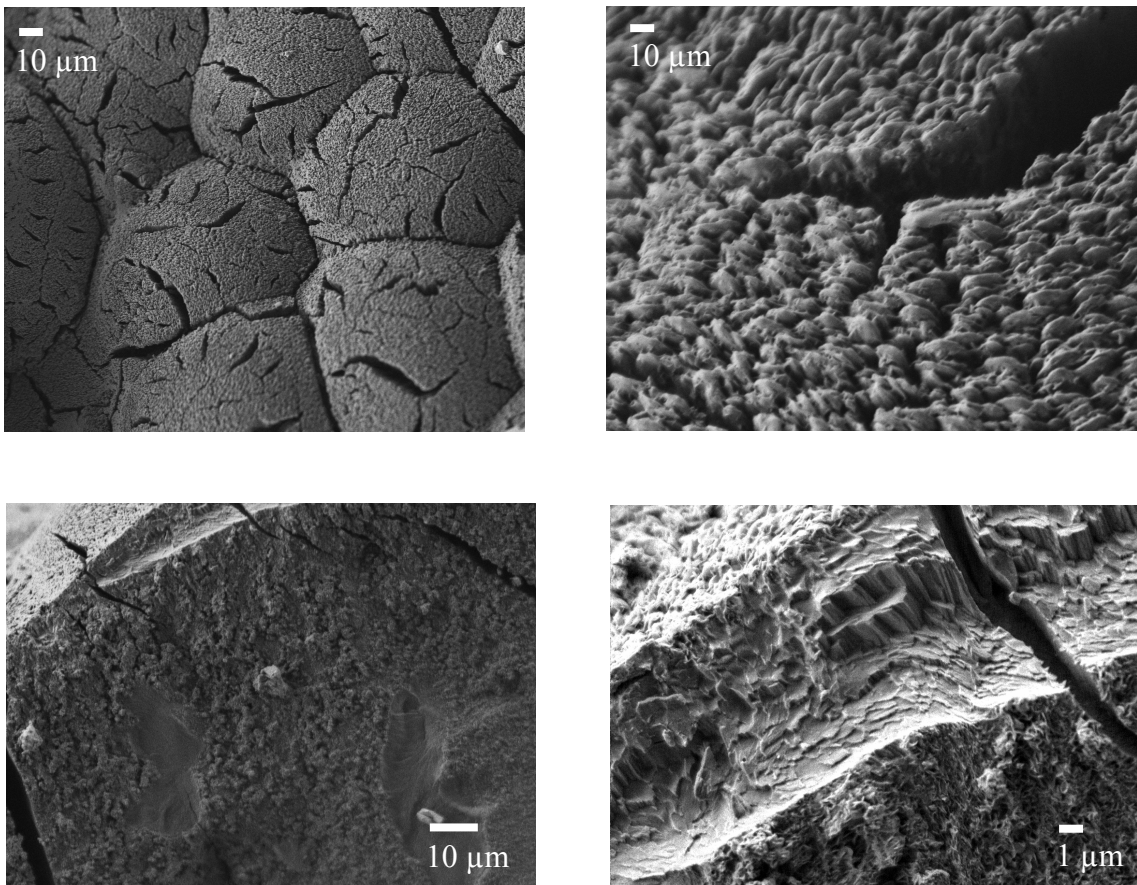


Abb. 4-36. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von kristallisierter Colominsäure.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 4-36 zeigen die kristalline Probe. Im Gegensatz zur unbehandelten Probe lassen sich hier regelmäßige Strukturen erkennen. Auf einem amorphen Untergrund hat sich eine feinkristalline Schicht herausgebildet. Die blättchenförmigen Kristalle sind einige Mikrometer lang und etwa einen Mikrometer breit.

Die chemische Identität der kristallinen Probe wurde mit Hilfe der IR-Spektroskopie überprüft.

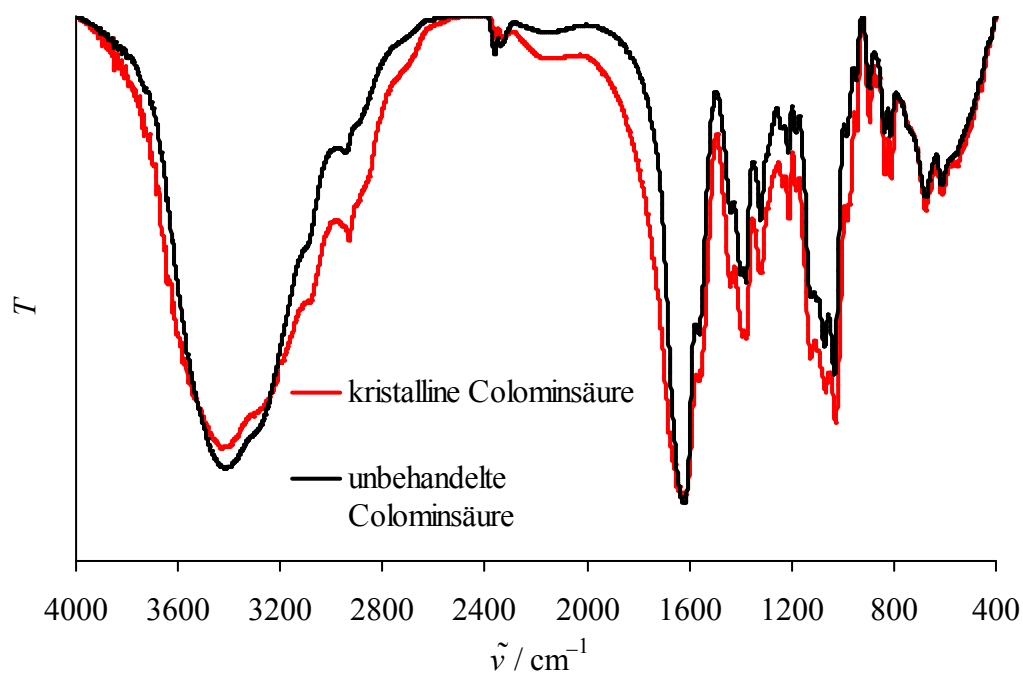


Abb.4-37. IR-Spektren der kristallinen Colominsäure im Vergleich zur unbehandelten Colominsäure.

Aus den IR-Spektren in Abb. 4-37 lässt sich erkennen, dass es sich bei den beiden Proben um chemisch identische Stoffe handelt. Die Probe wurde durch den Kristallisationsprozess chemisch nicht verändert.

Um den Wassergehalt in der kristallinen Probe zu bestimmen, wurde eine thermogravimetrische Messung durchgeführt. Zum Vergleich wurde auch die unbehandelte Colominsäure vermessen.

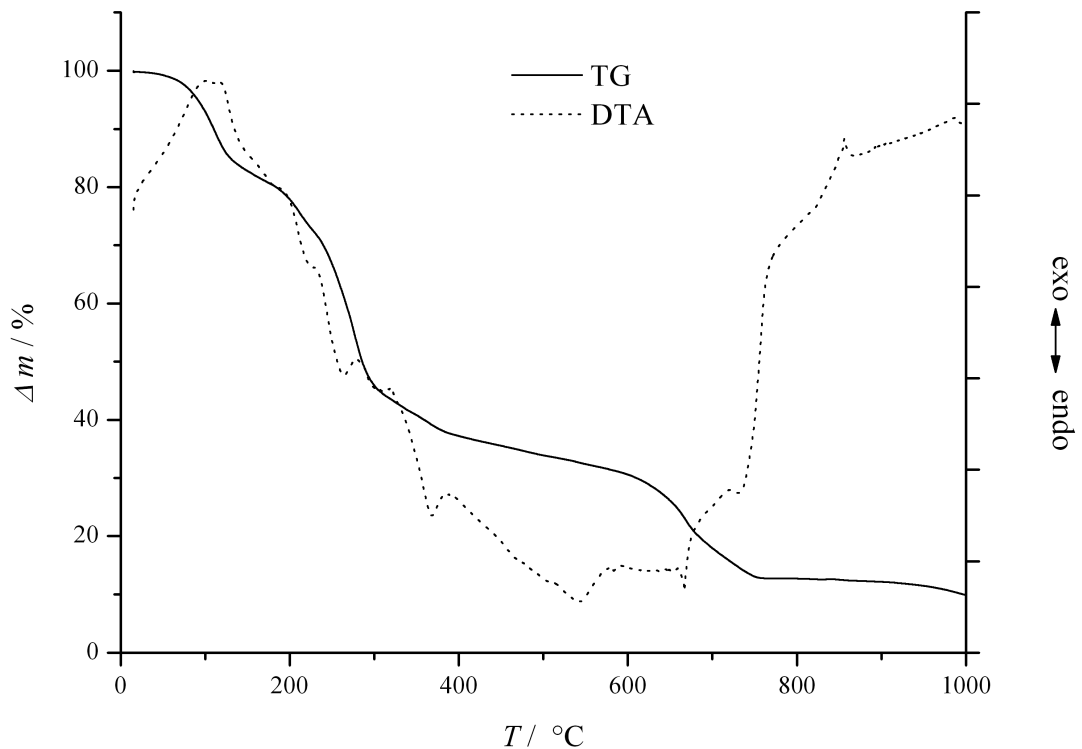


Abb. 4-38. Thermogravimetrie-Kurve der unbehandelten Colominsäure.

In der TG-Messung der unbehandelten Colominsäure (Abb. 4-38) wurde der Masseverlust bis zu einer Temperatur von 190 °C dem Wassergehalt zugeordnet. Die gekaufte Probe enthält somit 4 % Wasser. Die folgenden Stufen lassen sich auch mit Hilfe der IR-Spektroskopie nur schwer zuordnen. Bis 320 °C lassen sich noch C–H-Valenzschwingungen beobachten. Ab 320 °C treten die asymmetrische C–O-Valenzschwingung bei 1440  $\text{cm}^{-1}$  und die C-O-Deformationsschwingung bei 870  $\text{cm}^{-1}$  in Erscheinung und sind bei allen folgenden Stufen zu beobachten. Durch die Röntgen-Pulverdiffraktometrie konnte das Zwischenprodukt bei 700 °C als das Natriumcarbonat Thermonatrit identifiziert werden. Dabei handelt es sich um ein Natriumcarbonathydrat. Das enthaltene Wasser ist vermutlich auf eine Hydratisierung an Luft zurückzuführen. Die Restmasse beträgt 18 %. Die Phase des Endproduktes konnte nicht identifiziert werden.

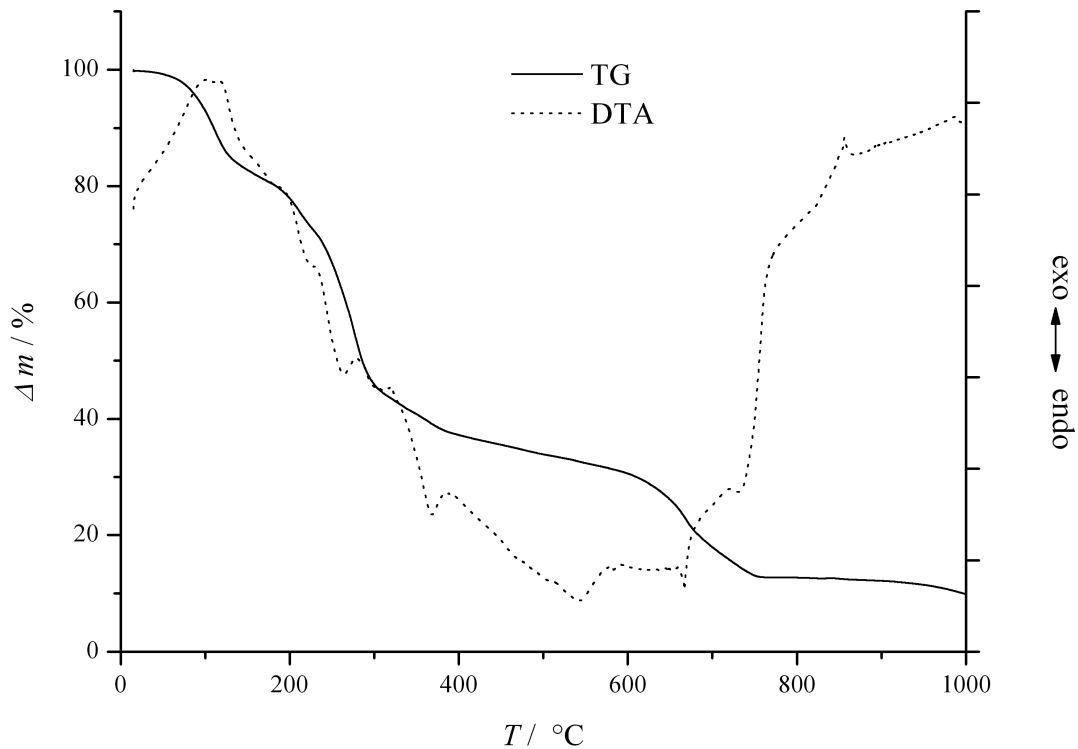


Abb. 4-39. Thermogravimetrie-Kurve der kristallinen Colominsäure.

In der TG-Messung der kristallinen Colominsäure wurde der Masseverlust bis zu einer Temperatur von 170 °C dem Wassergehalt zugeordnet (Abb. 4-39). Die kristalline Probe enthält somit 19 % Wasser. Rechnet man diesen Wassergehalt auf die Monomereinheiten um, so ergibt sich, dass im Kristall ein Verhältnis von 3.5 Wassermolekülen pro Monomereinheit vorliegt. Die Restmasse beträgt 9.8 %.

Die Elementgehalte an Natrium, Kalium, Magnesium, Calcium, Eisen und Kupfer der kristallinen und der unbehandelten Colominsäure wurden mit ICP-OES bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-2 aufgelistet.

Tabelle 4-2. Elementgehalte von Colominsäure vor und nach der Kristallisation mit Hilfe ICP-OES bestimmt. Die Bestimmung des Natriumgehaltes erfolgte bei einer Wellenlänge von 589.592 nm, die des Magnesiumgehaltes bei einer Wellenlänge von 280.270 nm und die des Calciumgehaltes erfolgte aus zwei Linien bei 393.366 nm und bei 396.847 nm.

	Na <i>m %</i>	Mg <i>m %</i>	Ca <i>m %</i>
unbehandelte Colominsäure	5.558 ± 0.056	0.001 ± 0.00006	0.010 ± 0.001
kristalline Colominsäure	5.237 ± 0.005	0.002 ± 0.0000	0.016 ± 0.0002

Die Messwerte für Kalium, Eisen und Kupfer liegen unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Es ist eine deutliche Abnahme des Natriumgehaltes in Folge der Kristallisation zu beobachten. Um die Messergebnisse richtig interpretieren zu können, muss der mit Hilfe der Thermogravimetrie bestimmte Wassergehalt der Proben berücksichtigt werden. Dabei wird zudem angenommen, dass die Restmasse der Probe nach der thermogravimetrischen Messung aus Natriumcarbonat besteht. Unter diesen Voraussetzungen lässt sich der prozentuale Anteil der ein Natrium als Gegenladung tragenden Carboxylatgruppen bestimmen. Die Carboxylationen der unbehandelten Probe tragen zu 96 % ein Natriumion. In der kristallinen Probe sind es nur 87 %. Dieser geringere Wert ist vermutlich auf eine Protonierung der Carboxylatfunktion zurückzuführen.

Die Probe wurde mit Hilfe der Röntgen-Pulverdiffraktometrie untersucht. In Abb. 4-40. lassen sich auf einem breiten, amorphen Untergrund deutlich Reflexe erkennen. Diese weisen allerdings eine gewisse Breite auf, welche die Indizierung deutlich erschwert. Eine mögliche Erklärung hierfür ist in der Inhomogenität der Probe zu suchen. Die gekaufte Probe enthält eine relativ breite Kettenlängenverteilung. Das kann die kristalline Anordnung im Festkörper erschweren. Eine Auftrennung nach Kettenlängen ist präparativ sehr aufwendig und konnte nicht im ausreichenden Maß erfolgen. Die Indizierung der Probe ist Tabelle 4-3 zu entnehmen.

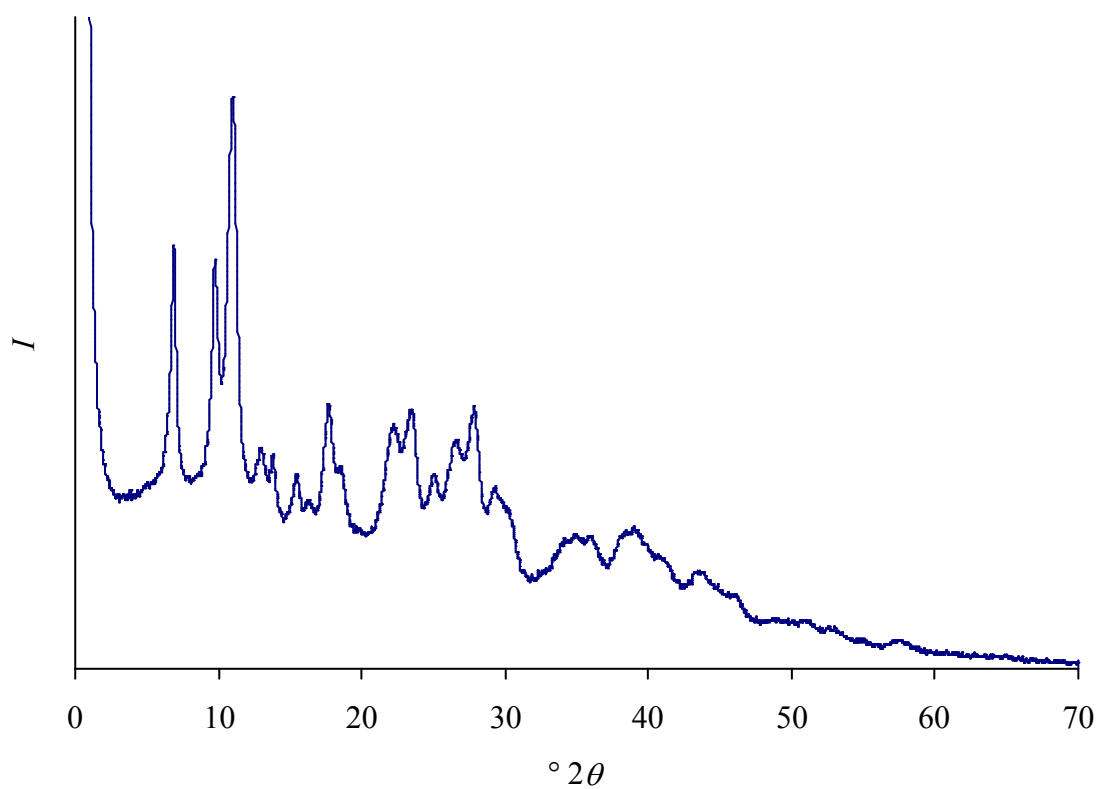


Abb. 4-40. Röntgen-Pulverdiffraktogramm der kristallisierten Colominsäure.

Tab. 4-3. Indizierung des Röntgen-Pulverdiffraktogramm der kristallinen Colominsäure aus Abb. 4-40.

$d$ beobachtet	h k l	$2\theta$ beobachtet	$2\theta$ berechnet	$2\theta$ beobachtet – berechnet
/ Å		/°	/°	/°
12.8624	1 0 0	6.867	6.848	0.0190
9.0718	1 1 0	9.742	9.715	0.0269
8.0737	0 0 1	10.950	10.960	- 0.0103
6.8248	0 1 1	12.961	12.953	0.0079
6.4414	1 0 1	13.736	13.705	0.0317
5.7491	1 1 1	15.400	15.351	0.0491
5.4269	2 0 1	16.320	16.379	- 0.0585
5.0227	0 2 1	17.644	17.649	- 0.0051
4.8095	1 2 1	18.433	18.397	0.0361
4.0221	0 0 2	22.083	22.022	0.0606
3.7953	2 2 1	23.420	23.335	0.0852
3.5578	3 2 0	25.008	24.910	0.0981
3.3581	2 3 1	26.522	26.549	- 0.0268
3.2141	4 0 0	27.733	27.642	0.0911
3.0556	4 1 1	29.203	29.214	- 0.0107
2.9811	0 4 1	29.949	29.952	- 0.0024
2.6232	0 1 3	34.153	34.041	0.1119
2.5719	5 0 0	34.856	34.749	0.1070
2.5045	0 4 2	35.825	35.735	0.0905
2.3199	5 1 1	38.786	38.672	0.1136
2.2140	5 2 1	40.614	40.721	0.1066
2.0751	2 3 3	43.626	43.580	- 0.0456
1.9864	6 1 2	45.558	45.633	0.0747
1.8678	1 2 4	48.715	48.712	- 0.0023
1.8019	6 0 3	50.597	50.618	0.0214
1.7364	4 5 2	52.558	52.671	0.1130
1.6050	3 6 3	57.313	57.363	0.0508

Es ergibt sich eine monokline Indizierung mit  $a = 13.02(3)$ ,  $b = 12.83(2)$ ,  $c = 8.141(9)$ ,  $\beta = 97.8(2)$  und  $V = 1347(4)$ . Eine Strukturlösung konnte nicht erfolgen, da es weder gelang, Einkristalle herzustellen, noch durch Strukturmodellierungen ein passendes Modell zu entwickeln.

#### 4.2.1.3 Diskussion

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, Colominsäure zu kristallisieren. Durch das hier vorgestellte Verfahren erhält man einen farblosen, polykristallinen Feststoff. Seine chemische Identität konnte mittels IR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Der Wassergehalt wurde mittels TG bestimmt. Wenn man diesen umrechnet, so erhält man einen Wert von 3.5 Wassermolekülen pro Monomereinheit. Während des Kristallisationsprozesses protoniert ein Teil der Carboxylatgruppen. Das Pulverdiffraktogramm konnte als monoklin indiziert werden. Die Lösung der Kristallstruktur steht noch aus. Dazu werden derzeit Strukturmodellierungen durchgeführt.

#### 4.2.2 Selbstorganisation von Polysialinsäure

Am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover wurde im Rahmen der Forschergruppe 548 Polysia Polysialinsäure aus einer Bakterienkultur von *Escherichia coli* K1 gewonnen. Die Gewinnung der Polysialinsäure erfolgte über eine Kultivierung im 10-L-Maßstab. Der Überstand wurde durch Zentrifugation abgetrennt und durch Ultrafiltration gereinigt. Die Aufreinigung erfolgt über eine Fällung mit Aceton, der anschließenden Resolvatisierung mit Cetavlon sowie einer erneuten Fällung mit Natriumchlorid. Der erhaltene Feststoff wird erneut in Wasser gelöst und noch einmal durch Größenausschlusschromatographie gereinigt. Der Feststoff wird durch Gefriertrocknung gewonnen.



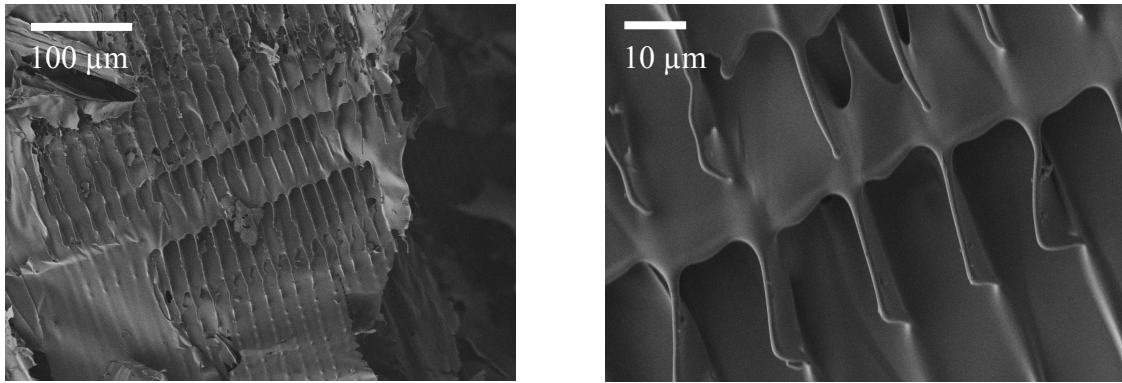


Abb. 4-41. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der vom Institut für Technische Chemie hergestellten Polysialinsäure.

Auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 4-41 lassen sich regelmäßige Strukturen erkennen. Wie oben schon beschrieben, stammt die Probe aus einer Bakterienkultur von *E. coli* K1. Die Polysialinsäure ist bei diesen Bakterien als Glycocalix kovalent mit der äußeren Membran verbunden. Diese besteht in ihrem Inneren aus einer Lipidschicht. An diese Lipide ist Polysialinsäure über einen Phospholipidanker kovalent gebunden. Diese Bindung wurde bei der Gewinnung scheinbar nicht gebrochen. Dadurch besitzen diese Polymere einen amphiphilen Charakter. Dieser ermöglicht eine Selbstanordnung der Moleküle. Ein weiterer Erklärungsansatz für die Strukturierung ist, dass das bei der Aufreinigung eingesetzte Cetavlon nicht vollständig abgetrennt werden konnte. Cetavlon könnte als strukturdirigierendes Agens fungieren. Die Strukturierung erfolgt in einem sehr großen Maßstab. Die Stege sind circa 15 µm voneinander entfernt. Sollte es möglich sein, dieses hohe Maß an Strukturierung beispielsweise auf silicatische Materialien zu übertragen, könnte eine neue Substanzklasse entstehen, die auch für technische Anwendungen wie Filtersysteme interessant wäre.



## 5. FUNKTIONALISIERUNG VON SILICA-NANOPARTIKELN

Einige Bakterien wie *Escherichia coli* können dank ihrer Glycocalix aus Polysialinsäure die Blut-Hirn-Schranke überwinden. In diesem Kapitel wird versucht, dieses Prinzip auf Silica-Nanopartikel zu übertragen. An die Oberfläche der Nanopartikel wird Polysialinsäure angebinden. Im Folgenden werden die Partikel charakterisiert und anschließend ihr potentiell Anwendungsspektrum erläutert.

### 5.1 Synthese der beschichteten Silica-Nanopartikel

Als Modellsubstanz wurde Sipernat 500 eingesetzt. Dabei handelt es sich um käuflich erhältliche Silica-Nanopartikel. Da diese durch eine im Wässrigen gefällte Kieselsäure hergestellt werden, besitzt ihre Oberfläche besonders viele Hydroxidgruppen. Dadurch kann das Material besonders leicht funktionalisiert werden. Die Anbindung der Polysialinsäure findet über ein Epoxysilan statt. Um die PSA anbinden zu können, muss diese erst am Stickstoff deacetyliert werden. Die so entstandene Aminfunktion reagiert dann mit der Epoxidgruppe unter Ausbildung einer Amidbindung. Die Reaktionen werden in Abb. 5-1 dargestellt.

#### Anbindung des Epoxids

100 mg Sipernat wird in 10 mL Aceton dispergiert und anschließend mit 100 µL GOPTMS (3-Glycidoxypropyltrimethylethoxysilan) versetzt. Nach einer Stunde werden die Nanopartikel abzentrifugiert. Anschließend werden sie mit Wasser dispergiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt.

## Deacetylierung der Colominsäure

In 20 mL Ethanol werden 0.5 g Colominsäure (CA) und 1.2 g Natriumhydroxid gelöst. Dazu werden 1.95 mL Wasser gegeben und das Gemisch bei 80 °C über Nacht gerührt. Die Lösung wird anschließend neutralisiert und am Rotationsverdampfer eingedampft. Der Feststoff wird über Nacht dialysiert und am folgenden Tag bis zur Trockne am Rotationsverdampfer eingedampft.

## Anbindung der Colominsäure

100 mg des mit GOPTMS beschichteten Sipernats werden mit 50 mg deacetylierter Colominsäure in 50 mL Wasser über 24 h gerührt. Anschließend werden die Nanopartikel abzentrifugiert. Zur Reinigung werden sie mit Wasser aufgeschlämmt und erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Die Nanopartikel werden an der Luft getrocknet.

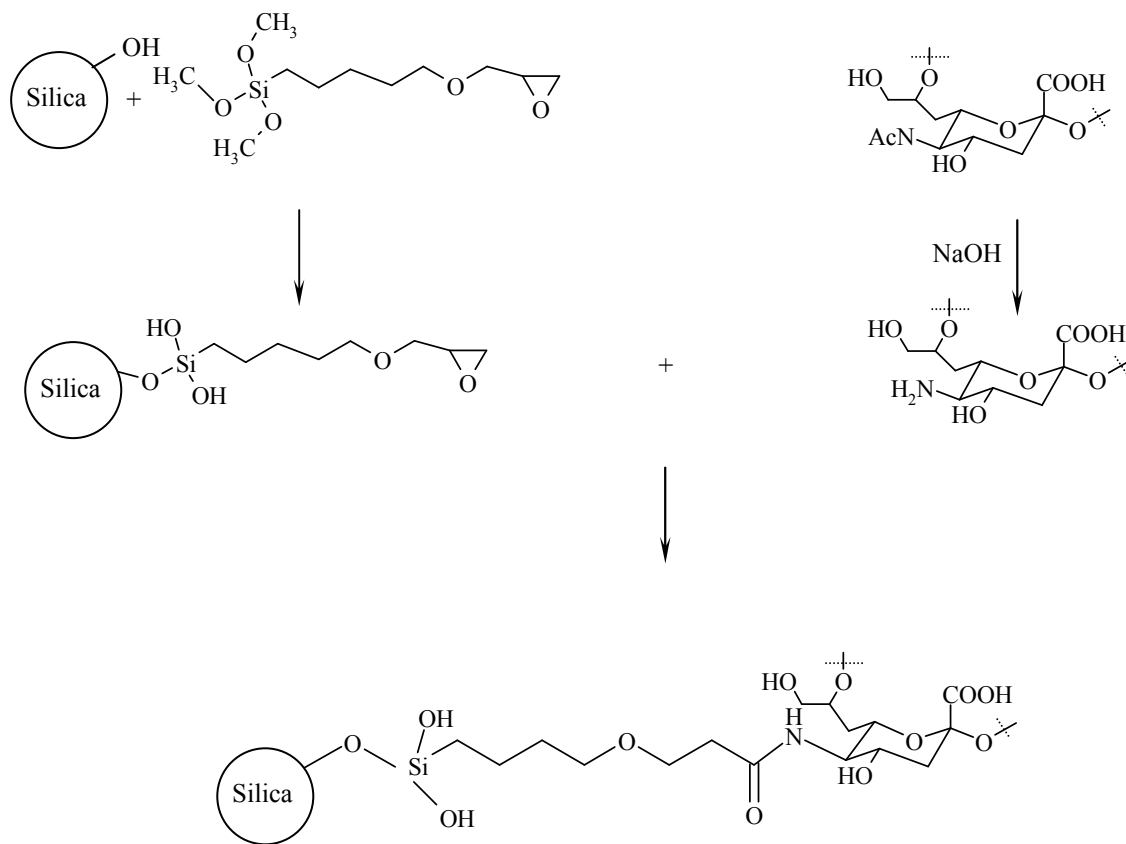


Abb. 5-1. Anbindung von Colominsäure an Silica-Nanopartikel.

## 5.2 Charakterisierung der beschichteten Silica-Nanopartikel

Mit Hilfe der IR-Spektroskopie soll die Gegenwart von Colominsäure an den beschichteten Proben nachgewiesen werden. Die stärkste beobachtete Bande bei Proben dieser Art war jene der Si–O-Valenzschwingung bei  $1100\text{ cm}^{-1}$ . Um die im Verhältnis dazu sehr schwachen Banden des Epoxids und der PSA besser erkennen zu können, wurde so viel Probe eingesetzt, dass die Si–O-Valenzschwingung aufgrund ihrer Intensität abgeschnitten wurde.

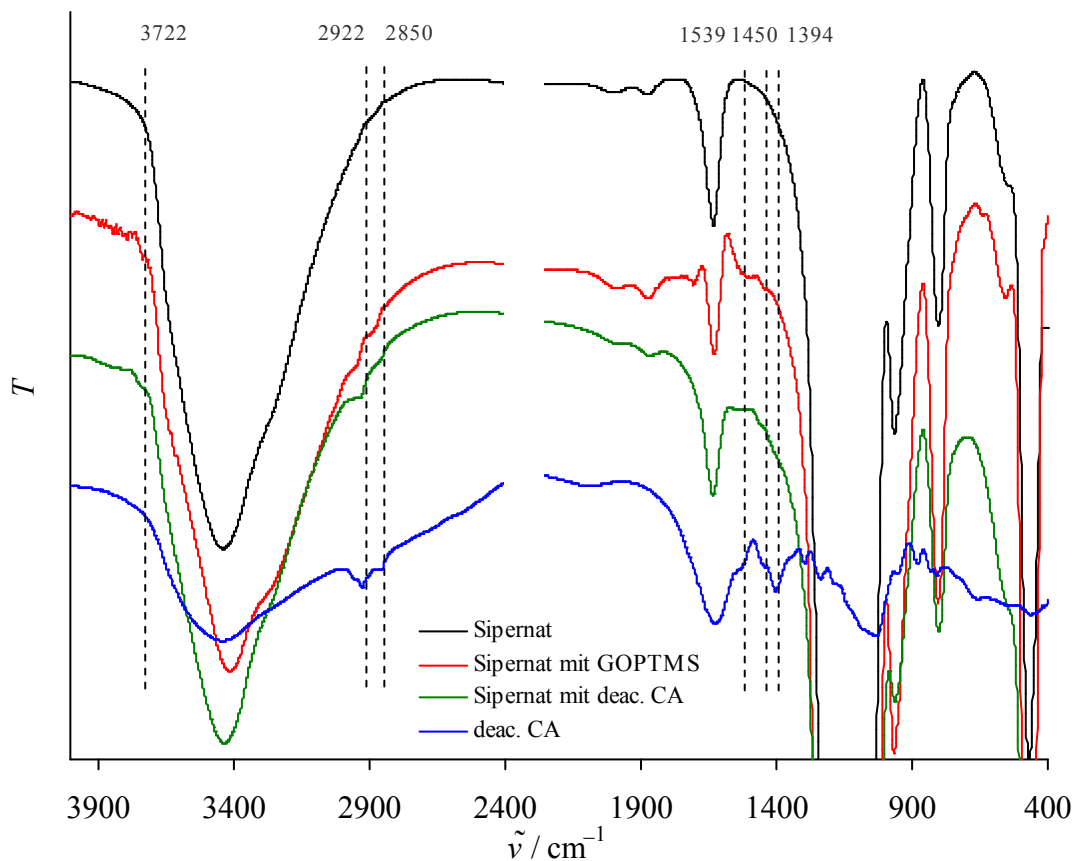


Abb. 5-2. IR-Spektren von Sipernat, Sipernat mit einer GOPTMS-Beschichtung, Sipernat mit einer Beschichtung aus deacetylierter Colominsäure und deacetylierter Colominsäure.

In Abb. 5-2 sind die IR-Spektren von Sipernat, Sipernat mit GOPTMS-Beschichtung sowie Sipernat mit einer Beschichtung aus deacetylierter Polysialinsäure dargestellt. Bei beiden beschichteten Proben (Sipernat mit GOPTMS und Sipernat mit deacetylierter Colominsäure) tritt eine Schwingung bei  $3722\text{ cm}^{-1}$  auf, die freien Silanolgruppen zuzuordnen ist. Des Weiteren tritt bei allen drei Proben eine sehr breite Bande zwischen

3700  $\text{cm}^{-1}$  und 3000  $\text{cm}^{-1}$  in Erscheinung, die den O–H-Valenzschwingungen zugeordnet werden kann. Die C–H-Valenzschwingungen treten bei der mit GOPTMS beschichteten Probe bei 2939  $\text{cm}^{-1}$  und 2869  $\text{cm}^{-1}$  auf und stimmen somit sehr gut mit den C–H-Schwingungen des reinen GOPTMS mit 2944  $\text{cm}^{-1}$  und 2868  $\text{cm}^{-1}$  überein. Die C–H-Valenzschwingungen der mit deacetylierter Colominsäure beschichteten Probe sind bei leicht verschiedenen Wellenzahlen (2922  $\text{cm}^{-1}$  und 2850  $\text{cm}^{-1}$ ) zu beobachten. Die C–H-Valenzschwingungen der reinen deacetylierten Colominsäure sind bei sehr ähnlichen Wellenzahlen (2918  $\text{cm}^{-1}$  und 2850  $\text{cm}^{-1}$ ) zu finden. Bei den drei beschichteten Proben ist eine, im Falle der mit deacetylierter Polysialinsäure, recht breite Schwingung bei 1625  $\text{cm}^{-1}$  bzw. 1620  $\text{cm}^{-1}$  zu beobachten. Zum einen kann diese Schwingung von dem an der Probe adsorbierten Wasser stammen, zum anderen ist dort aber auch die Amid-Deformationsschwingung I zu finden. Dadurch könnte die leichte Rechtsdrift dieses Signals bei der mit deacetylierter Colominsäure beschichteten Probe erklärt werden, die bei 1614  $\text{cm}^{-1}$  zu finden ist. Die Amid-Deformationsschwingungen I und II treten bei der mit deacetylierter Colominsäure beschichteten Probe und der deacetylierten Colominsäure im Bereich von 1614  $\text{cm}^{-1}$  und 1539  $\text{cm}^{-1}$  auf. Die symmetrische Carboxylatschwingung lässt sich bei der mit deacetylierter Colominsäure beschichteten Probe bei 1394  $\text{cm}^{-1}$  beobachten. Der reine Feststoff zeigt diese bei 1398  $\text{cm}^{-1}$ . Im Bereich von 1100  $\text{cm}^{-1}$  tritt die sehr intensive asymmetrische Si–O-Valenzschwingung in Erscheinung. Um die anderen Signale besser vergleichen zu können, wurde dieses Signal abgeschnitten. Die Si–O-Deformationsschwingungen können bei den sipernatbasierten Proben bei 958  $\text{cm}^{-1}$  bzw. 954  $\text{cm}^{-1}$  beobachtet werden. Die symmetrische Si–O-Valenzschwingung dieser Proben liegt zwischen 798  $\text{cm}^{-1}$  und 794  $\text{cm}^{-1}$ . Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere bei der Betrachtung der C–H-Valenzschwingungen gute Übereinstimmungen zwischen reinem GOPTMS und der mit GOPTMS beschichteten Probe, sowie zwischen der deacetylierten Colominsäure und der mit Colominsäure beschichteten Probe existieren. Das ist ein starker Hinweis auf eine erfolgte Anbindung.

Tabelle 5-1. IR-Signale in der Übersicht. Sipernat, das mit GOPTMS beschichtet wurde, wird als Probe (a) bezeichnet. Die mit deacetylierter Colominsäure beschichtete Probe wird mit Probe (b) bezeichnet. Die Vergleichswerte der GOPTMS Signale stammen aus [188].

Sipernat $\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$	Probe (a) $\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$	Probe (b) $\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$	GOPTMS $\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$	deac. CA $\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$	Schwingungstyp
	3722 $\text{cm}^{-1}$	3722 $\text{cm}^{-1}$			freie Silanolgruppen
3700 $\text{cm}^{-1}$ – 3000 $\text{cm}^{-1}$	3700 $\text{cm}^{-1}$ – 3000 $\text{cm}^{-1}$	3700 $\text{cm}^{-1}$ – 3000 $\text{cm}^{-1}$		3700 $\text{cm}^{-1}$ – 3000 $\text{cm}^{-1}$	O–H-Valenzschwingung
	2939 $\text{cm}^{-1}$ 2869 $\text{cm}^{-1}$	2922 $\text{cm}^{-1}$ 2850 $\text{cm}^{-1}$	2944 $\text{cm}^{-1}$ 2868 $\text{cm}^{-1}$ 2841 $\text{cm}^{-1}$	2918 $\text{cm}^{-1}$ 2850 $\text{cm}^{-1}$	C–H-Valenzschwingung
1625 $\text{cm}^{-1}$	1625 $\text{cm}^{-1}$	1620 $\text{cm}^{-1}$			Wasser
		1539 $\text{cm}^{-1}$		1614 $\text{cm}^{-1}$	Amid-Deformations-schwingungen I und II
	1431 $\text{cm}^{-1}$	1450 $\text{cm}^{-1}$	1439 $\text{cm}^{-1}$	1435 $\text{cm}^{-1}$	C–H-Deformations-schwingung
		1394 $\text{cm}^{-1}$		1398 $\text{cm}^{-1}$	symmetrische Carboxylat Valenzschwingung
1100 $\text{cm}^{-1}$	1100 $\text{cm}^{-1}$	1100 $\text{cm}^{-1}$	1088 $\text{cm}^{-1}$		Si–O-Valenzschwingung
958 $\text{cm}^{-1}$	958 $\text{cm}^{-1}$	954 $\text{cm}^{-1}$	910 $\text{cm}^{-1}$		Si–O-Deformations-schwingung
798 $\text{cm}^{-1}$	796 $\text{cm}^{-1}$	794 $\text{cm}^{-1}$	821 $\text{cm}^{-1}$		Si–O-Valenzschwingung

Die Partikel wurden zudem mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie charakterisiert. Dazu wurden TEM-, EFTEM- und EELS-Aufnahmen gemacht. Die Arbeiten wurden von Herrn Dr. Armin Feldhoff vom Institut für Physikalische Chemie der Leibniz Universität Hannover durchgeführt.

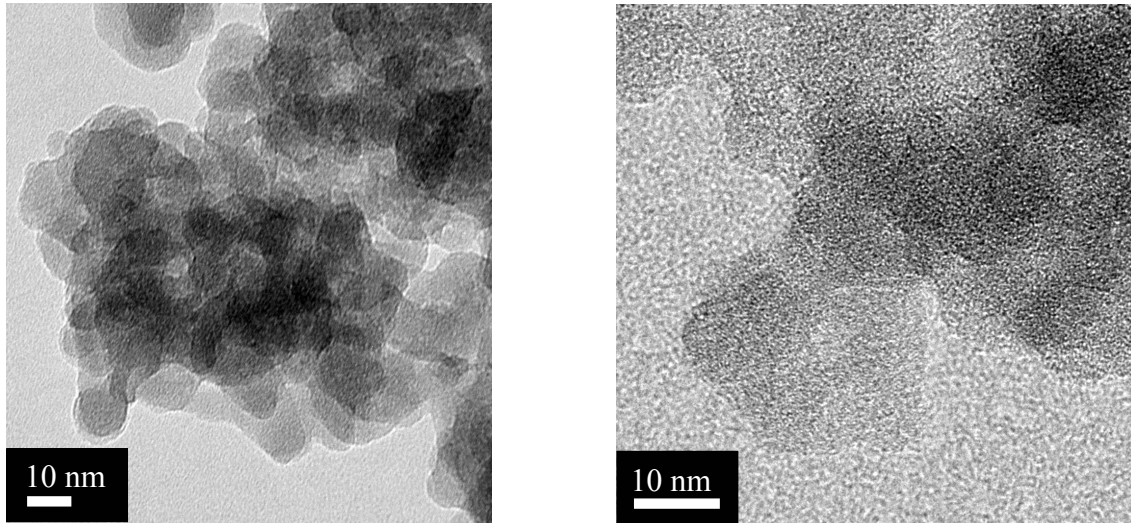


Abb. 5-3 TEM-Aufnahme von unbehandeltem Sipernat (links) und Sipernat, das mit deacetylierter Polysialinsäure (rechts).

In Abb. 5-3 kann man die Größe und Beschaffenheit der Nanopartikel erkennen. Sowohl die beschichtete als auch die unbeschichtete Probe weisen Partikel von circa 10 nm Größe auf. Die Partikel und ihre Beschichtung sind amorph, so dass sich bei klassischen TEM-Aufnahmen keine Unterschiede beobachten lassen. Um diese sichtbar machen zu können, wurden energiegefilterte Aufnahmen (EFTEM) gemacht (Abb. 5-4) Die Abbildungen wurden im Bereich des Energieverlustes durch Plasmonenanregungen aufgenommen. Die Aufnahmen entstanden bei einem Energieverlust von 5 bis 24 eV.



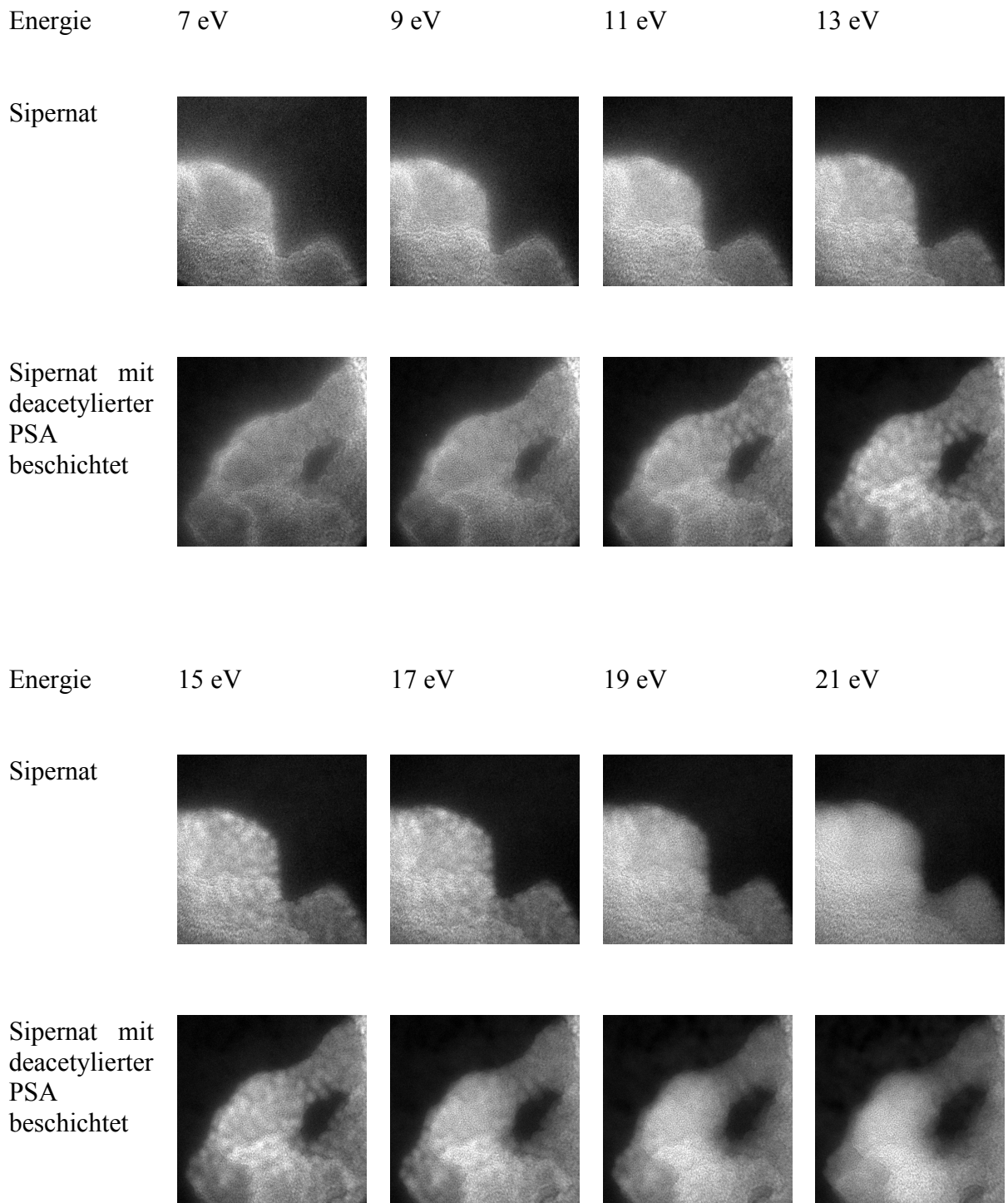


Abb. 5-4. Energiegefilterte Aufnahmen der unbeschichteten und der beschichteten Silica-Nanopartikel.

Auf den energiegefilterten Aufnahmen der unbehandelten Sipernat-Probe lässt sich eine Nanostrukturierung erkennen. Sie erscheint bei 13 eV und lässt sich bis 19 eV erkennen. Diese Strukturierung ist auch bei den mit CA beschichteten Proben zu sehen. Allerdings

wird sie schon bei niedrigen Energien beobachtet. Ab einer Energie von 9 eV lassen sich kleine Kugeln erkennen, die bis etwa 17 eV zu beobachten sind. Um Aussagen über die Elementverteilung in der Probe treffen zu können, wurden EELS-Aufnahmen und EELS-Spektren aufgenommen. Dabei ist insbesondere die Kohlenstoffverteilung in der Probe von Interesse.

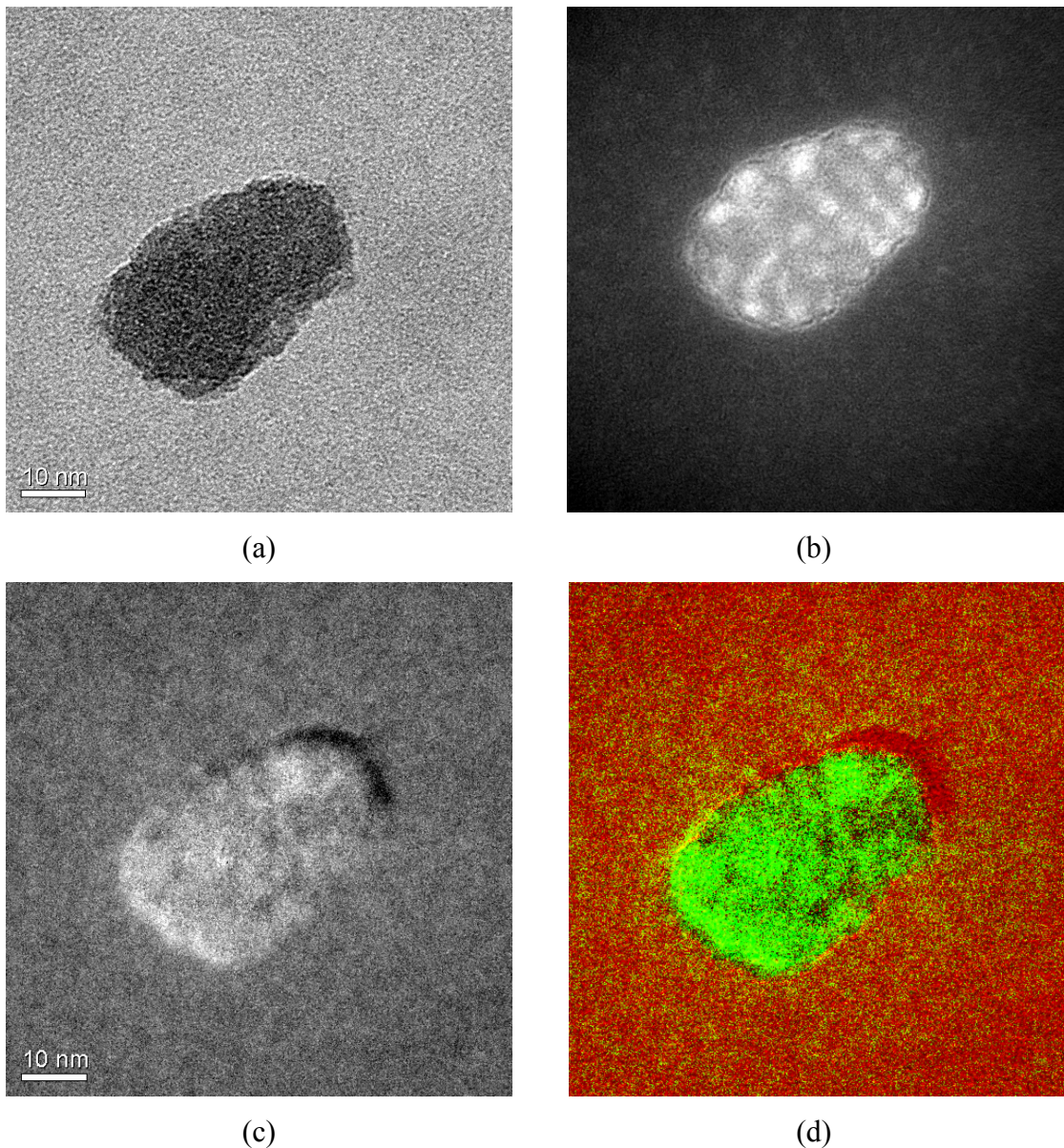


Abb. 5-5. (a) TEM-Aufnahme der mit Colominsäure beschichteten Probe. (b) EFTEM-Aufnahmen der mit Colominsäure beschichteten Probe. (c) Kohlenstoff-Verteilung (weiß) auf der mit Colominsäure beschichteten Probe. (d) Ebendieses als Falschfarbenbild. Das Kohlenstoffsignal erscheint in grün.

In der Abbildung 5-5 lässt sich ein beschichtetes Silica-Nanopartikel erkennen. Abb. 5-5 (a) zeigt das reguläre TEM-Bild, Abb. 5-5 (b) das EFTEM-Bild bei 20 eV. Es lassen sich wiederum die kugelförmigen Strukturen erkennen. Die Abbildungen 5-5 (c) und (d)

zeigen die Kohlenstoffverteilung auf dem Nanopartikel. Man kann deutlich erkennen, dass auf dem gesamten Partikel Kohlenstoff vorkommt. Die Verteilung des Kohlenstoffs ist von den kugelförmigen Strukturen der Partikel unabhängig. Das EELS-Spektrum in Abb. 5-6 (a) zeigt bei einer unbeschichteten Probe kaum Kohlenstoff. Das geringe noch zu beobachtende Signal für Kohlenstoff ist auf Verschmutzungen des Probenraums zurückzuführen. Das starke Signal für Stickstoff ist auf den Probenträger, der aus  $\text{Si}_3\text{N}_4$  besteht, zurückzuführen.

In Abb. 5-6 (b) ist das EELS-Spektrum der mit deacetylierter Colominsäure beschichteten Probe zu sehen. Man kann ein deutliches Kohlenstoffsignal erkennen. Das Kohlenstoffsignal ist mit dem von amorphem Kohlenstoff zu vergleichen [186]. Darüber hinaus ist wiederum das Stickstoffsignal des Probenträgers zu erkennen.

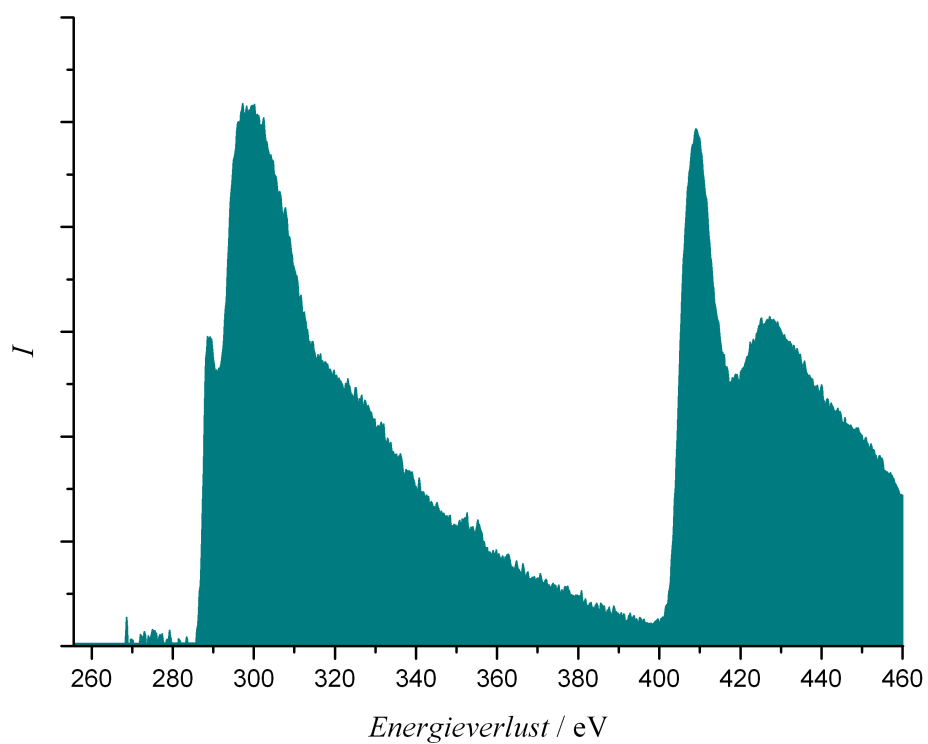
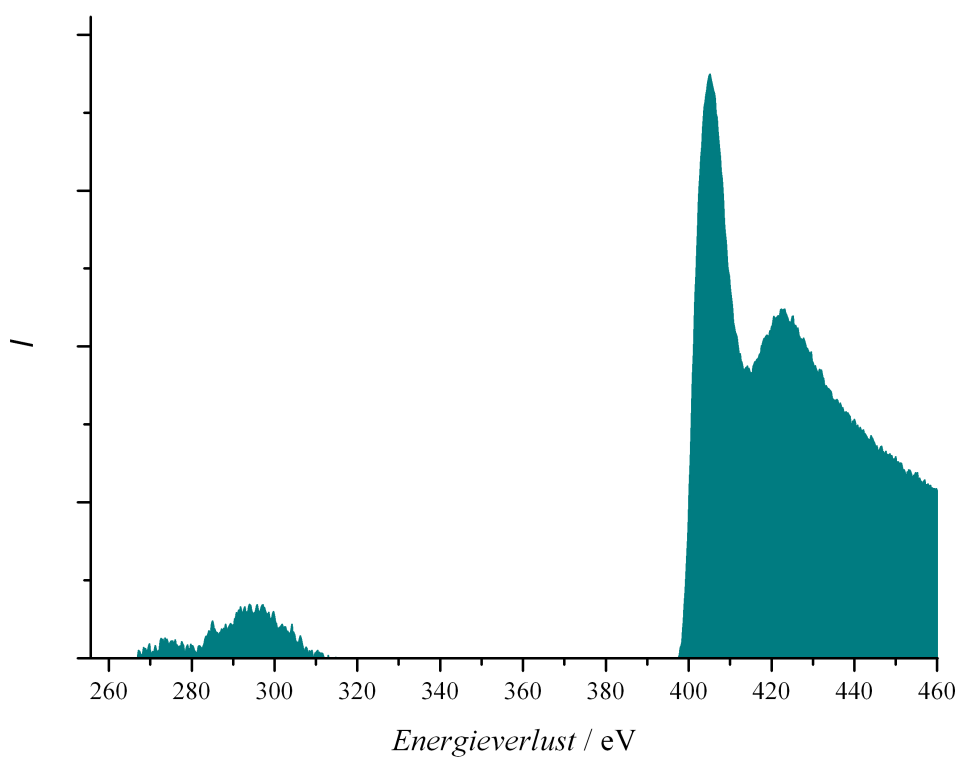


Abb. 5-6 EELS-Spektren des unbeschichteten Sipernats (oben) und der mit Colominsäure beschichteten Probe (unten).

Der Thiobarbitursäure-Assay (TBA-Assay) bietet eine quantitative Möglichkeit zur Bestimmung von Sialinsäuren. Er wurde hier eingesetzt, um die Anbindung von Polysialinsäure an Silica-Nanopartikel nachzuweisen. Der Nachweis wurde nur qualitativ eingesetzt. Die Messungen wurden am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover von Yvonne Stark durchgeführt.

Zunächst muss die Polysialinsäure bzw. Colominsäure durch Hydrolyse mit 0.1 M Phosphorsäure von den Nanopartikeln entfernt und in Sialinsäuremonomere zerlegt werden. Dazu gibt man zu 30 mg der Nanopartikeln 100 mL 0.1 M Phosphorsäure und lässt die Probe 18 h ruhen. Danach wird die Lösung mit 100  $\mu$ L 0.1 M Natriumhydroxidlösung neutralisiert und abzentrifugiert. 200  $\mu$ L des neutralisierten Zentrifugats werden zum Test herangezogen. Die Probelösung wird mit einer Oxidationslösung aus 10 mg Periodsäure, 100  $\mu$ L 1 M Phosphorsäure sowie 1.9 mL Wasser versetzt und eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend gibt man eine Reduktionslösung aus 0.5 g Natriumarsenat, 0.72 g Natriumsulfat, 200  $\mu$ L konzentrierter Schwefelsäure und 9.8 mL Wasser hinzu. Die Probe wird bis zum Verschwinden der braunen Farbe geschüttelt. Anschließend wird sie mit 500  $\mu$ L 3 %iger Thiobarbitursäure versetzt und bei 95 °C 13 Minuten inkubiert. Die Lösung wird zum Abkühlen 5 Minuten in ein Wasserbad gestellt. 400  $\mu$ L der Probelösung werden mit 700  $\mu$ L Cyclohexanon vermengt und die Absorption in einem UV-Vis-Spektrometer des Typs Multiscan Spektrum der Firma Thermo Labsystems bei 549 nm gemessen. Zum Vergleich wird reine Colominsäure herangezogen. Die Messwerte wurden Blindwert bereinigt und sind in Abb. 5-7 dargestellt.

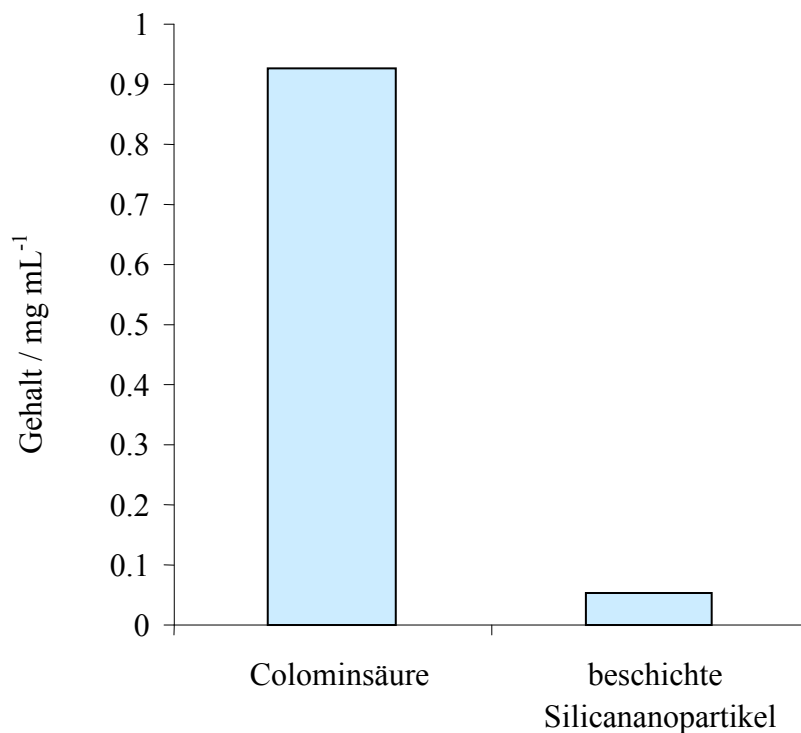


Abb. 5-7. Ergebnisse des TBA-Tests von reiner Colominsäure und von mit Colominsäure beschichteten Silica-Nanopartikeln.

Der TBA-Assay zeigt eine leichte Absorption in der Probelösung. Diese liegt deutlich über dem Blindwert. Diese Beobachtung ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Colominsäure auf der Oberfläche angebunden werden konnte. Eine quantitative Auswertung der Ergebnisse konnte nicht erfolgen, da es sich hier um die deacetylierte Variante der Colominsäure handelt.

### 5.3 Diskussion

Die IR-Spektren zeigten deutliche Hinweise auf eine erfolgte Funktionalisierung. Insbesondere die C–H-Valenzschwingungen sind dafür ein deutliches Indiz. Beim unbehandelten Sipernat sind in diesem Bereich keine Schwingungen vorhanden. Nach der Beschichtung mit GOPTMS sind die für ein Epoxisilan typischen Banden zu finden. Nach der Anbindung von Colominsäure findet eine leichte Verschiebung der C–H-Schwingungen hin zu den für deacetylierte Colominsäure typischen Signalen statt. Die

Anbindung der deacetylierten Colominsäure wird auch durch die EELS-Spektren gestützt. Auf den beschichteten Proben konnte deutlich Kohlenstoff nachgewiesen werden. Im Vergleich ist ein klarer Unterschied zum reinen Sipernat zu erkennen. Der TBA-Assay ist ein weiterer Hinweis auf die Anbindung von Colominsäure. Mit ihm konnte ein – wenn auch nur geringer – Nachweis für Sialinsäuren erbracht werden. In diesem Kapitel konnte folglich gezeigt werden, dass man Colominsäure an die Oberfläche von Silica-Nanopartikeln binden kann. Dazu wurde ein deacetyliertes Derivat der Colominsäure verwandt. Dies ist allerdings nicht stabil und zersetzt sich [187]. Um die Anwendbarkeit der Partikel gewährleisten zu können, muss noch eine Reacetylierung angeschlossen werden. Nur über längere Zeit stabile Partikel lassen sich in der Medizin einsetzen. Als potentiell Einsatzgebiet für colominsäurebeschichtete Nanopartikel ist vor allem das Gehirn zu sehen. Das Gehirn ist ein durch die Blut-Hirn-Schranke speziell geschütztes Organ [161]. Zum Überwinden dieser Schranke sind diese Partikel vermutlich gut geeignet, um beispielsweise Wirkstoffe in das Gehirn einzuschleusen. Polysialinsäure kommt im Körper unter anderem im Gehirn vor. Durch ihre Polysialinsäurehülle werden die Nanopartikel, ähnlich den hirninvasiven Bakterien *E. coli* K1 und *N. meningitidis*, getarnt und können so die natürliche Abwehr überwinden [6].

Für das Anwendungsgebiet der Nanopartikel ist der innere Aufbau der Partikel entscheidend. Ein magnetischer Kern würde die Anwendung in der Hyperthermie ermöglichen. Gerade inoperable Tumore werden mit dieser Technik behandelt. Eine zusätzliche Anbindung von Tumorantikörpern zum *targeting* wäre sinnvoll. Ein zweites mögliches Anwendungsgebiet liegt im Bereich des *drug delivery*. Die Polysialinsäurebeschichtung könnte auf mesoporösen Partikeln aufgebracht werden. Diese können mit einem Wirkstoff beladen werden, der dann im Gehirn sukzessive freigesetzt wird. Die Verwendung von mesoporösen anorganischen Materialien ermöglicht im Vergleich zu organischen Nanopartikeln eine größere Stabilität gegenüber der Immunabwehr [155]. Die hier aufgeführten Anwendungsbeispiele zeigen den großen potentiellen Nutzen der colominsäurebeschichteten Nanopartikel. Diese sind in einem weiteren Entwicklungsschritt am Tiermodell zu testen. Zudem muss die Technik noch auf andere Trägersysteme übertragen werden.





## 6. ORGANISCH-ANORGANISCHE KOMPOSITE AUF DER BASIS VON POLYSACCHARIDEN

In diesem Kapitel wird die Synthese, Charakterisierung und Bewertung von verschiedenen Polysaccharid-Kompositen vorgenommen. Durch Co-Präzipitation werden zum einen Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposite und zum anderen Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite als Vergleichsubstanz hergestellt. Aufgrund der extrem guten Löslichkeit von Polysialinsäure trat auf dem Weg zu Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen eine Vielzahl von Schwierigkeiten auf. Durch eine einfache Co-Präzipitation ließ sich kein Kompositmaterial herstellen. Die Polysialinsäure ging bei Kontakt mit Wasser immer wieder in Lösung. Um ein schwerlösliches Polysialinsäure-Komposit herstellen zu können, war es nötig, die Polysialinsäure quervernetzen. Inwieweit dabei die biochemischen Eigenschaften der Polysialinsäure verändert wurden, ist anschließend untersucht worden. Darüber hinaus wurden zellbiologische und mechanische Untersuchungen durchgeführt. Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung von Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen ist die nachträgliche Mineralisierung von Hydrogelen. Hierzu werden ebenfalls zwei Ansätze vorgestellt. Abschließend wird die Präzipitation von Calciumcarbonat in Polysaccharid-lösungen beschrieben.

### 6.1 Co-Präzipitation

Zunächst werden die durch Co-Präzipitation dargestellten Proben vorgestellt. Bei der Herstellung dieser Kompositmaterialien werden die organischen und anorganischen Bestandteile gleichzeitig aus Lösung gefällt. Das Material wird sowohl chemisch, biologisch als auch mechanisch geprüft und bewertet.

## 6.1.1 Organisch-anorganische Komposite auf Chitosanbasis

In diesem Abschnitt werden Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite vorgestellt. Sie wurden in der Literatur bereits als potentielle Implantatmaterialien vorgestellt. Die vorliegenden Komposite sind analog des in der Dissertation von *Krueger* vorgestellten Verfahrens hergestellt worden [7, 8]. Sie dienen zum Vergleich mit Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen.

## 6.1.1.1 Herstellung

Die Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite wurden durch Co-Präzipitation nach einer Vorschrift von *Krueger* hergestellt [7]. Allerdings wurde hier neben dem von *Krueger* verwandten Chitosan (CHI) der Firma Acros auch Chitosan der Firma Fluka mit unterschiedlichen Viskositäten, und somit auch unterschiedlichen Polymerisationsgraden verwandt. Drei unterschiedliche Chitosane werden eingesetzt: niedrigviskoses Chitosan mit einem Polymerisationsgrad von 150 000, mittelviskoses Chitosan mit einem Polymerisationsgrad von 300 000 bis 500 000 und hochviskoses Chitosan mit einem Polymerisationsgrad von 500 000 bis 700 000. Eine Übersicht der Ansätze zur Herstellung der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite wird in Tabelle 6-1 gegeben.

Tabelle 6-1.: Übersicht über die Herstellung der Hydroxylapatit-Chitosan-Komposite. Die Abkürzung CHI steht für Chitosan und die Abkürzung HAP für Hydroxylapatit.

theoretisches Verhältnis CHI/HAP / m %	35/65	48/52	65/35
Chitosan / g	1.167	2	4
2 % Essigsäure / mL	48	100	130
0.108 M Ca(ac) <sub>2</sub> / mL	200	200	200
0.0648 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / mL	200	200	200
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / g	2	2	2

Zunächst wird das Chitosan in 2 %iger Essigsäure gelöst. Anschließend gibt man zu der geligen Lösung je 200 mL 0.108 M Calciumacetatlösung und 0.0648 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung. Zu dem Gemisch werden 2 g Kaliumcarbonat gegeben und der pH-Wert mit Kaliumhydroxid auf 9 eingestellt. Der Ansatz wird unter Rühren 12 h gealtert und anschließend abzentrifugiert. Der Niederschlag wird dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und an der Luft soweit getrocknet, dass die Masse gut verarbeitet werden kann. Diese wird dann in zylindrische Gefäße (Rollrandschnappdeckelgläschen, Glasfritten) gegeben und mechanisch verdichtet. Beim Trocknen an der Luft schrumpfen die Proben unter Beibehalten ihrer Form auf ein Drittel ihrer ursprünglichen Größe. Für die mechanische Charakterisierung müssen die zylindrische Proben eine Länge aufweisen, die dem 1.5-fachen ihres Durchmessers entspricht. Abb. 6-1 zeigt eine beispielhafte Photographie der Komposite



Abb. 6-1. Photographie eines Chitosan-Hydroxylapatit-Komposits mit einem Chitosan/Hydroxylapatit-Verhältnis von 65/35. Das verwandte Chitosan war hochviskos. Der Durchmesser der Komposite beträgt circa 6 mm.

### 6.1.1.2 Charakterisierung

Mit Hilfe der IR-Spektroskopie sollen die chemische Identität der Proben überprüft werden.

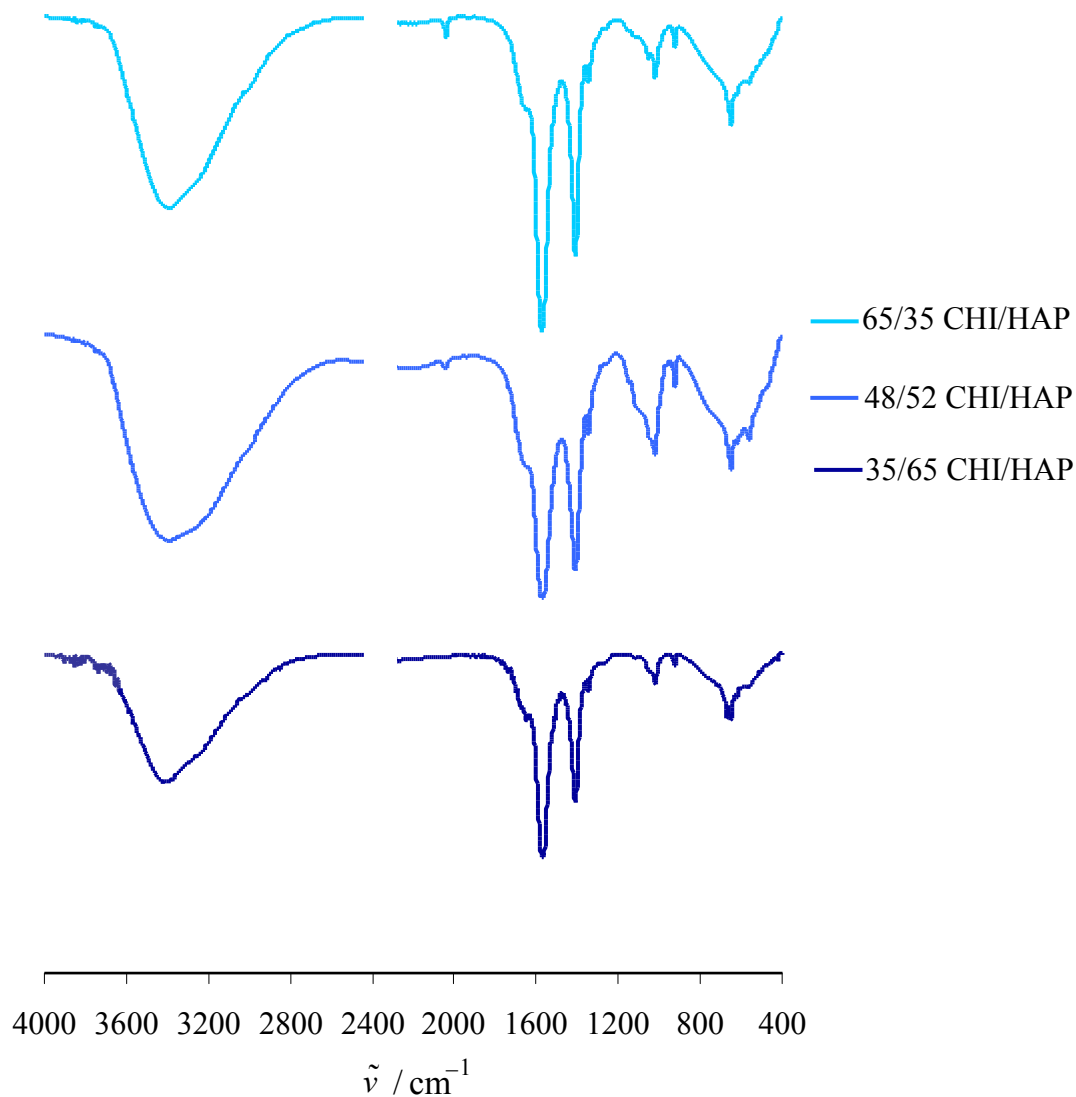


Abb. 6-2. IR-Spektren von Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen unterschiedlicher Zusammensetzung. Das verwendete Chitosan stammt von der Firma Acros.

Die in Abb. 6-2 gezeigten IR-Spektren unterscheiden sich nur geringfügig. Die Komposite weisen breite Schwingungen im Bereich von 3700–3000  $\text{cm}^{-1}$  auf, die O–H-Valenzschwingungen zugeordnet werden können. Die C–H-Valenzschwingungen treten sehr schwach bei 2900  $\text{cm}^{-1}$  und 2820  $\text{cm}^{-1}$  auf. Die breiten Banden bei 1650  $\text{cm}^{-1}$  und

$1560\text{ cm}^{-1}$  werden den Deformationsschwingungen I und II der Amidgruppe sowie der antisymmetrischen Valenzschwingung der Carboxylatgruppe zugeordnet. Zudem treten noch einige Schwingungen auf, die den Phosphatgruppen des Hydroxylapatits zugeordnet werden können. Die intensivste Bande ist die P–O-Valenzschwingung bei  $1035\text{ cm}^{-1}$ . Insgesamt stimmen die Ergebnisse gut mit den von *Krueger* und *Yamaguchi* vorgestellten Resultaten überein [7, 190].

Mit Hilfe der Röntgen-Pulverdiffraktometrie sollen die vorliegenden kristallinen Phasen näher bestimmt werden. Zunächst wurden die Proben mit Chitosan der Firma Acros untersucht (Abb. 6-3).

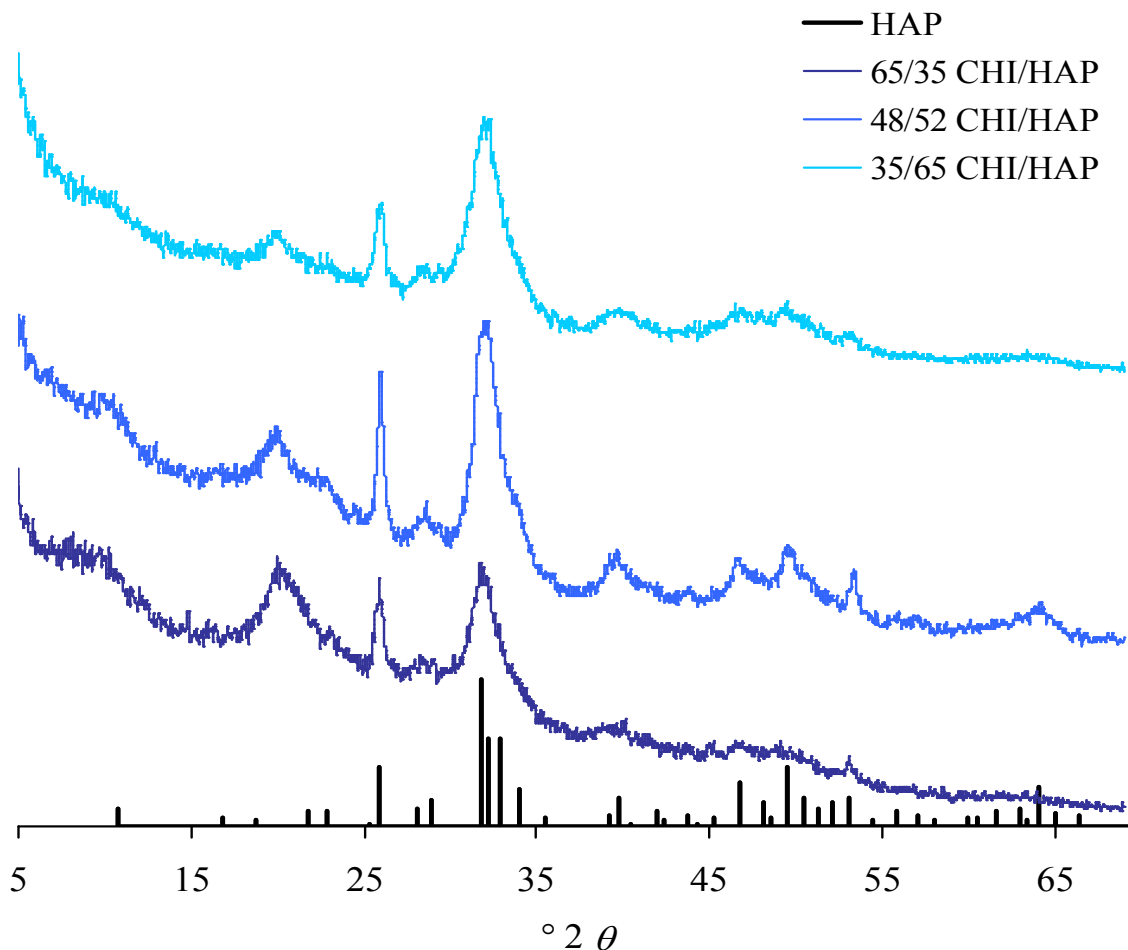


Abb. 6-3. Röntgen-Pulverdiffraktogramme von Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen unterschiedlicher Zusammensetzung. Das verwendete Chitosan stammt von der Firma Acros. Die schwarzen Linien geben die Reflexe des Hydroxylapatits wieder (PDF-Karte 9-432 ICDD).

Alle Röntgen-Pulverdiffraktogramme zeigen einen breiten Reflex bei  $20^\circ 2\theta$ , der dem Chitosan zuzuordnen ist [32]. Dessen Reflexintensität nimmt mit steigender Chitosankonzentration in der Probe zu. Des Weiteren lassen sich die übrigen, ebenfalls verbreiterten Reflexe mit Hydroxylapatit in Einklang bringen. Die Reflexverbreiterung kann zum einen auf eine starke Fehlordnung und zum anderen auf eine Nanokristallinität der Probe zurückzuführen sein. Zu einer Fehlordnung kann beispielsweise der Einbau von Carbonat in das Kristallgitter führen. Die Intensität der Reflexe des Hydroxylapatits nimmt mit dessen sinkender Konzentration ab. Ähnliche Ergebnisse sind auch von *Krueger* vorgestellt worden. Dort wird allerdings keine Korrelation zwischen Zusammensetzung und Reflexintensität beschrieben [7].

Die Proben mit Chitosan unterschiedlicher Polymerisationsgrade der Firma Fluka wurden ebenfalls mit der Röntgen-Pulverdiffraktometrie vermessen:

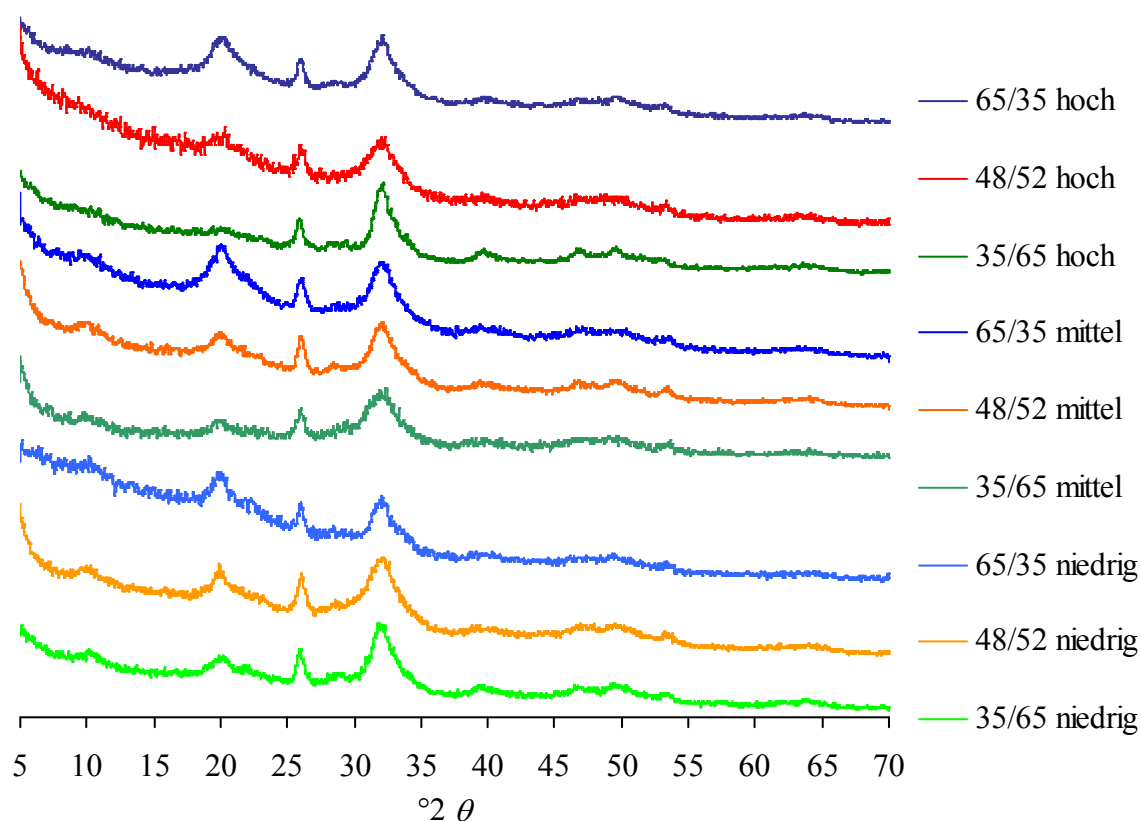


Abb. 6-4. Röntgen-Pulverdiffraktogramme von Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen unterschiedlicher Zusammensetzung. Das verwendete Chitosan hatte eine niedrige, mittlere oder hohe Viskosität und stammt von der Firma Fluka. In der Legende beschreibt die erste Zahl den prozentualen Gehalt an Chitosan und die zweite Zahl den prozentualen Gehalt an Hydroxylapatit.

Die Röntgendiffraktogramme der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite mit Chitosanen unterschiedlicher Polymerisationsgrade in Abb. 6-4. zeigen im Wesentlichen die gleichen Reflexe wie die Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite mit Chitosan der Firma Acros. Der Polymerisationsgrad des Chitosans scheint keinen Einfluss auf die Kristallinität der Probe zu haben. Auch bei diesen Proben variieren die Reflexintensitäten mit der Zusammensetzung der Probe.

Die in Abb. 6-5. dargestellten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen geben einen Überblick über die Morphologie Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite, die mit Chitosanen unterschiedlicher Polymerisationsgrade hergestellt wurden. Alle Proben zeigen einen homogenen Aufbau. Mit steigendem Polymerisationsgrad sind die Proben etwas poröser. Dieser Effekt verstärkt sich mit steigender Polymerkonzentration.

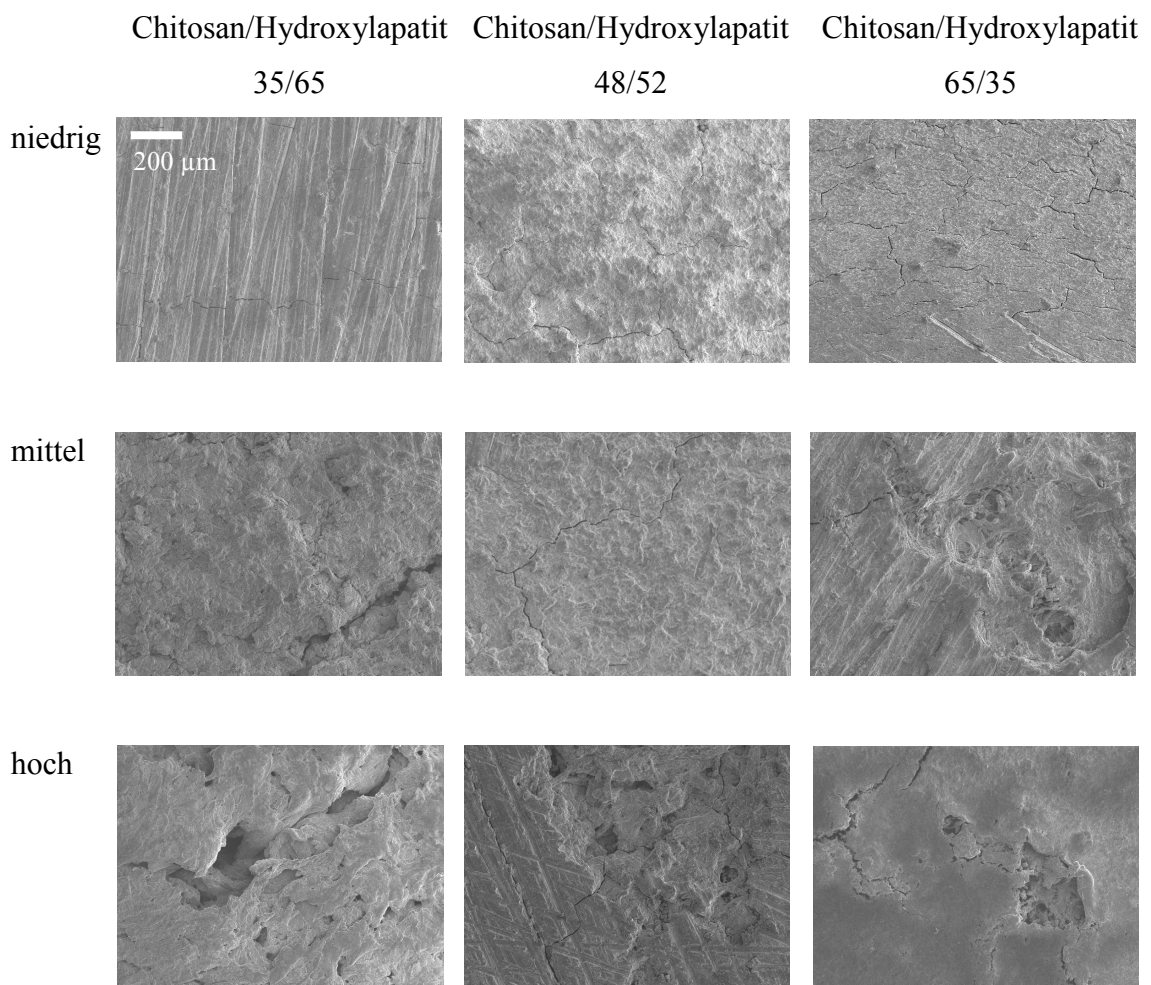


Abb. 6-5 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite bei einer 100-fachen Vergrößerung. Die verwandten Chitosane stammen von der Firma Fluka. Auf einigen Proben lassen sich Schleifspuren erkennen.

Die in Abb. 6-6. dargestellten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine 2000-fache Vergrößerung der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite, die mit Chitosanen unterschiedlicher Polymerisationsgrade hergestellt wurden. Auf allen Bildern ist ein homogener Feststoff zu sehen. Einzelne Bestandteile wie Kristallite lassen sich bei 2000-facher Vergrößerungen noch nicht unterscheiden. Dazu sind höhere Auflösungen vonnöten.

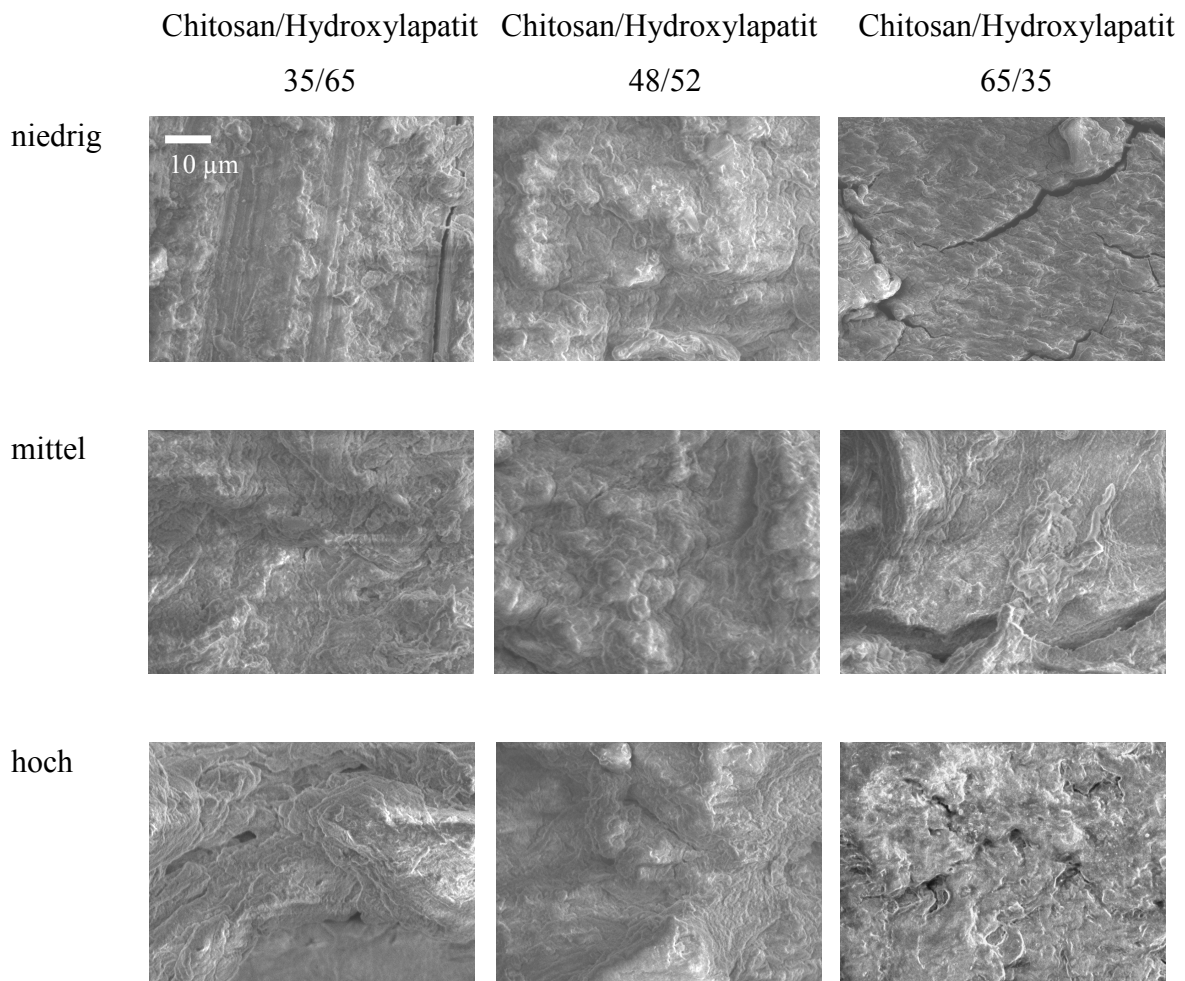
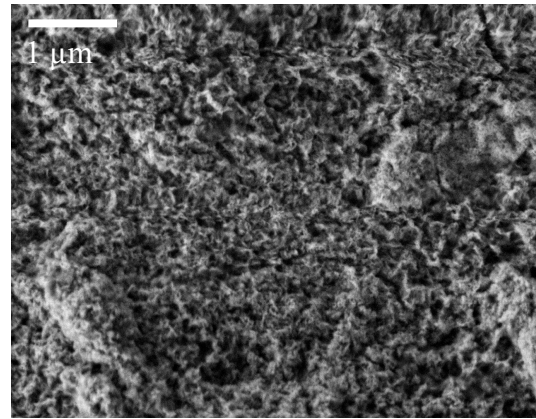
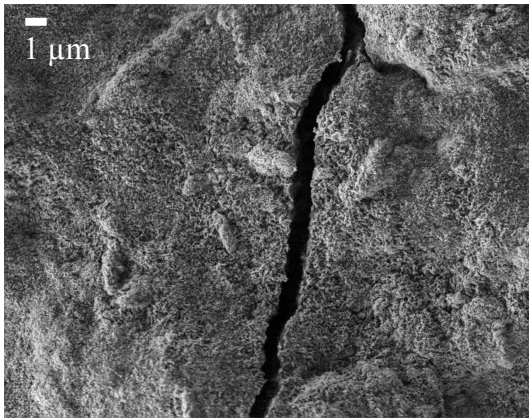


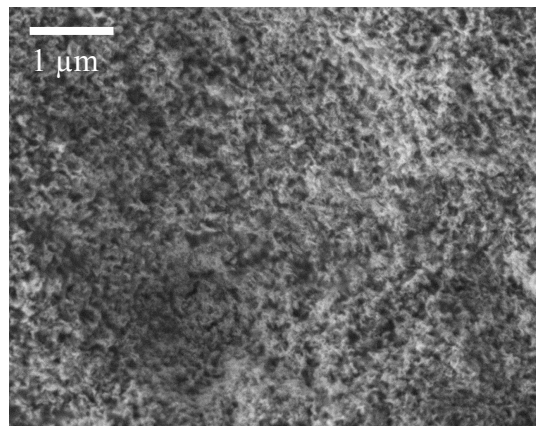
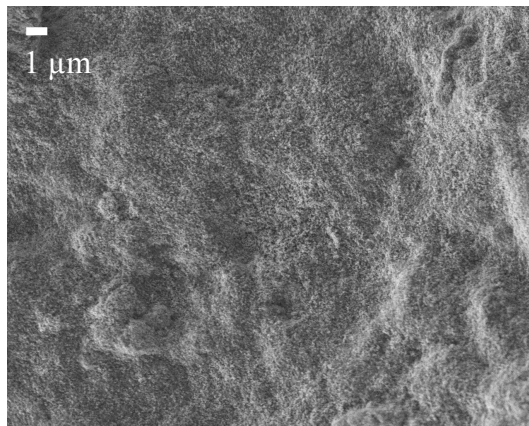
Abb. 6-6 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite bei einer 2000-fachen Vergrößerung. Die verwendeten Chitosane stammen von der Firma Fluka.

Im Folgenden werden die Proben mit einem Chitosan/Hydroxylapatit Verhältnis von 48/52 beispielhaft in starken Vergrößerungen gezeigt (Abb. 6-7).

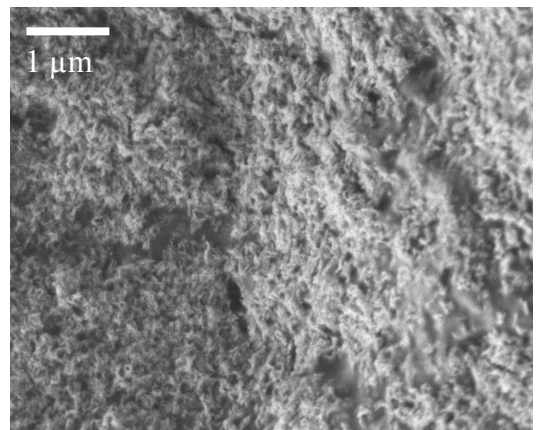
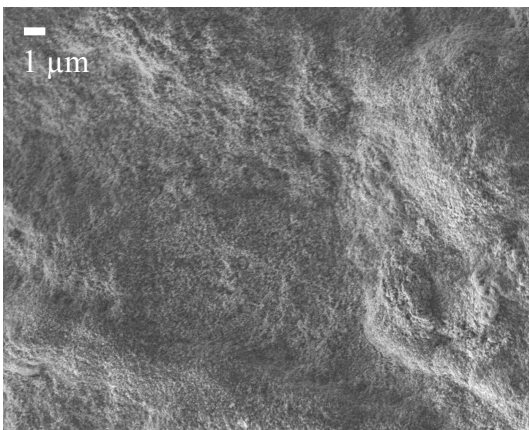




niedrig



mittel



hoch

Abb. 6-7. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite. Das Verhältnis CHI/HAP beträgt 48/52. Das verwandte Chitosan ist niedrig-, mittel- oder hochviskos. Die Bilder auf der linken Seite sind 5 000-fach, die auf der rechten Seite 20 000-Fach vergrößert.

Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite bei starken Vergrößerungen. Ab einer 20 000-fachen Vergrößerung lassen sich einzelne Bestandteile unterscheiden. Die 50 000-fache Vergrößerung eines Chitosan-Hydroxylapatit-Komposits mit niedrigviskossem Chitosan ist in Abb. 6-8 zu

sehen. Die Hydroxylapatitkristallite sind etwa 100 nm groß und haben eine blättchenartige Morphologie. Die Größe der beobachteten Partikel stimmt gut mit den Daten der Röntgen-Pulverdiffraktometrie überein.

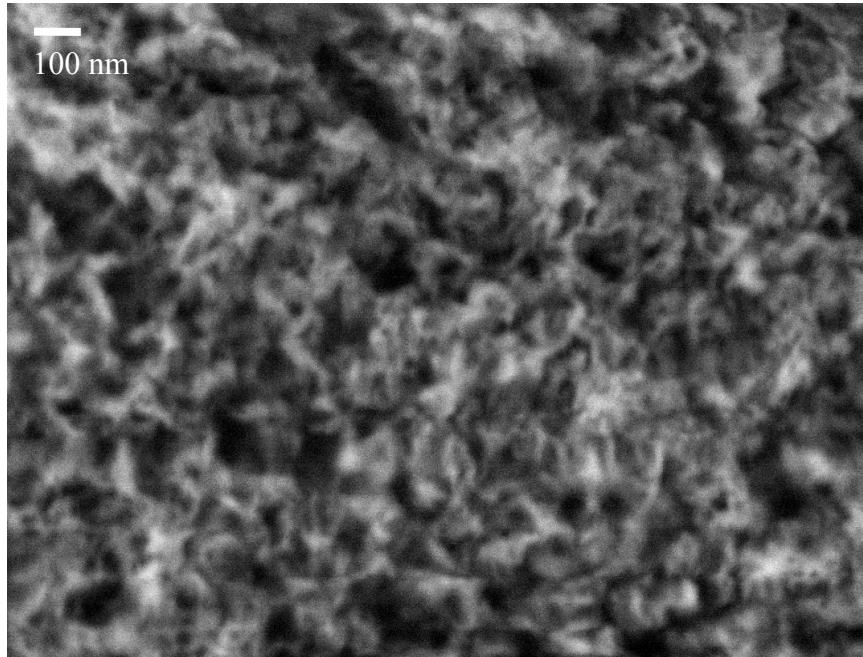


Abb. 6-8. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Chitosan-Hydroxylapatit-Komposits in 50 000-facher Vergrößerung. Das Verhältnis CHI/HAP beträgt 48/52. Das verwendete Chitosan ist niedrigviskos.

Auf der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme des Chitosan-Hydroxylapatit-Komposits mit hochviskosem Chitosan in Abb. 6-9 ist neben den Hydroxylapatitnanokristallen auch eine amorphe Schicht zu erkennen, die auf das Chitosan zurückgeführt werden kann. In diese sind die Hydroxylapatitnanokristalle eingebettet. Ähnliches ist, wenn auch nicht ganz so deutlich, bei mittel- und niedrigviskosem Chitosan ebenfalls zu beobachten. Eine Vorzugsrichtung der Kristalle, wie im natürlichen Knochen, lässt sich allerdings nicht erkennen. Sie ist aber auch bei dieser Herstellungsmethode nicht zu erwarten.

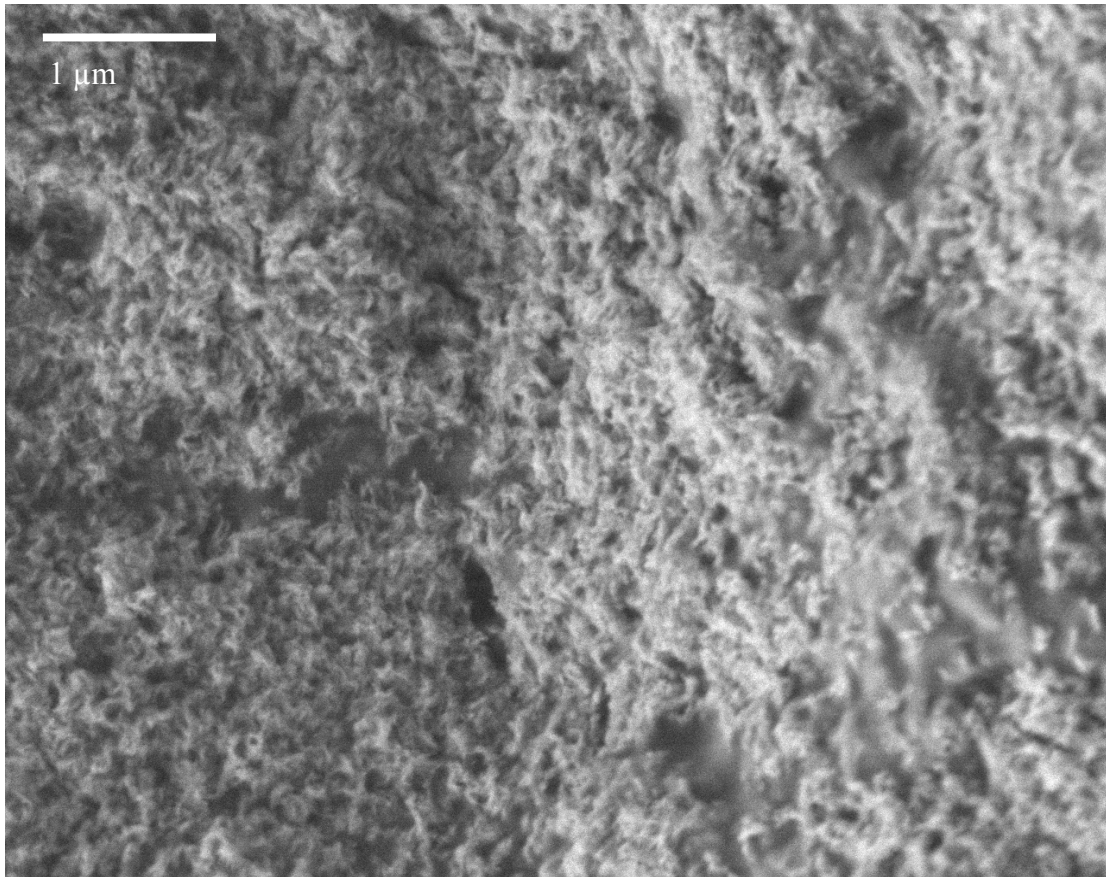


Abb. 6-9. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Chitosan-Hydroxylapatit-Komposits mit hohem Polymerisationsgrad.

Mit Hilfe von thermogravimetrischen Untersuchungen konnte die Zusammensetzung der Komposite bestimmt werden. Der Masseverlust bis zu einer Temperatur von 150 °C ist dem Verdampfen von Wasser zugeordnet. Aus der verbliebenen Masse wurde das Verhältnis von organischen zu anorganischen Bestandteilen bestimmt. Der Masseverlust im Bereich von 150 bis 600°C wird dem Chitosan zugeordnet. In diesem Bereich ist aber auch schon eine Abspaltung von Wasser aus dem Hydroxylapatit möglich. Die verbliebene Masse wird dem Hydroxylapatit zugeordnet. Eine Auflistung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 6-2.

Tab. 6-2. Übersicht der theoretischen und tatsächlichen Verhältnisse von organischen zu anorganischen Bestandteilen der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite. Die verwendeten Chitosane stammen von der Firma Acros.

Viskosität	theoretisches Verhältnis CHI/HAP	tatsächliches Verhältnis CHI/HAP
niedrig	35/65	37/63
	48/52	48/52
	65/35	67/33
mittel	35/65	35/65
	48/52	49/51
	65/35	63/37
hoch	35/65	36/64
	48/52	49/51
	65/35	63/37

Die theoretischen und tatsächlichen Verhältnisse von Chitosan zu Hydroxylapatit stimmen recht gut überein. Für die thermogravimetrischen Untersuchungen ist Fehler von etwa einem Prozent anzunehmen.

Um den inneren Aufbau der Proben beurteilen zu können, wurden diese mit Hilfe der  $\mu$ -CT untersucht. Exemplarisch wird hier das Bild eines Chitosan-Hydroxylapatit-Komposits mit einem CHI/HAP-Verhältnis von 48/52 dargestellt (Abb.6-10). Das für diese Probe verwendete Chitosan stammt von der Firma Acros.

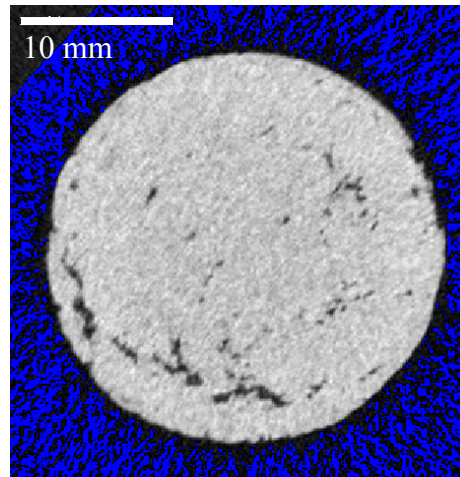


Abb. 6-10.  $\mu$ -CT eines Chitosan-Hydroxylapatit-Komposits mit einem Chitosan/Hydroxylapatit-Verhältnis von 48/52. Das verwendete Chitosan stammt von der Firma Acros. Die Abbildung zeigt einen Querschnitt durch die Probe.

Die in Abb. 6-10 gezeigte Probe zeigt einen weitgehend homogenen Aufbau. Vereinzelt sind Poren zu erkennen. Um die mechanische Belastbarkeit der Proben zu testen, wurden diese einer Druckprüfung unterzogen.

#### 6.1.1.3 Mechanische Prüfung

Um die Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite auf ihre mechanische Belastbarkeit zu testen, wurde es einer Druckprüfung unterzogen. Die Ergebnisse der mechanischen Prüfung mit Chitosan der Firma Acros sind in Abb. 6-11 gezeigt. Die Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite mit einem niedrigen oder mittleren Hydroxylapatitanteil weisen sehr homogene Messergebnisse auf. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte werden in Tab. 6-4 mit denen von *Li et al.* beschriebenen Druckfestigkeiten verglichen [141]. Die Komposite mit dem niedrigsten Anorganik-Anteil halten Druck am wenigsten stand. Bei etwa 20 bis 30 MPa beginnen die Proben sich unter dem Druck

stark zu verformen. Die Druckfestigkeiten bei einem CHI/HAP-Verhältnis von 65/35 liegen deutlich unter den von *Li et al.* ermittelten Werten. Eine mögliche Erklärung könnten Inhomogenitäten innerhalb der Probe sein. Inwieweit der Polymerisationsgrad des Chitosans eine Rolle spielt, muss noch überprüft werden. Bei den Kompositen mit einer Zusammensetzung von 48/52 CHI/HAP ist mit 95 MPa schon ein deutlich größerer Druck erforderlich, um die Proben zu verformen. Die gemessenen Druckfestigkeiten liegen etwas höher als die von *Li et al.* beschriebenen Werte. Verschiedene Proben der Zusammensetzung 35/65 CHI/HAP zeigen ein variierendes Verhalten. Die Verformung beginnt je nach Probe bei einem Druck zwischen 80 und 115 MPa. Diese unterschiedlichen Druckfestigkeiten sind vermutlich auf Inhomogenitäten innerhalb der Probenkörper zurückzuführen. Möglicherweise befindet man sich hier an der Grenze der Perkolation des Polymeranteils. Die gemessenen Werte stimmen gut mit den von *Li et al.* beschriebenen Werten überein. Die Druckfestigkeiten liegen hier im Bereich des natürlichen Knochens.

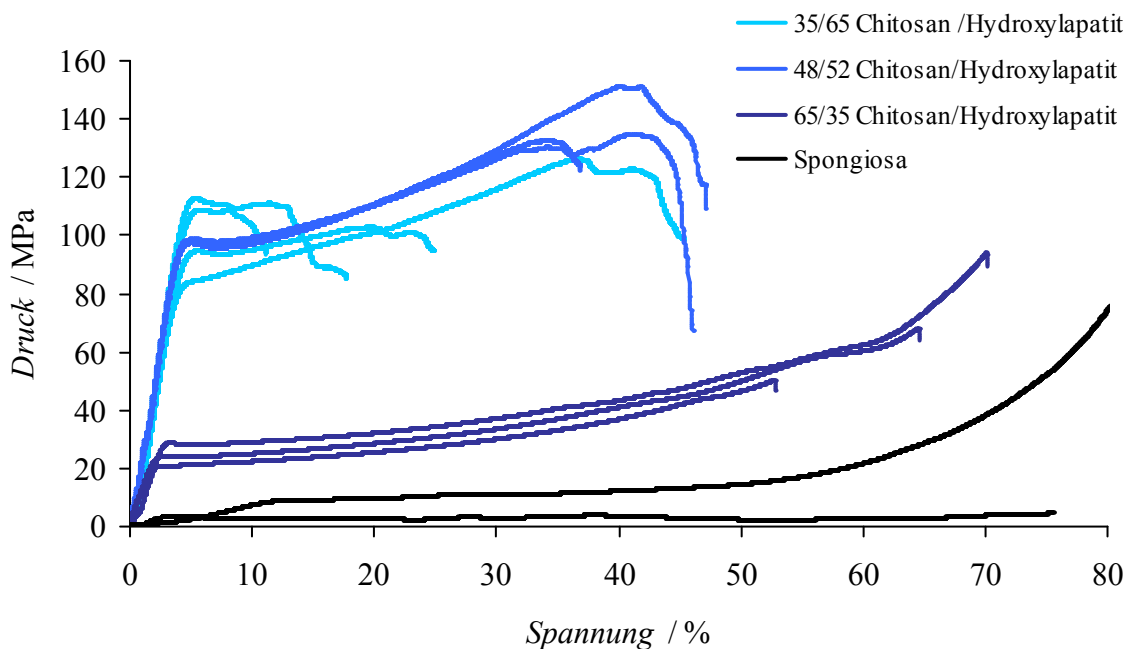


Abb. 6-11. Mechanische Prüfung von Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen unterschiedlicher Zusammensetzung im Vergleich mit Spongiosa. Das Chitosan stammt von der Firma Acros.

Tab. 6-3. Druckfestigkeiten der gemessenen Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite im Vergleich mit den bei *Li et al.* beschriebene Druckfestigkeiten [141].

Theoretisches CHI/HAP Verhältnis <i>m</i> %	gemessene Druckfestigkeit MPa	Theoretisches CHI/HAP Verhältnis <i>m</i> %	Druckfestigkeit bei <i>Li et al.</i> MPa
		20/80	102
		30/70	120
35/65	80-115		
		40/60	109
48/52	95	50/50	87
		60/40	85
65/35	20-30		
		70/30	67

### 6.1.2 Organisch-anorganische Komposite auf Polysialinsäurebasis

In diesem Abschnitt werden Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposite vorgestellt. Diese stellen eine neue Variante organisch-anorganischer Kompositmaterialien dar. Zunächst wurde versucht, unvernetzte Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposite herzustellen, was jedoch erfolglos war. Es gelang nicht, phasenreinen Hydroxylapatit zu fällen. Zudem löste sich die Polysialinsäure (PSA) im Wässrigen sofort auf. Im Folgenden wird nun die Herstellung und Charakterisierung von quervernetzten Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen beschrieben. Das hier zum Quervernetzten verwandte Diepoxyoctan bildet dabei einen Ether mit einer der Hydroxidgruppen des Zuckers aus.

### 6.1.2.1 Herstellung

Die Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposite wurden durch Co-Präzipitation von Hydroxylapatit mit Polysialinsäure und anschließender Quervernetzung der Polysialinsäure hergestellt. Die Polysialinsäure musste aufgrund ihrer sehr guten Löslichkeit quervernetzt werden, um ein wasserunlösliches Produkt zu erhalten.

Zur Herstellung werden 0.1 g Colominsäure in 5 mL Millipore-Wasser gelöst. Zu dieser Lösung werden 5 mL 1.08 M Calciumacetatlösung gegeben. Durch die Zugabe von 10 mL Aceton trübt sich die Reaktionslösung. Anschließend werden 5 mL 0.648 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung zugegeben und damit das Komposit gefällt. Dabei entsteht eine weiße Suspension. Zu dem Reaktionsgemisch werden 0.135 mL Diepoxyoctan gegeben und die Lösung wird mit Kaliumhydroxid auf pH 9 gebracht. Der Ansatz wird über Nacht gerührt und am nächsten Tag in einen Dialyseschlauch gefüllt. Das Gemisch wird 14 Tage gegen Millipore-Wasser dialysiert, wobei das Wasser täglich gewechselt wird. Anschließend wird der Inhalt des Schlauchs abzentrifugiert, der Niederschlag in Glasfritten gefüllt und an der Luft getrocknet. Dabei schrumpfen die Proben auf ein Viertel ihrer ursprünglichen Größe. Durch die Wahl der zur Trocknung verwendeten Probengefäße lässt sich die Probengeometrie vorgeben. So können beispielsweise zylindrische Proben hergestellt werden (Abb. 6-12).

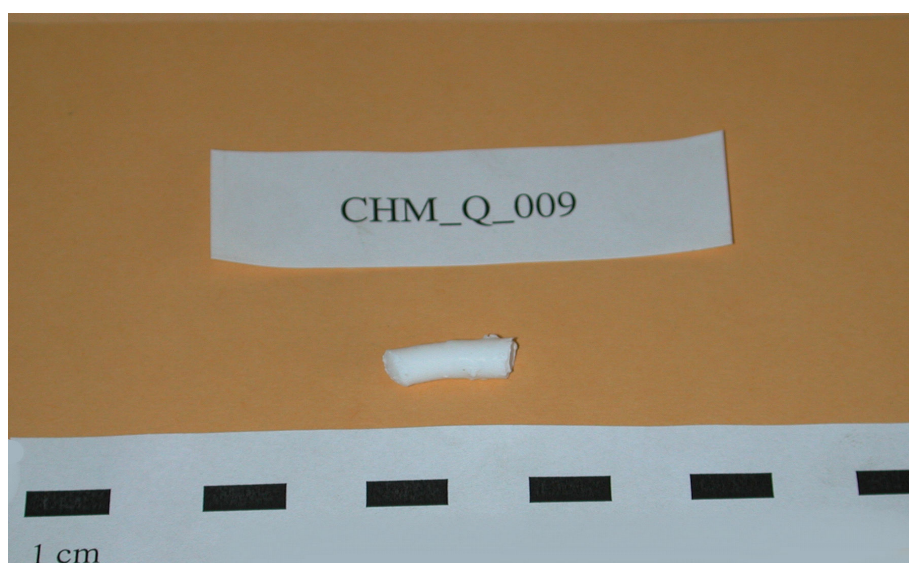


Abb. 6-12. Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposit in zylindrischer Form.



## 6.1.2.2 Charakterisierung

Zunächst werden die IR-Spektren von Polysialinsäure sowie des Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposits vorgestellt und deren wichtigste Schwingungen beschrieben (Abb. 6-13). Die Polysialinsäure weist breite Schwingungen im Bereich von  $3700\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  auf, die O–H-Valenzschwingungen zugeordnet werden können. Die C–H-Valenzschwingungen treten bei  $2929\text{ cm}^{-1}$  und  $2881\text{ cm}^{-1}$  auf. Die breite Bande bei  $1612\text{ cm}^{-1}$  und  $1556\text{ cm}^{-1}$  lässt sich den Deformationsschwingungen I und II der Amidgruppe sowie der antisymmetrische Valenzschwingung der Carboxylatgruppe zuordnen. Bei  $1392\text{ cm}^{-1}$  tritt die symmetrische Valenzschwingung der Carboxylatgruppe auf. Das Chitosan-Hydroxylapatit-Komposit zeigt ebenfalls eine breite Bande im Bereich von  $3700\text{ cm}^{-1}\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ , die auf O–H-Valenzschwingungen zurückzuführen ist. Die C–H-Valenzschwingungen der Polysialinsäure finden sich auch im Kompositmaterial bei  $2927\text{ cm}^{-1}$  wieder. Die symmetrische Valenzschwingung der Carboxylatgruppe tritt bei  $1398\text{ cm}^{-1}$  und die symmetrische O–H-Deformationsschwingung bei  $1373\text{ cm}^{-1}$  auf. Die symmetrische Deformationsschwingung der C–H-Gruppen erscheint im Komposit bei  $1315\text{ cm}^{-1}$ . Schwingungen, die durch die C–O-Valenzschwingungen verursacht werden, sind bei  $1029\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten. Zusätzlich treten im Kompositmaterial noch einige Schwingungen auf, die den Phosphatgruppen des Hydroxylapatits zuzuordnen sind. Die P–O-Valenzschwingungen sind bei  $1047\text{ cm}^{-1}$ ,  $985\text{ cm}^{-1}$ ,  $601\text{ cm}^{-1}$  sowie  $561\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten.

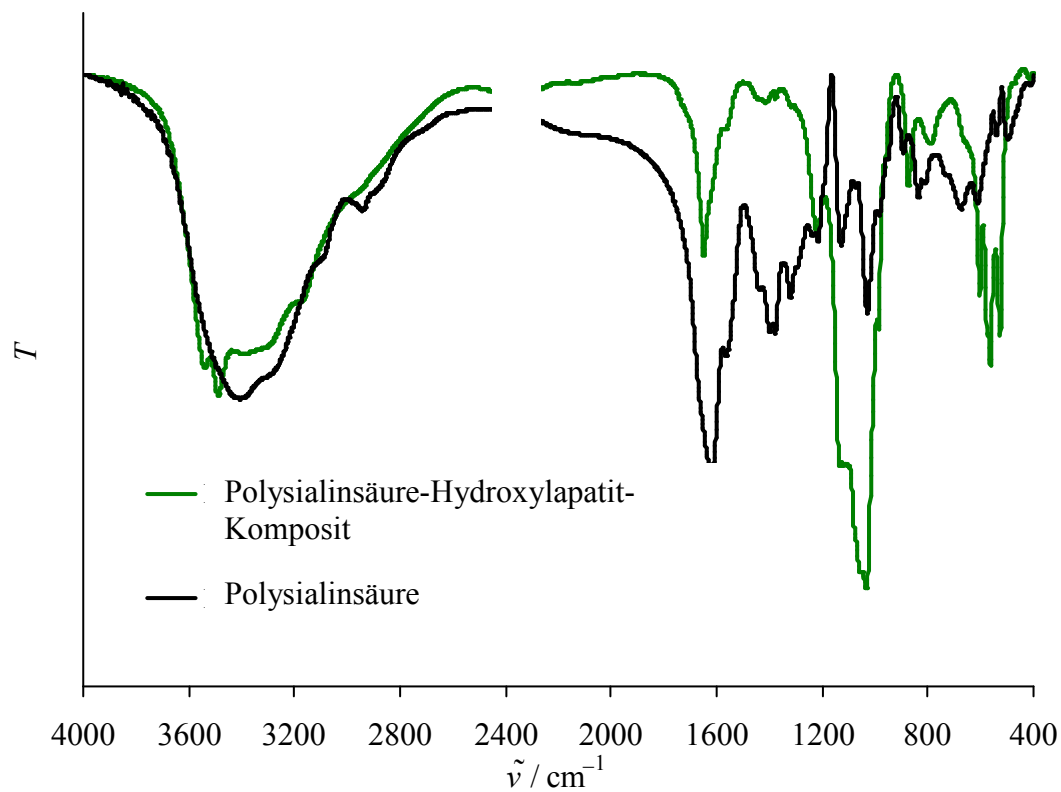


Abb. 6-13. Infrarotspektren des Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposits und der Polysialinsäure.

Es lässt sich also feststellen, dass eine gute Übereinstimmung der Banden des Hydroxylapatit und der Polysialinsäure mit dem vorgestellten Komposit besteht. Beide Komponenten sind im Material vorhanden und rufen die für sie charakteristischen Schwingungen hervor. Eine Übersicht wird in Tabelle 6-4 gegeben.

Tabelle 6-4. Auflistung der für Polysialinsäure und Hydroxylapatit [192] charakteristischen Banden im Vergleich mit dem Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposit (Zuordnung nach [191]).

Polysialinsäure $\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$	Hydroxylapatit $\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$	Polysialinsäure- Hydroxylapatit- Komposit $\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$	Schwingungstyp
3700-3000		3700-3000	O–H-Valenzschwingung
2929, 2881		2927	C–H-Valenzschwingung
1612			N–H-Deformations- schwingung des Amid I
1556			antisymmetrische Valenz- schwingung Carboxylat, N–H-Deformations- schwingung des Amid II
1392		1398	symmetrische Valenz- schwingung Carboxylat
1375		1373	symmetrische O–H- Deformationschwingung
1313		1315	symmetrische C–H- Deformationschwingung
	1046	1047	P–O-Valenzschwingung $\nu_3$
1026		1029	C–O-Valenzschwingung
	962	985	totalsymmetrische P–O- Valenzschwingung $\nu_2$
	601, 571	601, 561	antisymmetrische P–O- Valenzschwingung $\nu_4$

Mit Hilfe der Röntgen-Pulverdiffraktometrie soll die vorliegende kristalline Phase näher bestimmt werden (Abb.6-14).

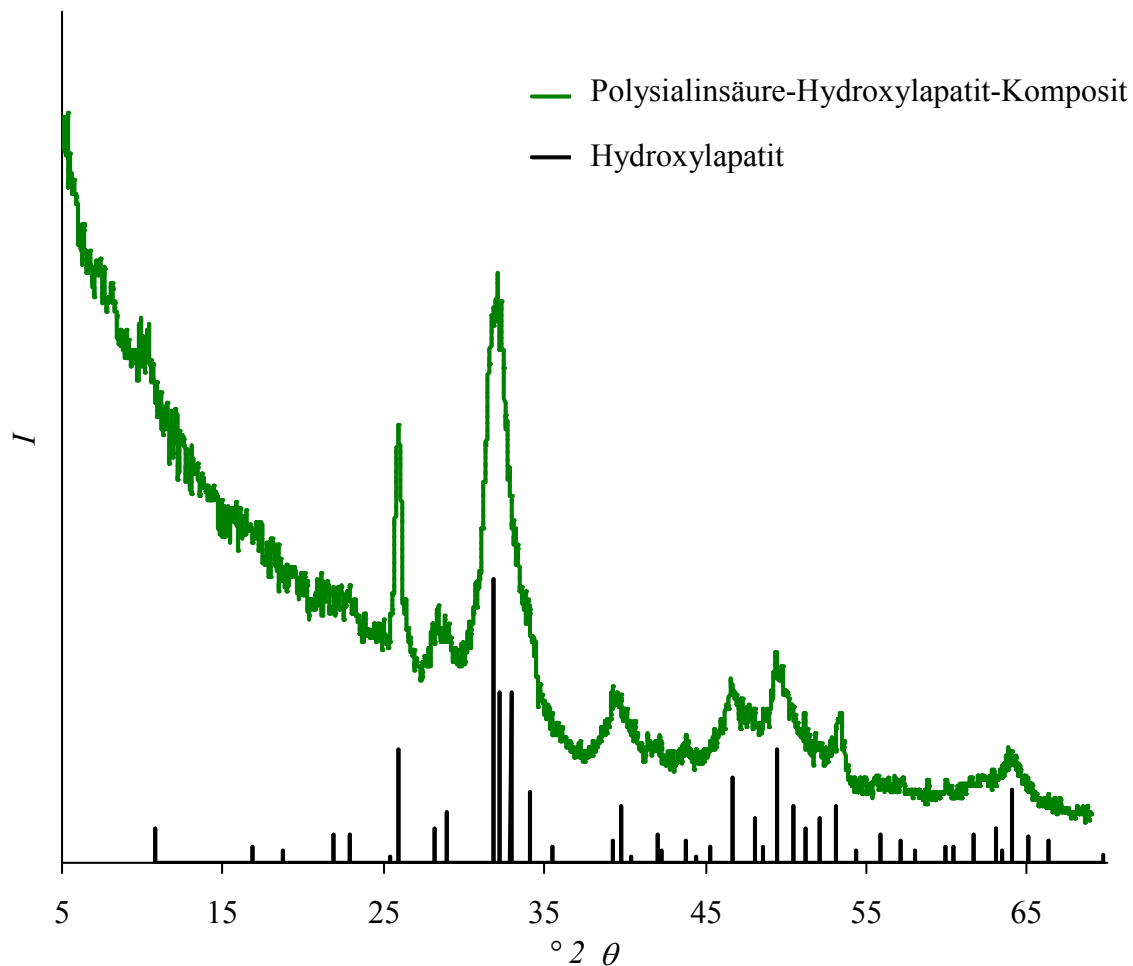


Abb. 6-14. Röntgen-Diffraktogramm eines Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposits. Die Linien geben die Reflexe von Hydroxylapatit wieder (PDF-Karte 9-432 ICDD).

Das in Abb. 6-14 abgebildete Röntgen-Diffraktogramm zeigt ein Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposit mit den für Hydroxylapatit in der Literatur genannten Reflexen. Die auftretenden Reflexe lassen sich sehr gut mit denen des Hydroxylapatits in Einklang bringen. Die Polysialinsäure in diesem Komposit ist röntgenamorph und bringt keine weiteren Reflexe hervor. Die Reflexe der untersuchten Probe sind vergleichsweise breit. Das spricht für nanokristallinen oder stark fehlgeordneten Hydroxylapatit.

Die Thermogravimetrie soll Aufschluss über das Verhältnis von organischem zu anorganischem Anteil im Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposit geben (Abb. 6-15).

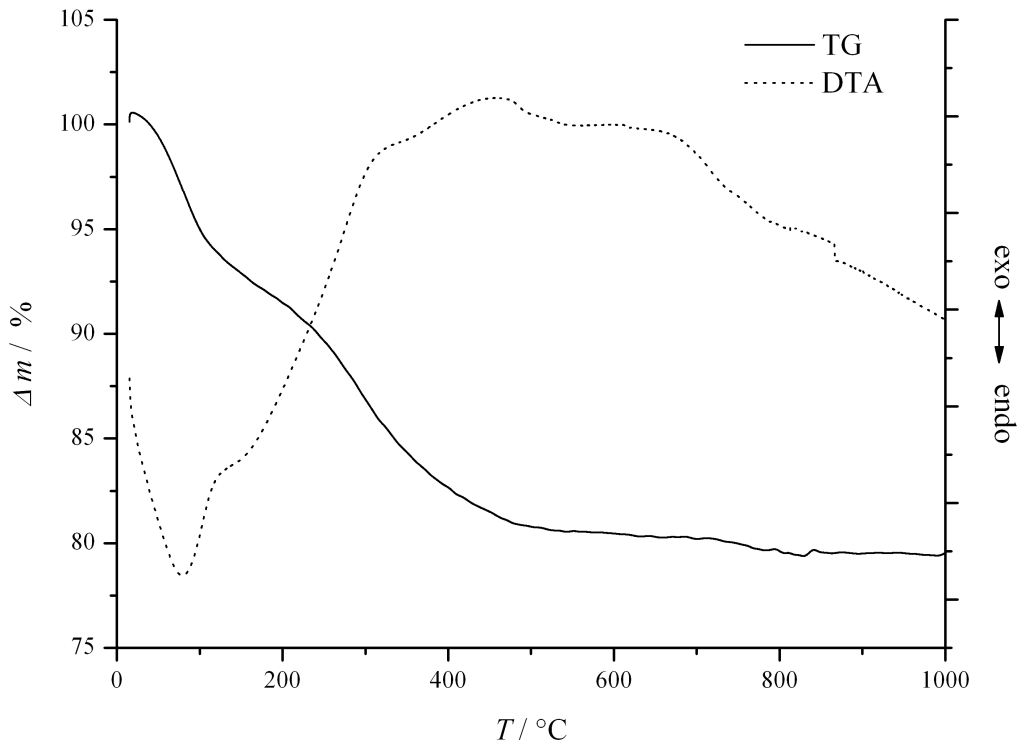


Abb. 6-15. Thermoanalytische Untersuchung des Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposits.

In Abb. 6-15. ist eine thermogravimetrische Messung an einem Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposit dargestellt. Die erste Stufe wurde dem Bereich von 20 °C bis 170 °C zugeordnet. Der Masseverlust in diesem Bereich ist dem Verdampfen von Wasser zugeordnet. Dadurch wurde für die Probe ein Wassergehalt von 7.2 % bestimmt. Zudem konnte aus der verbliebenen Masse das Verhältnis von organischen zu anorganischen Bestandteilen festgestellt werden: Dazu wird eine zweite Stufe dem Bereich von 170 °C bis 500 °C zugeordnet. Der Masseverlust beträgt hier 12.1 %. Das entspricht dem organischen Anteil in der Gesamtprobe. In diesem Bereich ist aber auch schon eine Abspaltung von Wasser aus dem Hydroxylapatit möglich. Als Restmasse verbleiben 79.4 %. Rechnet man nun das in der Probe enthaltene Wasser heraus, so setzt sich das Komposit aus 85 % anorganischen und 15 % organischen Bestandteilen zusammen. Damit ist der organische Anteil im Komposit nur etwa halb so groß wie im natürlichen Knochen.

Die Oberflächenmorphologie und die Partikelgröße lassen sich mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie untersuchen (Abb.6-16).

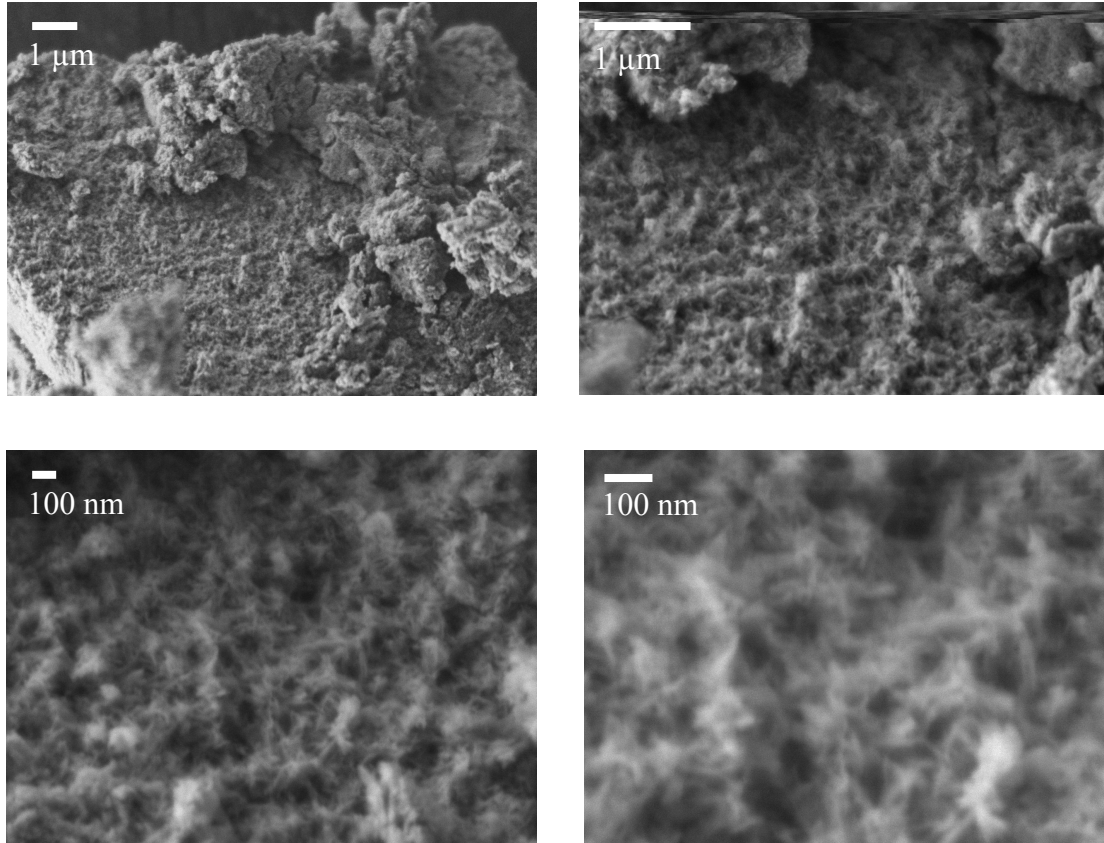


Abb. 6-16. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Polysialinsäure- Hydroxylapatit-Komposits in verschiedenen Vergrößerungen.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen einen homogenen Feststoff. Das Material enthält nanokristallinen Hydroxylapatit. Die einzelnen HAP-Kristallite erscheinen nadelförmig und sind circa 100 nm lang. Die Nanokristallinität des Hydroxylapatits steht im Einklang mit den Ergebnissen aus der Röntgendiffraktometrie. Dort tritt eine Reflexverbreiterung auf, die ebenfalls auf eine Nanokristallinität des Anorganik-Anteils hindeutet. Die Form der Kristalle ist typisch für Hydroxylapatit. Der organische Bestandteil der Probe lässt sich auf den Aufnahmen nur schwer identifizieren. Da es sich dabei um ein vergleichsweise kurzkettiges Polymer handelt, ist zu vermuten, dass dieses im Unterschied zu Chitosan keine Filme oder Schichten ausbildet. In der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme in Abb. 6-17 lassen sich kugelförmige Aggregate erkennen, die wahrscheinlich der Polyialinsäure zuzuordnen

sind. Zudem konnte in Kapitel 4 gezeigt werden, dass eine Salzzugabe, wie sie auch hier bei der Präparation der Proben erfolgt, zu einer Deaggregation führt. Dies sollte weiterhin die Ausbildung größerer zusammenhängender Polymerschichten, die mit dem Rasterelektronenmikroskop zu identifizieren wären, erschweren.

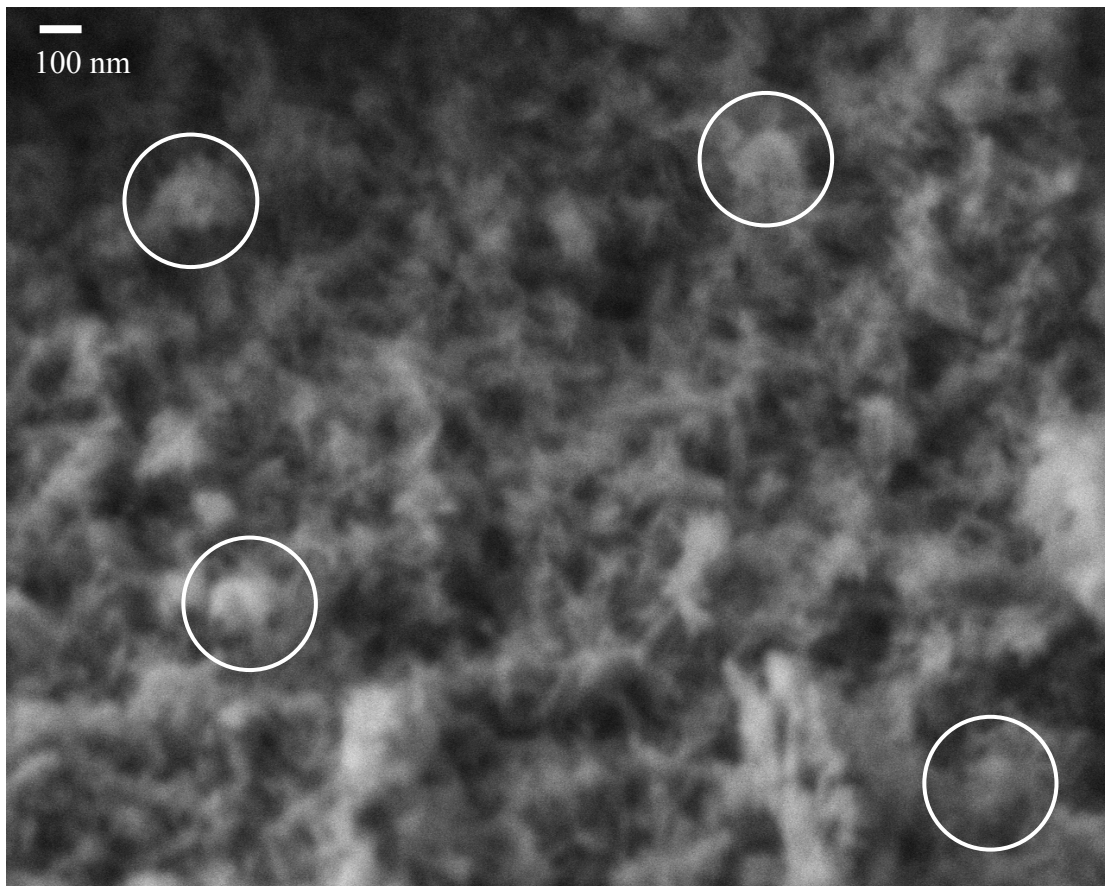


Abb. 6-17. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposits. In den Kreisen werden Polysialinsäurepartikel vermutet.

### 6.1.2.3 Biochemische Abbaubarkeit

Durch das Quervernetzen der Polysialinsäure wurde die Probe chemisch verändert. Um zu prüfen, inwieweit sich das Material noch durch das Enzym Endosialidase abbauen lässt, werden Probenstücke in eine bei pH 7.4 mit Phosphat gepufferte Lösung mit Endosialidase gegeben. Die Endosialidase stammt aus dem *E. coli* K1 infizierenden Phagen  $\Phi$ K1F. Als Vergleich wurde eine Probe in die reine Pufferlösung gegeben. Zudem wurde eine Endosialidasemutante eingesetzt:  $\Delta N245$ -endoNF-Ser911Ala. Dabei

handelt es sich um eine N-terminal um 245 Aminosäuren verkürzte Mutante, deren Serin an Position 911 durch ein Alanin ersetzt wurde.

Eine Möglichkeit zur Messung der freien reduzierbaren Enden der Polysialinsäure ist der Thiobarbitursäure-Assay (TBA-Assay). Dieser Assay wurde schon im Kapitel 5 beschrieben. Hier soll er nun verwandt werden, um die Möglichkeit des Abbaus der Komposite mit Endosialidase zu beurteilen, denn der Abbau sollte zu einem starken Zuwachs der freien reduzierbaren Enden führen. Der enzymatische Abbau wurde von David Schwarzer an der Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Gerardy-Schahn durchgeführt.

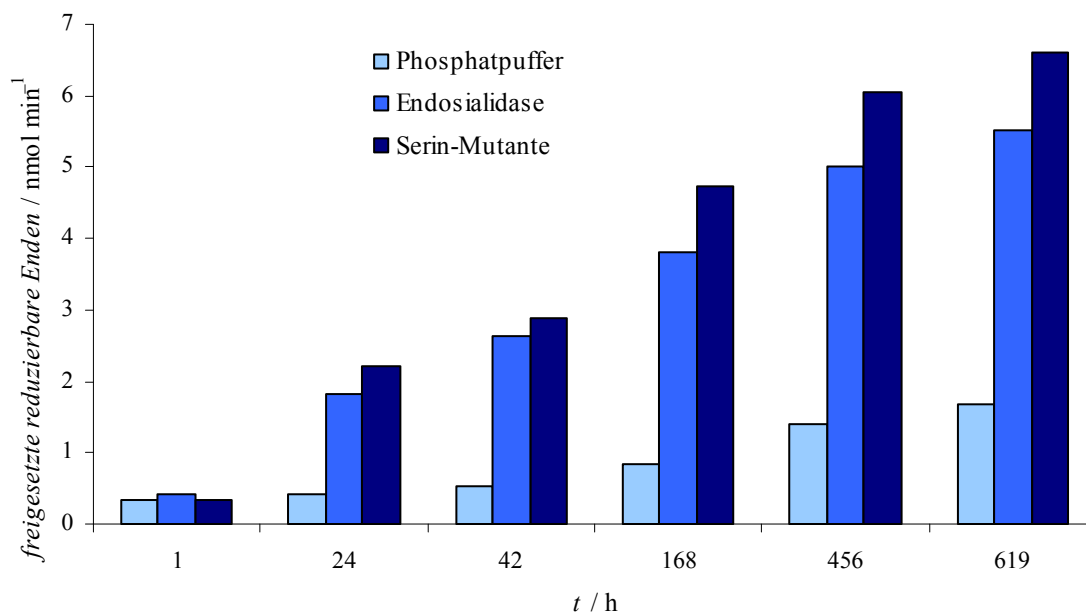


Abb. 6-18. Mit Hilfe des TBA-Assays ermittelte Aktivität von Endosialidase in Bezug auf den Abbau von Polysialinsäure aus quervernetzten Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen.

Die Aktivitätstests zeigen, dass alle drei Proben abgebaut werden (Abb. 6-18). Auch bei der Blindprobe mit der phosphatgepufferten Lösung ist ein – wenn auch geringer – Abbau feststellbar. Somit ist das Material offensichtlich nicht vollständig hydrolysestabil. Eine mögliche Erklärung ist die Autoprotolyse von Polysialinsäure. Die Gegenwart von Hydroxylapatit könnte diesen Prozess noch beschleunigen. Zudem wurde eine wachsende Instabilität der Polysialinsäure mit zunehmender Kettenlänge beschrieben [99]. Der Einfluss des Quervernetzens auf die Stabilität der Polysialinsäure ist ungewiss. Im Vergleich zur Probe in Pufferlösung werden die beiden mit Enzymen versetzten Proben deutlich schneller abgebaut. Die  $\Delta N245$ -endoNF-Ser911Ala Mutante



ist dabei noch aktiver als der Wildtyp. Während des Versuchs bildete sich am Boden ein weißer feinteiliger Niederschlag aus (siehe Abb. 6-19), der vermutlich auf aus dem Kompositverbund herausgelösten Hydroxylapatit zurückzuführen ist. Durch den Abbau der Polysialinsäure ‚fallen‘ die Hydroxylapatitkriställchen aus der Matrix heraus und sinken zu Boden.

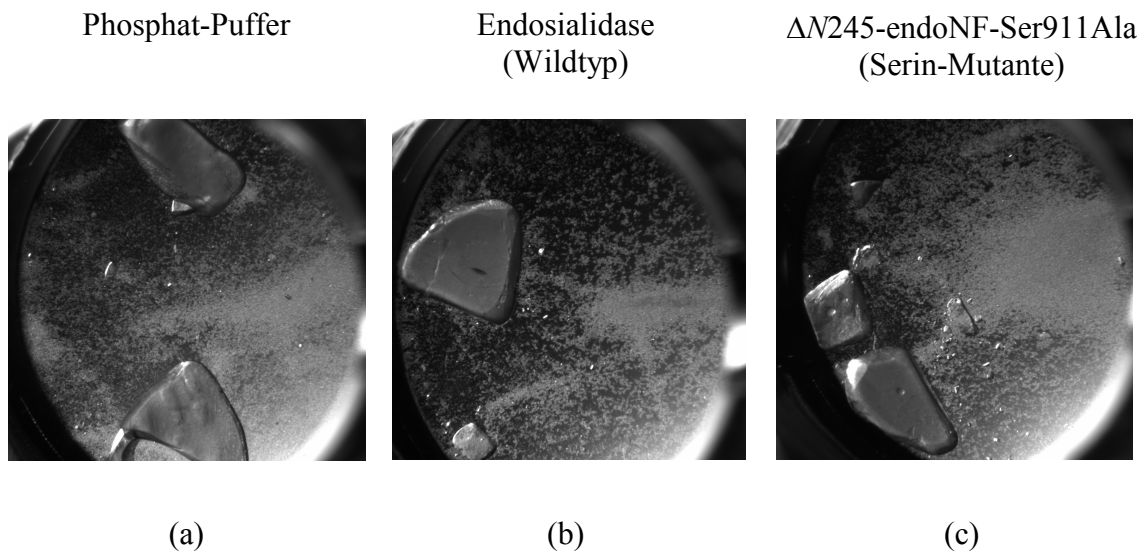
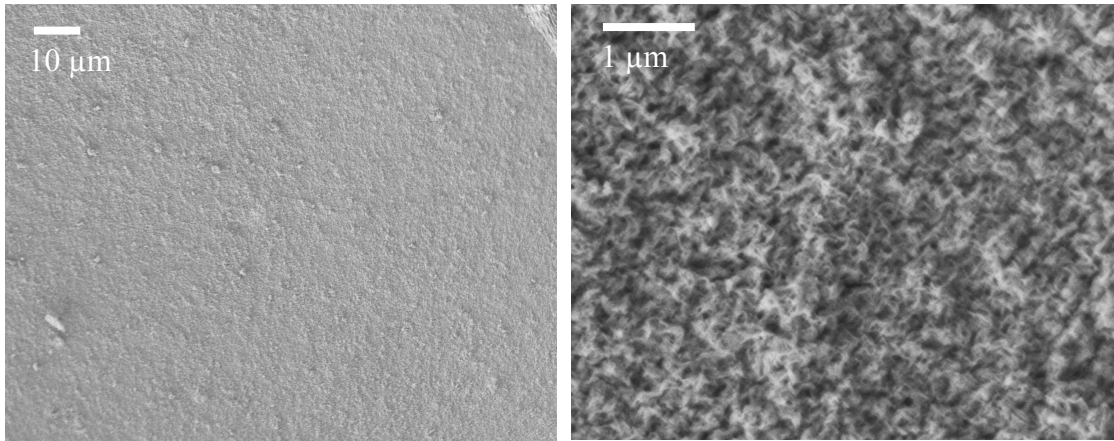


Abb. 6-19. Photographie von Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen nach 28 d in:  
(a) Phosphatpufferlösung, (b) Endosialidase in Phosphatpufferlösung und  
(c)  $\Delta N245$ -endoNF-Ser911Ala Mutante in Phosphatpufferlösung.

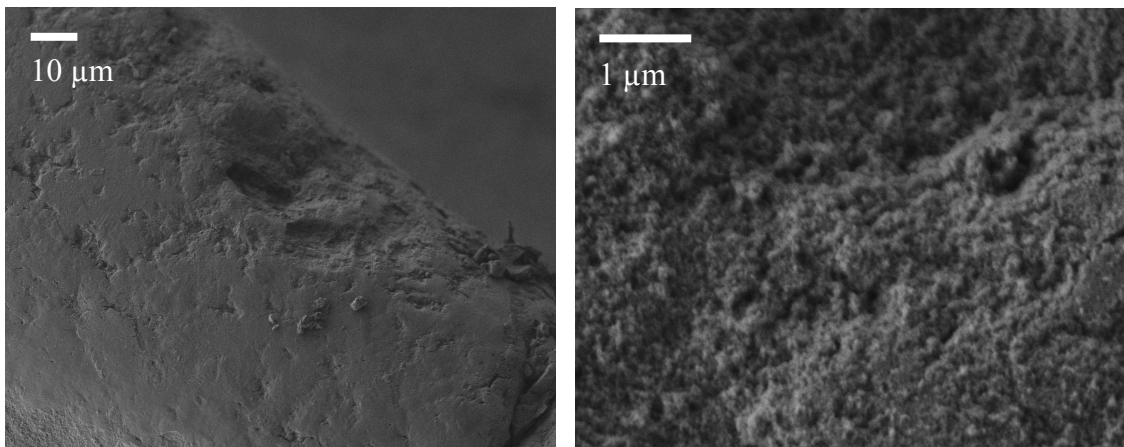
Die der  $\Delta N245$ -endoNF-Ser911Ala Mutante ausgesetzte Probe und die in Phosphatpuffer gelagerte Probe wurden getrocknet und anschließend im Rasterelektronenmikroskop untersucht (Abb. 6-20). Es konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Im Vergleich zum unbehandelten Komposit fällt hingegen auf, dass die Oberflächenstrukturen der beiden behandelten Proben insgesamt runder erscheinen. Dies ist vermutlich auf den Abbauprozess zurückzuführen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die enzymatische Abbaubarkeit der Polysialinsäure auch im quervernetzten Kompositmaterial erhalten werden konnte. Das Material ist allerdings nicht zu 100 % wasserstabil. Das ist möglicherweise auf eine Autoprotolyse der Polysialinsäure zurückzuführen. Das Material quillt in Kontakt mit Wasser stark auf. Durch die dabei entstehenden Spannungen bilden sich Risse. Diese beiden Eigenschaften sind für ein potentielles Implantatmaterial nicht wünschenswert. Durch

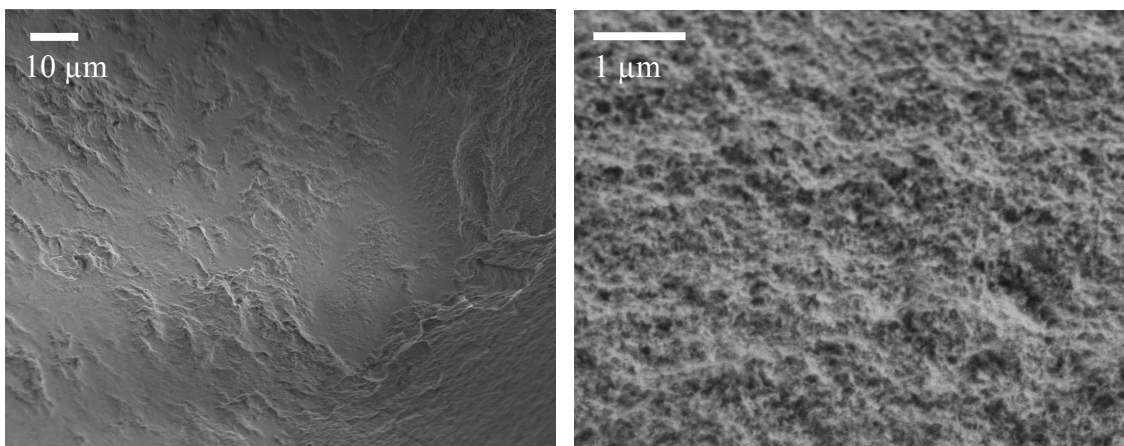
das Aufquellen im Körper ist es möglich, dass das Material von seiner vorgesehenen Position abweicht oder Druck auf das umgebende Gewebe ausübt. Zudem werden sich die mechanischen Eigenschaften eines solchen hydrogelartigen Komposits deutlich von denen eines kompakten Komposits unterscheiden. Ein Einsatz an mechanisch belasteten Stellen im Knochen ist somit nicht möglich.



(a)



(b)



(c)

Abb. 6-20. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an einem enzymatisch abgebauten Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposit (c) im Vergleich mit einer unbehandelten (a) sowie einer in Phosphatpufferlösung gelagerten Probe (b).

#### 6.1.2.4 Cytotoxizität

Um die Cytotoxizität der Proben zu prüfen, wird etwas Komposit in eine Zellkulturplatte gegeben und der Behälter mit Zellkulturmedium aufgefüllt. Zum Vergleich wird das Zellkulturmedium ohne Probe herangezogen. Als Zellen wurden immortalisierte Schwann-Zellen aus neonatalen Ratten verwandt. Um die Viabilität der Zellen zu prüfen, wird alle zwei Tage eine Probe des Zellkulturmediums entnommen. Diese Proben werden mit dem gelben MTT-Reagenz (3-(4,5-Ddimethyldiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid) versetzt. Leben die Zellen, wird das Reagenz in den blauen Formazan-Komplex umgesetzt. Dieser kann anschließend photometrisch quantifiziert und auf diese Weise die Viabilität und Anzahl der Zellen bestimmt werden. Die Tests fanden am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover statt und wurden von Yvonne Stark und Stephanie Bruns durchgeführt.

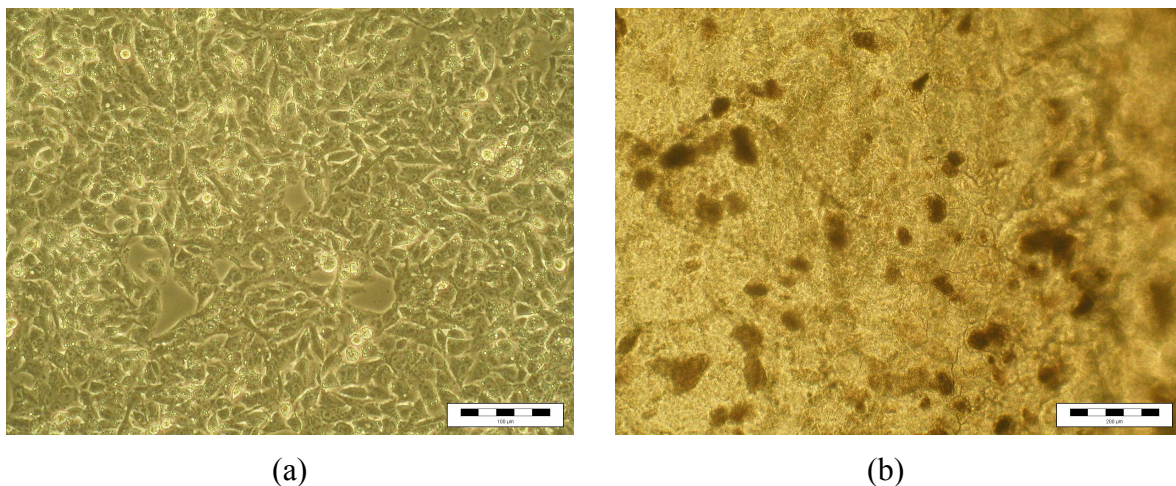


Abb. 6-21. Lichtmikroskopische Aufnahmen von (a) immortalisierten Schwann-Zellen im Kulturmedium und (b) im Kulturmedium der Zellkultur mit dem Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposit. Die Zellen befinden sich am Boden der Zellkulturplatte.

In Abb. 6-21 (a) ist eine gesunde Kultur von Schwann-Zellen zu sehen. Die Zellen bilden einen dichten Teppich, der sich am Boden des Gefäßes befindet. Im Vergleich dazu sind die Zellen, die sich in einem Probengefäß mit dem Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposit befinden, eher kugelförmig (dunkle Kreise in Abb. 6-21 (b)) und bilden kleine Zellhaufen aus, anstatt sich zu spreiten. Das deutet darauf hin, dass die Gegenwart des Komposits die Zellen beeinträchtigt. Hierbei ist auch zu

berücksichtigen, dass Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposite im Hinblick auf die Verwendung als Knochenersatzmaterial entwickelt wurden. Mit einer Osteoblastenkultur würden sich eventuell bessere Ergebnisse erzielen lassen. Allerdings sterben die Zellen auch nicht ab, was zeigt, dass das vorliegende Material generell nicht cytotoxisch ist. Die in Abb. 6-22 dargestellten Ergebnisse des MTT-Tests zeigen aber, dass das Komposit nicht toxisch ist. Im Vergleich zum reinen Zellkulturmedium zeigt sich eine nur geringfügig erniedrigte Viabilität. Das ist eventuell darauf zurückzuführen, dass die eingesetzten Zellen nicht den Zellenarten entsprechen, die der Probe als Osteosynthesematerial ausgesetzt sein würden.

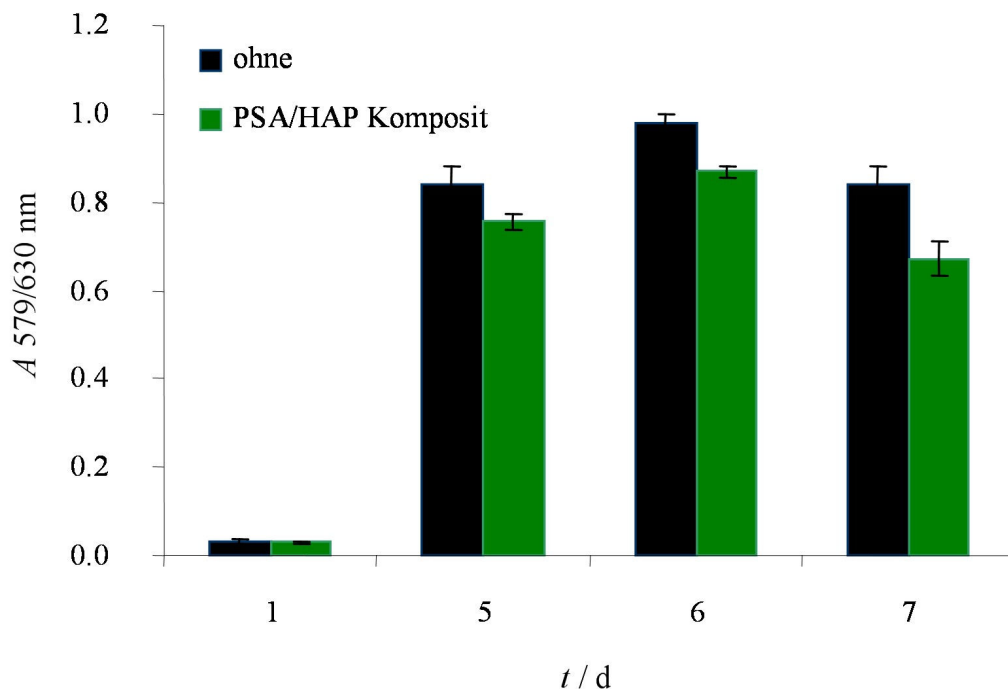


Abb. 6-22. Ergebnisse des MTT-Tests zur Viabilität von Schwann-Zellen in Abwesenheit und in Gegenwart eines Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposits.

Eine direkte Besiedelung des Materials mit Zellen war nicht möglich, da diese nicht auf der sehr glatten, hydrogelartigen Oberfläche des aufgequollenen Komposits adhären konnten.

## 6.1.2.2 Mechanische Prüfung

Um das Material auf seine mechanische Belastbarkeit zu testen, wurde es einer Druckprüfung unterzogen (Abb. 6-23). Dazu wurde die Probe in eine zylindrische Form gebracht und in eine Universalprüfmaschine eingebracht. Des Weiteren wurde die Probe im  $\mu$ -CT vermessen. Die Messungen fanden am Institut für Werkstoffkunde der Universität Hannover unter Mithilfe von Herrn Dipl.-Ing. Christian Klose und Herrn Dr.-Ing. Dirk Bormann statt.

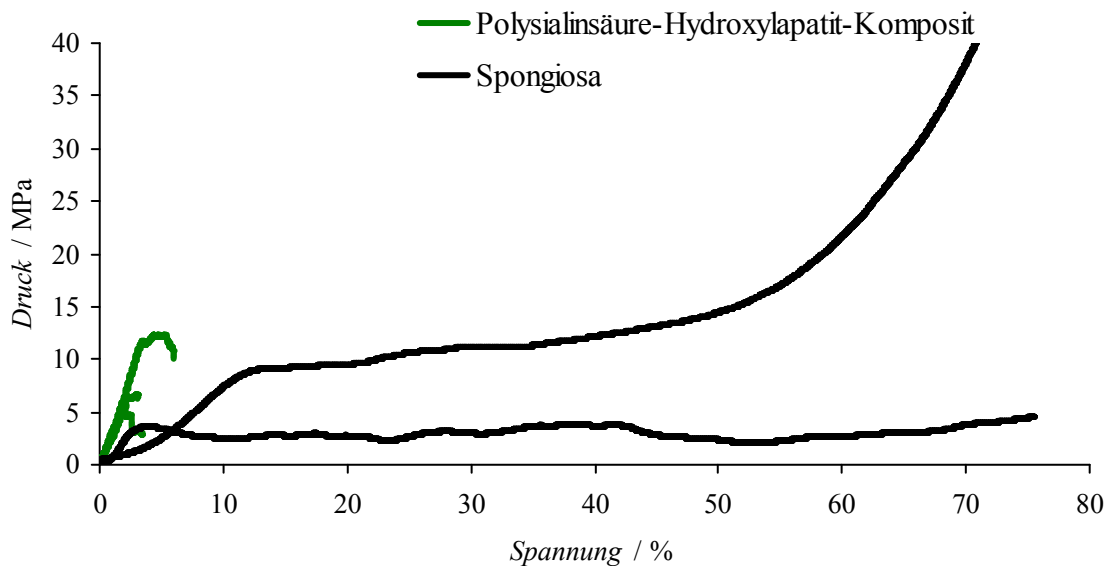


Abb. 6-23. Druckprüfung des Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposits im Vergleich mit Spongiosa.

Das Druck-Spannungsdiagramm in Abb. 6-23. zeigt das Verhalten des Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposits im Vergleich zu Spongiosa. Dabei fällt ins Auge, dass das Komposit schon bei relativ geringen Belastungen (5-10 MPa) zerbricht. Dies ist vermutlich auf die unzureichenden Polymereigenschaften der Polysialinsäure zurückzuführen. Die Kettenlänge ist mit 100 Monomereinheiten zu gering, um eine ausreichende Elastizität des Komposits zu gewährleisten. Das Quervernetzen der Polysialinsäure führt auch zu einer Erhöhung der Steifigkeit. Eine Erhöhung des Polymerisationsgrades könnte zur Lösung des Problems beitragen. Dem steht jedoch die Neigung der Polysialinsäure entgegen, sich mit steigenden Kettenlängen autoprotolytisch zu zersetzen. Zudem gibt es im Moment kein Verfahren zur Herstellung von Polysialinsäureketten, die länger als 400 Monomereinheiten sind. Für

eine signifikante Änderung der Materialeigenschaften wäre aber eine mindestens tausendmal längere Kette erforderlich. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die schlechten mechanischen Eigenschaften ist die Bildung von kugelförmigen Polysialinsäurepartikeln. Darauf deuten die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen hin. Diese würden, anders als das die anorganischen Nanopartikel verbindende Chitosan, keinen Beitrag zur mechanischen Stabilität leisten.

Mit Hilfe der  $\mu$ -CT lässt sich der innere Aufbau von Proben beurteilen. Die  $\mu$ -CT-Aufnahmen in Abb. 6-24 zeigen, dass es sich um ein homogenes, kompaktes Material handelt. Es sind nur vereinzelt Poren zu erkennen. Diese sind vermutlich auf den Trocknungsprozess zurückzuführen. Auf den Aufnahmen sind keine Röntgenkontrastunterschiede zu erkennen. Die beiden Komponenten des Komposits sind demzufolge sehr homogen verteilt. Diese Beobachtung wird auch von den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen gestützt.

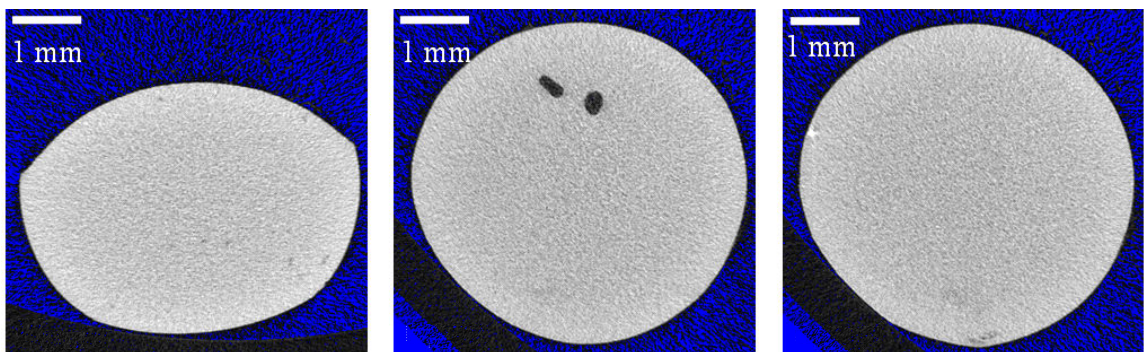


Abb. 6-24.  $\mu$ -CT-Aufnahmen von Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen.

### 6.1.3 Diskussion der Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposite im Vergleich mit Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen

Im Folgenden sollen die Eigenschaften der beiden in den vorangegangenen Abschnitten vorgestellten Komposite diskutiert und miteinander verglichen werden.

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels konnte gezeigt werden, dass es nach der Synthesevorschrift von *Krueger* gelingt, Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite herzustellen. Dabei lässt sich das Chitosan/Hydroxylapatit-Verhältnis variieren und es lassen sich Chitosane mit unterschiedlichem Polymerisationsgrad einsetzen. Solche Komposite wurden mit Hilfe einer Druckprüfung auf ihre mechanische Belastbarkeit hin untersucht. Die gemessenen Druckfestigkeiten für die Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite der Zusammensetzung CHI/HAP 35/65 und 52/48 liegen in einem ähnlichen Bereich wie die von *Li et al* beschriebenen Druckfestigkeiten [141]. Nur die Druckfestigkeiten der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite der Zusammensetzung CHI/HAP 65/35 liegen im Vergleich deutlich unter den von *Li et al* beschriebenen Werten. Inwieweit das auf den Polymerisationsgrad des Chitosans zurückzuführen ist, muss noch überprüft werden. Darüber hinaus können auch Inhomogenitäten der Proben niedrigere Druckfestigkeiten verursachen. Zumindest die Werte von Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen mit einem Chitosan/Hydroxylapatit-Verhältnis von 35/65 liegen im Bereich der Druckfestigkeiten des natürlichen Knochens. Weiterhin wurde der Aufbau der Probe mit Hilfe der hochauflösenden Rasterelektronenmikroskopie beurteilt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Größe der Hydroxylapatitkristallite etwa im Bereich von 100 nm liegt. Damit sind sie etwas größer als die von *Rusu* beschriebenen Kristalle und auch größer als die Hydroxylapatitkristalle im natürlichen Knochen [8] [16]. Dennoch ist zu vermuten, dass dieser nanokristalline Hydroxylapatit noch ausreichend klein ist, um vom Körper resorbiert zu werden. Demzufolge könnte auf diese Weise ein biodegradierbares Implantatmaterial hergestellt werden.

In Hinblick auf die Anwendbarkeit als biodegradierbares Implantat ist der Umstand von Nachteil, dass sich die Abbaubarkeit nur indirekt über den Deacetylierungsgrad des Chitosans steuern lässt [53]. Stattdessen wäre eine direkte Kontrolle der Abbauraten wünschenswert.

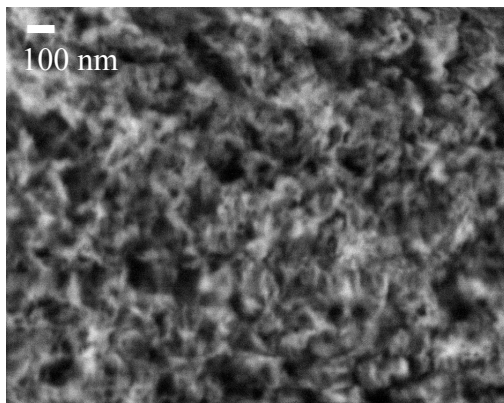
In einem weiteren Abschnitt wurde die Herstellung und Charakterisierung eines Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposits vorgestellt. Durch das Quervernetzen des Polymers gelang es, ein schwerlösliches Kompositmaterial mit einem



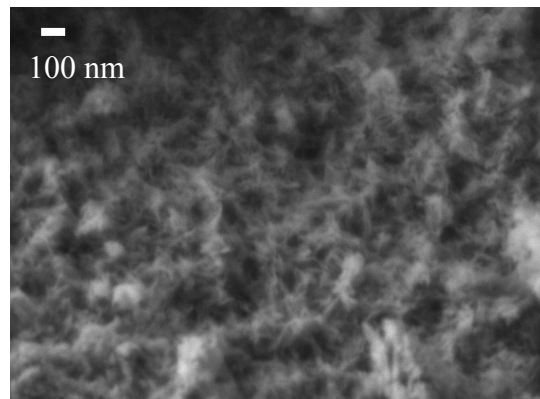
Polysialinsäure/Hydroxylapatit-Verhältnis von 15/85 herzustellen. Das Material ist homogen. Der im Material enthaltene Hydroxylapatit ist, wie rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen und die Röntgen-Pulverdiffraktometrie zeigen, nanokristallin. Dieses ist, wie oben schon erwähnt, eine für ein bioresorbierbares Implantatmaterial wünschenswerte Eigenschaft, da nanokristalliner Apatit von Osteoclasten abgebaut und an seiner Stelle von Osteoblasten natürlicher Knochen wieder aufgebaut werden kann [135]. Ein weiterer Vorteil von Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen ist in der enzymatischen Abbaubarkeit der Polysialinsäure zu sehen. Es konnte gezeigt werden, dass diese auch nach dem Quervernetzen erhalten bleibt. Allerdings zeigten die Versuche auch bei jenen Materialien, die nur phosphathaltiger Pufferlösung ausgesetzt waren, einen geringen Abbau. Das kann auf eine Autoprotolyse der Polysialinsäure zurückgeführt werden [99]. Die Proben sind nicht cytotoxisch. Es wäre aber interessant, zur besseren Beurteilung die Versuche mit Osteoblasten zu wiederholen. Das starke Quellen der Probe stellt für den Einsatz als Implantatmaterial im Körper ein generelles Problem dar. Dieses Verhalten kann zu einer Dislokation des Implantats führen. Außerdem besitzen solche hydrogelartigen Materialien nur unzureichende mechanische Eigenschaften und können daher nicht an mechanisch belasteten Stellen eingesetzt werden. Die mechanischen Messungen zeigen, dass es sich bei den Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen um ein sehr sprödes Material handelt, das schon bei geringen mechanischen Belastungen zerspringt. Diese Materialeigenschaft ist zum einen auf das mit 100 Monomereinheiten sehr kurzkettige Polymer und zum anderen auf die zusätzliche Erhöhung der Steifigkeit in Folge des Quervernetzens der Polysialinsäure zurückzuführen. Eine Vervielfachung der Kettenlänge könnte Abhilfe schaffen. Diese ist jedoch schwer zu realisieren, da sich Polysialinsäure mit steigenden Kettenlängen autoprotolytisch zersetzt. Zudem ist bislang kein Verfahren zur Herstellung von längererkettiger Polysialinsäure bekannt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposite einige vielversprechende Eigenschaften aufweisen, ihr Aufquellen sowie ihre mechanischen Eigenschaften ihren Einsatz als Knochenersatzmaterial jedoch unwahrscheinlich erscheinen lassen.

Beim Vergleich der beiden diskutierten Komposite lassen sich unter dem Rasterelektronenmikroskop nur geringe Unterschiede bei den Hydroxylapatit-Kristalliten feststellen. In Abb. 6-25. sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der beiden Komposite bei starken Vergrößerungen zu sehen. In beiden Fällen lässt sich

nanokristalliner Hydroxylapatit identifizieren. Im Falle von Chitosan scheinen die Hydroxylapatit-Kristallite eher blättchenförmig und die Hydroxylapatit-Kristallite in Gegenwart von Polysialinsäure eher nadelförmig zu sein. Die Art des verwendeten Polysaccharids scheint einen gewissen Einfluss auf die Morphologie der Kristalle zu haben. Dabei scheint Polysialinsäure einen geringeren Einfluss auf die Morphologie der Hydroxylapatit-Kristallite zu haben.



(a)



(b)

Abb. 6-25. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von (a) Chitosan- und (b) Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen.

Die Reflexbreiten des Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposits in den Röntgen-Pulverdiffraktogrammen sind mit denen der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite vergleichbar (Abb. 6-26). Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 6-25) zeigen, dass die Abmessungen der Kristallite in einer ähnlichen Größenordnung liegen. So lassen sich auch anhand der Röntgen-Pulverdiffraktogramme kaum Unterschiede auszumachen.

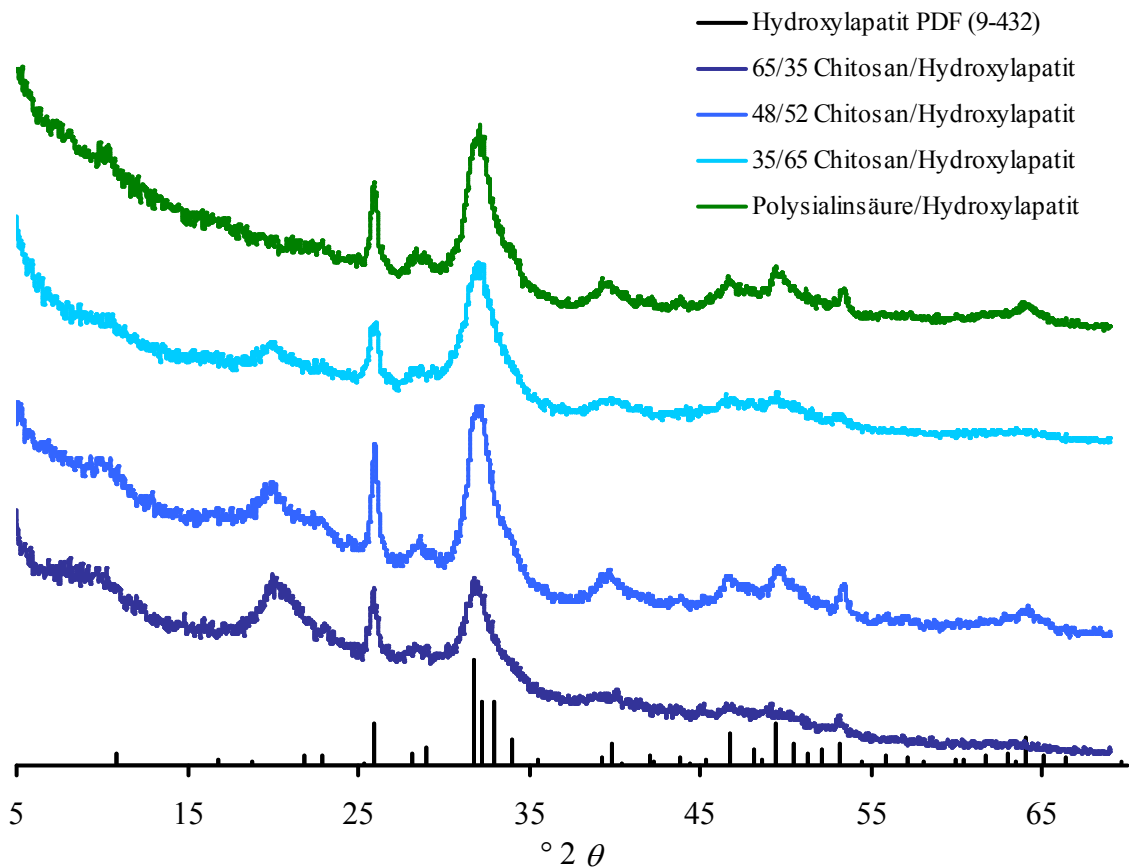


Abb. 6-26. Röntgen-Pulverdiffraktogramme von Chitosan- und Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen.

Bei Vergleich der Abbaubarkeit der Materialien besitzen die Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposite einen entscheidenden Vorteil: Ihr Abbau lässt sich durch die Zugabe von Endosialidase kontrollieren. Allerdings scheint das hier vorgestellte Material einem Autoprotolysemechanismus zu unterliegen, so dass der Vorteil der kontrollierten Abbaubarkeit hier nur bedingt zum Tragen kommt. Bei den Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen lässt sich die Abbaugeschwindigkeit im Körper nur indirekt über den Deacetylierungsgrad des Chitosans kontrollieren.

Ein deutlicher Nachteil der Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposite ist in ihren schlechten mechanischen Eigenschaften zu sehen (Abb. 6-27). Das frühe mechanische Versagen des Materials schließt einen Einsatz als Implantat aus. Im Vergleich dazu verfügen die Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite über mechanische

Eigenschaften, die denen des natürlichen Knochens ähneln. Das ist eine wünschenswerte Eigenschaft für Implantatmaterialien.

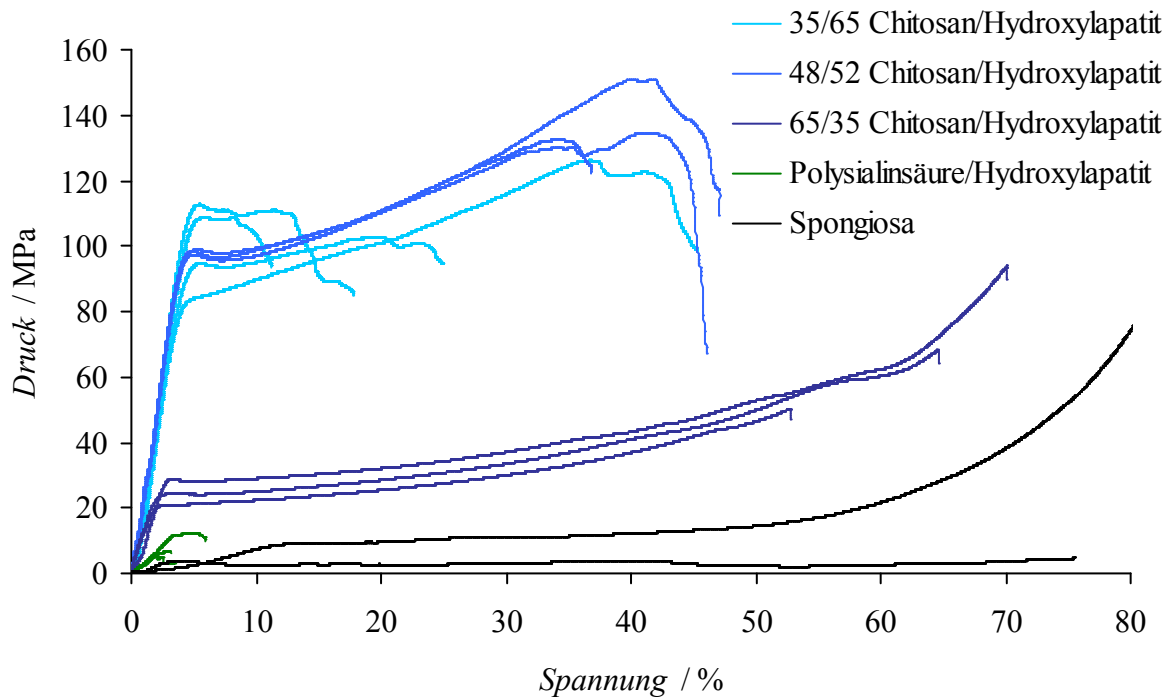


Abb. 6-27. Druckprüfung der durch Co-Präzipitation hergestellten Komposite mit Chitosan (Acros) und Polysialinsäure.

Die Beobachtungen zur mechanischen Stabilität der Proben lassen sich auch anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen nachvollziehen. Dabei soll nun ein besonderes Augenmerk auf dem Polymeranteil der Probe liegen. In Abb. 6-28 sind noch einmal beide Proben im Vergleich zu sehen. Dabei ist zu beobachten, dass das Chitosan die Hydroxylapatit-Kristallite einbettend umgibt. Dadurch besitzen die Komposite die gewünschte Elastizität. Anders liegt der Fall bei den Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen. Wie schon in Kapitel 4 gezeigt werden konnte, neigt Polysialinsäure in salzhaltigen Lösungen nicht zur Ausbildung von Netzwerken, sondern liegt eher in isolierten als geknäuelten Polymerketten vor. Das scheint auch innerhalb des Komposits der Fall zu sein. Die Polysialinsäure trägt dadurch nicht zur Erhöhung der Elastizität bei. Das Material bleibt sehr spröde. Ob ein höherer Polymerisationsgrad der Polysialinsäure diesen Umstand verbessern würde, bleibt noch zu überprüfen.

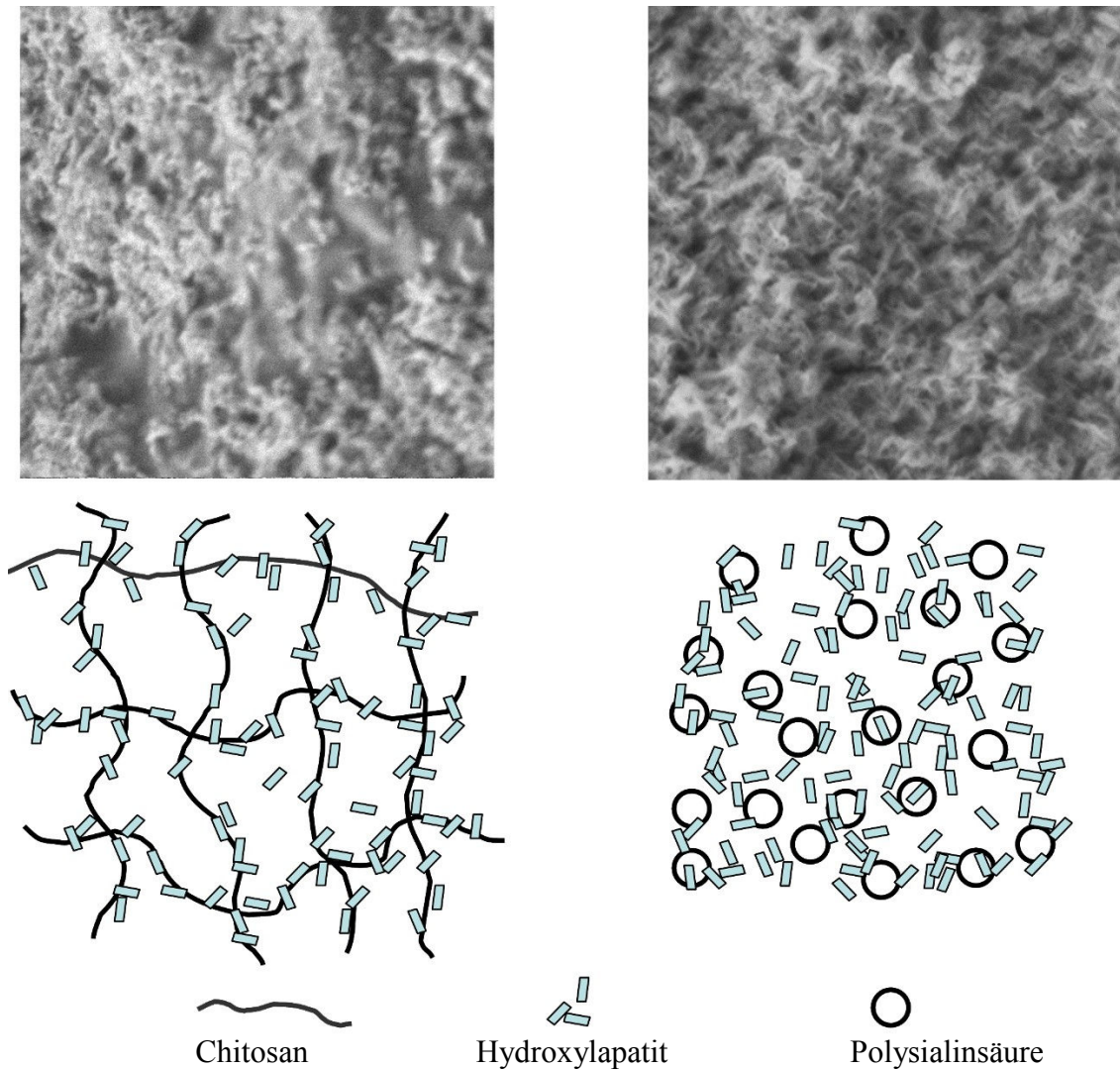


Abb. 6-28. Modell des inneren Aufbaus der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite (links) und der Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposite (rechts) im Vergleich mit den entsprechenden rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich die Abbaubarkeit von Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen im Vergleich zu Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen zwar deutlich besser steuern lässt, letztere jedoch über erheblich bessere mechanischen Eigenschaften verfügen.

## 6.2 Hydrogele

Die Polysialinsäure-Hydrogele wurden von Silke Berski am Institut für organische Chemie der Universität Hannover hergestellt. Dazu wurde die Polysialinsäure mit Diepoxyoctan verlinkt, um ein wasserbeständiges Gel zu erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit sollten diese Gele mineralisiert werden. Um eine Mineralisation zu erreichen, wurden zwei Strategien verfolgt: Zum einen wurde das Hydrogel simulierter Körperflüssigkeit (SBF) ausgesetzt, die den Ionengehalt des Blutes widerspiegeln soll. Zum anderen sollte das Gel in einer Präzipitationsanlage mineralisiert werden. Die Ergebnisse der beiden Ansätze werden im Folgenden gemeinsam diskutiert.

### 6.2.1 Mineralisation von Polysialinsäure-Hydrogelen in simulierter Körperflüssigkeit

Die Verwendung von simulierter Körperflüssigkeit zur Abscheidung von Hydroxylapatit ist in der Literatur bereits beschrieben worden [7, 193, 194]. Dieses Verfahren soll nun auf das Polysialinsäurehydrogel übertragen werden.

#### 6.2.1.1 Versuchsdurchführung

Die SBF wird wie folgt hergestellt:

In einen Erlenmeyerkolben 250 mL deionisiertes Wasser füllen. Darin werden nacheinander 3.9909 g Natriumchlorid, 0.1770 g Natriumhydrogencarbonat, 0.1132 g Kaliumchlorid, 0.1141 g Dikaliumhydrogenphosphat Tetrahydrat sowie 0.1527 g Magnesiumchlorid Hexahydrat gelöst. Die Lösung hat nun einen pH-Wert von 7.95. Anschließend werden 15 mL 0.01 M Salzsäure zugegeben. Dadurch sinkt der pH-Wert auf 7.44 ab. Die Lösung wird auf 30 °C erwärmt. Nacheinander werden dann 0.1870 g Calciumchlorid-Dihydrat, 0.3530 g Natriumsulfat und 3.0302 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan gelöst. Bei der Zugabe der letzten Substanz wird die Lösung trübe, sie hat dann einen pH-Wert von etwa 9.3. Anschließend werden 10 mL 2 M Salzsäure

zugegeben. Die Lösung wird oberhalb von pH 7.45 wieder klar. Man lässt die Lösung für weitere 5 min rühren. Dann wird sie in einem Messkolben auf 500 mL aufgefüllt. Das Hydrogel wird in simulierte Körperflüssigkeit (SBF) gegeben und dort 14 Tage belassen. Anschließend wird die Probe gefriergetrocknet. Da die SBF in Bezug auf Calciumphosphatlösung übersättigt ist, war zu erwarten, dass das Hydrogel mineralisiert wird.

#### 6.2.1.2 Charakterisierung der Hydrogele

Die Mineralisierung der Proben wurde mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie beurteilt. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 6-29 zeigen, dass durch die Gefriertrocknung eine poröse Struktur erhalten werden konnte. Auf der Oberfläche des Hydrogels sind lediglich geringe Abscheidungen von anorganischem Material zu beobachten. Die Abscheidungen haben eine wurmartige Struktur. Die Morphologie der Abscheidung stimmt nicht mit den von *Krueger* beschriebenen Abscheidungen von Hydroxylapatit aus SBF auf amorphen Siliciumdioxid überein [7]. Eine Identifizierung der Phase konnte nicht erfolgen. Die Probe war röntgenamorph, was vermutlich auf die geringe Menge an Abscheidungen zurückzuführen ist.

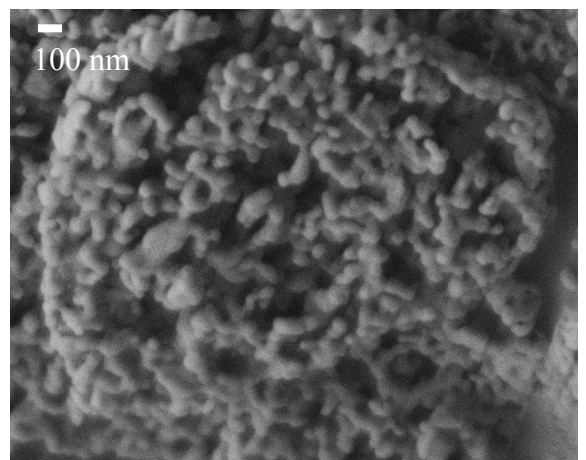
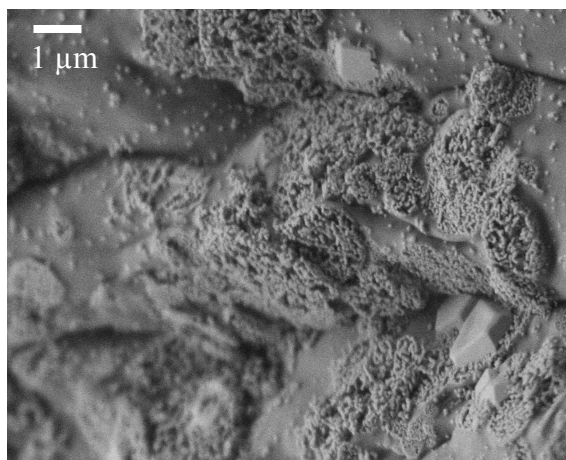
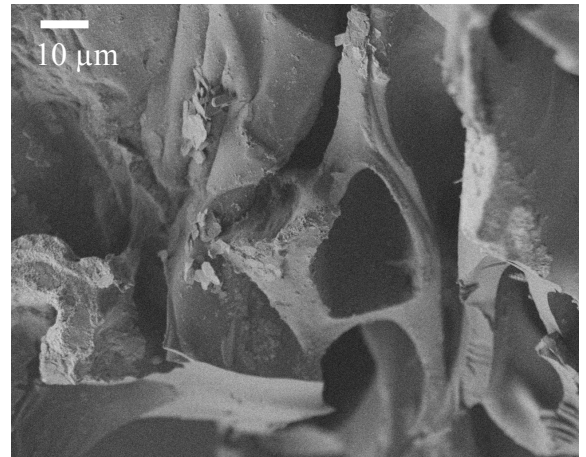
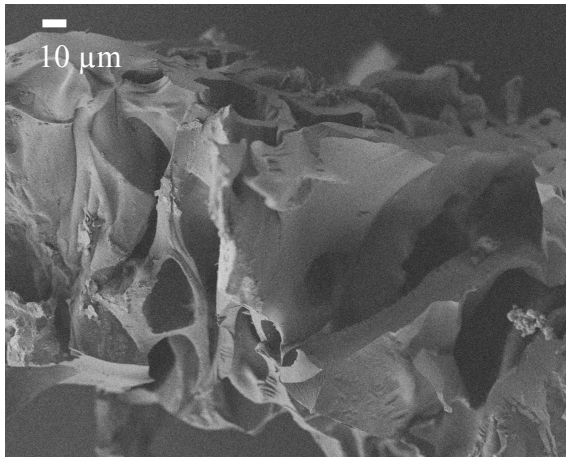


Abb. 6-29. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der durch SBF mineralisierten Proben. Es lassen sich vereinzelt kleine Areale feststellen, die einen nanopartikulären Aufbau aufweisen.



## 6.2.2 Mineralisation eines Polysialinsäure-Hydrogels

In diesem Abschnitt soll die Mineralisation von Polysialinsäure-Hydrogelen beschrieben werden.

### 6.2.2.1 Versuchsdurchführung

Für die Kristallisation wird die Probe zwischen zwei Reservoirs eingespannt (Abb. 6-30). In einem der Reservoirs befindet sich 0.108 M Calciumacetatlösung und im anderen befindet sich 0.0648 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung. Während des Versuchs diffundieren die Ionen in das Hydrogel. Dort sollen sie Kristallisationskeime ausbilden und so das Hydrogel mineralisieren. Die Versuchsdauer beträgt einen Monat. Anschließend wird das Hydrogel gefriergetrocknet.

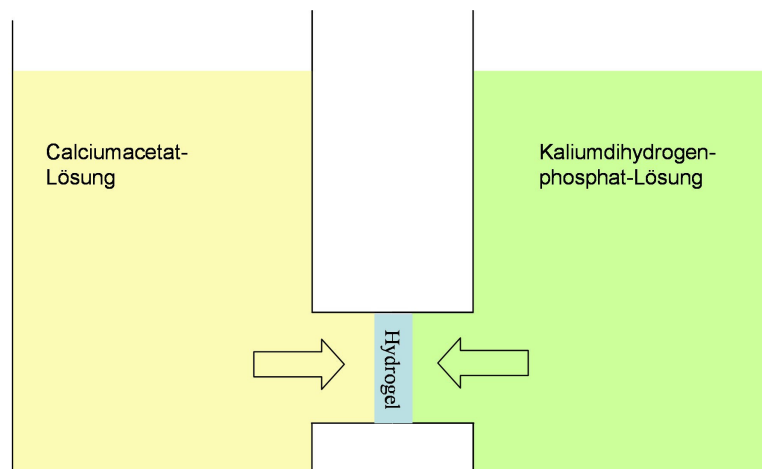


Abb. 6-30. Versuchsaufbau: Mineralisation von Hydrogelen.

### 6.2.2.2 Charakterisierung der Hydrogele

Die Mineralisierung der Proben wurde mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie beurteilt. In Abb. 6-31. ist das gefriergetrocknete Hydrogel zu erkennen. Es besitzt eine

poröse Struktur. Insgesamt lässt sich bei der in Abb. 6-31 dargestellten Probe nur ein sehr geringer Mineralisationsgrad feststellen. Vereinzelt sind kugelartige Gebilde zu beobachten, die mit den von *Busch* in einem Collagen-Gel hergestellten Hydroxylapatitkristallen vergleichbar sind [22]. Eine Identifizierung der Phase konnte nicht erfolgen, da die Probe röntgenamorph war. Das ist auch hier vermutlich auf die geringe Menge an Abscheidungen zurückzuführen.

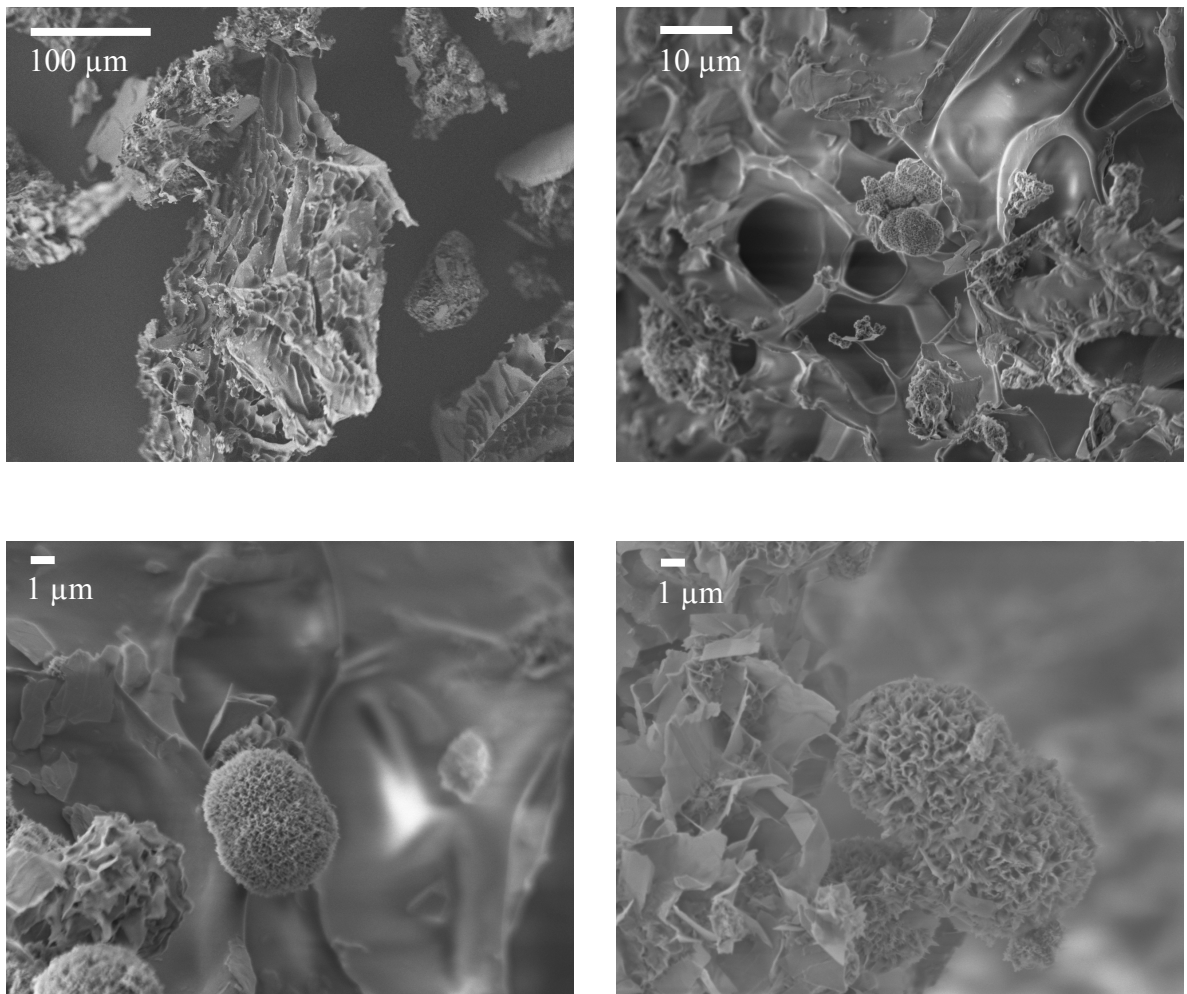


Abb. 6-31. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der mineralisierten Proben.

### 6.2.3 Diskussion der Mineralisation von Polysialinsäure-Hydrogelen

Beide Versuche zeigen, dass sich das Polysialinsäurehydrogel nur schlecht mineralisieren lässt. Nur vereinzelt sind Abscheidungen zu beobachten. Eine vollständige Mineralisation der Materialien ist jedoch nicht erfolgt. Dies stimmt zwar mit der biologische Funktion der Polysialinsäure überein, denn bei der Bildung des zentralen Nervensystems ist keine Mineralisation erwünscht; trotzdem wäre bei einem sauren Polysaccharid wie Polysialinsäure eine Mineralisierung zu erwarten gewesen.

## 6.3 Calciumcarbonat-Präzipitate

Um die natürliche Zusammensetzung des Knochens besser nachzuahmen, wurde bei der Herstellung der Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Präzipitate bei einigen Versuchen Kaliumcarbonat zugegeben. Dabei fiel ein weißer Feststoff aus, der als Calciumcarbonat identifiziert werden konnte. Dies gab Anlass zu den folgenden Untersuchungen. Es wurde Calciumcarbonat in Polysialinsäure-Lösungen präzipitiert. Zum Vergleich wurden entsprechende Versuche in Gegenwart von Hyaluronsäure durchgeführt. Auch bei diesen Versuchen fiel ein weißer Feststoff aus. Beide Proben sollen hier nun kurz vorgestellt werden.

### 6.3.1 Synthese der Calciumcarbonat-Präzipitate

In 20 mL 0.108 M Calciumacetat werden 0.1 g des entsprechenden Polysaccharids gelöst. Die Probe wird 1 h lang gerührt. Anschließend werden 5 mL Aceton zugegeben. Dann wird 1 mL 1 M Kaliumcarbonatlösung zugegeben. Der Niederschlag wird abfiltriert und an der Luft getrocknet.

### 6.3.2 Charakterisierung der Calciumcarbonat-Präzipitate

Die Morphologie der Präzipitate wurde mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Die Präzipitate von Hyaluronsäure und Polysialinsäure weisen eine vergleichbare Größe auf (Abb. 6-32). In beiden Fällen haben sich in erster Näherung kugelförmige Partikel von etwa 5  $\mu\text{m}$  Größe gebildet. Bei höheren Vergrößerungen lassen sich jedoch deutliche Unterschiede erkennen. Die Präzipitate der Hyaluronsäure weisen eine feinstrukturierte Oberfläche auf. Die Präzipitate der Polysialinsäure besitzen dagegen eine eher kantige Oberfläche aus einigen größeren Kristallen. Einzelne Kristallite der Polysialinsäure-Präzipitate weisen eine rhomboedrische Morphologie auf. Die Kristallite der Hyaluronsäure-Präzipitate sind nanokristallin (Abb. 6-33). Sie sind etwa 30 nm groß.

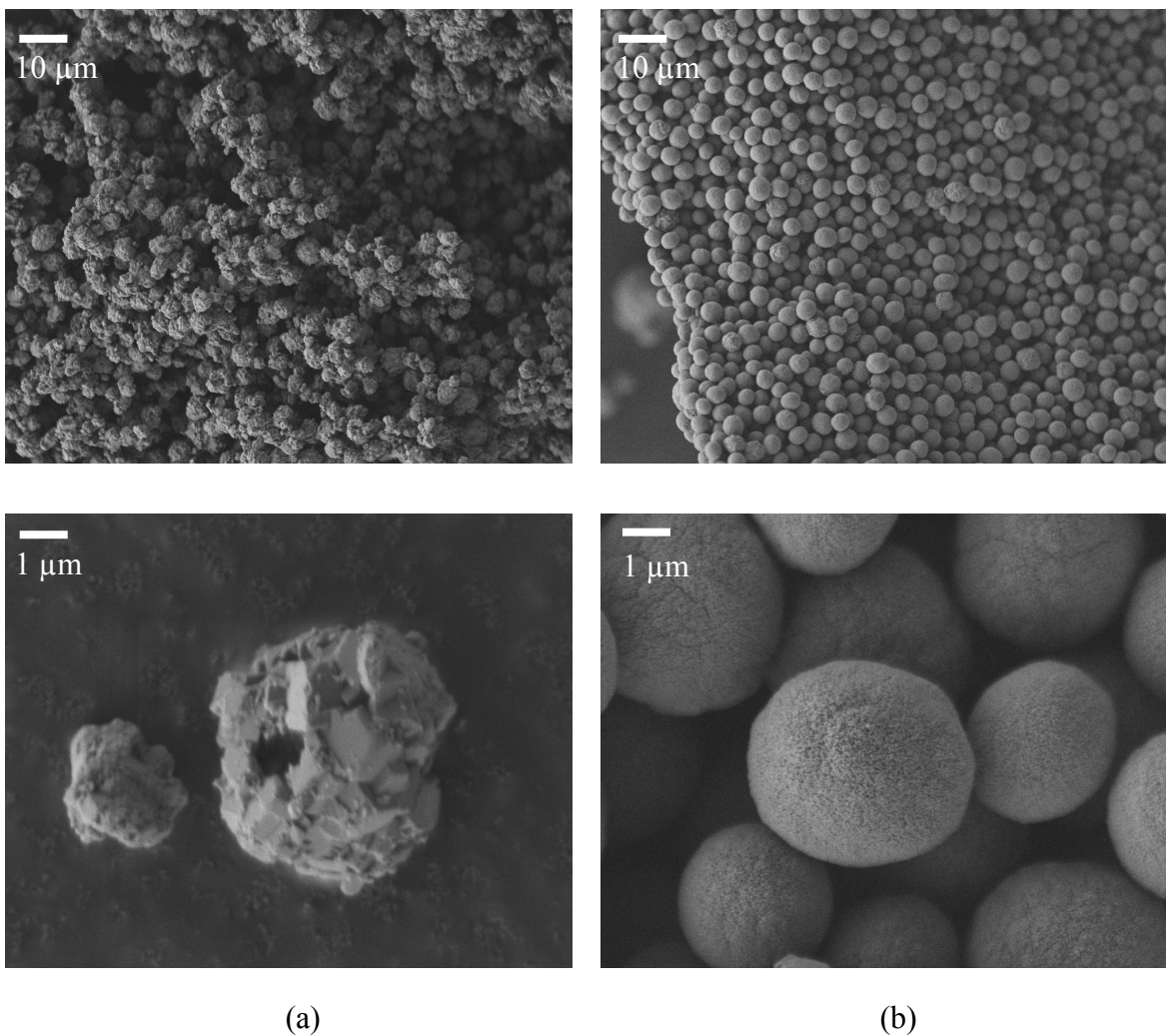


Abb. 6-32. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von (a) Polysialinsäure-Calciumcarbonat-Präzipitaten und (b) Hyaluronsäure-Calciumcarbonat-Präzipitaten.

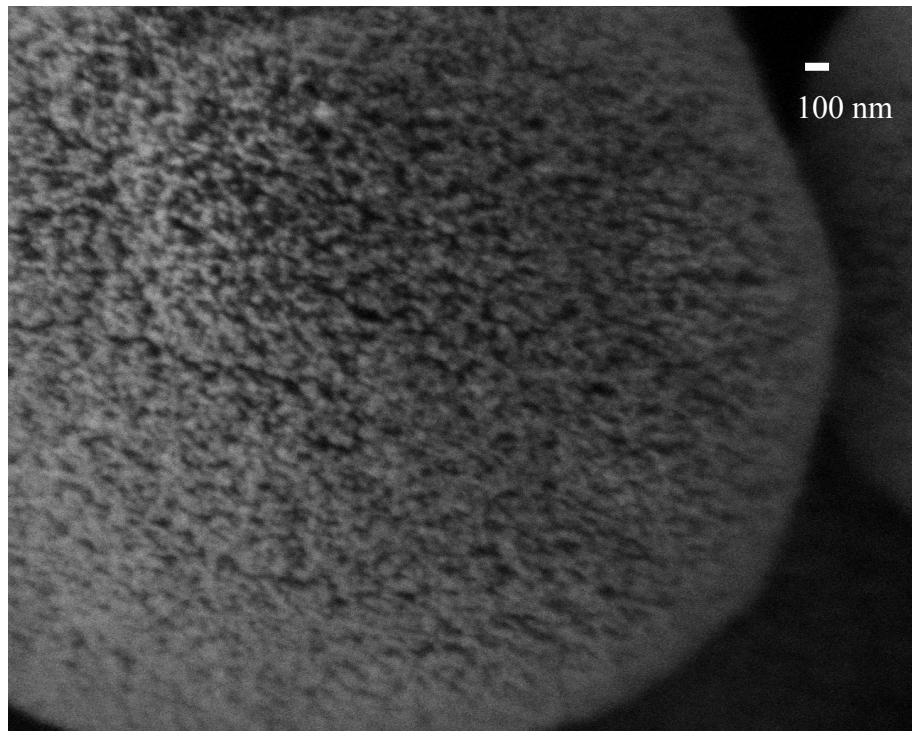


Abb. 6-33. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Hyaluronsäure-Calciumcarbonat-Präzipitats.

Die Bestimmung der Phasen der Partikel erfolgte mit Hilfe der Röntgen-Pulverdiffraktometrie. Bei der Präzipitation mit Polysialinsäure hat sich der thermodynamisch stabile Calcit gebildet (Abb. 6-34). Die Probe weist eine hohe Kristallinität auf. Bei der Präzipitation mit Hyaluronsäure hat sich metastabiler Vaterit gebildet (Abb. 6-35). Das Präzipitat ist eher schlecht kristallin. Die Reflexe sind leicht verbreitert, was auf eine Fehlordnung oder Nanokristallinität hindeuten kann. Die Nanokristallinität der Probe steht im Einklang mit den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Hyaluronsäure-Präzipitate. Des Weiteren zeigt das Röntgen-Pulverdiffraktogramm des Hyaluronsäure-Präzipitats einen hohen amorphen Untergrund. Bei  $7^\circ 2\theta$  tritt ein sehr breiter Reflex auf. Ob dieser auf eine poröse Struktur des Vaterits oder auf Effekte zurückzuführen ist, die ihre Ursache im Primärstrahl haben, konnte nicht geklärt werden.

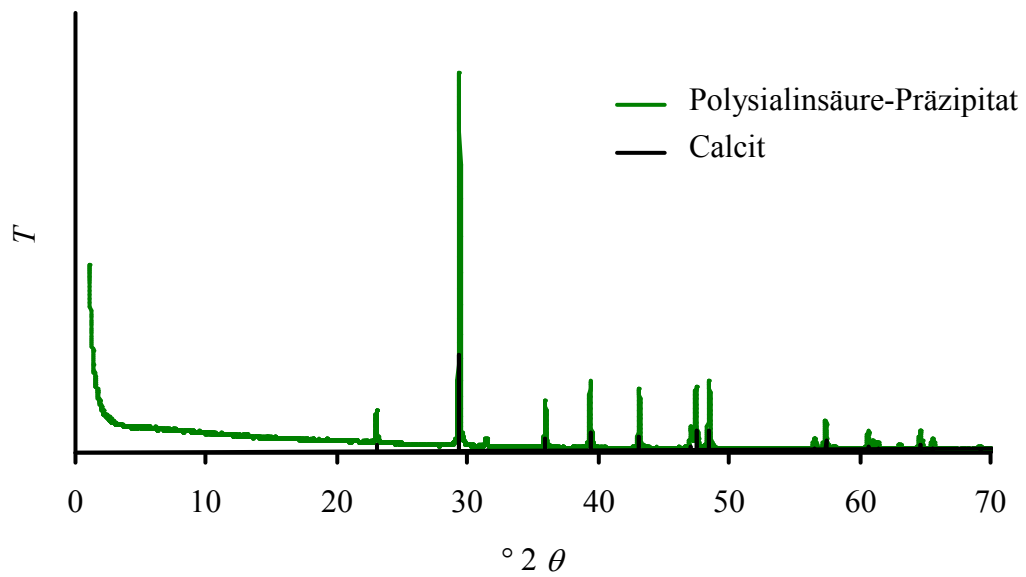


Abb. 6-34. Röntgen-Pulverdiffraktogramm des Polysialinsäure-Präzipitats. Die schwarzen Linien geben die Reflexe des Calcits wieder (PDF 47-1743 ICDD).

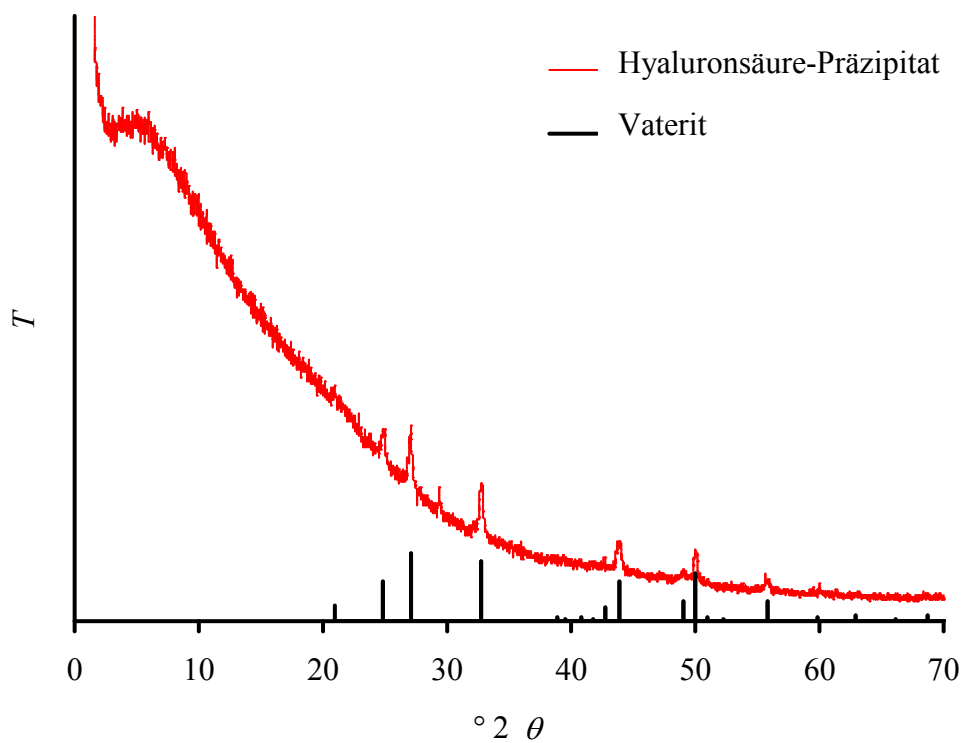


Abb. 6-35. Röntgen-Pulverdiffraktogramm des Hyaluronsäure-Calciumcarbonat-Präzipitats. Die schwarzen Linien geben die Reflexe des Vaterits wieder (PDF 33-268 ICDD).

### 6.3.3 Diskussion der Calciumcarbonat-Präzipitate

Obwohl sich die beiden Polysaccharide chemisch auf den ersten Blick sehr ähnlich sind, zeigen sie bei der Präzipitation von Calciumcarbonaten deutliche Unterschiede. Bei beiden Polymeren bilden sich kugelförmige Präzipitate mit einem Durchmesser von etwa 5  $\mu\text{m}$ . Die Morphologie dieser Kugeln unterscheidet sich aber stark. Das Hyaluronsäure-Präzipitat besteht aus Vaterit. Die Oberfläche ist porös und besteht aus vielen einzelnen Kristalliten, die 30 nm groß sind. Im Gegensatz dazu bilden sich bei den Präzipitaten der Polysialinsäure vergleichsweise große rhomboedrische Calcitkristalle aus. Die Oberfläche hat eine eher kantige Struktur und besteht aus wenigen Kristalliten. Die Keimbildungswahrscheinlichkeit bei den Polysialinsäure-Calciumcarbonat-Präzipitate ist viel kleiner als die der Hyaluronsäure-Calciumcarbonat-Präzipitate. Die Unterschiede können zum einen auf eine viel geringere Ladungsdichte der Hyaluronsäure zurückgeführt werden. Zum anderen geht Polysialinsäure, wie in Kapitel 4 gezeigt werden konnte, eine spezifische Wechselwirkung mit Calciumionen ein. Diese kann die Kristallisation ebenfalls beeinflussen. Durch die Wechselwirkung scheint die Polysialinsäure nicht oder nur sehr bedingt für die Kristallisation zur Verfügung zu stehen.

## 6.4 Diskussion

Im Rahmen der Versuche zur Co-Präzipitation konnte gezeigt werden, dass es sowohl bei Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen als auch bei Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen gelang, ein homogenes Kompositmaterial herzustellen. Die  $\mu\text{-CT}$ -Aufnahmen zeigen den homogenen inneren Aufbau der Komposite. Mit Hilfe der IR-Spektroskopie und der Röntgendiffraktometrie wurden die jeweiligen Komponenten der Komposite identifiziert. In beiden Fällen zeigt die Röntgendiffraktometrie in Kombination mit rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen, dass der Hydroxylapatit in den erhaltenen Proben – ähnlich dem natürlichen Knochen – nanokristallin ist [16]. In bioresorbierbaren Implantatmaterialien ist dies eine wünschenswerte Eigenschaft, da nanokristalliner Apatit vom Körper vergleichsweise leicht resorbiert und durch natürlichen Knochen ersetzt wird [135]. Zur Herstellung eines schwerlöslichen

Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposits war es nötig, die Polysialinsäure quervernetzen. Die Ursache hierfür liegt in der sehr guten Löslichkeit von Polysialinsäure. Diese liegt in den polyelektrolytischen Eigenschaften des Polymers begründet. Da es sich bei dem hier vorgestellten Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposit um eine neue Art von Komposit handelt, wurde dieser näher untersucht. Mit Hilfe der Thermogravimetrie konnte das Verhältnis von organischen zu anorganischen Komponenten bestimmt werden. Dieses ist mit 15 % organischem und 85 % anorganischem Anteil niedriger als im natürlichen Knochen.

Die Proben sind nicht cytotoxisch. Die hier gewonnenen Ergebnisse müssen aber noch an Osteoblasten überprüft werden, da die Schwann-Zellen nicht typisch für den potentiellen Einsatzbereich eines Knochenmaterials sind. Die glatte Oberfläche der Proben stellt offensichtlich ein Problem dar, da die Zellen an ihr nicht adhären können. Für das gute Einwachsen eines Implantats wäre aber eine raue Oberfläche von Vorteil, da diese die Zellanhaftung erleichtert. Zudem haben die  $\mu$ -CT-Aufnahmen den sehr kompakten Aufbau des Materials gezeigt. Ein Einwachsen der Zellen in das Implantat wird dadurch erschwert. Trotz der Quervernetzung lässt sich das Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposit durch Endosialidase kontrolliert abbauen. Das stellt einen großen Vorteil gegenüber herkömmlichen Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen dar, da sich der Chitosanabbau in diesen nur unzureichend über den Deacetylierungsgrad des Chitosans steuern lässt [53]. Eine geringe Degradation der Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposite wurde aber auch in phosphatgepufferter Lösung beobachtet. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der autokatalytische Abbau der Polysialinsäure [99].

Die mechanischen Eigenschaften der Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposite sind aber ungenügend. Die Proben zerspringen schon unter geringen mechanischen Belastungen. Damit sind sie für den Einsatz als Implantatmaterial nicht geeignet. Die schlechten mechanischen Eigenschaften sind vermutlich auf den niedrigen Polymerisationsgrad der Polysialinsäure zurückzuführen. Darüber hinaus führt die Quervernetzung zu einer weiteren Erhöhung der Steifigkeit des Materials. Eine mögliche Lösung hierfür wäre die Herstellung längererkettiger Polysialinsäuren. Die Herstellung erfolgt im Moment ausschließlich aus Bakterienkulturen, die Polysialinsäure mit einem maximalen Polymerisationsgrad von 400 Monomereinheiten produzieren. Daher darf bezweifelt werden, dass es gelingt, die Kettenlänge auf diesem Produktionsweg deutlich zu erhöhen. Zudem wird für Polysialinsäure ein



autokatalytischer Abbau beschrieben. Die Wahrscheinlichkeit des Abbaus nimmt mit steigender Kettenlänge zu [99]. Eine weitere Ursache für die mechanische Instabilität des Probenmaterials ist in der mechanischen Spannung der Probe zu suchen. Durch das starke Schrumpfen des Materials beim Trocknen entstehen Spannungen innerhalb der Probe. Zudem scheint sich Polysialinsäure im Material nicht wie Chitosan als Matrix zu verhalten, in die sich die Kristalle einbetten. Stattdessen liegt sie eher in Form von separierten Partikeln vor. Diese Beobachtung wird durch das in Kapitel 4 vorgestellte Verhalten der Polysialinsäure bei Salzzugabe gestützt. In Gegenwart von Salzen neigt Polysialinsäure zur Partikelbildung. Ein Gel, wie es für Chitosan typisch ist, bildet sich nicht aus. Im Vergleich zu den Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen besitzen die Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite vorteilhaftere mechanische Eigenschaften. Insbesondere die Komposite mit einem Chitosan/Hydroxylapatit Verhältnis von 35/65 weisen eine Druckfestigkeit auf, die im Bereich der Werte des natürlichen Knochens liegt. In diesen Kompositen wirkt das Chitosan als einbettende Matrix. Die vorteilhaften mechanischen Eigenschaften machen dieses Komposit zu einem potentiell guten Knochenersatz. Allerdings muss bei diesem, wie auch bei allen anderen Kompositmaterialien, beachtet werden, dass sie als Implantatmaterial eine zusätzliche Fixierung benötigen. Das kann zusätzliche Operationen erfordern, die neben der Gefährdung des Patienten hohe Kosten sowie volkswirtschaftlichen Schaden verursachen. Zudem lassen sich beim Chitosan die Abbauraten nur indirekt kontrollieren.

Ein Polysialinsäurehydrogel ließ sich nur schwer mineralisieren. Weder bei der Mineralisierung des Hydrogels, noch im Kontakt mit SBF bildete sich eine nennenswerte Anzahl von Kristallen aus. Dieser Umstand kann seine Ursache in der biologischen Funktion der Polysialinsäure haben. Sie spielt in der Bildung des zentralen Nervensystems eine wichtige Rolle [189]. Bei diesem Prozess ist keine Mineralisation gewünscht.

Bei den Calciumcarbonat-Präzipitaten von Hyaluronsäure und Polysialinsäure sind, trotz der auf den ersten Blick großen chemischen Ähnlichkeit der beiden Polysaccharide, deutliche Unterschiede erkennen. In beiden Fällen ist die Bildung von kugelförmigen, etwa 5  $\mu\text{m}$  großen Präzipitaten zu beobachten. Die Morphologien der Proben unterscheiden sich aber erheblich. Bei den Polysialinsäure-Präzipitaten bilden sich sehr wenige Kristallisationskeime aus. Es entstehen Partikel aus wenigen größeren Calcitkristallen. Im Gegensatz dazu entstehen bei Hyaluronsäure sehr viele

Kristallisationskeime, an denen sich die metastabile Phase Vaterit ausbildet. Dieser Vergleich verdeutlicht, dass Polysialinsäure sich nur schwierig mit Calciumcarbonat mineralisieren lässt.

Bei der Zusammenfassung der drei hier beschriebenen Varianten der Mineralisation fällt auf, dass sich Polysialinsäure generell nur schwer durch Calciumsalze mineralisieren lässt. Unter Berücksichtigung ihrer Funktion im Körper ist diese Eigenschaft sinnvoll, da bei der Nervenbahnausbildung keine Mineralisation wünschenswert ist. In Kapitel 4 konnte gezeigt werden, dass eine spezifische Wechselwirkung zwischen Calcium und Polysialinsäure besteht. Daher muss noch überprüft werden, ob die schlechte Mineralisierbarkeit der Polysialinsäure nur auf calciumhaltigen Mineralen zutrifft.

## 7. ENTWICKLUNG VON KOMBIIMPLANTATEN

Kombiimplantate stellen eine Neuentwicklung auf dem Gebiet der Biomedizintechnik dar. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Implantat ist bioresorbierbar und für den Einsatz als Knochennagel oder auch als Knochenersatzmaterial konzipiert. Die Entwicklung fand in Kooperation mit dem Institut für Werkstoffkunde statt.

### 7.1 Herstellung der Implantate

Die Erfindung ist im Wesentlichen aus zwei Teilen aufgebaut: einer umgebenden Magnesiumhülle und einer Kompositfüllung im Kern (Abb. 7-1).

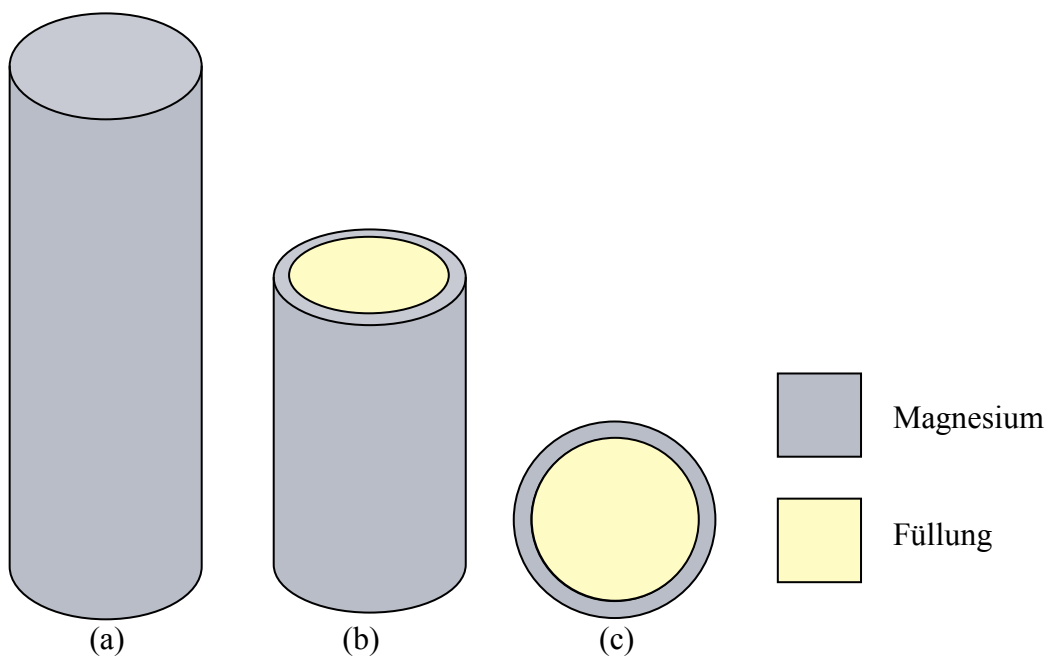


Abb. 7-1. Aufbau der Kombiimplantate. (a) Gesamtansicht, (b) Querschnitt, (c) Draufsicht auf den Querschnitt.

Der Kern der Implantate kann beispielsweise aus einem Chitosan–Hydroxylapatit-Kompositmaterial bestehen. Die Synthese und die Eigenschaften dieser Materialien wurden im Kapitel 6 erläutert. Es sind aber auch noch andere Füllungen denkbar. Das umgebende Magnesium besteht aus einer biokompatiblen Legierung. Die Auswahl der Legierungskomponenten, deren Eigenschaften und Verarbeitung wurden von Frau Dipl.-Ing. Miriam Zeddis im Rahmen ihrer Diplomarbeit beschrieben [188]. Die Herstellung der Implantate verläuft nach folgendem Schema (Abb. 7-2):

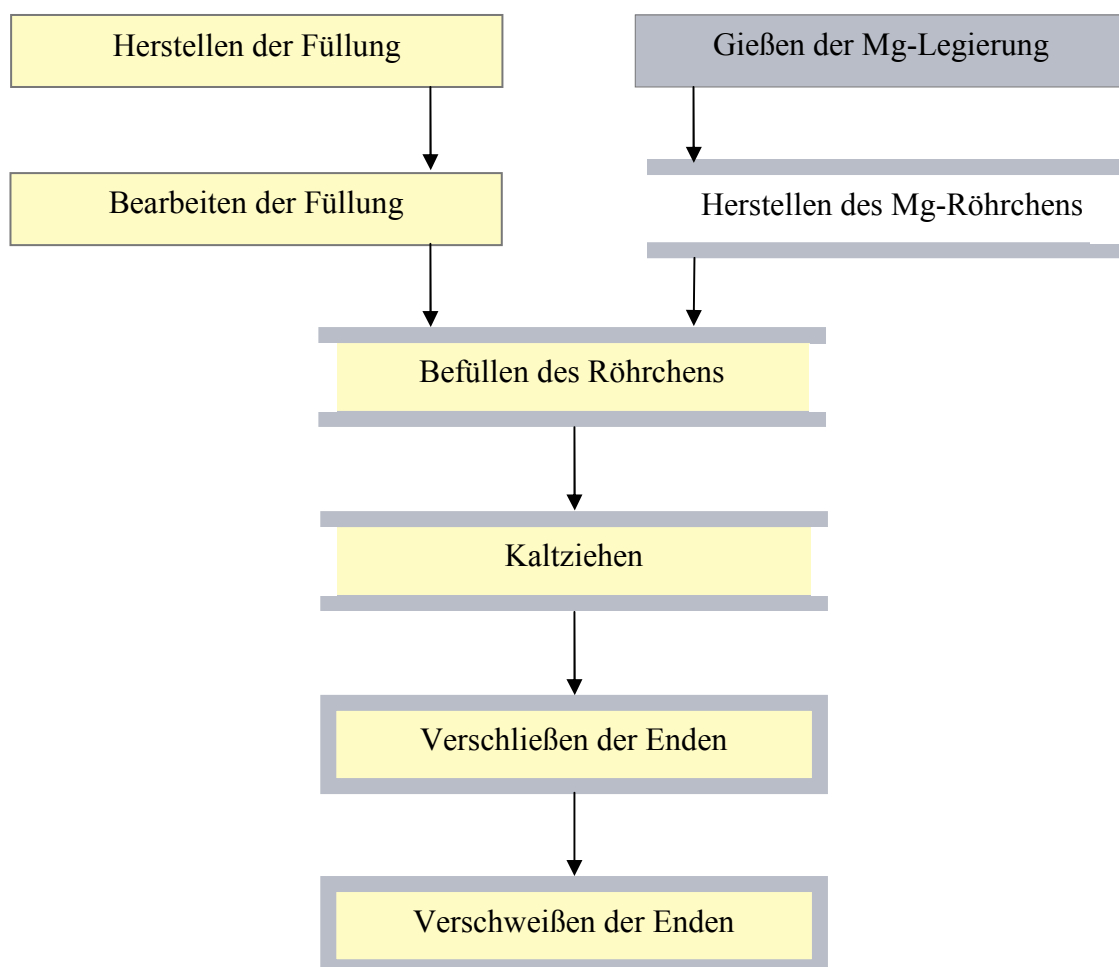


Abb. 7-2. Fertigungsschema für Kombiimplantate.

Zunächst wird die Kompositfüllung, wie in Kapitel 6 beschrieben, hergestellt. Die getrockneten Komposite werden durch mechanische Bearbeitung in eine zylindrische Form gebracht. Das Magnesium wird gegossen und zu Bolzen verarbeitet. Diese werden

dann stranggepresst und mittels Warmziehen zu Röhren geformt. Die werden anschließend mit den Kompositen befüllt. Um die Hohlräume zwischen Komposit und Container zu beseitigen, werden die befüllten Röhren nun kaltgezogen. Es ist wichtig, dass dieser Prozess kalt erfolgt, denn das Komposit ist nicht sehr hitzebeständig. Anschließend werden die Enden der Röhren mit Magnesiumstopfen verschlossen und diese mittels eines Elektronenstrahls verschweißt. Auch dabei ist darauf zu achten, dass sich das Innere des Implantats nicht zu stark erwärmt. Eine Übersicht über die einzelnen Schritte wird in Abbildung 7-3 gegeben.

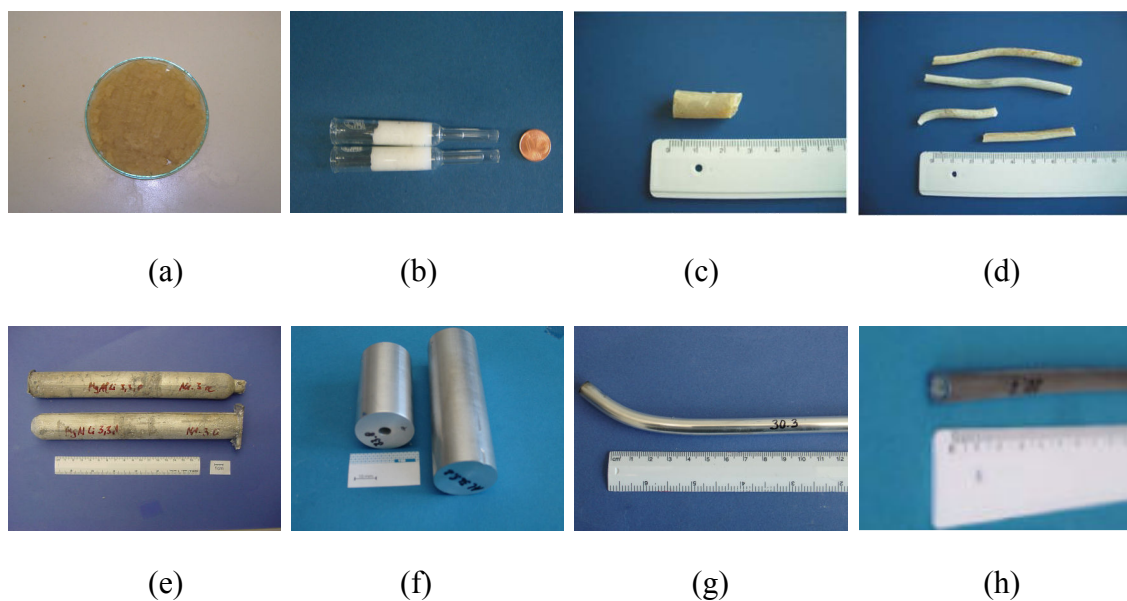


Abb. 7-3. Fertigen der Implantate. (a) frisch gefälltes Komposit, der Durchmesser der Schale beträgt 10 mm; (b) Stopfen der Komposite; (c) getrocknetes Komposit; (d) Komposit nach der Bearbeitung; (e) Gussbolzen; (f) Bolzen nach dem Abdrehen; (g) Magnesiumröhren; (h) befülltes Magnesiumröhren (Bilder c-h aus [188]).

Aufgrund von technischen Schwierigkeiten beim Kooperationspartner konnte im Rahmen dieser Arbeit leider kein fertiges Implantat hergestellt werden. Die anzuschließenden Tierversuche stehen daher ebenfalls noch aus.

## 7.2 Diskussion

Da die Implantate noch nicht im Tierexperiment getestet wurden, kann im Folgenden nur eine theoretische Bewertung der Erfindung erfolgen. Eines der großen Probleme bei Magnesiumimplantaten ist die massive Wasserstoffentwicklung bei der Korrosion im Körper. Dabei können sich große Gasblasen ausbilden [149]. Daher bedarf es einer Reduktion der implantierten Magnesiummenge. Diese Anforderung konnte mit den hier vorgestellten Kombiimplantaten erreicht werden. Da, bezogen auf das Gesamtimplantat, wesentlich weniger Magnesium eingesetzt wird, reduziert sich auch die Menge des als Korrosionsprodukt entstehenden Wasserstoffs deutlich. Die Ausbildung von Gasblasen, wie von *Witte* beschrieben, kann so vermieden oder zumindest deutlich minimiert werden [148, 149].

Das Magnesium als Bestandteil des Implantates erfüllt mehrere Aufgaben. Zum einen kann das Implantat aufgrund seiner guten mechanischen Eigenschaften einfach implantiert werden. Es ist den Belastungen beim Einsetzen des Implantats gewachsen und so für den Chirurgen gut handhabbar. Dies stellt einen wesentlichen Fortschritt in Bezug auf die von *Rueger* definierten Anforderungen hinsichtlich der Weiterentwicklung von bioresorbierbaren Implantatmaterialien dar [128]. Das Komposit, das hier als Füllung eingesetzt wird, hielt für sich als bioresorbierbare Implantat alleingegenommen, den Belastungen beim Einsetzen nicht oder nur unzureichend stand. Im Unterschied zu bioresorbierbaren Keramiken und Kompositen ist zudem keine weitere Fixierung erforderlich. Dadurch entfällt auch eine zweite Operation zur Entfernung der Fixierung, wodurch auch die Kosten der Nachbehandlung erheblich gesenkt werden können und die Rekonvaleszenzzeit erheblich verkürzt wird. Diese Verkürzung kommt dem Patienten zugute und generiert darüber hinaus auch einen volkswirtschaftlichen Nutzen. Somit erfüllen die Kombiimplantate eine weitere von *Rueger* definierte Anforderung [128]. Aufgrund seiner mechanischen Eigenschaften ist auch eine Nutzung des Implantats an mechanisch belasteten Stellen im Knochen denkbar. Damit ergibt sich ein höheres Anwendungsspektrum für diese Implantate als für konventionelle bioresorbierbare Kompositimplantate. Darüber hinaus führt die Anwesenheit von Magnesium zu einer vermehrten Knochenneubildung am Implantat [148]. Das führt zu einer schnellen Integration des Implantates in den umgebenden Knochen. Das schnelle Anwachsen von neuem Knochen an das Implantat ist eine wichtige Voraussetzung für die Einheilung und die schnelle Wiederbelastbarkeit des

Knochens. Damit wird wiederum die Rekonvaleszenz verkürzt und es entsteht zusätzlich ein bedeutender volkswirtschaftlicher Nutzen.

Es besteht des Weiteren die Möglichkeit, Wirkstoffe in das Komposit einzubringen, welche das Einwachsen weiter verbessern oder Entzündungen hemmen. Das Komposit selbst hat ähnliche mechanische Eigenschaften wie der natürliche Knochen (Vergl. Kapitel 6). Wenn es durch das sich auflösende Magnesium gut eingewachsen ist, sollte es den mechanischen Anforderungen gerecht werden können, da die mechanischen Eigenschaften des Komposits im Bereich des natürlichen Knochens liegen. Da das Komposit biodegradierbar ist, würde es im Körper durch natürlichen Knochen langsam ersetzt werden. Nach einiger Zeit wäre dann nur noch der natürliche Knochen vorhanden.

Ein Auflösen des Knochens um das Implantat kann als unwahrscheinlich angesehen werden. Anders als beispielsweise Titanimplantate besitzen die einzelnen Bestandteile des Kombiimplantats dem natürlichen Knochen ähnliche mechanische Eigenschaften. Daher sollte eine Lockerung des Implantats durch Knochendegeneration nicht auftreten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Kombiimplantate eine Weiterentwicklung im Sinne der von *Rueger* beschriebenen Anforderungen zur Verbesserung von Kombiimplantaten darstellen. In der Zukunft müssen klinische Tests durchgeführt werden, um diese theoretischen Überlegungen zu bestätigen. Die Erfindung wurde zum Patent angemeldet.





## 8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In dieser Arbeit wurden im Rahmen der Forschergruppe 548 PolySia grundlegende Untersuchungen zu den physikochemischen Eigenschaften von Polysialinsäure durchgeführt. Insbesondere wurde das Aggregationsverhalten in Lösung untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Polysialinsäure eine starke Tendenz zur Aggregation hat. In salzfreien wie auch in salzhaltigen Lösungen bilden sich Aggregate mit einem hydrodynamischen Radius von 160 nm. Diese deaggregieren teilweise in Gegenwart von Salzen und bilden Partikel aus, die mit einem hydrodynamischen Radius von 7 nm vermutlich aus einzelnen Polymerketten bestehen. Auch die Art des zugegebenen Salzes beeinflusst das Aggregationsverhalten und, wie statische Lichtstreuexperimente gezeigt haben, die Form der Partikel in Lösung. Insbesondere Calciumionen treten auf spezifische Weise mit der Polysialinsäure in Wechselwirkung. In einer 0.033 M Calciumchloridlösung bilden sich ca. 500 nm lange stäbchenförmige Aggregate der Polysialinsäure aus. Auch aus dem Bereich der Medizin gibt es Hinweise auf spezifische Interaktion zwischen Calciumionen und Polysialinsäure. So spielt die Calciumkonzentration bei der Nervenreuebildung, an der auch Polysialinsäure beteiligt ist, eine wichtige Rolle [88-90]. Die Untersuchungen hierzu müssen in Zukunft weiter vertieft werden. So sollten neben weiteren statischen Lichtstreuexperimenten noch NMR- und Kleinwinkelbeugungsexperimente durchgeführt werden, um ein umfassenderes Bild von den Wechselwirkungen zu erhalten.

Des Weiteren wurde der Einfluss von Alkalihalogeniden auf Polysialinsäure untersucht. Der Einfluss unterschiedlicher Kationen auf das Aggregationsverhalten wurde herausgearbeitet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch die Wahl des Anions das Verhalten des Polysaccharids in Lösung beeinflusst. Dabei konnte festgestellt werden, dass beim Vergleich der Alkalichloride die Zugabe von Kaliumchlorid zur stärksten Deaggregation der Polysialinsäure führt. Bei den betrachteten Anionen führt Chlorid zu einer stärkeren Deaggregation als Bromid oder Iodid.

In einer simulierten Cerebrospinalflüssigkeit zeigt Polysialinsäure ein konzentrationsabhängiges Aggregationsverhalten. Bei höheren Konzentrationen von

Polysialinsäure zeigt sich eine Deaggregation, während sich bei niedrigeren Polysialinsäure-Konzentrationen große Aggregate mit einem hydrodynamischen Radius von 225 nm ausbilden. Dieses Verhalten kann eine wichtige Rolle in der Zellproliferation und Adhäsion spielen. Der Einfluss von künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit auf das Aggregationsverhalten von Polysialinsäure bedarf ebenfalls weiterer Untersuchungen. Die statische Lichtstreuung kann hier wertvolle Informationen zur Form der in Lösung vorliegenden Partikel liefern.

Neben dem Verhalten in Lösungen wurde auch die Struktur der Polysialinsäure im festen Zustand untersucht. Es gelang, einen kristallinen Feststoff herzustellen, dessen Röntgen-Pulverdiffraktogramm mit einem monoklinen Kristallgitter indiziert werden konnte. Die Lösung der Kristallstruktur steht jedoch noch aus. Die Zucht von Einkristallen scheint bei einem Polysaccharid wenig aussichtsreich, am nächsten käme man dem Einkristallcharakter wohl mit der Zucht von Fasern. Eine wichtige Unterstützung zur Lösung des Strukturproblems bieten Strukturmodellierungen. Vorteilhaft wäre es auch, wenn als Ausgangsmaterial größe selektierte Polysialinsäuremoleküle zur Verfügung stünden.

Des Weiteren war die Anbindung von Polysialinsäure an Silica-Nanopartikeln Gegenstand dieser Arbeit. Die Motivation ist die Entwicklung eines Systems zum Transport von Wirkstoffen, das die Blut-Hirn-Schranke überwindet. Eine Polysialinsäurebeschichtung hätte ein großes Potential, diese Anforderung zu erfüllen, da dieses System auch von hirninvasiven Bakterien angewandt wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnte deacetylierte Polysialinsäure erfolgreich über ein Epoxysilan an Silica-Nanopartikel gebunden werden. Diese Nanopartikel müssen für den Einsatz in der Medizin noch weiterentwickelt werden. Derzeit besteht die Beschichtung aus dem deacetylierten Derivat der Colominsäure. Dieses ist jedoch instabil und muss noch einer Reacetylierung unterzogen werden. Ist diese erfolgreich, muss einer Übertragung der Technik von der hier verwandten Modellsubstanz auf medizinisch interessante Systeme, wie mesoporöse Partikel oder magnetische Core-Shell-Partikel, erfolgen. Anschließend wären diese Partikel im Tiermodell zu testen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Herstellung von potentiellen Knochenersatzmaterialien. Zum einen wurden dazu Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite hergestellt. Dabei gelang es, homogene Komposite herzustellen, die über gute mechanische Eigenschaften verfügen. Die Druckfestigkeit von Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen der Zusammensetzung 35 % Chitosan und 65 %

Hydroxylapatit liegt im Bereich des Wertes von natürlichem Knochen. Bei den hier vorgestellten Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen sollte in Zukunft der Einfluss der Kettenlänge des Polymers auf die mechanischen Eigenschaften untersucht werden. Zum anderen wurde ein neuer Typ von organisch-anorganischen Kompositen entwickelt. Es handelt sich dabei um ein Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposit, bei dem die Polysialinsäure quervernetzt wurde. Diese Materialien sind homogene Feststoffe, deren anorganischer Bestandteil nanokristalliner Hydroxylapatit ist. Die Komposite sind nicht cytotoxisch und können durch das Enzym Endosialidase abgebaut werden. Sie sind allerdings auch nur bedingt hydrolysestabil. Die Polysialinsäure unterliegt vermutlich einer Autoprotolyse, die zu einem Abbau in phosphathaltiger Lösung führt. Zudem quellen die Komposite in wässrigen Lösungen stark auf. Mechanische Messungen zeigen, dass die Komposite sehr spröde sind, was unter anderem auf den vergleichsweise geringen Polymerisationsgrad der Polysialinsäure zurückzuführen ist. Das Quellverhalten und die schlechten mechanischen Eigenschaften machen einen Einsatz als Knochenersatzmaterial unwahrscheinlich. Um mechanisch stabile Komposite herstellen zu können, bedürfte es einer um ein vielfaches längeren Polysialinsäurekette. Ob deren Darstellung gelingen kann, ist aufgrund der beschriebenen Autoprotolyse fraglich. Zudem erfolgt die Herstellung zurzeit über eine Bakterienkultur, die eine maximale Kettenlänge von 400 Monomereinheiten hervorbringt.

Die Mineralisation von Polysialinsäure-Hydrogelen war nicht erfolgreich. In Verbindung mit den Beobachtungen bei den Versuchen zur Calciumcarbonat-Präzipitation deutet das darauf hin, dass sich Polysialinsäure zumindest von Calciumsalzen nur schlecht mineralisieren lässt. Inwieweit dieses eine Calcium-spezifische Eigenschaft der Polysialinsäure ist, bleibt noch zu untersuchen.

Der letzte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines neuen bioresorbierbaren Implantats für die Anwendung als Knochenersatzmaterial (diese Entwicklung erfolgte im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 599 Biomedizintechnik). Das Implantat besteht aus einer Magnesiumhülle und einem Kern, der beispielsweise aus einem Chitosan-Hydroxylapatit-Komposit hergestellt werden kann. Das Magnesium erfüllt in diesem Implantat mehrere Aufgaben: Es sorgt einerseits für eine hohe mechanische Belastbarkeit des Implantats, sowohl beim Einsetzen als auch bei der Belastung des implantierten Knochens. Zum anderen fördert die Gegenwart von Magnesium die Knochenneubildung. Das Innere des Implantats besteht

mit dem Komposit aus einer biodegradierbaren Substanz, die gut in natürlichen Knochen umgewandelt werden kann. Die Erfindung wurde zum Patent angemeldet. Der nächste Umsetzungsschritt auf diesem Gebiet wäre die Herstellung eines Prototyps. Die hier aufgestellten Thesen zum Verhalten im Körper müssen im Tiermodell überprüft werden.

## 9. ANHANG

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
<i>c</i>	Konzentration
CA	Colominsäure
CBF	Cerebrospinalflüssigkeit
CHI	Chitosan
CT	Computertomographie
<i>d</i>	Netzebenenabstand
DLS	Dynamische Lichtstreuung
EELS	Energieverlustspektroskopie
EFTEM	Energiegefilterte Transmissionselektronenmikroskopie
GOPTMS	3-Glycidoxypropyltrimethylethoxysilan
HAP	Hydroxylapatit
HYA	Hyaluronsäure
$M_w$	Molmmasse
NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül
PSA	Polysialinsäure
<i>q</i>	Streuvektor
REM	Rasterelektronenmikroskopie
$R_g$	Gyrationsradius
SBF	Simulierte Körperflüssigkeit
SLS	Statische Lichtstreuung
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
<i>u</i>	Länge des Streuvektors <i>q</i>

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

1-1	(a) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines <i>Escherichia coli</i> -Bakteriums (b) Schema eines funktionalisierten Nanopartikels.	4
2-1	Photographie eines Oberschenkelknochens im Querschnitt.	7
2-2	Lichtmikroskopische Aufnahme eines eingefärbeten Querschnitts durch ein Osteon.	9
2-3	Computertomographie von Spongiosa.	10
2-4	Strukturformel von Chitosan.	13
2-5	Strukturformel von Hyaluronsäure.	15
2-6	Modell einer Hyaluronsäuredomäne vom Molekül in Lösung.	16
2-7	Polymerbildende Derivate der Sialinsäure.	17
2-8	Strukturformel der $\alpha$ 2,8-verknüpften Polysialinsäure.	18
2-9	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Escherichia coli</i> .	19
2-10	Zell-Zell-Interaktion von NCAM und der polysialisierten Form von NCAM.	20
2-11	Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von Polysialinsäure-Filamenten.	22
2-12	(a) Modell eines gestreckt vorliegenden Polyelektrolyten in salzfreier Lösung. (b) Modell eines ungeladenen Polymers, das als zufälliges Knäuel vorliegt.	26
2-13	Domänenstruktur von Polyelektrolyten.	27
2-14	Modell des idealen Implantats.	29
2-15	Röntgenbilder von Hüftendoprothesen.	33
2-16	Zirkonia Zahnersatz.	34
2-17	(a) Röntgenbild eines Meerschweinchens mit Wasserstoffgasblase. (b) Photographie eines Meerschweinchens mit Wasserstoffgasblase.	40

2-18	Mit Calcein grün eingefärbte Implantatprobe 18 Wochen nach der Implantation.	41
2-19	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> .	42
2-20	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von mesoporösen Silicananopartikel.	44
3-1	Aufbau eines $\mu$ -CTs mit Kegelstrahlgeometrie.	55
3-2	CT-Aufnahme eines Hirntumors.	56
4-1	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von Colominsäure (Charge Z4P4565) in Millipore-Wasser bei verschiedenen Konzentrationen.	60
4-2	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von Colominsäure (Charge Z6R2470) in Millipore-Wasser bei verschiedenen Konzentrationen.	61
4-3	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilungen von Hyaluronsäure in Millipore-Wasser bei verschiedenen Konzentrationen.	62
4-4	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in LiCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentration im Vergleich mit einer Lösung von 5 g/L CA in Millipore-Wasser.	65
4-5	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in NaCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentration im Vergleich mit einer Lösung von 5 g/L CA in Millipore-Wasser.	66
4-6	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in KCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentration im Vergleich mit einer Lösung von 5 g/L CA in Millipore-Wasser.	66
4-7	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in RbCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentration im Vergleich mit einer Lösung von 5 g/L CA in Millipore-Wasser.	67
4-8	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.01 M Alkalichlorid-Lösungen.	68
4-9	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.1 M Alkalichlorid-Lösungen.	68

4-10	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 1 M Alkalichlorid-Lösungen.	69
4-11	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in NaBr-Lösungen unterschiedlicher Konzentration.	70
4-12	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in KBr-Lösungen unterschiedlicher Konzentration.	71
4-13	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.01 M Alkalibromid-Lösungen.	72
4-14	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.1 M Alkalibromid-Lösungen.	73
4-15	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 1 M Alkalibromid-Lösungen.	73
4-16	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in NaI-Lösungen unterschiedlicher Konzentration.	74
4-17	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.01 M Natriumhalogenid-Lösungen.	75
4-18	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.1 M Natriumhalogenid-Lösungen.	76
4-19	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 1 M Natriumhalogenid-Lösungen..	76
4-20	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.01 M Kaliumhalogenid-Lösungen.	77
4-21	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.1 M Kaliumhalogenid-Lösungen.	78
4-22	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 1 M Kaliumhalogenid-Lösungen.	78
4-23	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in NaNO <sub>3</sub> -Lösungen unterschiedlicher Konzentration.	80
4-24	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in MgCl <sub>2</sub> -Lösungen unterschiedlicher Konzentration.	81
4-25	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in CaCl <sub>2</sub> -Lösungen unterschiedlicher Konzentration	82



4-26	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ unterschiedlicher Konzentrationen.	83
4-27	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.01 M Erdalkalichlorid-Lösungen.	84
4-28	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.1 M Erdalkalichlorid-Lösungen.	85
4-29	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 1 M Erdalkalichlorid-Lösungen.	85
4-30	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.01 M Calciumsalz—Lösungen.	86
4-31	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 0.1 M Calciumsalz—Lösungen.	87
4-32	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von 5 g/L CA in 1 M Calciumsalz--Lösungen.	87
4-33	SLS-Messungen von Colominsäure in 0.1 M Natriumchloridlösung (a) bzw. in 0.033 M Calciumchloridlösung (b) als Holtzer-Plot.	89
4-34	Aus DLS-Messungen abgeleitete Partikelgrößenverteilung von CA in künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit.	91
4-35	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von unbehandelter Colominsäure.	95
4-36	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von kristallisierter Colominsäure.	95
4-37	IR-Spektren der kristallinen Colominsäure im Vergleich zur unbehandelten Colominsäure.	96
4-38	Thermogravimetrie-Kurve der unbehandelten Colominsäure.	97
4-39	Thermogravimetrie-Kurve der kristallinen Colominsäure.	98
4-40	Röntgen-Pulverdiffraktogramm der kristallisierten Colominsäure.	100
4-41	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der vom Institut für Technische Chemie hergestellten Polysialinsäure	103

5-1	Anbindung von Colominsäure an Silicananopartikel.	106
5-2	IR Spektren von Sipernat, Sipernat mit einer GOPTMS-Beschichtung, Sipernat mit einer Beschichtung aus deacetylierter Colominsäure und deacetylierte Colominsäure.	107
5-3	TEM-Aufnahme von unbehandeltem Sipernat (links) und mit deacetylierter Polysialinsäure beschichtetem Sipernat (rechts).	110
5-4	Energiegefilterte Aufnahmen der unbeschichteten und der beschichteten Silicananopartikel.	111
5-5	(a) TEM-Aufnahme der mit Colominsäure beschichteten Probe. (b) EFTEM-Aufnahmen der mit Colominsäure beschichteten Probe. (c) Kohlenstoff-Verteilung (weis) auf der mit Colominsäure beschichteten Probe. (d) Ebendies als Falschfarbenbild. Das Kohlenstoffsignal erscheint in grün.	112
5-6	EELS-Spektren des unbeschichteten Sipernats (oben) und der mit Colominsäure beschichteten Probe (unten).	114
5-7	Ergebnisse des TBA-Tests von reiner Colominsäure und von mit Colominsäure beschichteten Silicananopartikeln.	116
6-1	Photographie eines Chitosan-Hydroxylapatit-Komposits mit einem Chitosan/Hydroxylapatit Verhältnis von 65/35.	121
6-2	IR-Spektren von Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen unterschiedlicher Zusammensetzung.	122
6-3	Röntgen-Pulverdiffraktogramme von Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen unterschiedlicher Zusammensetzung.	123
6-4	Röntgen-Pulverdiffraktogramme von Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen unterschiedlicher Zusammensetzung.	124
6-5	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite bei einer 100-fachen Vergrößerung.	125
6-6	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite bei einer 2000-fachen Vergrößerung.	126
6-7	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite.	127

6-8	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Chitosan-Hydroxylapatit-Komposits in 50 000-facher Vergrößerung.	128
6-9	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Chitosan-Hydroxylapatit-Komposits mit hohem Polymerisationsgrad.	129
6-10	$\mu$ -CT eines Chitosan-Hydroxylapatit-Komposits mit einem Chitosan/Hydroxylapatit Verhältnis von 48/52.	131
6-11	Mechanische Prüfung von Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen unterschiedlicher Zusammensetzung im Vergleich mit Spongiosa.	132
6-12	Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposit in zylindrischer Form.	134
6-13	Infrarotspektren des Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposits und der Polysialinsäure.	136
6-14	Röntgen-Diffraktogramm eines Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposits.	138
6-15	Thermoanalytische Untersuchung des Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposits.	139
6-16	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposits in verschiedenen Vergrößerungen.	140
6-17	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposits.	141
6-18	Mit Hilfe des TBA-Assays ermittelte Aktivität von Endosialidase in Bezug auf den Abbau von Polysialinsäure aus quervernetzten Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen.	142
6-19	Photographie von Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen nach 28 d in (a) Phosphatpufferlösung, (b) Endosialidase in Phosphatpufferlösung und (c) $\Delta$ N245-endoNF-Ser911Ala Mutante in Phosphatpufferlösung.	143
6-20	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an einem enzymatisch abgebauten Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposit (c) im Vergleich mit einer unbehandelten (a) sowie einer in Phosphatpufferlösung gelagerten Probe (b).	145
6-21	Lichtmikroskopische Aufnahmen von (a) immortalisierten Schwann-Zellen im Kulturmedium und (b) im Kulturmedium der Zellkultur mit dem Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposit.	146

6-22	Ergebnisse des MTT-Tests zur Viabilität von Schwann-Zellen in Abwesenheit und in Gegenwart eines Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposits.	147
6-23	Druckprüfung des Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposits im Vergleich mit Spongiosa.	148
6-24	$\mu$ -CT Aufnahmen von Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen.	149
6-25	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von (a) Chitosan- und (b) Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen.	152
6-26	Röntgen-Pulverdiffraktogramme von Chitosan- und Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Kompositen.	153
6-27	Druckprüfung der durch Co-Präzipitation hergestellten Komposite mit Chitosan (Acros) und Polysialinsäure.	154
6-28	Modell des inneren Aufbaus der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite (links) und der Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposite (rechts) im Vergleich mit den entsprechenden rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.	155
6-29	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der durch SBF mineralisierten Proben. Es lassen sich vereinzelt kleine Areale feststellen, die einen nanopartikulären Aufbau aufweisen.	158
6-30	Versuchsaubau: Mineralisation von Hydrogelen.	159
6-31	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der mineralisierten Proben.	160
6-32	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von (a) Polysialinsäure-Calciumcarbonat-Präzipitaten und (b) Hyaluronsäure-Calciumcarbonat-Präzipitaten.	162
6-33	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Hyaluronsäure-Calciumcarbonat-Präzipitats.	163
6-34	Röntgen-Pulverdiffraktogramm des Polysialinsäure-Präzipitats. Die schwarzen Linien geben die Reflexe des Calcits wieder (PDF 47-1743 ICDD).	164
6-35	Röntgen-Pulverdiffraktogramm des Hyaluronsäure-Calciumcarbonat-Präzipitats. Die schwarzen Linien geben die Reflexe des Vaterits wieder (PDF 33-268 ICDD).	164

7-1	Aufbau der Kombiimplantate. (a) Gesamtansicht, (b) Querschnitt, (c) Draufsicht auf den Querschnitt.	169
7-2	Fertigungsschema für Kombiimplantate.	170
7-3	Fertigen der Implantate. (a) frisch gefälltes Komposit; (b) Stopfen der Komposite;(c) getrocknetes Komposit; (d) Komposit nach der Bearbeitung; (e) Gussbolzen; (f) Bolzen nach dem Abdrehen; (g) Magnesiumröhrchen; (h) befülltes Magnesiumröhrchen.	171

### 9.3 Tabellenverzeichnis

2-1	Übersicht über die als Biomaterialien verwendeten Calciumphosphate.	36
2-2	Druckfestigkeiten von Chitosan-Hydroxylapatit-Kompositen nach <i>Li et al.</i> .	38
4-1	Bei den DLS-Messungen verwandte Salzkonzentrationen.	64
4-2	Elementgehalte von Colominsäure vor und nach der Kristallisation mit ICP-OES bestimmt.	99
4-3	Indizierung des Röntgen-Pulverdiffraktogramm der kristallinen Colominsäure aus Abb. 4-40.	101
5-1	IR-Signale in der Übersicht. Sipernat, das mit GOPTMS beschichtet wurde, wird als Probe (a) bezeichnet. Die mit deacetylierter Colominsäure beschichtete Probe wird mit Probe (b) bezeichnet.	109
6-1	Übersicht über die Herstellung der Hydroxylapatit-Chitosan-Komposite. Die Abkürzung CHI steht für Chitosan und die Abkürzung HAP für Hydroxylapatit.	120
6-2	Übersicht über die theoretischen und tatsächlichen Verhältnisse von organischen zu anorganischen Bestandteilen der Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite. Die verwandten Chitosane stammen von der Firma Acros.	130
6-3	Druckfestigkeiten der gemessenen Chitosan-Hydroxylapatit-Komposite im Vergleich mit den bei <i>Li et al.</i> beschriebenen Druckfestigkeiten.	133
6-4	Auflistung der für Polysialinsäure und Hydroxylapatit charakteristischen Banden im Vergleich mit dem Polysialinsäure-Hydroxylapatit-Komposit.	137

## 9.4 Chemikalienliste

Substanz	Hersteller	Reinheit
Aceton	Fluka	puriss. p.a.
Ammoniak	Fluka	puriss. p.a.
Calciumacetat	Riedel-de Haën.	puriss.
Calciumchlorid-Dihydrat	Fluka	Ultra
Calciumnitrat-Tetrahydrat	Fluka	Ultra
Chitosan	Acros	2 % Ascherückstand
Chitosan, low viscosity	Fluka	≤ 1% unlöslicher Rückstand
Chitosan, middle viscosity		≤ 1% unlöslicher Rückstand
Chitosan, high viscosity	Fluka	≤ 1% unlöslicher Rückstand
Colominsäure Lot. No.Z4P4565, Z6R2470, Z7G4076	nacalai tesque	min. 98 %
Diepoxyoctan	Aldrich	97 %
Essigsäure	Riedel-de Haën.	puriss.
GOPTMS	Fluka	purum
Hyaluronsäure	Fulka	≤ 1% Protein
Kaliumcarbonat	Fluka	puriss.
Kaliumchlorid	Fluka	puriss. p.a.
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	p.a.

Substanz	Hersteller	Reinheit
Kaliumhydroxid	Fluka	Ultra
Lithiumchlorid	Fluka	Ultra
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Fluka	Ultra
Natriumchlorid	Fluka	puriss. p.a.
Natriumhydroxid	Fluka	puriss. p.a.
Rubidiumchlorid	Fluka	purum p.a.



## 9.5 Literaturverzeichnis

- [1] [http://www.hawaii.edu/artgallery/crossings/tcm\\_chun\\_ky.htm](http://www.hawaii.edu/artgallery/crossings/tcm_chun_ky.htm)  
Stand 24.12.2007
- [2] Pankhurst, Q.A.; Connolly, J.; Jones, S.K., Dobson, J.;  
J. Phys. D: Appl. Phys. (2003) 36 R167-R181
- [3] Durbec, P.; Cremer, H.;  
Mol Neurobiol (2001) 24 53-64
- [4] Pelkonen, S.; Häyrynen, J.; Finne, J.;  
J. Bacteriol. (1988) 170 6 2646-2653
- [5] Ferrero, M.A.; Reglero, A.; Fernanidez-Lopez, M; Ordas, R.;  
Rodriguez-Aparicio, L.B.;  
Biochem. J. (1996) 317 157-165
- [6] Kasper, J.B.; Nataro, J.P.; Mobley, H.L.T.;  
Nat. Rev. Microbiol. (2004) 2 123-140
- [7] Krueger, I.  
Dissertation Universität Hannover 2006
- [8] Rusu, V.M., Ng, C.H.; Wilke, M.; Tiersch, B.; Fratzl, P.; Peter, M.G.;  
Biomater. (2005) 26 5414-5426
- [9] Staiger, M.P.; Pietak, A.M.; Huadmai, J.; Dias, G.;  
Biomater. (2006) 27 1728-1734
- [10] Currey, J.;  
Science (2005) 309 253-254
- [11] Epple, M.;  
Biomaterialien und Biomineralisation;  
Teubner Wiesbaden 2003
- [12] <http://depts.washington.edu/bonebio/ASBMRed/ASBMRed.html>  
Stand 10.11.2007
- [13] Merry, J.; Gibson, I.R.; Best, S.M.; Bonfield, W.;  
J Mater Sci:Mater in Med. (1998) 9 779-783
- [14] Tadic, D.; Peters, F.; Epple, M.;  
Biomater. (2002) 23 2553-2559
- [15] Borum, L.; Wilson, O.C.;  
Biomater. (2003) 24 3681-3688

- [16] Nalla, R.K.; Kinney, J.H.; Ritchie, R.O.;  
Nature materials (2003) 2 164-168
- [17] Fratzel, P.; Gupta, H.S.;  
Nanoscale Mechanism of Bone Deformation and Fracture;  
in Handbook of Biomineralization Editor B auerlein, E.  
Wiley-VCH Weinheim 2007
- [18] Wise, E.R.; Maltsev, S.; Davies, M.E.; Duer, M.J.; Jaeger, C.;  
Loverdige, N.; Murray, R.C.; Reid, D.G.;  
Chem. Mater. (2007) 19 5055-5057
- [19] Taylor, D.;  
Nature materials (2003) 2 133-134
- [20] Felsenbein, D.;  
Pharm Unserer Zeit; (2001) 6 488-494
- [21] Veis, A.;  
Biomineralization; Editors: Dove, p.; De Yoreo, M.; er, J.Y.;  
The mineralogical Society of America  
Washington, D.C. (2003) Vol 54 249
- [22] Busch, S.;  
Dissertation TU Darmstadt 1998
- [23] Ladmiral, V.; Melia, E.; Haddleton, D.;  
Eur Polym J (2004) 40 431-449
- [24] Zaikov, G.E. (Editor)  
Chemistry of polysaccharides;  
Koninklijke Brill NV, Leiden 2005
- [25] Yui, T.; Ogawa, K.,  
in Polysaccharides 2<sup>nd</sup> Ed.  
Marcel Dekker, New York 2005
- [26] V arum, K.M.; Smidsr od, O.;  
in Polysaccharides 2<sup>nd</sup> Ed.  
Marcel Dekker, New York 2005
- [27] Rinaude, M.;  
Food Hydrocolloids (2001) 15 433-440
- [28] Sui, W.; Song, G.; Chen, G.; Xu, G.;  
Coll Surf A: Physicochem. Eng. Aspects (2005) 256 29-33
- [29] Shepherd, R.; Reader, S.; Falshaw;  
Glycoconj. J. (1997) 14 535-542

- [30] Knaul, J.; Hudson, S.M.; Creber, K.A.M.;  
J Appl Polym Sci 72 1721-1732
- [31] Heux, L.; Brugnerotto, J.; Desbrières, J.; Versali, M.-F.; Rinaudo, M.;  
Biomacromolecules (2000) 1 746-751
- [32] Jaworska, M.; Sakurai, K.; Gaudon, P.; Guibal,  
E.; Polym Int 52 (2003) 198-205
- [33] Yalpani, M.; Hall, L.;  
Macromolecules (1984) 17 272-281
- [34] Sashiwa, H.; Kawasaki, N.; Nayakama, A.; Muraki, E.;  
Yamamoto, N.; Aiba, S.-I.;  
Biomacromolecules (2002) 3 1126-1128
- [35] Masur, Y.; Laurance, D.H.  
Macromolecules 17 (1984) 272
- [36] Nyström, B.; Kjøniksen, A.L.; Iversen, C.;  
Adv. Colloid Interf. Sci. (1999) 79 81
- [37] Kjøniksen, A.L.; Iversen, C.; Nyström, B.; Nakken, T.; Palmgren, O.;  
Macromolecules (1998) 31 8142-8148
- [38] Kjøniksen, A.L.; Nyström, B.; Iversen, C.; Nakken, T.; Palmgren, O.;  
Tande, T.; Langmuir (1997) 13 4948-4952
- [39] Anthonsen, M.W.; Vårum, K.M.; Hermansson, A.M.; Smidsrød, O.;  
Brandt, D.;  
Carbohydr Polym (1994) 25 13-23
- [40] Philippova, O.E.; Volkov, E.V.; Sitnikova, N.L.; Khoklov, A.R.;  
Biomacromolecules (2001) 2 483-490
- [41] Muzzarelli, A.R.;  
Natural Chelating Polymers;  
Pergamon Press; New York 1973
- [42] Masari, M.S.; Reuter, F.W.; Friedmann,  
J. Appl. Polym. Sci. (1974) 18 675-681
- [43] Modrzejewska, Z.; Kaminski, W.;  
Ind. Eng. Chem. Res. (1999) 38 4946-4959
- [44] Liu, H.; Chen, B.; Mao, Z.; Gao, C.;  
J. Appl. Polym. Sci. (2007) 106 6 4248-4256
- [45] Molvinger, K.; Quinard, F.; Brunek, D.; Boissière, M.; Devoiselle, J.M.;  
Chem. Mater. (2004) 16 3367-3372

- [46] Quinard, F.; Choplin, A.; Domard, A.;  
Langmuir (2000) 16 9106-9108
- [47] VandeVord, P.J.; Matthew, H.W.T., DeSilva, S.P.; Mayton, L.;  
Wu, B.; Wooley, P.H.;  
Inc. J. Biomed Mater Res (2002) 59 585-590
- [48] Desbries, J.; Rinaudo, M. Babak, V.; Vikhoreva, G.;  
Polym. Bull. (1997) 39 209
- [49] Hamman, J.H.; Schultz, C.M.; Kotze, A.F.;  
Drug Dev. Ind. Pharm. (2003) 29 161-172
- [50] Khor, E.; Lim, L.Y.  
Biomater. (2003) 24 2339-2349
- [51] Qu, X., Wirsén, A.; Albertson, A.-C.;  
Polymer, (2000) 4841-4847
- [52] Sinha, V.R.; Kumura, R.;  
Int. J. Pharm. (2001) 224 (1-2) 19-38
- [53] Martino, A.D.; Sittinger, M.; Rsibud, M.V.;  
Biomater. (2005) 26 5983-5990
- [54] Meyer, K.; Palmer, J.W.;  
JBC (1934) 107 629-634
- [55] Milas, M., Rinaudo;  
Polysaccharides 2<sup>nd</sup> Edition (2002) 535-549
- [56] Hascall, V.;  
Glycoconj. J. (2000) 17 607-617
- [57] Hascall, V.C.; Laurent, T.C.;  
Hyaluronan: Structure and Physical Properties;  
published online in [www.glycoforum.gr.jp](http://www.glycoforum.gr.jp) (1997)
- [58] Winter, W.T.; Arnott, S.;  
J. Mol. Biol. (1977) 117 761-784
- [59] Ohya, S.; Nakayama, Y.; Matsuda, T.;  
Biomacromolecules (2001) 2 856-863
- [60] Asari, A.,  
Novel Functions of Hyaluronen Oligosaccharides; published online in  
[www.glycoforum.gr.jp](http://www.glycoforum.gr.jp) (2005)
- [61] Ladmiral, V.; Melia, E.; Haddleton, D.;  
Eur Polym J (2004) 40 431-449

- [62] Traving, C.; Schauer, R.;  
Cell. Mol. Life Sci. (1998) 54 1330
- [63] Inoue, Y.; Inoue, S.;  
Pure Appl. Chem.; (1999) 71 5 789-800
- [64] Varki, A.;  
Glycobiology (1992) 2 1 25-40
- [65] Traving, C.; Schauer, R.  
Cell. Mol. Life Sci. (1988) 54 1330-1349
- [66] Janas, T.; Janas, T.;  
in Polysaccharides 2<sup>nd</sup> Ed.  
Marcel Dekker New York 2005
- [67] Henderson, T.; Venable, R.; Egan, W.;  
J. Am. Chem. Soc. (2003) 125 10 2930-2939
- [68] Rita Gerardy-Schahn,  
Vortrag DGBM Tagung 2007 Hannover
- [69] Tzeng, Y.-L.; Datta, A.K., Strole, C.A.; Lobritz, M.A.; Carlson, R.W.;  
Stepens, D.S.;  
Infect. Immun. (2005) 73 3 1491-1505
- [70] Steenbergen, S.M.; Vimr, E. R.;  
JBC (2003) 278 17
- [71] Pon, R.A.; Lussier, M.; Yang, Q.-L.; Jennnigsen, H.J.  
J. Exp. Med. (1997) 185 11 1929-1938
- [72] Häyrinen, J.; Jennigsem, H.; Raff, H.V.; Rougon, G.; Hanai, N.;  
Gerardy-Schahn, R.; Finne, J.;  
JID (1995) 171 1481-90
- [73] Troy, F.A.;  
Glycobiology (1992) 2 1 5-23
- [74] Close, B.E.; Colley, K.J.;  
JBC (1998) 273 51 34586-3459
- [75] Angata, K.; Fukada, M.;  
Biochimie (2003) 85 195-206
- [76] von der Ohe, M.; Wheeler, S.F.; Wuhrer, M.; Harvey, D.J.; Liedtke, S.;  
Mühlenhoff, M.; Gerardy-Schahn, R.; Geyer, H.; Dwek, R.A.; Geyer, R.;  
Wing, D.R., Wing, D.R.; Schechner, M.;  
Glycobiology (2002) 12 1 47-63

- [77] Finne, J.; Finne, U.; Deagostini-Bazin, H.; Goridis, C.;  
Biochem Biophys Res Comm. (1983) 112 2 482-487
- [78] Yang, R.; Major, D.; Rutishauer, U.;  
JBC (1994) 269 23039-23044
- [79] Johnson, C.P.; Fujimoto, I.; Rutishauer, U.; Leckband, D.E.;  
JBC (2005) 280 137-145
- [80] Yang, P.; Yin, X.; Rutishauer, U.;  
JCB (1992) 116 1487-1496
- [81] Nakata, D.; Troy, F.A.;  
JBC (2005) 280 46 38305-38316
- [82] Inoue, S.; Inoue, Y;  
JBC (2001) 276 34 31863-31870
- [83] Monnier, P.P.; Beck, S.G.M.; Bolz, J.; Henke-Fahle, S.;  
Dev. Biol. (2001) 229 1-14
- [84] Yabe, U.; Sato, C.; Matsuda, T.; Kitajima, K.;  
JBC (2003) 278 16 13875-13880
- [85] Roth, J.; Taatjes, D.J.; Bitter-Suermann, D.; Finne, J.;  
Proc. Natl. Acad. Sci. (1987) 84 1969-1973
- [86] Troy, F.A.;  
Trends Glycosci. Glycotechnol. (1997) 9 315
- [87] Zuber, C.; Lackie, P.M.; Catterall, W.A.; Roth, J.;  
JBC (1992) 267 14 9965-9971
- [88] Covault, J., Liu, Q.Y.; el-Deep, S.;  
Brain Res Mol Brain Res. (1991) 11 11-16
- [89] Klitgaard Polvsen, G.; Kornerup Ditlevsen, D.; Berezin, V.; Bock, E.;  
Neurochem Res. (2003) 28 127-141
- [90] Gomez, T.; Spitzer, N.;  
Nature (1999) 397 350-355
- [91] Rouiller, D.G.; Cirulli, V.; Halban, P.A.;  
Exp Cell Res. (1990) 191 305-312
- [92] Behr, J.; Lehn, J.;  
FEBS Letters (1972) 22 2 178-180
- [93] Bystricky, S.; Pavliak V.; Szu, S.;  
Biophys Chem. (1997) 63 147-152

- [94] Shimoda, Y.; Kitajima, K.; Inoue, S.; Inoue, Y.;  
Biochemistry (1994) 33 1202-1208
- [95] Yamasaki, R.; Bacon, B.;  
Biochemistry (1991) 30 851-857
- [96] H. Baumann, J.R. Brisson, F. Michon, R. Pon, H.J. Jennings,  
Biochemistry (1993) 32 4007-4013
- [97] Mühlenhoff, M.; Eckhardt, M.; Gerardy-Schahn, R.;  
Curr. Opinion in Structural Biology (1998) 8 558-564
- [98] Toikka, J.; Aalto, J.; Häyrynen, J.; Pelliniemi, L.J.; Finne, J.;  
JBC (1998) 273 44 28557-28559
- [99] Manzi, A.E.; Higa, H.H.; Diaz, S.; Varki, A.;  
JBC (1994) 269 23617-23624
- [100] Gulari, E.; Chu, B.; Liu, T.Y.;  
Biopolymers (1979) 18 2943-2961
- [101] Stummeyer, K., Dickmanns, A.; Mühlenhoff, M.; Gerardy-Schahn, R.;  
Ficner, R.;  
Nat. Struct. Mol. Biol. (2005) 12 90-96
- [102] El Maarouf, A.; Pectridis, A.K.; Rutishauer;  
Proc. Natl. Acad. Sci. (2006) 103 45 16989-16994
- [103] Haile, Y.; Haastert, K.; Cesnulevicius, K.; Stummeyer, K.; Timmer, M.;  
Berski, S.; Dräger, G.; Gerardy-Schahn, R.; Grothe, C.;  
Biomater. (2007) 28 1163-1173
- [104] Gregoriadis, G., Fernades, A.; Mital, M.; McCormack, B.;  
Cell. Mol. Life Sci. (2000) 57 1964-1969
- [105] Du, Y.; Taga, A.; Suzuki, S.; Liu, W.; Honda, S.;  
J. Chromatogr. A (2002) 962 221-231
- [106] Rees, D.A.; Scott; W.E.;  
J. Chem. Soc. (B) (1971) 469-479
- [107] Okuyama, K., Noguchi, K.; Miyazawa, T.; Yui, T.; Ogawa, K.;  
Macromolecules (1997) 30 5849-5855
- [108] Zhang, Y; Xu, C.; Xu, Y.; Gao, R. ; Zhang, X.;  
Carbohydr. Res.(2005) 340 1914-1917
- [109] Atkins, E.D.T.; Phelps,C.F.; Sheehan, J.K.;  
Biochem. J. (1972) 128 1255-1263

- [110] Sheehan, J.K.; Gardener, H.K.; Atkins, E.D.T.;  
J. Mol. Biol. (1977) 117 113-135
- [111] Flippen, J.L.;  
Acta Cryst. (1973) B29 1881-1886
- [112] Janaswamy, S.; Chandrasekaran, R.;  
Carbohydr. Res. (2005) 340 835-83
- [113] Borsali, R.; Nguyen, H., Pecora, R.;  
Macromolecules (1998) 31 1548-1555
- [114] Ermi, B.D., Amis, E.J.;  
Macromolecules (1998) 31 7378-7384
- [115] Sedlak, M.;  
Langmuir (1999) 15 4045-4051
- [116] Drifford, M.; Dalbiez, J.P.;  
Biopolymers (1985) 24 1501-1514
- [117] Lifson, S.; Katchalski, A.;  
J. Polym. Sci. (1954) 13 43-55
- [118] Holm, C.; Joanny, J.F.; Kremer, K.; Netz, R.R.; Reinecker, P.; Seidel, C.;  
Vilgis, T.A.; Winkler, R.G.;  
Adv. Polym. Sci. (2004) 166 67-111
- [119] Cieland, R.L.; Wang, J.L.; Detweiler, D.M.;  
Macromolecules (1982) 15 386-395
- [120] Förster, S.; Schmidt, M.; Antonietti, M.;  
Polymer (1990) 31 781-792
- [121] Seldlák, M., Amis, E.;  
J. Chem. Phys. (1992) 96 1 817-825
- [122] de Gennes, P.G.; Pincus, P.; Velasco, R.M.; Brochard, F.;  
J. Phys. (Paris) (1976) Colloq. 37, 1461
- [123] Burchard, W.;  
in Polysaccharides 2<sup>nd</sup> Ed.  
Marcel Dekker New York 2005
- [124] Sogami, I., Ise, N.,  
J. Chem. Phys. 81 6320 (1984)
- [125] Ise, N.  
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (1986) 25 323



- [126] Schmitz, K.S.; Lu, M., Gauntt, J.;  
J. Chem. Phys. (1983) 78 5059
- [127] Peyratout, C.S.; Dähne, L.;  
Angew. Chem. (2004) 116 3850-3872
- [128] Rueger, J.M.  
Orthopäde (1998) 27 2 72-79
- [129] Staiger, M.P.; Pietak, A.M.; Huadmai, J.; Dias, G.;  
Biomater. (2006) 27 1728-1734
- [130] Weihe, S ;Epple, M.;  
Naturwissenschaften (2001) 2 18-20
- [131] Tadic, D.; Epple, M.;  
Biomater. (2004) 25 987-994
- [132] Ninomi, M.;  
Metallurgical and Materials Transactions A (2002) 33A 477-486
- [133] Kujala, S.; Pajala, A.; Kallioinen, M.; Pramila, A.; Tuukkanen, J.;  
Ryänen, J.;  
Biomater. (2004) 25 353-358
- [134] [www.de.zz-l.de/typo3temp/pics/e4542def69.jpg](http://www.de.zz-l.de/typo3temp/pics/e4542def69.jpg) Stand 10.11.2007
- [135] Rezwani, K.; Chen, Q.Z.; Blaker, J.J.; Boccaccini, A.R.;  
Biomater. (2006) 27 3413-3431
- [136] Günther, K.P.; Scharf, H.-P.; Pesch, H.-J.; Puhl, W.;  
Orthopäde (1998) 27 105-117
- [137] Borum, L.; Wilson, O.C.;  
Biomater. (2003) 24 3681-3688
- [138] Gondolf-Zink, B.;  
Orthopäde (1998) 27 96-104
- [139] Balazs, A.; Emrick, T.; Russell, T.;  
Science (2006) 314 1107-1110
- [140] Wang, X.; Li, Y.; Wei, J.; de Groot, K.;  
Biomater. (2002) 23 4787-4791
- [141] Li, Z.; Yubao, L.; Aiping, Y.; Xuelin, P.; Xuejang, W.; Xiang, Z.;  
J Mater Sci Mater Med. (2005) 16 213-219

- [142] Rusu, V.M., Ng, C.H.; Wilke, M.; Tiersch, B.; Fratzl, P.; Peter, M.G.; Biomater. (2005) 26 5414-5426
- [143] Hu, Q.; Li, B.; Wang, M.; Shen, J.; Biomater. (2004) 25 779-785
- [144] Kong, L., Gao, Y.; Cao, W.; Gong, Y.; Zhao, N., Zhang, X.; J. Biomed Mater Res (2005) 75A 275-282
- [145] Oliveira, J.M.; Rodrigues, M.T.; Silva, S.S.; Malafaya, P.B.; Gomes, M.E.; Viegas, C.A.; Dias, I.R.; Azevedo, J.T.; Mano, J.F.; Reis, R.L. Biomater. (2006) 27 6123-6137
- [146] Scott, J.E.; published online in [www.glycoforum.gr.jp](http://www.glycoforum.gr.jp) (1998)
- [147] Witte, F.; Feyerabend, F.; Maier, P. Fischer, J.; Strömer, M.; Blawert, C.; Dietzel, W.; Hort, N.; Biomater. (2007) 28 2163-2174
- [148] Witte, F.; Kaese, V.; Haferkamp, H.; Switer, A.; Meyer-Lindenberg, A.; Wirth, C.J.; Windhagen, H.; Biomater. (2005) 26 3557-2563
- [149] Switzer, A.; Dissertation; Tierärztliche Hochschule (2005) Hannover
- [150] Kaese, V.; Fortschritt-Berichte VDI Reihe 5 Nr. 666 VDI-Verlag Düsseldorf 2002
- [151] Witte, F.; Podolsky, C.; Hassel, T.; Lucas, A.; Werkstatttechnik online (2004) 94 692-696
- [152] Hort, N. [www.gkss.de/templates/images\\_d/portal/medizin\\_2.pdf](http://www.gkss.de/templates/images_d/portal/medizin_2.pdf) Stand 30.10.2007
- [153] Chen, C.-C., Liu, C.-Y.; Wu, C.-H.; Yeh, C.-C.; Su, M.-T.; Wu, Y.-C.; Adv. Mater. (2005) 17 404-407
- [154] Arruebo, M.; Fernández-Pacheco, R.; Ibarra, R.; Santamaria, J.; Nanotoday (2007) 2 22-32
- [155] Barbé, C., Bartlett, J.; Kong, L., Finnie, K.; Lin, H.Q.; Larkin, M., Calleja, S., Bush, A.; Calleja, G.; Adv. Mater. (2004) 16 1959-1966
- [156] Tröster, S.D.; Müller, U.; Kreuter, J.; Int J Pharm (1990) 61 85-100

- [157] The Chemistry of Nanomaterials; Sythesis, properties and Applications in 2 Volumes; Vol. 1  
Editors: Rao, C.N.R.; Müller, A.; Cheetham, A.K.;  
Wiley-VCH Weinheim 2004
- [158] Banfield, J.F.; Welch, S.A.; Zhang, H.; Thomson Ebert, T.; Penn, R.L.;  
Science (2000) 289 751-754
- [159] <http://www.calpoly.edu/~rfranke/Image1a.jpg>  
Stand 10.11.2007
- [160] Pardridge, W.A.;  
J Control Release (2007) 122 345-348
- [161] Gaillard, J.P.; de Boer, A.G.;  
J Control Release (2006) 116 e60-e62
- [162] Tsutsui, Y.; Tomizawa, K.; Nagita, M.; Michiue, H.; Nishiki, T.-I.;  
Ohmori, I.; Seno, M.; Matsui, H.;  
J Control Release (2007) 122 159-164
- [163] Fujita, M.; Lee, B.-S.; Khazenzon, N.M., Penichet, M.L.; Wawrowsky,  
K.A.; Patil, R.; Ding, H.; Holler, E.; Black, K.L.; Ljubimova, J.Y.;  
J Control Release (2007) 122 356-363
- [164] Estévez, C.M.; Smith, J.E.; Wang, K., He, X.; Wang, l.; Tan, W.;  
Nanotoday (2007) 2 44-3250
- [165] Stöber, W., Fink, A., bohme, E.;  
J. Colloid Interface Sci. (1968) 26 62
- [166] Rámila, A., Muños, B.; Pérez-Partiente, J. ; Vallet-Regi, M.  
J. Sol Gel Sci. Tech. (2003) 26 1199-1202
- [167] Katiyar, A.; Yadav, S.; Smirniotis, P.G.; Pinto, N.G.;  
J. Chromatogr. A (2006) 1122 13-20
- [168] Chung, T.-H.; Wu, S.-H.; Yao, M.; Lu, C.-W.; Lin, Y.-S.; Hung, Y.; Mou,  
C.-Y.; Chen, Y.-C.; Huang, D.-M.;  
Biomater. (2007) 28 2959-2966
- [169] <http://sars.nhri.org.tw/enews/jpg2007/200707101635311.jpg>  
Stand 07.11.2007
- [170] Chen, J.-F.; Ding, H.-M.; Wang, J.-X.; Shao, L.,  
Biomater. (2004) 25 723-727
- [171] Bamnolker, H.; Nitzan, B., Gura, S.; Margel, S.;  
J Mater Sci Lett (1997) 16 1412-1415

- [172] Boksányi, L., Liardon, O., Kováts, E.;  
Adv Coll Int Sci (1976) 6 95-137
- [173] Gauthier, S. ; Aimé, J.P. ; Bouhacina, Z. ; Attias, A.J. ;Desbat, B. ;  
Langmuir (1996) 12 5126-5137
- [174] Elam, J.H.; Nygren, H.; Stenberg, M.;  
J. Biomed. Mater. Res.(1984) 18 953-959
- [175] Luzinov, I., Julthongpiput, D., Liebmann-Vinson, A.; Cregger, T.; Foster,  
M.D.; Tsukruk, V.V.;  
Langmuir (2000) 16 504-516
- [176] Alessandrini, A.; DeRenzi, V., Berti, L.; Barak, I.; Facci, P.;  
Surface Science (2005) 582 202-208
- [177] Suh, K.Y., Yang, J.M.; Kahdemhosseini, A., Berry, D.; Tran, T.-N.,  
Park, H., Langer, R.;  
J. Biomed, Mater. Res. Part B: Appl. Biomater. (2005) 72B 292-29
- [178] Yu, J.H.; Lee, C.W.; Im, S.S.; Lee, J.S.  
Rev. Adv. Mater. Sci. (2003) 4 55-59
- [179] <http://www.jeol.de>  
Stand 02.01.2008
- [180] Flegler, S.; Heckmann, J.W.; Klomprens, K.L.;  
Elektronenmikroskopie,  
Spektrum Heidelberg 1995
- [181] Instrumentelle Analytische Chemie  
K. Cammann (Hrsg.)  
Spektrum Verlag Heidelberg 2001
- [182] Kalender, W.A.;  
Coputertomographie; Publicis Cooperate Publishing; Erlangen 2006
- [183] Buzug, T.M.;  
Einführung in die Computertomographie;  
Springer Verlag, Berlin Heidelberg 2004
- [184] Coles, B.L.; Horsford, D.J.; McInnes, R.R.; van der Kooy, D.;  
Eur. J. Neurosci. (2006) 23 75-82
- [185] [http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)  
Stand 02.01.2008
- [186] Mansot, J.L.; Golabkan, V.; Romana, L.; Césaire, T.;  
J Microsc (2003) 210 110-118
- [187] Persönliche Mitteilung Prof. Rita Gerardy-Schahn Dezember 2007

- [188] Zeddis, M.;  
Diplomarbeit; Fachhochschule Osnabrück 2007
- [189] Becker, C.G.; Artola, A.; Gerardy-Schahn, R.; Becker, T.; Wetzl, H.;  
Schachner, M.;  
J. Neurosci. Res. (1996) 45 143-152
- [190] Yamaguchi, I.; Tokuchi, K.; Fukuzaki, H.; Koyama, Y.; Takakuda, K.;  
Monma, H.; Tanaka, J.;  
J Biomed Mater Res (2001) 55 20-27
- [191] Hesse, M.; Meyer, H.; Zeeh, B;  
Spektroskopische Methoden in der Chemie;  
Thieme Stuttgart (2005)
- [192] Fowler, B.O.;  
Inorg. Chem. (1974) 13 194-207
- [193] Li, P.; Nakanishi, K.; Kokubo, T.; de Groot, K.;  
Biomater. (1993) 14 963-968
- [194] Gomez-Vega, J.M.; Sugimura, H.; Takai, O.; Hozumi, A.J.;  
J. Mater. Sci.:Mater. in Med. (2001) 12 923-927



## 9.6 Tabellarischer Lebenslauf

PERSÖNLICHES

---

Name: Christin Menneking, geb. Rögge  
Anschrift: Jakobstraße 5; 30163 Hannover  
Geburtsdatum: 13. September 1979  
Geburtsort: Herford  
Familienstand: verheiratet  
Telefon: (0511) 1612799

SCHULAUSBILDUNG

---

1986 – 1990 Ev. Grundschule Exter; Vlotho  
1990 – 1999 Friedrichs-Gymnasium; Herford  
*Abitur*

STUDIUM

---

1999 –2004 Studium der Chemie / Universität Hannover  
*Diplom-Chemikerin*  
seit 2005 Arbeiten zur Dissertation /  
Universität Hannover; Institut für Anorganische Chemie

BERUFSERFAHRUNG

---

- 2000 - 2001            Universität Hannover; Institut für Werkstoffkunde  
Prof. Dr.-Ing. Heinz Haferkamp /  
Prof. Dr.-Ing. Friedrich-Wilhelm Bach  
*Wissenschaftliche Hilfskraft*
- 2002 – 2003            Universität Hannover; Institut für Anorganische Chemie  
Arbeitskreis für Festkörper- und Materialchemie  
Prof. Dr. Peter Behrens  
*Wissenschaftliche Hilfskraft*
- Seit 2005                Universität Hannover; Institut für Anorganische Chemie  
Arbeitskreis für Festkörper- und Materialchemie  
Prof. Dr. Peter Behrens  
*Wissenschaftliche Mitarbeiterin*



## 9.7 Publikationsliste

## ORIGINALARBEITEN

K. Bechstein, C. Menneking, J. Vogt, P. Behrens, C. Vogt  
 Chemical and structural characteristics of siliceous sponge skeletons in four species of Demospongiae  
 übersandt an *Analytical and Bioanalytical Chemistry*

O. Helmecke, C. Menneking, P. Behrens, H. Menzel  
 "Influence of shape and surface properties of microstructured reaction areas on the deposition of silica"  
 angenommen bei *Colloid and Polymer Science*

C. Menneking, J. Cravillon, P. Behrens:  
 "Aggregation and co-precipitation of polysialic acid"  
 in *Biomaterialien* 7 (2006) 91

C. Menneking; D. Bormann, F.-W. Bach, P. Behrens  
 Chemical and mechanical properties of polysaccharide hydroxylapatite composites  
 in Arbeit

C. Menneking, J. Cravillon, P. Behrens  
 Physicochemical properties of colominic acid  
 in Arbeit

C. Menneking; D. Bormann, F.-W. Bach, P. Behrens  
 Erfindungsmeldung Kombiimplantate

## TAGUNGSBEITRÄGE

C. Menneking, P. Behrens:  
 Physicochemical properties of polysialic acid, a candidate biomaterial  
 BPS'07 10th biannual Bayreuth Polymer Symposium in Bayreuth

C. Menneking, P. Behrens:  
 "Partially crystalline polysialic acid and its powder X-ray diffractogram"  
 3<sup>rd</sup> International meeting on Polysialic acid 2007 in Bad Lauterberg

D. Bormann, C. Menneking, P. Behrens, Fr.-W. Bach:  
 "Mechanical properties of polysialic acid composites as implant materials"  
 3<sup>rd</sup> International meeting on Polysialic acid 2007 in Bad Lauterberg

P. Behrens, I. Krueger, C. Menneking, E. Dimpfel, P.P. Mueller, H. Mojalla, M. Stieve, T. Lenarz:  
 Evaluation of commercial available nanoporous glasses (CPG<sup>®</sup>) as biomaterial  
 Workshop der DFG Forschergruppe PolySia ,Biomater. – Synthesis, Processing and Biological Evaluation' 2006 in Hannover

M. Jahns, P. Behrens, C. Menneking, S. Horstmann, F. Cornelius, H. Menzel:  
“Synthetic polyamines as a model system for the biomineralization of silica: adjusting the morphology of silica precipitates”

Workshop der DFG Forschergruppe PolySia ,Biomater. – Synthesis, Processing and Biological Evaluation’ 2006 in Hannover

B. Hering, C. Menneking, H. Menzel, P. Behrens:

“The influence of different polyamines combined with anionic sugars on silica deposition”

Workshop der DFG Forschergruppe PolySia ,Biomater. – Synthesis, Processing and Biological Evaluation’ 2006 in Hannover

C. Menneking, B. Rode, J. Cravillon, C. Kasper, T. Scheper, P. Behrens:

”Aggregation Behaviour of Polysialic Acid”

Workshop der DFG Forschergruppe PolySia ,Biomater. – Synthesis, Processing and Biological Evaluation’ 2006 in Hannover

C. Menneking, J. Cravillon, P. Behrens:

“Aggregation and co-precipitation of polysialic acid”

2<sup>nd</sup> International Symposium ‘Interface Biology of Implants’ 2006 Rostock-Warnemünde

C. Menneking, K. Bechstein, S. Gruhl, J. Vogt, H.-C. Schröder, C. Vogt, P. Behrens:

“Structure, growth and chemical composition of silica spicules in demosponges”

Jahrestagung der GDCh 2005 in Düsseldorf

C. Menneking, N. Witteck, P. Behrens:

“Mineralisation of polysialic acid”

8th Essen Symposium on Biomater. and Biomechanics: Fundamental and Clinical Applications 2005 in Essen

C. Menneking, J. Cravillon, P. Behrens:

“Aggregation behavior of polysialic acid in aqueous solutions in the presence and in absence of salts”

16<sup>th</sup> Joint Meeting 2005 in Hannover

C. Rögge, K. Bechstein, S. Gruhl, J. Vogt, H.-C. Schröder, P. Behrens, C. Hamm, C. Vogt:

“I. Interaction between formation, structure and performance of marine biomineralised materials”

C. Rögge, S. Gruhl, J. Vogt, U. Breuer, C. Vogt, P. Behrens:

“Analytical investigations on silica spicules of the sponge *Suberites domuncula*“

2. Berichtskolloquium des DFG Schwerpunktsprogramm ,Biomineralisation’ 2004 in Bonn