
Polymer-Silica-Materialien: Ihre Bedeutung bei der Biomineralisation und in der Biomaterialforschung

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

Doktorin der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Chemikerin Olga Kufelt
geboren am 16.11.1981 in Lebedewka

2010

Polymer-Silica-Materialien: Ihre Bedeutung bei der Biomineralisation und in der Biomaterialforschung

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

Doktorin der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Chemikerin Olga Kufelt
geboren am 16.11.1981 in Lebedewka

2010

Referent: Prof. Dr. Peter Behrens

Korreferent: Prof. Dr. Franz Renz

Tag der Promotion: 05.11.2010

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation „Polymer-Silica-Materialien: Ihre Bedeutung bei der Biomineralisation und in der Biomaterialforschung“ selbstständig verfasst habe und alle benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden. Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 04.08.2010

Dipl.-Chemikerin Olga Kufelt

Danksagung

Bei Prof. Peter Behrens möchte ich mich für die Ermöglichung und Betreuung meiner Arbeit in einem interdisziplinären Umfeld bedanken. Hierdurch hatte ich Möglichkeiten mit Kooperationspartnern aus unterschiedlichen Fachrichtungen zusammenzuarbeiten und wertvolle Einblicke in biologische, medizinische und technische Gebiete zu gewinnen.

Bei Prof. Franz Renz möchte ich mich für die Anfertigung des Zweitgutachtens und die damit verbundenen interessanten Gespräche herzlich bedanken.

Der Arbeitsgruppe Menzel danke ich für die gute Zusammenarbeit und insbesondere Frauke Cornelius für die Synthese der Polyamine, die eine wichtige Basis der Arbeit bildeten.

Allen Mitgliedern der Teilprojektgruppe D1 des SFB 599 danke ich für die wertvolle Zusammenarbeit und die intensiven Diskussionen. Insbesondere sind hier Muhammad Badar und Prof. Peter P. Müller für die vielen *in vitro*-Untersuchungen zu nennen sowie Nina Ehlert und Tammo Lüßenhop, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Für die gute Zusammenarbeit im Rahmen der Kooperation mit dem Teilprojekt D8 des SFB 599 unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Meike Stiesch möchte ich mich besonders bei Lysann Ringenberg und Dr. Andreas Winkel für die zahlreichen *in vitro*-Experimente bedanken.

Ein großer Dank gilt dem gesamten Arbeitskreis Behrens für die wunderbare Zeit, die selbstverständlichen Hilfestellungen untereinander und das mehr als angenehme Arbeitsklima. Die Arbeit sowie zahlreiche (Frauen)Gespräche im legendären „Biolabor“ mit den Biomädels in wechselnder Besetzung werden mir immer unvergessen bleiben. Ein großer Dank gebührt ebenfalls meinen HiWis Jan Hartwig, Semra Alemdar und ganz besonders Natalja Wendt, meiner Weltklasse-HiWine und Powerfrau, für ihren unermüdlichen und engagierten Einsatz und wenn es noch hundert weitere Proben zu beschichten gab.

Bei meiner Familie und allen Menschen, die mir nahe stehen, möchte ich mich sehr für die immerwährende Unterstützung während des gesamten Studiums und vor allem in der Zeit der Anfertigung dieser Dissertation bedanken.

Kurzzusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich in zweierlei Hinsicht mit Hybridmaterialien aus stickstoffhaltigen Polymeren und amorphem Siliciumdioxid, nämlich in Bezug auf ihre Bedeutung in der Biomineralisation und der Biomaterialforschung. In beiden Fällen stehen also lebende Systeme im Fokus.

Lineare und verzweigte Polyamine spielen in der Natur eine wichtige Rolle im Biomineralisationsprozess von Silica in Kieselalgen. In dieser Arbeit werden daher Kieselsäurekondensationsreaktionen unter Einfluss verschiedener synthetischer linearer Polyamine untersucht. Dabei hat insbesondere die Kettenlänge der Polyamine einen entscheidenden Einfluss auf den Kondensationsprozess und auf die Silicaabscheidung. Im Fokus der Untersuchungen stehen hier kurze Polypropylenimine, die bis zu acht Imineinheiten enthalten, hinsichtlich einer für die Aktivität möglicherweise erforderlichen Mindestkettenlänge. Für die Untersuchung der Kinetik der Kondensationsreaktion wurde die Molybdat-Methode herangezogen, das Partikelwachstum wurde mit Dynamischer Lichtstreuung verfolgt. Die Morphologie des gefällten Silicas wurde mit Rasterelektronenmikroskopie, die Zusammensetzung des Präzipitats mit der simultanen Thermoanalyse untersucht. Unter den gegebenen Bedingungen ist eine Kettenlänge von mindestens acht Propylenimin-Einheiten notwendig, damit das Amin eine Präzipitationsaktivität zeigt. Im Falle methylierter Polyimine reicht bereits eine Kettenlänge von sechs Einheiten aus.

Im zweiten Teil konzentriert sich die Arbeit auf die Modifizierung von Biomaterialien im Hinblick auf Anwendungen im medizinischen Bereich. Die Erforschung antibakterieller Beschichtungen ist Gegenstand intensiver Forschung, die Einsatzgebiete gehen weit über den medizinischen Bereich hinaus und Anwendungen sind für viele Gebrauchsgegenstände im Alltagsleben denkbar. Hier steht die Applikation einer antibakteriellen Beschichtung auf Mittelohrprothesen im Blickpunkt. Diese bakterizide Schicht soll die Bakterienfilmbildung auf der Prothese verhindern und so eine Besiedelung mit Schleimhautepithel fördern. Mittelohrprothesen werden eingesetzt, um den Hörverlust nach dem Verlust der Gehörknöchelchenkette zu kompensieren, wie er zum Beispiel bei einer chronischen Mittelohrinfektion auftritt. Poly(4-vinyl-*N*-alkylpyridiniumbromid) ist für seine bakterizide Wirkung bekannt. Dieses Polymer wurde durch verschiedene Verfahren auf Substrate aus Glas, amorphem oder nanoporösem Siliciumdioxid aufgebracht. Die Charakterisierung der Substratoberfläche erfolgte durch Kontaktwinkel-messungen, die Menge an gebundenem Polymer konnte indirekt über einen Fluorescein-Farbstofftest photometrisch ermittelt werden. Untersuchungen in Bakterienkulturen zeigten allerdings nur eine begrenzte Wirksamkeit. Des Weiteren wurden silberhaltige Polymerbeschichtungen präpariert und ihre Wirkung untersucht.

Stichworte: Silica, Silica-Hybridmaterialien, Biomineralisation, Polyamine, Poly(4-vinyl-*N*-alkylpyridiniumbromid), antibakterielle Beschichtungen

Abstract

The present work deals with two aspects of hybrid materials of nitrogen-containing polymers and amorphous silicon dioxide, namely in the fields of biomineralization and biomaterials. Thus, in both cases living systems are in the focus of the investigations.

Linear and branched-chain polyamines play a prominent role in the biomineralization process which leads to condensed silica in diatoms. Therefore, the examination of silicic acid condensation reactions under the influence of different synthetic linear polyamines is a main topic of this work. In particular, the polyamine chain length seems to have a crucial effect on the condensation process and on silica precipitation. Short propyleneimines consisting of maximally eight imine groups are in the focus due to the fact that a minimum chain length is probably required for the polyamine activity. For the investigation of the kinetics of the condensation reaction the molybdate method was applied, particle growth was followed with dynamic light scattering. The morphology of the obtained precipitates was examined with scanning electron microscopy and the composition of the precipitates was determined using simultaneous thermal analysis. Under the given conditions, a chain length of at least eight propylene imine units is necessary for the precipitation-active amines. In the case of methylated polyimines, a chain length of six units is sufficient.

The second part of the work concentrates on the chemical modification of biomaterials for medical applications. Considerable research has been directed towards investigations on antibacterial coatings, with application fields extending far beyond the medical sector to numerous objects in everyday life. Here, the focus lies in the application of an antibacterial coating on middle ear prostheses. Such a bactericidal layer could prevent the formation of a bacterial film on the implant and favour its colonization with mucosa. In middle ear surgery, where the loss of the ossicular chain is often the result of a chronic inflammation of the middle ear, the implant replacing the ossicular chain compensates the hearing loss. *N*-hexylated poly-(4-vinylpyridine) is well known for its bactericidal effect. Using different methods, this polymer was attached to substrates of glass, of amorphous and of nanoporous silica. The characterization of the substrate surface was performed by contact angle measurements; the amount of the attached polymer was determined photometrically by using the fluorescein dye test. Investigations in bacterial cultures however showed only a limited effect. In addition, silver-containing polymer coatings were prepared; their antibacterial effect was also tested in bacterial culture experiments.

Key words: silica, silica hybrid materials, biomineralization, polyamines, poly-(4-vinyl-*N*-hexylpyridiniumbromide), antibacterial coatings

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Tabellenverzeichnis..... | IV |
| Abbildungsverzeichnis..... | VI |
| Abkürzungsverzeichnis | XII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 2 Allgemeine Grundlagen | 9 |
| 2.1 Grundlagen der Biomineralisation..... | 9 |
| 2.1.1 Biominerale in der Natur | 9 |
| 2.1.2 Biosilifizierung in Diatomeen..... | 13 |
| 2.1.3 Bioorganische Moleküle in Diatomeen | 15 |
| 2.1.4 Metabolismus und Mechanismen der Biogenese..... | 18 |
| 2.1.5 Mechanismen der Kieselsäurekondensation..... | 29 |
| 2.1.5.1 Kondensationsverhalten der Kieselsäure..... | 29 |
| 2.1.5.2 Partikelwachstum | 31 |
| 2.1.5.3 Grundlagen der Sol- und Gelbildung | 31 |
| 2.2 Anatomie des Mittelohres und Prinzipien der Schallübertragung..... | 34 |
| 2.2.1 Pathologie des Mittelohres..... | 37 |
| 2.2.2 Methoden zur Rekonstruktion des Schalleitungsapparates | 38 |
| 2.2.3 Optimierungsstrategien für Mittelohrprothesen..... | 41 |
| 2.2.4 Antibakterielle Oberflächen..... | 45 |
| 2.2.5 Biofilmformation | 47 |
| 2.2.5.1 Bakterizide Beschichtungen auf der Basis von Polymeren..... | 51 |
| 2.2.6 Geordnete mesoporöse Materialien | 57 |
| 2.2.6.1 Präparation dünner Silicafilme: EISA-Mechanismus | 59 |
| 3 Analytischer Teil..... | 61 |
| 3.1 Molybdat-Methode | 61 |
| 3.2 Dynamische Lichtstreuung | 63 |
| 3.3 Rasterelektronenmikroskopie | 64 |
| 3.4 Simultane Thermoanalyse | 65 |
| 3.5 Kontaktwinkel..... | 65 |
| 3.6 Spin Coating | 66 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.7 | Dip Coating..... | 67 |
| 3.8 | Zellviabilität..... | 67 |
| 3.9 | Bakterielle Aktivität..... | 68 |
| 4 | Experimenteller Teil..... | 70 |
| 4.1 | Synthese und Charakterisierung der Additive..... | 70 |
| 4.1.1 | Darstellung des Hexaazadocosans..... | 72 |
| 4.1.2 | Darstellung von N^1, N^4, N^9, N^{12} -Tetratosylspermin (3)..... | 73 |
| 4.1.3 | Darstellung des Dinitrils (4)..... | 74 |
| 4.1.4 | Darstellung des Diamins (5)..... | 74 |
| 4.1.5 | Darstellung der Hexatosylverbindung (6)..... | 75 |
| 4.1.6 | Darstellung des N, N' -Bis-[3-(3-amino-propylamino)-propyl]-butan-1,4-diamins (1)..... | 75 |
| 4.1.7 | Darstellung des $N, N, N', N', 4, 8, 13, 17$ -Octamethyl-4, 8, 13, 17-tetraaza-eicosan-1, 20-diamin (1a) (MHAD)..... | 76 |
| 4.1.8 | Methylierung von Spermin (2) zum $N, N, N', N', 4, 9$ -Hexamethyl-4, 9-diazadodecan-1, 12-diamin (2a) (MSpermin)..... | 77 |
| 4.2 | Kondensationsreaktionen der Kieselsäure..... | 78 |
| 4.3 | Kinetik der Kieselsäurekondensation..... | 80 |
| 4.3.1 | Kalibration der Molybdat-Methode..... | 80 |
| 4.3.2 | Durchführung der Messungen..... | 81 |
| 4.4 | Partikelbildung und Partikelwachstum..... | 82 |
| 4.5 | Präzipitationsaktivität der Additive..... | 83 |
| 4.6 | Mesoporöse Beschichtungen..... | 84 |
| 4.7 | Kovalente Anbindung von Poly(4-vinylpyridin)..... | 84 |
| 4.7.1 | Anbindung von 3-Aminopropyltrimethoxysilan..... | 85 |
| 4.7.2 | Umsetzung mit 1,4-Dibrombutan..... | 85 |
| 4.7.3 | Anbindung von Poly(4-vinylpyridin) und Hexylierung..... | 85 |
| 4.8 | Präparation von Silica-Hybrid-Filmen..... | 85 |
| 4.8.1 | Präparation silberhaltiger Silica-Hybrid-Materialien..... | 86 |
| 4.9 | Kovalente Anbindung von Poly(4-vinylpyridin) via 3-Brom-propyltrimethoxysilan..... | 87 |
| 4.10 | Fluorescein-Test..... | 88 |
| 5 | Ergebnisse und Diskussion..... | 90 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5.1 | Präzipitationsaktivität der Polyamine | 90 |
| 5.1.1 | Kinetik der Kondensationsreaktionen..... | 92 |
| 5.1.2 | Partikelbildung und Partikelwachstum | 94 |
| 5.1.2.1 | Partikelbildung und Partikelwachstum unter Einfluss von Polyaminen..... | 94 |
| 5.1.3 | Präzipitationsaktivität in Gegenwart von Phosphat..... | 103 |
| 5.1.4 | Morphologische Untersuchung der Präzipitate..... | 118 |
| 5.1.5 | Thermogravimetrische Untersuchungen..... | 125 |
| 5.2 | Charakterisierung der Silicabeschichtungen..... | 130 |
| 5.2.1 | Kovalent gebundenes Poly(4-vinyl- <i>N</i> -hexylpyridinium)bromid – Herstellung und Charakterisierung | 131 |
| 5.2.1.1 | Viabilitätstests mit Maus- und Gingivafibroblasten..... | 135 |
| 5.2.1.2 | Antibakterielle Eigenschaften | 142 |
| 5.2.2 | Silica-Hybridmaterialien..... | 147 |
| 5.2.3 | PVP-Anbindung durch Modifizierung mit BPTMS | 151 |
| 6 | Zusammenfassung und Ausblick | 154 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 160 |
| 8 | Anhang..... | 170 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 4.1: Konzentrationen der verschiedenen eingesetzten Additive. Angegeben sind die Molmasse bezogen auf eine Monomereinheit M_N , die Konzentration c bezogen auf die Masse und die theoretische Monomerenkonzentration c_N | 79 |
| Tabelle 4.2: Übersicht über die mit der Dynamischen Lichtstreuung durchgeführten Messungen..... | 83 |
| Tabelle 4.3: Übersicht der durchgeführten Syntheseansätze mit BPTMS. | 87 |
| Tabelle 4.4: Übersicht über die durchgeführten Mikrowellensynthesen..... | 88 |
| Tabelle 5.1: Ergebnisse der Präzipitationsexperimente verschiedener Polyamine in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration c_P | 91 |
| Tabelle 5.2: Übersicht über aus DLS-Messungen erhaltene Partikeldurchmesser d_Z bei gegebener Phosphatkonzentrationen c_P sowie die in dem betreffenden Polyamin-Phosphat-System beobachteten maximalen Partikeldurchmesser d_{Zmax} in Gegenwart von verschiedenen langen Polyaminen. Werte für PMPI ₁₄ und PMPI ₉ wurden aus Lit. [203] entnommen. | 107 |
| Tabelle 5.3: Vergleich der aus REM-Untersuchungen erhaltenen Partikeldurchmesser d , die an Präzipitaten beobachtet wurden, die aus Reaktionen in Gegenwart von PPI ₈ , PMPI ₉ und PMPI ₂₀ bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen c_P erhalten wurden..... | 124 |
| Tabelle 5.4: Ergebnisse des Fluorescein-Farbstofftests jeweils nach der Anbindung von APTMS, 1,4-Dibrombutan, PVP und hexyliertem PVP.. | 132 |
| Tabelle 5.5: Ergebnisse des Fluorescein-Tests an Proben mit kovalent angebundenem, hexylierten PVP. Als Untergrund diente unbehandeltes Glas sowie amorphe und mesoporöse Silicabeschichtungen. Die Referenzproben bestehen aus unbehandeltem Glas..... | 134 |
| Tabelle 5.6: Ergebnisse der Farbstoffuntersuchungen und Kontaktwinkelmessungen an Proben mit kovalent angebundenem, hexylierten, octylierten bzw. decylierten PVP..... | 135 |
| Tabelle 5.7: Zusammenfassung zur Bewertung der Biokompatibilität in Bezug auf Mausfibroblasten von Proben mit kovalent angebundenem, nicht hexyliertem PVP auf Glas (A) sowie von hexyliertem PVP, das auf Glas (B) sowie auf amorphe (C) bzw. mesopöröse (D) Silicabeschichtungen angebunden wurde..... | 138 |
| Tabelle 5.8: Zusammenfassung zur Bewertung der Biokompatibilität in Bezug auf Gingivafibroblasten von Proben mit kovalent angebundenem, nicht hexyliertem PVP auf Glas (A) sowie von hexyliertem PVP, das auf Glas (B) sowie auf amorphe (C) bzw. mesopöröse (D) Silicabeschichtungen angebunden wurde. Als Kontrolle wurde unbehandeltes Glas herangezogen. | 139 |

| | |
|---|-----|
| Tabelle 5.9: Vergleich der mit dem Fluorescein-Test gemessenen Dichte von Ammoniumgruppen für unterschiedlich alkylierte PVP-Silica-Hybrid-Proben und Proben mit kovalent angebundenem PVP, das ebenfalls auf unterschiedliche Weise alkyliert ist. | 148 |
| Tabelle 5.10: Ergebnisse der Stabilitätstests verschieden alkylierter Polymer-Silica-Hybridbeschichtungen in PBS und SBF für eine Dauer von 5 d. Bei der Kontrolle handelt es sich um einen reinen amorphen Silicafilm..... | 150 |
| Tabelle 5.11: Ergebnisse des Fluorescein-Tests an PVP-beschichteten Proben in Abhängigkeit des eingesetzten Alkylierungsmittels. Das PVP wurde nach der Derivatisierung mit BPTMS auf Glasplättchen angebunden und mit verschiedenen Konzentrationen des Alkylierungsreagenzes hexyliert..... | 151 |
| Tabelle 5.12: Ergebnisse der in Ethanol und Wasser durchgeführten Stabilitätstests anhand von Werten des Fluorescein-Tests an PVP-beschichteten Proben. Das PVP wurde nach Derivatisierung mit BPTMS auf Glasplättchen angebunden und mit verschiedenen Konzentrationen des Alkylierungsreagenzes hexyliert..... | 152 |
| Tabelle 6.1: Zusammenfassung der in Gegenwart verschieden langer Polyamine sowie unterschiedlicher Phosphatkonzentrationen c_p erhaltenen Partikeldurchmesser d_z und d_{zmax} . Werte für PMPI ₁₄ und PMPI ₉ wurden aus [203] entnommen..... | 155 |
| Tabelle 6.2: Übersicht der mit Hilfe von Fluorescein-Tests gemessenen Konzentrationen der Ammoniumgruppen $c(A^+)$ von hexylierten, octylierten bzw. decylierten PVP-Proben. Die Beschichtungen wurden durch kovalente Anbindung von PVP nach Modifizierung der Oberfläche mit APTMS, in Form von PVP-Silica-Hybridfilmen oder durch kovalente Anbindung mit Hilfe von BPMTS-derivatisierten Polymeren erzeugt..... | 158 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1.1: Beispiele für die Strukturierung von Diatomeenschalen..... | 2 |
| Abbildung 1.2: Normaler Aufbau der Mittelohrstrukturen (a) und die schematische Darstellung einer Total Replacement Prosthese für die Herstellung der Schalleitung zwischen Trommelfell und Innenohr bestehend aus Bioverit® II (c). | 5 |
| Abbildung 1.3: Käuflich erhältliches Poly(4-vinylpyridin) entfaltet nach der Alkylierung zum Poly(4-vinyl-N-hexylpyridiniumbromid) eine antibakterielle Wirkung. | 6 |
| Abbildung 1.4: Poly(4-vinyl-N-hexylpyridiniumbromid) wird kovalent an unbehandeltes Glas (a), amorphes (b) und mesoporöses (c) Silicauntergrund angebunden. | 7 |
| Abbildung 2.1: Beispiele für einige Biominerale..... | 9 |
| Abbildung 2.2: Strukturvielfältigkeit des Silicas in Diatomeen..... | 11 |
| Abbildung 2.3 : In Biomineralen liegen die anisometrischen Mineralteilchen (blau) oft versetzt angeordnet, durch einen organischen Kleber (orange) verbunden vor (a). Die bei mechanischer Zugbelastung auftretende Kraft wird durch Scherung des organischen Klebstoffs zwischen den Mineralteilchen übertragen (b)..... | 12 |
| Abbildung 2.4: REM-Aufnahmen einiger repräsentativer Diatomeenpezies. | 14 |
| Abbildung 2.5: Petrischalen-Prinzip für den Aufbau radial-symmetrischer Diatomeen (links). Schale von <i>Thalassiosira pseudonana</i> als Beispiel für eine Diatomee mit radial-symmetrischen Aufbau (rechts)..... | 15 |
| Abbildung 2.6: Bioorganische Stoffe, die aus Diatomeenschalen isoliert wurden. | 16 |
| Abbildung 2.7: Spermin und Spermidin sind häufige Polyamine. Die Putrescin-Reste sind farbig gekennzeichnet..... | 17 |
| Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Diatomeenzelle während des Zellteilungsprozesses. | 20 |
| Abbildung 2.9: Zellteilungszyklus der Diatomeen..... | 21 |
| Abbildung 2.10: Lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einzelner Diatomeen-Zellen in zeitlicher Abhängigkeit in den charakteristischen Entwicklungsstadien (Scale bar: 2 µm). | 22 |
| Abbildung 2.11: Ein ²⁹ Si-NMR-Spektrum von Diatomeenzellen, die während des Zellteilungsprozesses mit ²⁹ Si gekennzeichnet wurden. | 23 |
| Abbildung 2.12: Phasenseparations-Modell nach SUMPER. | 24 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 2.13: Links: Schematische Darstellung der wahrscheinlichen Rolle von Templat-Aggregaten während der Zellwandbiogenese nach dem Phasenseparationsmodell. | 25 |
| Abbildung 2.14: Querschnittsprofil einer radial-symmetrischen Diatomeenschale basierend auf REM-Daten. | 26 |
| Abbildung 2.15: Modell zur Entstehung von Silica-Schalen in Diatomeen, basierend auf der polymer- und proteingesteuerten Silicasynthese..... | 28 |
| Abbildung 2.16: Oligomerisierung der Kieselsäure oberhalb eines pH-Wertes von 2..... | 30 |
| Abbildung 2.17: Schematische Darstellung von Gelnetzwerken. | 32 |
| Abbildung 2.18: Anatomie des menschlichen Ohres im Querschnitt. Übersicht des äußeren Ohres, Mittel- und Innenohr..... | 34 |
| Abbildung 2.19: Schematische Darstellung der Gehörknöchelchenkette im Mittelohr, Schnitt durch die Paukenhöhle. | 35 |
| Abbildung 2.20: Detaillierte Darstellung der Gehörknöchelchen bestehend aus Hammer, Amboss und Steigbügel. | 36 |
| Abbildung 2.21: Bänder und Gelenke der Gehörknöchelchen. | 36 |
| Abbildung 2.22: Schematische Darstellung der Total Ossicular Replacement Prothesis (TORP)..... | 38 |
| Abbildung 2.23: Konzepte zur modularen Modifizierung von Mittelohrprothesen.. | 43 |
| Abbildung 2.24: Bildung von Mukosa und Spongiosa auf einer Bioverit® II Mittelohrprothese im Kaninchenmodell. | 44 |
| Abbildung 2.25: Dentales Implantat mit osseointegrierter Implantatfixtur, Implantat-Abutment und Implantatkrone. | 46 |
| Abbildung 2.26: Schematische Darstellung der schrittweisen Besiedelung eines Biomaterials/ Implantatmaterials mit Bakterien und anschließender Biofilmbildung. | 48 |
| Abbildung 2.27: Schematische Darstellung der bakteriellen Adhäsion auf molekularer und zellulärer Ebene unter der Einbeziehung bakterieller Faktoren. | 49 |
| Abbildung 2.28: Beispiele für bakterizide Polymere..... | 52 |
| Abbildung 2.29: Schematische Darstellung der antibakteriellen Funktionsweise von kationischen Polymeren. | 53 |
| Abbildung 2.30: Schema zur kovalenten Anbindung von Poly(4-vinylpyridin) an eine Silicaoberfläche mit Hilfe von APTMS und 1,4-Dibrombutan als Linkermolekül.. | 54 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 2.31: Schema zur kovalenten Anbindung von Poly(4-vinylpyridin) an eine Silicaoberfläche mit Hilfe von BPTMS als reaktive Gruppe. | 55 |
| Abbildung 2.32: Schema zur Präparation polymerhaltiger Silicafilme mit Hilfe des Spin Coating. | 56 |
| Abbildung 2.33: Beispiele für Strukturen mesoporöser Materialien..... | 57 |
| Abbildung 2.34: Bildung mesoporöser Materialien durch strukturdirigierende Agentien (SDA) am Beispiel von MCM-41. | 58 |
| Abbildung 2.35: Verschiedene Stadien beim Dip Coating-/ Spin Coating-Prozess einer komplexen Flüssigkeit aus Silica-Sol, Tensid, Alkohol und Wasser. | 59 |
| Abbildung 3.1: Struktur des KEGGIN-Ions. | 61 |
| Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Prinzips beim Spin Coating. | 66 |
| Abbildung 4.1: Im Hinblick auf ihren Einfluss auf die Kieselsäurekondensation untersuchte Polyamine, von oben nach unten nach absteigender Anzahl von Polypropylenimino-Gruppen angeordnet: PPI ₈ , HAD, MHAD, Spermin sowie die methylierte Variante MSpermin..... | 71 |
| Abbildung 4.2: Schema zur Darstellung linearer Polyamine nach CORNELIUS. | 72 |
| Abbildung 4.3: Schema zur Darstellung des Hexaazadocosans (1). | 73 |
| Abbildung 4.4: Synthese von MHAD (1a) ausgehend von HAD (1a). | 76 |
| Abbildung 4.5: Darstellung von MSpermin (2a) ausgehend von HAD (2). | 77 |
| Abbildung 4.6: Genereller Ansatz zur Vorgehensweise bei der Untersuchung der Kondensationsreaktionen. | 80 |
| Abbildung 4.7: Kalibrationsgerade zur Bestimmung der Kieselsäurekonzentration mit der Molybdat-Methode..... | 81 |
| Abbildung 4.8: Allgemeine Vorgehensweise bei den kinetischen Messungen nach der Molybdat-Methode..... | 82 |
| Abbildung 4.9: Struktur (links) und eine Fotografie (rechts) des Natriumsalzes von Fluorescein. | 89 |
| Abbildung 5.1: Kinetik der Kieselsäurekondensation unter Einfluss von HAD/MHAD und Spermin/MSpermin im Vergleich zu einer Reaktion ohne Amin. | 93 |
| Abbildung 5.2: Exemplarische Auftragung der Anzahlverteilungen gegen den Partikeldurchmesser einer Kondensationsreaktion unter Einfluss von PMPI ₉ | 95 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 5.3: Ergebnisse der Dynamischen Lichtstreuung für Kieselsäurekondensationsreaktionen ohne Polyamin sowie in Gegenwart von PPI ₈ , HAD, MHAD, Spermin und MSpermin in Abhängigkeit von der Reaktionszeit..... | 97 |
| Abbildung 5.4: Ergebnisse der DLS-Messungen für die Kieselsäurekondensation in Gegenwart der zu untersuchenden Polyamine in Form der erhaltenen Z-Mittel d _Z | 99 |
| Abbildung 5.5: Z-Mittel aus den DLS-Messungen in Gegenwart von Polyaminen sowie aus der Referenzmessung ohne Polyamin..... | 100 |
| Abbildung 5.6: Schematische Darstellung des Effekts von Polyaminen auf die Silicabildung..... | 103 |
| Abbildung 5.7: Aus DLS-Messungen erhaltenen Z-Mittel für die Kieselsäurekondensation in Gegenwart von PPI ₈ in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration..... | 105 |
| Abbildung 5.8: Anzahlverteilungen der Partikelgrößen aus der Dynamischen Lichtstreuung für die Reaktionen in Gegenwart von PPI ₈ sowie 10 bzw. 100 mM Phosphat in Abhängigkeit von der Zeit..... | 105 |
| Abbildung 5.9: Ergebnisse der DLS-Messungen in Form der erhaltenen Z-Mittel für die Kieselsäurekondensation in Gegenwart von HAD in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration..... | 110 |
| Abbildung 5.10: Anzahlverteilungen der Partikelgrößen aus der Dynamischen Lichtstreuung für die Reaktionen in Gegenwart von HAD in Gegenwart von 10 bzw. 100 mM Phosphat..... | 110 |
| Abbildung 5.11: Ergebnisse der DLS-Messungen in Form der erhaltenen Z-Mittel für die Kieselsäurekondensation in Gegenwart von MHAD in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration..... | 111 |
| Abbildung 5.12: Anzahlverteilungen der Partikelgrößen aus der Dynamischen Lichtstreuung für die Reaktionen in Gegenwart von MHAD sowie 10 bzw. 100 mM Phosphat..... | 111 |
| Abbildung 5.13: Ergebnisse der DLS-Messungen in Form der erhaltenen Z-Mittel für die Kieselsäurekondensation in Gegenwart von Spermin in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration..... | 114 |
| Abbildung 5.14: Anzahlverteilungen der Partikelgrößen aus der Dynamischen Lichtstreuung für die Reaktionen in Gegenwart von Spermin sowie 10 bzw. 100 mM Phosphat..... | 115 |
| Abbildung 5.15: Ergebnisse der DLS-Messungen in Form der erhaltenen Z-Mittel für die Kieselsäurekondensation in Gegenwart von MSpermin in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration..... | 115 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 5.16: Anzahlverteilungen der Partikelgrößen aus der Dynamischen Lichtstreuung für die Reaktionen in Gegenwart von MSpermin sowie 10 bzw. 100 mM Phosphat. | 116 |
| Abbildung 5.17: REM-Aufnahmen des Präzipitates aus der Reaktion in Gegenwart von PPI_8 bei einem Phosphatzusatz von 50 mM. | 119 |
| Abbildung 5.18: REM-Aufnahmen des Präzipitates aus der Reaktion in Gegenwart von PPI_8 bei einem Phosphatzusatz von 100 mM. | 120 |
| Abbildung 5.19: REM-Aufnahmen des Präzipitates aus der Reaktion in Gegenwart von PPI_8 bei einem Phosphatzusatz von 150 mM. | 121 |
| Abbildung 5.20: REM-Aufnahmen des Präzipitates aus der Reaktion in Gegenwart von PMPI_9 bei einem Phosphatzusatz von 100 mM; entnommen aus Lit. [203]. | 122 |
| Abbildung 5.21: Thermogravimetrische Messung an einem Präzipitat, das aus einer Kondensationsreaktion in Gegenwart von PPI_8 und 100 mM Phosphat erhalten wurde..... | 126 |
| Abbildung 5.22: Thermogravimetrische Messung an einem Präzipitat, das aus einer Kondensationsreaktion in Gegenwart von PPI_{12} und 100 mM Phosphat erhalten wurde. ... | 127 |
| Abbildung 5.23: Graphische Gegenüberstellung der erhaltenen thermogravimetrischen Stufen aus Messungen an Proben, die in Gegenwart verschiedener Phosphatmengen und PPI_8 bzw. PPI_{12} erhalten wurden. | 128 |
| Abbildung 5.24: Schematische Darstellung der Vorgänge während der Silizifizierung in Gegenwart von langen Polyaminketten (oben) bzw. kurzen Polyaminen (unten). | 129 |
| Abbildung 5.25: Röntgen-Diffraktogramm eines calcinierten mesoporösen Silicafilms. Der Film wurde mit Hilfe von Spin Coating auf runde Glasplättchen aufgebracht. | 130 |
| Abbildung 5.26: Kontaktwinkelmessungen zur Kontrolle des Reaktionserfolgs bei der Anbindung von PVP. | 131 |
| Abbildung 5.27: Probenplättchen mit angebundenem hexyliertem PVP sowie mit nicht hexyliertem PVP. Als Untergrund diente unmodifiziertes Glas. Die hexylierte Probe ist durch Fluorescein rot gefärbt. | 133 |
| Abbildung 5.28: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellmorphologie von Mausfibroblasten auf unterschiedlich modifizierten Glasproben nach einem Tag und drei Tagen Beobachtungszeit. | 136 |
| Abbildung 5.29: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellmorphologie von Gingivafibroblasten auf unterschiedlich modifizierten Glasproben nach 24 h und 72 h Beobachtungszeit. | 137 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 5.30: REM-Aufnahmen zerbröckelter amorpher Silicabeschichtungen auf Glassubstraten (links und Mitte). | 137 |
| Abbildung 5.31: Ergebnisse der LDH-Assays für humane Gingivafibroblasten..... | 140 |
| Abbildung 5.32: Proliferationsrate von Gingivafibroblasten..... | 141 |
| Abbildung 5.33: Überprüfung der antibakteriellen Eigenschaften der unterschiedlich modifizierten Glasproben mit <i>S. mutans</i> und <i>S. sanguinis</i> | 142 |
| Abbildung 5.34: Bakterienanlagerung (<i>S. mutans</i>) an die mit PVP beschichteten Proben auf nicht hexyliertem PVP (A) auf Glas, hexyliertem PVP auf Glas (B) bzw. auf einer amorphen (C) bzw. auf einer mesoporösen (D) Beschichtung nach 1 h Inkubationszeit. | 144 |
| Abbildung 5.35: Auffällige Bakterienadhäsion von <i>S. sanguinis</i> im Randbereich von amorph beschichteten Proben mit hexyliertem PVP. | 145 |
| Abbildung 5.36: Bakterienanlagerung (<i>S. sanguinis</i>) an die mit PVP beschichteten Proben auf nicht hexyliertem PVP auf Glas (A), hexyliertem PVP auf Glas (B) bzw. auf einer amorphen (C) bzw. auf einer mesoporösen (D) Beschichtung nach 1 h Inkubationszeit. . . | 146 |
| Abbildung 5.37: REM-Aufnahme eines Hybridfilms aus octylierten PVP und Silica (Verhältnis Silica zu Polymer 5:1). Das Hybridmaterial ergibt einen homogenen Film. | 147 |
| Abbildung 5.38: Ergebnis der Röntgenfluoreszenzanalyse eines silberhaltigen Polymer-Silica-Hybridfilms..... | 149 |
| Abbildung 5.39: Ergebnisse bakterieller Tests mit <i>P. aeruginosa</i> an verschiedenen PVP-Silicabeschichtungen..... | 149 |
| Abbildung 5.40: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Live/Dead-Farbuntersuchung an einer nach der Derivatisierung mit BPTMS mit hexyliertem PVP beschichteten Probe nach 30 min Inkubationszeit. | 153 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|--|
| AFM | Atomic Force Microscopy (Rasterkraftmikroskopie) |
| AAP | Akkumulations-Assoziiertes Protein |
| APTMS | 3-Aminopropyltrimethoxysilan |
| BMP2 | Bone Morphogenetic Protein 2 |
| BPTMS | 3-Brompropyltrimethoxysilan |
| <i>cmc</i> | critical micelle concentration |
| CROP | Cationic ring-opening polymerization |
| <i>d</i> | Partikeldurchmesser |
| <i>d_z</i> | Z-Mittel |
| DCM | Dichlormethan |
| DLS | Dynamische Lichtstreuung |
| DMF | Dimethylformamid |
| EISA | Evaporation-Induced Self-Assembly |
| HBSS | Hank's Buffered Salt Solution |
| HZI | Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung |
| <i>g</i> | Erdschwerebeschleunigung (9.81 m·s ⁻²) |
| LDH | Lactatdehydrogenase |
| LB | Lysogeny Broth |
| MHH | Medizinische Hochschule Hannover |
| OD | optische Dichte |
| PAH | Poly(allylamin)hydrochlorid |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PIA | Polysaccharid Interzelluläres Adhäsion |

| | |
|----------|--|
| PMPI | Polymethylpropylenimin |
| PPI | Polypropylenimin |
| PTFE | Polytetrafluorethylen |
| PVP | Poly(4-vinylpyridin) |
| rpm | <i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute |
| REM | Rasterelektronenmikroskopie |
| SAXS | Small Angle X-ray Scattering |
| SBF | simulated body fluid |
| SDA | Strukturdirigierendes Agens |
| SDV | Silicon Deposition Vesicle |
| SIT | Silicon Transport protein |
| STV | Silicon Transport Vesicle |
| <i>T</i> | Temperatur |
| TEOS | Tetraethoxysilan |
| TG | Thermogravimetrie |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TMOS | Tetramethoxysilan |
| ZKP | Zellkulturplastik |

1 Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Hybridwerkstoffen aus silicatischen Materialien und stickstoffhaltigen Polymeren. Dabei stehen zwei unterschiedliche Zielsetzungen im Blickpunkt, die beide einen Bezug zu lebenden Systemen haben. Im ersten Teil wird die Bildung von Hybridmaterialien aus Polyaminen und amorphem Siliciumdioxid (Silica) behandelt, ein biomimetisches System, das die Bildung der Schalen von Kieselalgen nachahmt. Das Ziel im zweiten Teil der Arbeit ist es, auf der Basis potentiell bakterizider Polymere antibakterielle Beschichtungen für den Einsatz im biomedizinischen Bereich zu entwickeln.

Prozesse der Biomineralisation und der Biosilifizierung sind schon seit mehreren Jahren im Fokus der Forschung. Die Vermarktung silicatischer Produkte aus gefälltem amorphem Siliciumdioxid (Silica) führte zur Entstehung einer Milliarden-Industrie [1]. Diese Entwicklung ist sicherlich auf die Möglichkeit zurückzuführen, Produkte für spezielle Anwendungen unter Kontrolle der Oberflächenchemie und der Morphologie während des Kondensations- und Aggregationsprozesses herstellen zu können. Industrielle Prozesse der Produktion hochwertiger silicatischer Materialien erfordern üblicherweise harsche Reaktionsbedingungen wie hohe Temperaturen (für die Herstellung der Ausgangsmaterialien wie Wasserglas) sowie stark basische oder saure Bedingungen. Zudem entstehen oft umweltschädliche Nebenprodukte oder es sind giftige Silicatprecursoren erforderlich. Die chemische und morphologische Kontrolle der erzeugten Materialien ist bislang nicht optimal. Die natürliche Biogenese von Silica in Organismen wie Diatomeen, Schwämmen oder Radiolarien ermöglicht hingegen den Zugang zu faszinierenden, ästhetisch ansprechenden hochfunktionalen Materialien. Die Besonderheit dabei ist, dass diese Materialien unter biologischer Kontrolle aus Monokieselsäure geringer Konzentrationen erhalten werden können [2]. Daher sind Untersuchungen zu den Mechanismen der Biomineralisation von Silica von größter Bedeutung und es werden enorme Anstrengungen dahingehend unternommen, diese Prozesse zu verstehen und nachahmen zu können, um neue überlegene Materialien und Synthesewege zu erschließen. Die Umsetzung der Vorgaben der Natur in synthetisch-chemischen Prozessen führt oft sogar zu noch weiter verbesserten Eigenschaften von Materialien.

In der heutigen Zeit gibt es zahlreiche Beispiele für bioinspirierte Produkte wie zum Beispiel selbstreinigende Oberflächen mit dem sogenannten Lotus-Effekt.

Als Basis für die Untersuchung der Mechanismen der Biomineralisation von Silica haben sich Diatomeen als vielversprechende Forschungsobjekte erwiesen. Diese Arbeit beschäftigt sich in ihrem ersten Teil mit einem Modellsystem zur Biomineralisation von Siliciumdioxid in Form der Silicaschalen von Diatomeen. Diese marinen Einzeller bauen Zellwände aus amorphem Siliciumdioxid mit einer für jede einzelne Spezies spezifischen Mikro- und Nanostrukturierung auf. Einige Beispiele für auftretende Strukturierungen sind in Abbildung 1.1 in Form von rasterelektronen- und rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen gezeigt. Die Schalen weisen nicht nur eine verblüffende Architektur sondern auch eine hohe Stabilität auf [3]. Die Schalen dienen vor allem dem Schutz vor Fressfeinden. Durch ein ausgeklügeltes und feines Porensystem ist stets der Austausch mit der Umwelt möglich. Die Schalen sind aus amorphem Siliciumdioxid aufgebaut. Dieser natürliche Gerüststoff weist eine große Anzahl von OH-Gruppen auf der Oberfläche auf. Diatomeen sind photosynthetische Organismen und zu einem beträchtlichen Teil an der Bindung des atmosphärischen Kohlenstoffdioxids beteiligt. Somit ist ihre Bedeutung für den Kohlenstoffkreislauf enorm.

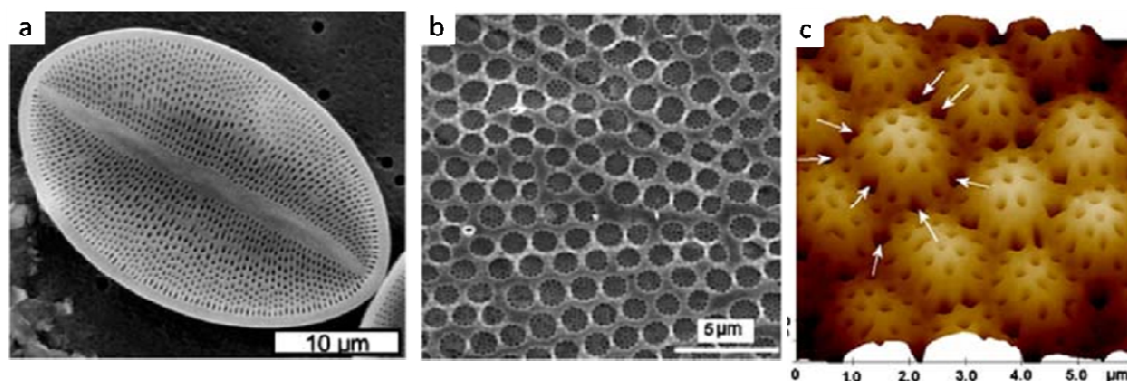


Abbildung 1.1: Beispiele für die Strukturierung von Diatomeenschalen. (a) Eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Cocconeis* sp., b) Eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der inneren Schicht von *Coscinodiscus* sp. zeigt ein Porensystem, (c) Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen von *Coscinodiscus* sp. zeigen kleine Strukturen auf. Entnommen aus Lit. [4,5].

Wegen der überragenden Leistung dieser winzigen Lebewesen, exquisite Strukturen aus Silica präzise herstellen zu können, sind Diatomeen zur Inspirationsquelle für

neue Anwendungen in der Nanotechnologie avanciert [6]. Biomimetische Ansätze können nach Erforschung der biologischen Vorgänge zu innovativen Produkten umgesetzt werden [7]. Als Beispiel für eine solche bioinspirierte Anwendung kann der Einsatz für optische Gassensoren genannt werden, da die Schalen von Diatomeen in Gegenwart bestimmter Gase (NO_2) Photolumineszenz zeigen und so Signale optochemisch weitergeben können [8]. Weiterhin werden Ansätze verfolgt, Diatomeenstrukturen als natürliche, hochpräzise Template für die Herstellung von Nanopartikeln einzusetzen [9,10]. Insgesamt wäre es erstrebenswert, solche Templatstrukturen aus Biosilica für keramische (MgO , TiO_2 , Zeolithe), halbleitende (Si-Ge) oder organische Gerüststoffe zu nutzen.

Die biochemischen Vorgänge der Biosilifizierung in den Diatomeen sind sehr komplex und daher bislang nicht vollständig geklärt. Zahlreiche Untersuchungen haben bislang gezeigt, dass neben dem kondensierten Silica und schwach polymerisiertem Silicat verschiedene organische Verbindungen in den Diatomeenschalen enthalten sind [11]. Diese gelten neben weiteren Faktoren als maßgeblich für den Bildungsprozess der Schalen [12-17]. Bei diesen Verbindungen handelt es sich unter anderem um lineare Polyamine verschiedener Kettenlängen [13,14] und um stark modifizierte Peptide und Proteine, wie die Silaffine und Silacidine, die Stoffklasse der sogenannten Silaffine [15-17]. Silaffine sind Polypeptide mit je nach Vertreter unterschiedlichen Molmassen und Modifizierung. Silaffin nat1-A₁ weist zum Beispiel eine geringe Molmasse, Polypropylenimin-Seitenketten sowie phosphorylierte Aminosäure-Reste auf. Vertreter der Silacidine sind Aspartat-, Glutamat- und Serinphosphat-reiche Peptide [18]. Sowohl Silaffine als auch Polyamine haben einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung und die Strukturierung von Silica und sind in der Lage, Silica *in vitro* zu präzipitieren [15,17]. Untersuchungen der Kieselsäurekondensationsreaktion und der Silicapräzipitation unter Einwirkung von Polyaminen können also zum Verständnis der Rolle der Polyamine während des Biomineralisationsprozesses dienen. Aktuelle Untersuchungen mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (AFM) und der Rasterelektronenmikroskopie (REM) ermöglichen Aufschlüsse über den Aufbau und die Entstehungswege der nanostrukturierten Silicaschalen [4,5,19].

Von JAHNS liegen aus unserer Arbeitsgruppe detaillierte Studien über den Einfluss von linearen Polyaminen sowie von Silaffin-1-analogen Polymeren auf die Bildung

von amorphem Siliciumdioxid vor [20]. In seiner Arbeit wurden Modelle für die Wirkungsweise der polymeren Substanzen bei den Präzipitationsvorgängen in Diatomeen vorgeschlagen. Ergebnisse über den Einfluss kurzketziger linearer Polyamine auf die Bildung von Silica liegen allerdings bis jetzt kaum vor [21-23]. In dieser Arbeit liegt daher das Augenmerk vor allem auf der Überprüfung der Aktivität kurzketziger, linearer Polyamine im Hinblick auf ihren Einfluss auf die Silica-Abscheidung. Von besonderem Interesse ist dabei, ob eine minimale Kettenlänge der Polyamine erforderlich ist, um ein schnelles Partikelwachstum und eine rasche Präzipitation *in vitro* zu fördern. Dazu soll mit Hilfe verschiedener analytischer Methoden ein Gesamtüberblick über die Einflüsse von Polyaminen in Abhängigkeit von ihrer Kettenlänge bei der Bildung von amorphem Siliciumdioxid dargestellt werden. Die Gewinnung der natürlichen Polymine aus den Diatomeenschalen gestaltet sich äußerst schwierig und liefert nur sehr geringe Mengen. Daher werden in dieser Arbeit synthetisch hergestellte Substanzen herangezogen. Ein Teil dieser Polyamine wurde von FRAUKE CORNELIUS [24] von der Arbeitsgruppe MENZEL vom Institut für Technische Chemie der Technischen Universität Braunschweig im Rahmen eines gemeinsamen DFG-Projektes im DFG-Schwerpunktprogramm „Prinzipien der Biomineralisation“ zur Verfügung gestellt.

Im zweiten Teil der Arbeit liegt die Zielsetzung auf der Entwicklung einer antibakteriellen Beschichtung auf der Basis spezieller stickstoffhaltiger Polymere. Der Einsatz der Beschichtung soll vor allem im biomedizinischen Bereich liegen, wobei der Transfer auf andere Anwendungen ebenfalls möglich ist. Der Einsatz einer bakteriziden Beschichtung ist vor allem auf dem Feld der Implantologie sinnvoll und erwünscht. Die Anzahl der Patienten, die mit einem Implantat versorgt werden müssen, steigt stetig an [25,26]. Ein gravierendes medizinisches Problem bei der Verwendung von permanenten Kathetern, Stents und Implantaten ist die bakterielle Kontamination dieser Materialien und Hilfsmittel [27]. Infektionen sind häufig für das Versagen von Implantaten in der modernen Medizin verantwortlich. Ein bakteriell befallenes Dauerimplantat muss letztendlich oft entfernt werden, um die Infektion medikamentös zu behandeln. So werden zum Beispiel Mittelohrprothesen zur Rekonstruktion des Schalleitungsapparates oft in chronisch infiziertes Mittelohrgewebe implantiert (Abbildung 1.2). Eine fortschreitende Infektion verhindert die Einheilung und eine vernünftige Fixierung des Implantats an die Mittelohrstrukturen. Medikamentöse Behandlungen mit Antibiotika haben den

Nachteil, dass sich Resistenzen ausbilden können. Eine antibakterielle Beschichtung könnte langfristig der Entstehung eines Biofilms auf der Prothese entgegenwirken und im idealen Fall die Besiedelung der Prothese mit Schleimhautepithel fördern.

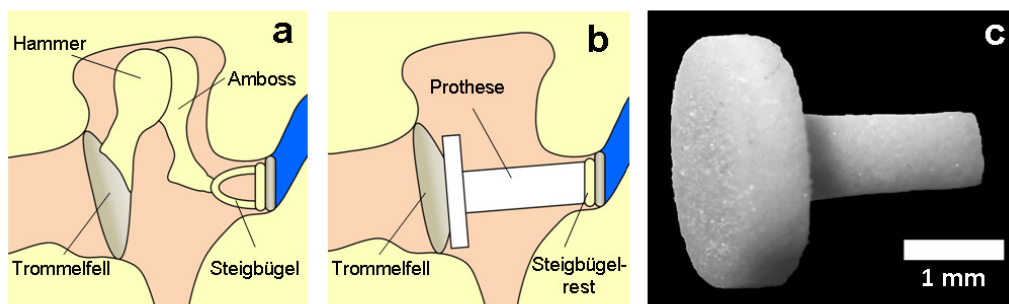


Abbildung 1.2: Normaler Aufbau der Mittelohrstrukturen (a) und die schematische Darstellung einer Total Replacement Prothese für die Herstellung der Schalleitung zwischen Trommelfell und Innenohr bestehend aus Bioverit® II (c). Entsprechend Lit. [28].

Die Entwicklung einer geeigneten Beschichtung stellt sich als eine Herausforderung dar, denn viele pathogene Keime haben ausgeklügelte Schutzmechanismen, die sie vor unwirtlichen Lebensräumen schützen [29-31]. Dazu gehört vor allem die Bildung von Biofilmen, also Lebensgemeinschaften unterschiedlicher Bakterienstämme, die unter anderem hohe Antibiotikaresistenzen zeigen können. Sekrete, die von den Bakterien produziert werden, können antibakteriell ausgestattete Oberflächen maskieren und ihren Effekt erheblich reduzieren. Obwohl eine graduelle Freisetzung antibakterieller Substanzen wie Antibiotika oder Silberionen diese Probleme in manchen Fällen umgehen kann, haben solche Wirksysteme auch große Nachteile, wie zum Beispiel nur eine kurzfristige Wirkung, toxische Effekte bei schlecht kontrollierter Freisetzung und die mögliche Ausbildung von Resistenzen.

Eine Alternative bieten polymere antibakterielle Substanzen, die den Vorteil haben, dass sie nicht flüchtig und chemisch stabil sind, mit Hilfe reaktiver Gruppen chemisch angebunden werden können und nicht hautpermeabel sind. Resistenzen sind bei Polymeren nach derzeitigem Stand der Forschung nicht bekannt, was einen enormen Vorteil gegenüber herkömmlichen Antibiotika darstellt [32]. Zudem kann eine langfristige Funktion der polymeren Beschichtung erwartet werden, da das Biozid in der Regel nicht oder nur sehr langsam abgebaut wird. In dieser Arbeit liegt

der Fokus auf dem industriell hergestellten und käuflich erwerblichen Poly(4-vinylpyridin) (PVP) als Basismaterial einer solchen bakteriziden Schicht (Abbildung 1.3). Die Alkylierung des Polymers führt zur Einführung einer flexiblen hydrophoben Seitenkette, die die Bakterienzellwand penetrieren kann [33,34].

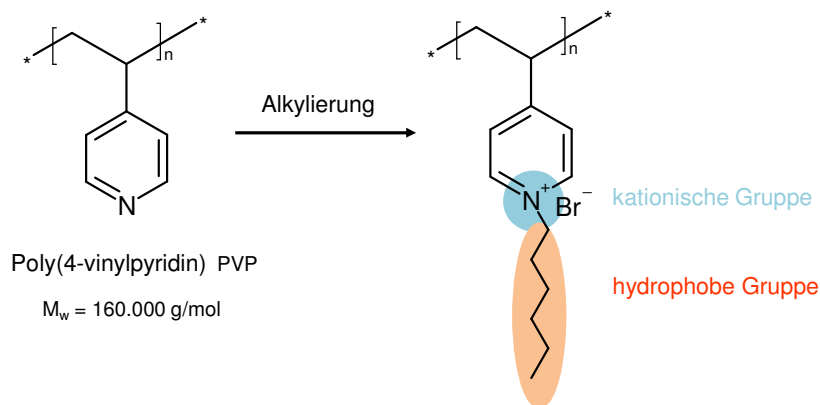


Abbildung 1.3: Käuflich erhältliches Poly(4-vinylpyridin) entfaltet nach der Alkylierung zum Poly(4-vinyl-*N*-hexylpyridiniumbromid) eine antibakterielle Wirkung.

In dieser Arbeit werden in einem ersten Ansatz ausgehend von Glas sowie unterschiedlich modifizierten Glasoberflächen, wie amorphe bzw. mesoporöse Silicabeschichtungen, Polymere zunächst mit Hilfe von Linkermolekülen kovalent an diese Oberflächen angebunden, um eine bakterizide Schicht zu erhalten (Abbildung 1.4). Frühere Studien haben gezeigt, dass mesoporöse Silicabeschichtungen auf Standard-Bioverit[®] II-Prothesen einen positiven postoperativen Einfluss zeigen [35]. Während die Bildung einer erwünschten Mukosaschicht gefördert wurde, konnte unkontrolliertes Knochenwachstum tendenziell gehemmt werden [36]. Darüber hinaus bietet die Beschichtung mit ihrer großen Oberfläche und den Silanolgruppen eine gute Basis für chemische Modifizierungen der Implantatoberfläche. Die Charakterisierung der Materialien erfolgte mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen sowie photometrisch mit einem Fluorescein-Farbstofftest. Es folgten *in vitro*-Untersuchungen zur Kompatibilität und antibakteriellen Effizienz.

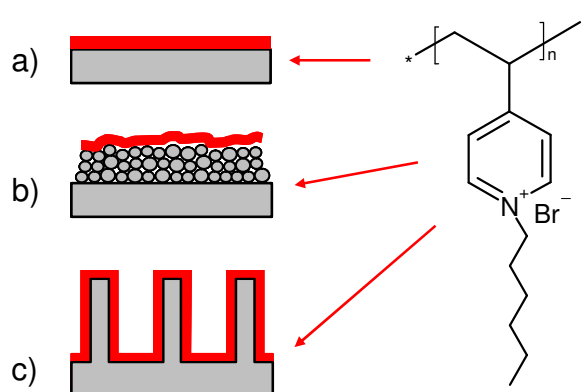


Abbildung 1.4: Poly(4-vinyl-N-hexylpyridiniumbromid) wird kovalent an unbehandeltes Glas (a), amorphes (b) und mesoporöses (c) Silicauntergrund angebunden.

Die zweite Strategie befasst sich mit der Herstellung von Polymer-Silica-Hybridmaterialien, wobei das vorher separat alkylierte PVP in eine Silicamatrix eingebettet wird. Diese Methode sollte eine höhere Konzentration des Polymers in der bakteriziden Schicht gewährleisten, um möglicherweise eine antibakterielle Aktivität zu verstärken. Dieser Ansatz bietet zudem die Möglichkeit, pulverförmige Substanzen in eine Beschichtung einzubinden. Die PVP-Silica-Hybridmaterialien werden deshalb zusätzlich mit Stoffen ausgerüstet, die Silberionen freisetzen. Es wurden reine Polymer-Silica-Materialien mit hexyliertem, octyliertem und decyliertem PVP sowie silberhaltige Hybridmaterialien erhalten. Als Silberionenquelle dienten silberausgetauschter Sodalith sowie nanoskaliges Silber. Der Einsatz von Silberionen in dieser Form sollte eine kontrollierte Freisetzung ermöglichen und vor allem einen kurzfristigen bakteriziden Effekt zeigen, zusätzlich zur Langzeitwirkung der antibakteriellen Schicht. Die Materialien wurden in bakteriellen Tests auf die Wirksamkeit geprüft.

Im dritten Teil wurde das Polymer Poly(4-vinylpyridin) zunächst mit reaktiven Methoxysilangruppen ausgestattet und dann hexyliert. Durch Aufbringen des Synthesegels auf Glasplättchen erfolgte eine Kondensation der Silanolgruppen der Glasoberfläche mit den Methoxysilangruppen des modifizierten Polymers. Zur Charakterisierung der erhaltenen Materialien wurden Farbstofftests sowie *in vitro*-Untersuchungen zur antibakteriellen Wirksamkeit herangezogen.

Die Arbeiten zu den antibakteriellen Beschichtungen entstanden im Rahmen des Teilprojekts D1 „*Funktionalisierte Mittelohrprothesen*“ des Sonderforschungsbereichs 599 „*Zukunftsfähige bioresorbierbare und permanente Implantate aus metallischen und keramischen Werkstoffen*“. In diesem Teilprojekt kooperieren Forscher der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH), des Helmholtz Zentrums für Infektionsforschung in Braunschweig und der Leibniz Universität Hannover (LUH).^{*} Darüber hinaus bestand eine enge Kooperation mit dem Teilprojekt D8 „*Dentale Abutments*“, in dessen Rahmen zahlreiche *in vitro*-Untersuchungen stattgefunden haben.[†]

^{*} Mitglieder des Teilprojekts D1: Prof. Dr. Peter Behrens, Dr. Nina Ehlert, Dipl.-Chem. Tammo Lüßenhop, Dipl.-Chem. Anne Christel, Dipl.-Chem. Olga Kufelt, Institut für Anorganische Chemie, Leibniz Universität Hannover; Prof. Dr. Thomas Lenarz, Dr. Martin Stieve, Dr. Hamidreza Mojallal, Dr. Julia C. Vogt, Dr. Julia Schöne, Iwa Hlozaneck, Rebecca Lensing, Hals-Nasen-Ohren-Klinik, Medizinische Hochschule Hannover; Dr. Gudrun Brandes, Institut für Zellbiologie im Zentrum Anatomie, Medizinische Hochschule Hannover; Prof. Dr. Peter P. Müller, Dipl.-Chem. Muhammad Badar, Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung Braunschweig

[†] Lysann Ringenberg, Dr. Andreas Winkel, Dr. Wieland Heuer, Prof. Dr. Meike Stiesch; Zahnprothetische Klinik, Medizinische Hochschule Hannover

2 Allgemeine Grundlagen

2.1 Grundlagen der Biomineralisation

2.1.1 Biominerale in der Natur

Biomineralisation steht im Allgemeinen für die biologische Bildung von anorganischen Mineralien. Heute sind mehr als 70 verschiedene Mineralien bekannt, die für Lebewesen von enormer Bedeutung sind und unterschiedlich genutzt werden. An dieser Stelle sind zum Beispiel Muscheln zu nennen, die ihre harte Schale aus Perlmutter zum Schutz vor Fressfeinden besitzen. In Abbildung 2.1 sind einige typische Vertreter als Beispiele für die Vielfalt und Formen von Biomineralien gezeigt.

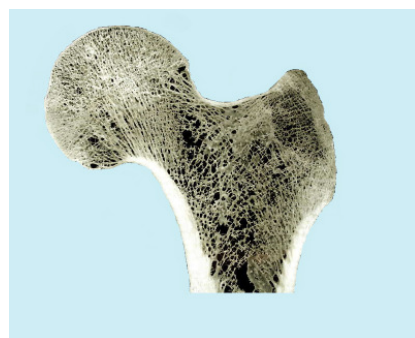
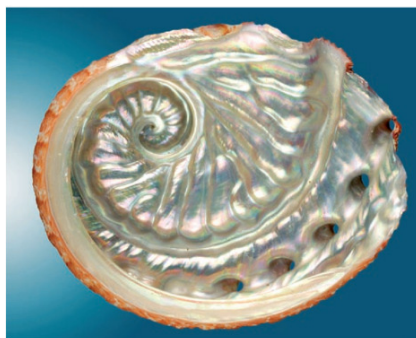


Abbildung 2.1: Beispiele für einige Biominerale: Muschelschale aus Perlmutter, die laminatartig aus Aragonitplättchen aufgebaut ist [37]. Menschlicher Knochen enthält als anorganische Phase Hydroxylapatit [38]. Meeresschwämme wie der Baikalschwamm *Lubomirskia baicalensis* enthalten amorphes Siliciumdioxid (Biosilica) [39]. Auch zahlreiche Pflanzen enthalten beträchtliche Mengen an Biosilica, wie zum Beispiel Reisspelzen in Reis [40].

Lebewesen haben es im Laufe der Evolution gelernt, für den Aufbau ihrer Gewebe spröde Mineralkristalle mit weichen Biopolymeren zu kombinieren und so mechanisch äußerst belastbare und dabei gleichzeitig elastische, mineralisierte Gewebe zu erhalten. Intensiv genutzt für Biomineralien wird vor allem Calcium, so ist es in rund der Hälfte aller bekannten Biominerale in Form von Calciumcarbonat oder -phosphat enthalten [41].

Biominerale sind im sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich in vielfältigster Form anzutreffen, wo sie oft als mechanische Verstärkung bei Stütz- und Schutzmechanismen dienen. Beispiele sind die schon genannten Muschel- und Schneckenschalen (siehe Abbildung 2.1), die aus Calciumcarbonat aufgebaut sind, welches ebenfalls oft in den Exoskeletten wirbelloser Tiere, wie Hummer und Krabben, zu finden ist. Der weiche Körper dieser Lebewesen wird dabei von der harten Schale geschützt. Ein weiteres wichtiges Beispiel sind die Knochen von Wirbeltieren. Im menschlichen Knochen ist Calciumphosphat in Form von Hydroxylapatit die anorganische Komponente. Bei der organischen Matrix handelt es sich überwiegend um Kollagen [42-45]. Kollagen ist ein wichtiges Faserprotein. Der Aufbau dieses Faserproteins aus verschiebbaren Molekülketten bedingt die Elastizität und die hohe Zugfestigkeit des Knochens [46]. Das Verhältnis von Hydroxylapatit und Kollagen beträgt etwa 70:30.

Biomineralisation wird aber auch bei etlichen Pflanzen wie Reis oder bei verschiedenen Gräsern wie dem Ackerschachtelhalm *Equisetum arvense* beobachtet [47,48]. Dabei findet man oft amorphes Siliciumdioxid, welches zur Stabilisierung der Struktur sowie zum Schutz vor Fressfeinden dient. Als Silica-Quelle dient den Pflanzen gelöste Kieselsäure, deren Aufnahme mit dem Wasser aus dem Erdboden erfolgt. Das Silica wird teilweise aber auch in kolloidaler Form von der Pflanze aufgenommen. Reisspelzen enthalten beispielsweise beträchtliche Mengen an amorphem Siliciumdioxid und werden aus diesem Grund als zukunftssträchtige Silicaquelle gehandelt (Abbildung 2.1) [49]. Der Ackerschachtelhalm *Equisetum arvense* nutzt Kieselsäure, um stabile Halme aufzubauen [50]. Weiterhin kommt biogenes Silica in den Nadeln von Silicaschwämmen sowie bei einigen anderen primitiven Tieren vor.

Einzellige Meeresorganismen verwenden eine Vielzahl von Biomineralien. Hier wird die mineralische Komponente meistens als Schutzpanzer benutzt. Durch die Öffnungen und Poren der Schale findet der Austausch mit der Umwelt statt, wobei Nährstoffe und andere zum Aufbau der Schale benötigte Substanzen aufgenommen werden können. Als Beispiel können Coccolithophore mit ihrer Schale aus kristallinem Calciumcarbonat genannt werden. Der Aufbau der schützenden Schale erfolgt durch Anordnung winziger Calcitkristalle zu einer übergeordneten Struktur. Radiolarien und Diatomeen schützen sich durch den Aufbau einer Schale aus amorphem Siliciumdioxid. Hierbei ergeben sich die vielfältigsten und ungewöhnlichsten Strukturen (siehe Abbildung 2.2).

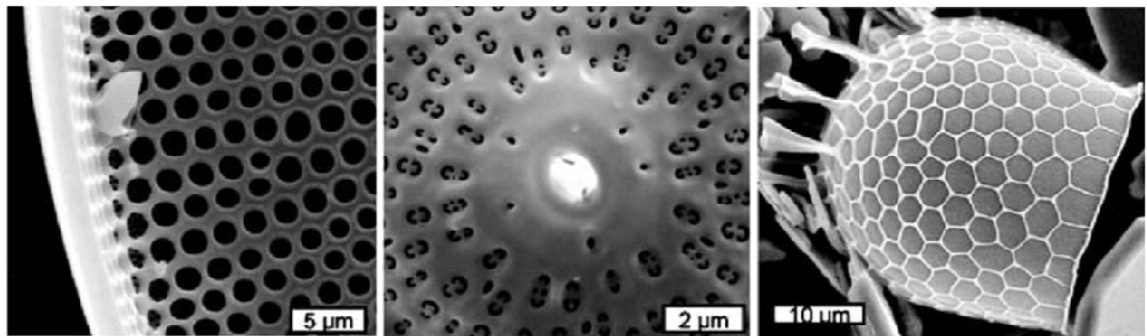


Abbildung 2.2: Strukturvielfältigkeit des Silicas in Diatomeen. Von links nach rechts: *Coscinodiscus wailesii*, *Ditylum brightwellii*, *Stephanopyxis turris*, entnommen aus [4].

Biomineralien sind stets Verbundwerkstoffe aus organischen und anorganischen Komponenten. Rein aus anorganischen keramischen Substanzen bestehende Materialien sind spröde. Die tatsächliche Bruchfestigkeit dieser Materialien liegt meistens weit unter dem theoretischen Wert und wird von den Defekten im Mineral bestimmt. Die mechanische Beanspruchung kann leicht zum Bruch führen, da die Materialien kaum elastisch sind. Aus der Natur sind zwar geeignete elastische organische Substanzen wie Cellulose und Chitin bekannt, sie bieten jedoch eine ungenügende Festigkeit. Der Verbund von anorganischen und organischen Komponenten ermöglicht Organismen den Zugang zu vielfältigen stabilen und zugleich elastischen Stütz- und Schutzmaterialien. In der Regel ist die anorganische Substanz in Form von einigen hundert Nanometer großen Kristalliten in eine organische Matrix aus stark vernetzten Fasern oder Schichten eingelagert. Die

Strukturierung erfolgt meist hierarchisch auf mehreren Längenskalen. So werden in vielen Biomineralien anisometrische, plättchenförmige Mineralteilchen gegeneinander verschoben gestapelt. Die gestapelten Mineralkristalle werden dann durch dünne Schichten eines organischen Klebstoffes miteinander verbunden. Dieses Prinzip der Verflechtung der mineralischen und organischen Bestandteile auf einer Nanometerskala ist in Abbildung 2.3 schematisch dargestellt.

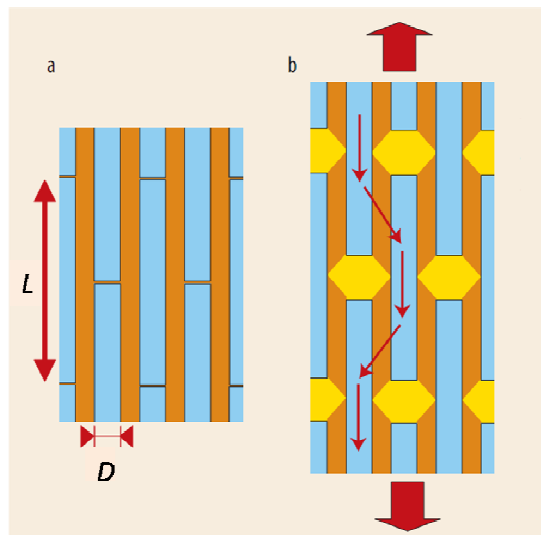


Abbildung 2.3 : In Biomineralen liegen die anisometrischen Mineralteilchen (blau) oft versetzt angeordnet, durch einen organischen Kleber (orange) verbunden vor (a). Die bei mechanischer Zugbelastung auftretende Kraft wird durch Scherung des organischen Klebstoffs zwischen den Mineralteilchen übertragen (b). D ist die Dicke, L die Länge des Mineralteilchens. Aus Lit. [37].

Die Einlagerung von elastischer Substanz in ein hartes Material führt zum entsprechenden Verlust von dessen Härte. Im Gegenzug wird das Material elastischer und reagiert unempfindlicher auf Schlageinwirkung, weil die eingelagerten Kristallite in gewissem Umfang gegeneinander verschiebbar sind. Die geringe Steifigkeit des Klebstoffes wird durch ein großes Längen-zu-Dicken-Verhältnis der Mineralteilchen kompensiert. Die hohe mechanische Belastbarkeit von Biomineralien wird durch das Verhältnis organischer Komponenten zu anorganischen Bestandteilen erreicht. Diese Anteile variieren je nach Einsatzbestimmung des Materials sehr stark. Oft beträgt der Anteil der organischen Komponente nur wenige Prozent. So liegen im Fluorapatit des Zahnschmelzes nur Bruchteile eines Prozents an organischen Molekülen vor [42]. Die Härte und die

hohe mechanische Belastbarkeit der Zähne wird hingegen durch einen Verbund von Fluorapatit mit organischen Bestandteilen erreicht [51]. Biomimetische Ansätze können dazu genutzt werden, neue Verbundwerkstoffe, zum Beispiel für Konstruktionszwecke, zu erzeugen.

Der Kristallisationsprozess biologischer Minerale verläuft in der Regel unter strenger biologischer Kontrolle, was moderate Reaktionsbedingungen erlaubt. Die Reaktionstemperatur, der pH-Wert sowie weitere chemische Faktoren der physiologischen Umgebung werden durch die Organismen präzise eingestellt. Proteine und andere organische Moleküle beeinflussen zudem den Bildungsprozess der Mineralkristalle, wobei ein organisches Grundgerüst für die spätere Mineralisation entsteht. Dieses gibt dann die Form der eingelagerten Mineralkristalle sowie ihre Anordnung vor, so dass ein sehr hohes Maß an Ordnung sowohl im makro- wie auch im mikroskopischen Bereich vorliegt. Des Weiteren können amorphe Mineralphasen als Vorstadien strukturgebend für komplexe Formen sein [52].

2.1.2 Biosilifizierung in Diatomeen

Inspiration und Antrieb dieser Arbeit ist das Verständnis der Biomineralisationsprozesse, die in Diatomeen ablaufen und so zu architektonisch ungewöhnlichen Strukturen der Zellwände der Diatomeenschalen führen. Diatomeen, auch Kieselalgen genannt, sind eukaryotische Organismen, die in nahezu allen Gewässern, wie Salz- und Süßwassergewässern, sowie auf allen möglichen feuchten Oberflächen vorkommen. Kieselalgen machen einen wesentlichen Teil des marinen Phytoplanktons aus und sind bis zu 40 % an dessen Produktion beteiligt [53,54]. Die marinen Einzeller bauen ihre Schale aus amorpher Polykieselsäure auf. Damit gehören sie zu Organismen, die gelöstes Silica aus der Umwelt aufnehmen und biogenes Silica (Biosilica) präzipitieren [55]. Dabei entstehen im Falle der Diatomeen feinstrukturierte Porensysteme sowie Oberflächen mit ungewöhnlichen Morphologien im mikro- und nanoskaligem Bereich. In Abbildung 2.4 sind repräsentative REM-Aufnahmen einiger Diatomeenspezies gezeigt.

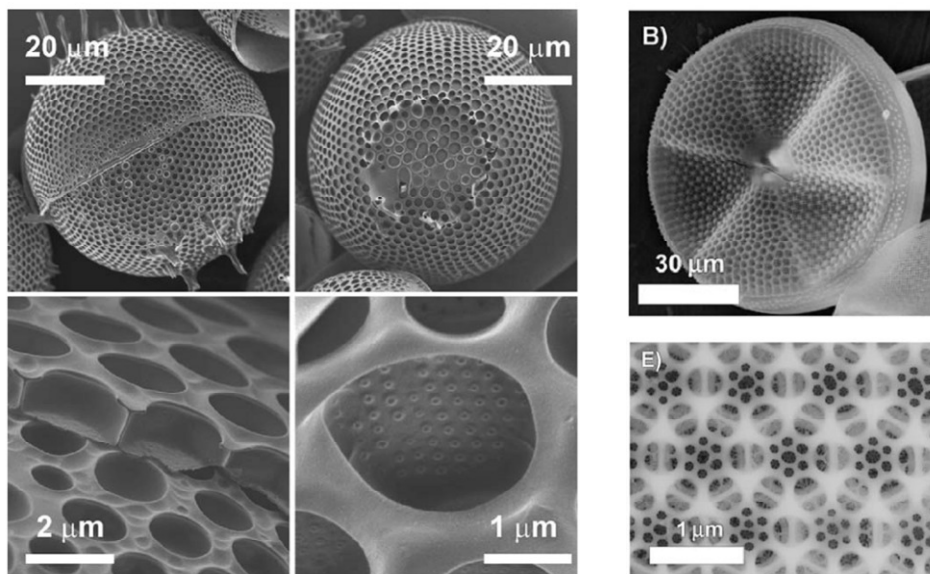


Abbildung 2.4: REM-Aufnahmen einiger repräsentativer Diatomeenpezies. Links: Isolierte Zellwände von *Stephanopyxix turis* in verschiedenen Vergrößerungen. Entnommen aus Lit. [55]. Rechts oben: *Actinoptychus spec.*. Rechts unten: hochauflösende Darstellung des Porensystems von *Coscinodiscus granii*. Aus Lit. [56].

Die benötigte Monokieselsäure wird dem umgebenden Meerwasser entzogen, welches Kieselsäure in einer durchschnittlichen Konzentration von $70 \mu\text{M}$ enthält [57]. Bis heute sind etwa 200.000 lebende Spezies dieser marinen Einzeller bekannt [58]. Für jede Spezies ist die Form der Kieselschale, auch Frustulum genannt, sowie die Porenanordnung charakteristisch [59]. Die Identifikation der Diatomeenart kann daher ausschließlich über den hierarchischen Aufbau der Silicaschalen erfolgen. Diese artspezifischen Eigenschaften sind somit genetisch gesteuert und werden von Generation zu Generation präzise weitergegeben. Die Sequenzierung eines kompletten Genoms, wie im Falle der *Thalassiosira pseudonana* geschehen, erleichtert biochemische Studien zur Biomineralisation dieser Organismen und macht es möglich, Modellorganismen für die zukünftige Forschung zu etablieren [60,61].

Anhand ihrer Baupläne lassen sich die Diatomeen in zwei Ordnungen unterteilen. Es gibt Diatomeen mit lang gestrecktem, bilateral-symmetrischen Aufbau sowie radial-symmetrisch aufgebaute Diatomeen (siehe Abbildung 2.5). Die Diatomeenzelle ist dicht von einer Silicaschale umschlossen, die sich wie eine Petrischale verhält. Die Zellwände der radial-symmetrischen Diatomeen sind aus zwei Teilen, der Hypotheka

und der Epitheka, aufgebaut. Die untere Seite der Schale ist die Hypovalva, die obere Seite wird als Epivalva bezeichnet. Die jeweiligen Seitenwände überlappen dicht und bestehen aus Gürtelbändern. Auf diese Weise ist das Innere der Diatomee vor der Umwelt geschützt. Der Stoffaustausch mit der Umgebung wird durch die artspezifische Anordnung der Poren in der Diatomeenschale sichergestellt. Zum Schutz vor Desilifizierung sind die Schalen mit einem schleimartigen Schutzmantel überzogen.

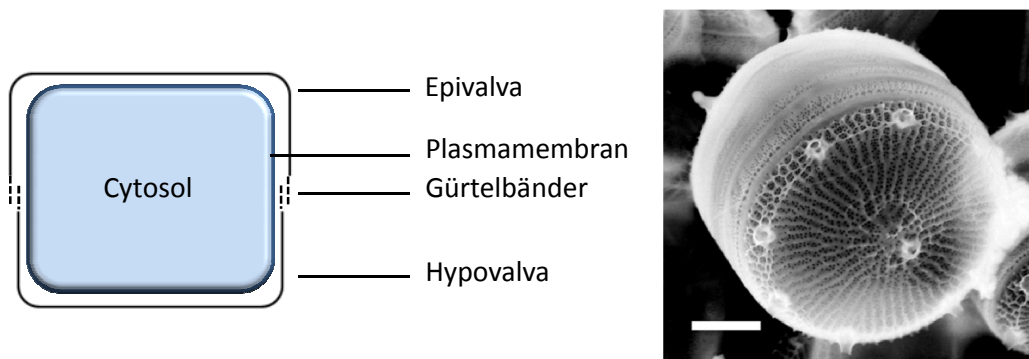


Abbildung 2.5: Petrischalen-Prinzip für den Aufbau radial-symmetrischer Diatomeen (links). Schale von *Thalassiosira pseudonana* als Beispiel für eine Diatomee mit radial-symmetrischen Aufbau (rechts), scale bar: 1 μm [56].

Der Mechanismus der Schalenbildung von Diatomeen wurde von verschiedenen Forschungsgruppen untersucht. Die Eigenschaften der Schale selbst wurden unter anderem mit Hilfe von Rasterelektronenmikroskopie (REM) sowie Rasterkraftmikroskopie (AFM) untersucht [62,63]. Aus diesen Untersuchungen ist bekannt, dass die Schalen aus einer dichten Packung von sphärischen Silicapartikeln bestehen. Aktuelle Ergebnisse, insbesondere mit AFM, bestätigen, dass die Diatomeenschalen aus Silica-Nanopartikeln aufgebaut sind, deren Größe von 20 bis zu 70 nm variieren kann [5].

2.1.3 Bioorganische Moleküle in Diatomeen

Zahlreiche Untersuchungen der Zusammensetzung der Diatomeenschalen zeigen, dass diese neben Silica verschiedene bioorganische Substanzen enthalten. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese an der strukturgebenden Bildung der Schalen maßgeblich beteiligt sind. Das Biosilica der Diatomeen kann also als ein

Kompositmaterial betrachtet werden, welches langkettige lineare Polyamine sowie bestimmte Proteine bzw. Proteinfamilien enthält, nämlich die Silaffine, Silacidine, Pleuraline und Frustuline (Abbildung 2.6). Die Substanzen konnten durch Auflösung der Schalen mit Hilfe von Flusssäure isoliert werden. Polyamine und Silaffine wurden von KRÖGER und SUMPER in zahlreichen Studien beschrieben und charakterisiert [13-18,64]. In Abbildung 2.6 sind Beispiele für die Strukturen natürlich vorkommender Polyamine sowie des Silaffins natSil-1A₁ gegeben.

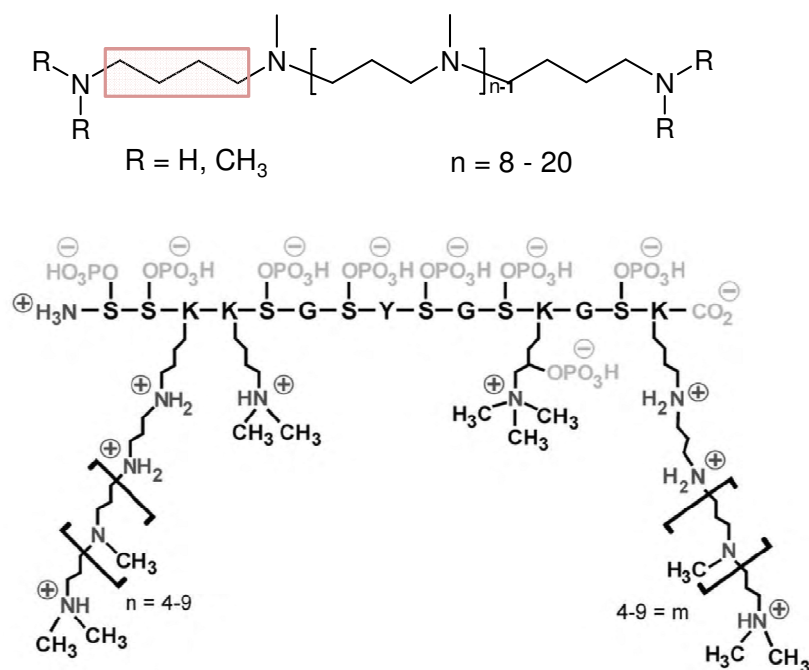


Abbildung 2.6: Bioorganische Stoffe, die aus Diatomeenschalen isoliert wurden, nach Lit. [65]. Oben: Die Polyamine sind Putrescin-Abkömmlinge und bestehen aus methylierten Propylenimin-Einheiten. Die in Diatomeen vorkommenden Polyamingemische sind hinsichtlich Kettenlängen und Methylierungsgraden artspezifisch. Unten: Polypeptidkette des natSil-1A₁ mit Polyamin-Seitenketten an Lysin-Resten (K) sowie phosphorylierten Serin-Resten (S).

Die linearen Polyamine bestehen generell aus Propylenimineinheiten, die sich in bis zu 20 Wiederholungseinheiten zu langen Ketten aneinanderreihen können. Die meisten Polyamine sind Propylenimine mit einem Putrescin-Rest am Kettenende, ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 2.6 gegeben. Neben Putrescinen sind Spermine und Spermidine (Abbildung 2.7) sehr häufige Polyaminvertreter, wobei Spermine vorrangig bei Eukaryonten vorkommen.

KNOTT et al. zeigten anhand von Untersuchungen des Genoms von Diatomeen, dass diese spezielle Enzyme, die so genannten Synthasen, zur Synthese von Polyaminen enthalten [66]. Das enthaltene Polyamingemisch und somit letztendlich auch die äußere Struktur der Schale sind auf die genetisch festgelegte, artspezifische Anzahl und Vielfalt der Synthasen zurückzuführen.

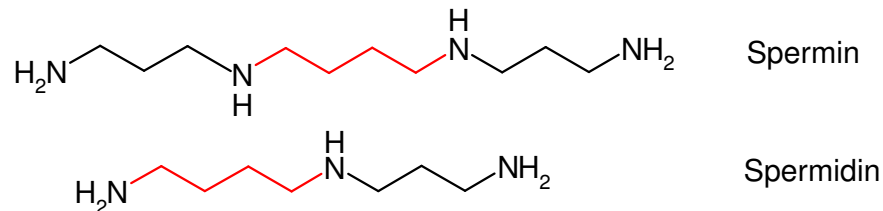


Abbildung 2.7: Spermin und Spermidin sind häufige Polyamine [21]. Die Putrescin-Reste sind farbig gekennzeichnet.

Silaffin natSil-1A₁ ist in einem hohen Maß funktionalisiertes Oligopeptid mit einer hohen molekularen Masse. Die Lysin-Reste weisen Seitenketten auf, die große Ähnlichkeit mit den linearen Polyaminen haben. Eine weitere Eigenschaft dieses Silaffins sind zu einem hohen Maß phosphorylierte Serin-Reste (Abbildung 2.6). Somit enthält das Molekül sowohl protonierte Aminogruppen mit positiver Ladung als auch deprotonierte Phosphatgruppen mit negativer Ladung. Insgesamt weist das Molekül demnach zwitterionische Eigenschaften auf. Studien belegen ein Selbstorganisationsvermögen dieser Molekülklasse zu supramolekularen Aggregaten eben aufgrund elektrostatischer Interaktionen zwischen den protonierten Aminogruppen und den negativ geladenen Phosphat-Resten [65,67,68]. Dieser Selbstorganisationsprozess gilt als Grundvoraussetzung für die Präzipitationsaktivität der Silaffine.

Generell sind die in Diatomeen enthaltenen Polyamine und Silaffine artspezifisch. Bei den Polyaminen variiert die Struktur besonders im Hinblick auf die Kettenlänge, den Methylierungsgrad und das Vorhandensein von speziellen Strukturelementen, wie zum Beispiel quartäre Ammoniumgruppen. Auch Silaffine konnten bisher aus vielen verschiedenen Diatomeenspezies isoliert werden und zeigen artspezifische Besonderheiten auf. So können neben Phosphatgruppen zum Beispiel auch Sulfatgruppen [69] oder quartäre Ammoniumgruppen enthalten sein [64]. Interessant

ist in diesem Zusammenhang auch, dass quartäre Ammoniumverbindungen wie Tetraethylammonium oder Tetrabutylammonium als strukturdirigierende Agenzien (SDA) zur Herstellung bestimmter Zeolithe dienen [70].

Polyamine kommen allgemein in fast allen Organismen vor, da sie in viele grundlegende zelluläre Prozesse wie zum Beispiel die Regulation enzymatischer Aktivität eingebunden sind [71,72]. Diatomeen sind in der Lage, speziesspezifische Gemische an langkettigen Polyaminen zu synthetisieren [13]. Ihr Einfluss auf die Bildung der Silicaschalen konnte in zahlreichen in-vitro Studien gezeigt werden, denn auch lineare Polyamine zeigen in Analogie zu den Silaffinen ein selbstorganisierendes Verhalten [9,14,73]. Die Präzipitation von Silica konnte in diesen Versuchen allerdings nur durch Zugabe von Phosphationen herbeigeführt werden [74]. Sowohl durch Silaffine als auch durch lineare Polyamine wird aufgrund ihrer Eigenschaften eine schnelle Silicapräzipitation in kieselsäurehaltigen Lösungen induziert. Eine direkte katalytische Wirkung dieser Substanzen wird nach neueren Erkenntnissen aber ausgeschlossen [20].

2.1.4 Metabolismus und Mechanismen der Biogenese

Die für den Aufbau der Schalen benötigte Monokieselsäure wird dem umgebenden Meerwasser entzogen. Wie schon erwähnt, beträgt die hier enthaltene Konzentration der Kieselsäure ca. 70 μM [57]. Die Sättigung für Monokieselsäure liegt bei 2 mM [75]. Untersuchungen von TANAKA et al. zeigen außerdem, dass abhängig von der Wassertiefe verschiedene Silicium-Komplexe, wie zum Beispiel vorrangig das $[\text{Si}(\text{OH})_2\text{O}_2\text{Na}]^-$ -Monomer, sowie etliche weitere Oligomere als Siliciumquelle vorliegen, die dann von den verschiedenen Organismen, auch von den Diatomeen, assimiliert werden [76].

Da die Konzentration an Kieselsäure in den Meeressgewässern in der Regel sehr gering ist, muss ein aktiver Si-Transport in das Zellinnere durch angepasste Transportmechanismen gefördert werden. Der Transport und die Aufnahme der Monokieselsäure in die Zelle erfolgt durch die so genannten Silicon Transport proteins (SITs) [77]. THAMATRAKOLN und HILDEBRAND untersuchten die regulatorischen Eigenschaften und die Transportaktivität dieser Proteine (SITs) an *Thalassiosira pseudonana*-Kulturen [78]. So konnten sie vor allem während der Zellwandbildung maximale Silicium-Aufnahmeraten beobachten. Des Weiteren

zeigten kinetische Studien der Silicium-Aufnahme verschiedener Diatomeenspezies, dass insbesondere bei niedrigen Si(OH)_4 -Konzentrationen die Si-Aufnahme durch die SITs bestimmt wird.

Somit hat die Zelle ein Reservoir an gelöster Kieselsäure zu Verfügung. Für den weiteren Verlauf ist es wichtig, dass die Kieselsäure zwar konzentriert vorliegt, aber nicht vorzeitig kondensiert oder präzipitiert. Dies wird mit einem Kontrollmechanismus verhindert, so dass die Kieselsäure zum Entstehungsort der Schalen gelangt und dort entsprechend aufkonzentriert wird. Innerhalb der Zelle werden Silicium-Pools für die Lagerung von Silicium vermutet, welches für den Aufbau neuer Schalen akkumuliert wird [79,80]. Für diesen Ablauf sind zwei Mechanismen vorstellbar: Transport durch Ionophore und Transport durch **Silica Transport Vesicles (STVs)** [81]. Ionophore sind Komplexbildner und verhindern durch Bindung der Kieselsäure deren vorzeitige Polymerisation und setzen diese erst am Ort des Schalenaufbaus frei. Bekannte Ionophore sind Catechol und seine Derivate wie zum Beispiel Tiron. Dieses vermag sechsfach koordinierte Kieselsäure-Tiron-Komplexe in Lösung zu bilden [82]. Eine unterdrückende Wirkung auf die Polykondensation der Kieselsäure wird auch Chitosanderivaten zugesprochen [83]. Die zweite Variante ist der Transport der Kieselsäure in Silica-Transport-Vesikeln, wobei die Kieselsäure innerhalb dieser Vesikel in löslicher oder unlöslicher Form vorliegen kann.

Die Biosynthese der Zellwände erfolgt dann in hoch spezialisierten Zellkompartimenten, den so genannten **Silicon Deposition Vesicles (SDVs)**. In diesen Vesikeln liegen spezielle Reaktionsbedingungen vor. Untersuchungen von VRIELING et al. deuten auf ein leicht saures Milieu mit einem pH-Wert von etwa 5.5 hin [84]. In Abbildung 2.8 ist die Aufnahme von Si(OH)_4 durch SITs in das Zellinnere der Diatomee sowie die weitere Anreicherung in den SDVs schematisch dargestellt.

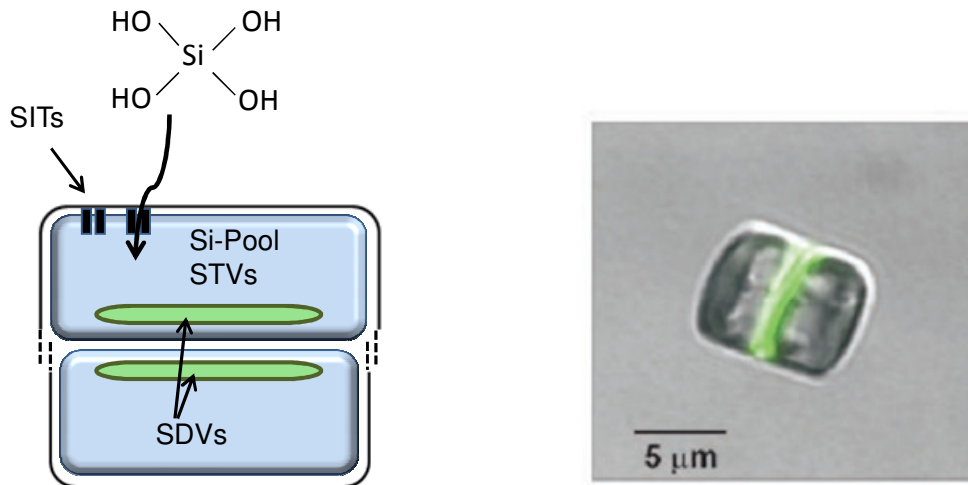


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Diatomeenzelle während des Zellteilungsprozesses. Die Synthese der neuen Zellwände erfolgt in dafür spezialisierten Silicon Deposition Vesicle- (SDV) Zellkompartimenten. Monokieselsäure aus dem umgebenden Meerwasser wird mit Hilfe der Silicon Transport (SIT) Proteine in das Zellinnere geschleust. Innerhalb der Zelle werden Silicium-Pools für die Lagerung von Silicium vermutet, der intrazelluläre Transport von $\text{Si}(\text{OH})_4$ zu den SDVs soll durch Silicon Transport Vesicles (STVs) erfolgen. Rechts: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer *T. pseudonana*-Zelle während der Zellteilung; aus Lit. [85]. Die grün fluoreszierende Farbe ist frisch synthetisiertem Silica zuzuordnen.

Die Bildung der Schalen geht in verschiedenen biologischen Prozessen vonstatten. Ein bedeutender Prozess ist dabei die Zellteilung, da hier die Aufspaltung der Mutterzelle in zwei Tochterzellen mit jeweils neu gebildeter Schale erfolgt. Für den Aufbau der Schale muss die benötigte Kieselsäure aus dem Wasser durch die Zellmembran in das Zellinnere gelangen. Der Zellteilungszyklus zur Bildung der Schale ist schematisch der Abbildung 2.9 zu entnehmen [86]. Der Teilung der Zelle geht die Teilung des Zellkerns (Mitose) voraus. Dabei wandert der Zellkern (Nukleus) zur derjenigen Seite der Tochterzelle, wo die Hypotheka entstehen soll. Das Mikrotubuli-Zentrum platziert sich zwischen dem Zellkern und der Plasmamembran.

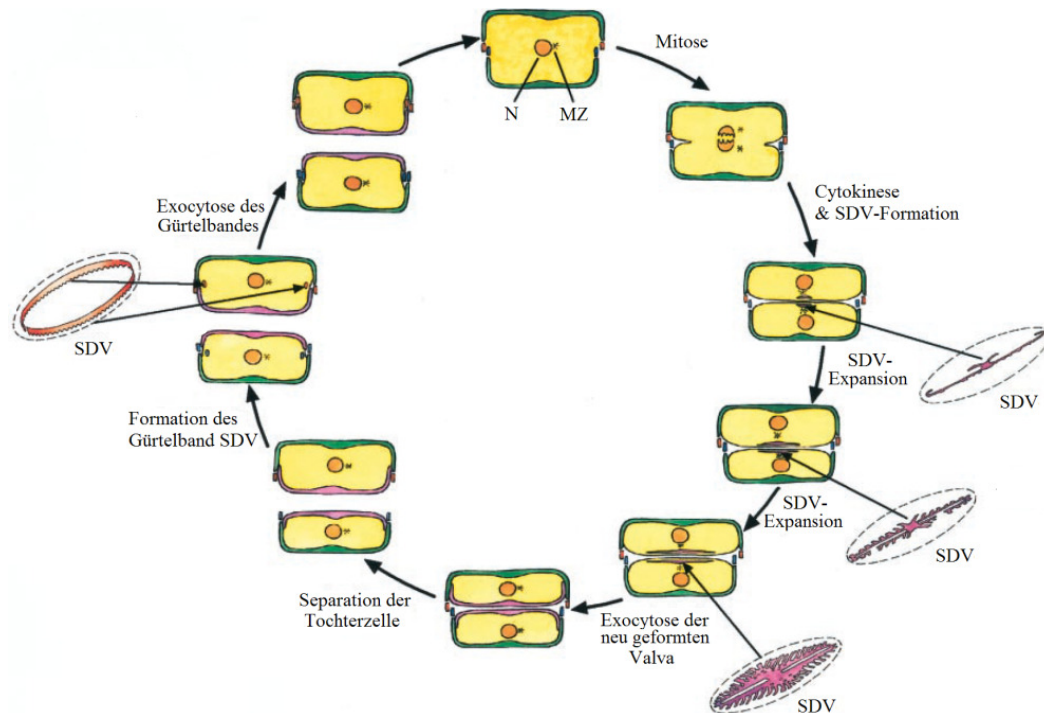


Abbildung 2.9: Zellteilungszyklus der Diatomeen; nach Lit. [86]. N: Nucleus, MZ: Mikrotubuli-Zentrum. Nach der Zellmitose bildet jede Zelle ein SDV, um eine Hypovalva aufzubauen. Diese wird durch Exocytose aus der Zelle befördert, wonach die Zellen getrennt vorliegen. Die abschließende Bildung neuer SDVs führt zum Aufbau der Gürtelbänder. Am Ende der Zellteilung weist eine der Tochterzellen eine verkleinerte Schale auf.

Zwischen dem Mikrotubuli-Zentrum und der Zellmembran wird die jeweilige SDV gebildet. Danach folgen die Ausdehnung der SDV sowie der Aufbau der Hypovalva für die jeweilige Tochterzelle. Die vollständig aufgebaute Hypovalva wird durch Exocytose aus der Zelle geschleust. Nun liegen zwei getrennte Zellen vor. Im weiteren Verlauf entstehen SDVs für die Bildung der Gürtelbänder. Der Abbildung 2.9 ist zu entnehmen, dass am Ende des Teilungsprozesses für eine Tochterzelle eine geringere Größe resultiert, da die alte Hypotheka nun die neue Epitheka darstellt. Für folgende Zyklen bedeutet dies, dass die Schale einer Tochterzelle fortwährend kleiner wird. Durch eine nach einigen dieser asexuellen Zyklen einsetzende sexuelle Reproduktion im Rahmen derer die ursprüngliche Theka-Größe wieder hergestellt wird, wird diese Verkleinerung kompensiert.

Metabolische Vorgänge der Zellteilung der Diatomeen im Hinblick auf einen intrazellulären Silicium-Pool wurden von GRÖGER et al. und SUMPER et al. mit Hilfe

von ^{29}Si -NMR-Spektroskopie und konfokaler Laserfluoreszenzmikroskopie untersucht [85,87]. Hierzu wurden zunächst Silicium-ausgehungerte Zellen der *Thalassiosira pseudonana* mit ^{29}Si angereichert und eingefroren, mögliche Silicium-Precursoren wurden mittels ^{29}Si -Festkörper-NMR untersucht, die verschiedenen Stadien der Entwicklung während der Zellteilung sowie die Bildung neuer Gürtelbänder und Schalen mit Laserfluoreszenzmikroskopie verfolgt. In Abbildung 2.10 sind charakteristische fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einzelner Diatomeenzellen in zeitlicher Abhängigkeit der Entwicklungsstadien gezeigt. Ca. 30 Minuten nach Beginn der Zellteilung wird die Herstellung neuer Gürtelbänder nur von wenigen Zellen anhand der grünen Farbe angedeutet, während nach 1.5 h die meisten Zellen Gürtelbänder ausbilden (weiße Pfeile im Bild).

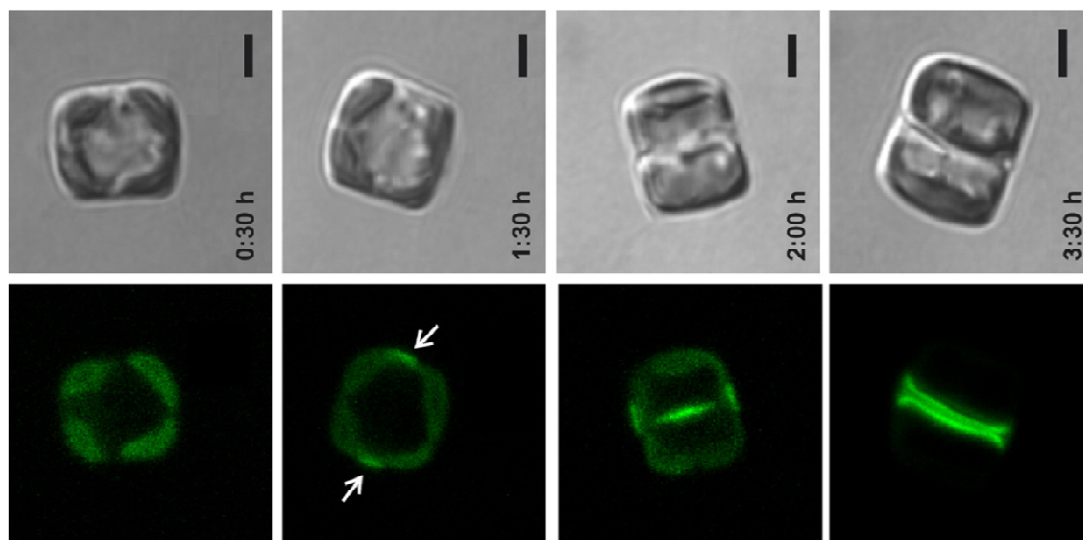


Abbildung 2.10: Lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einzelner Diatomeen-Zellen in zeitlicher Abhängigkeit in den charakteristischen Entwicklungsstadien (Scale bar: 2 μm). Die grüne Farbe tritt durch Fluoreszenz des gefärbten akkumulierten Silicas in den Zellen auf, welches frisch synthetisiert worden ist. Die zeitliche Abfolge der Aufnahmen zeigt die Entstehung der Gürtelbänder bis 1.5 h nach Beginn der Zellteilung, nach 2 h kann bereits die Entstehung der Schalen beobachtet werden, die in der Mitte der Zelle positioniert sind. Die letzte Aufnahme nach 3.5 h zeigt zwei Tochterzellen, die noch nicht vollständig getrennt sind. Aus Lit. [87].

Nach zwei Stunden kann die Bildung neuer Schalen in der Mitte der Zelle beobachtet werden, in der Aufnahme nach 3.5 h liegen zwei Tochterzellen vor, die noch nicht vollständig getrennt sind. Die grüne Fluoreszenz steht an den entsprechenden Stellen jeweils für frisch synthetisiertes Silica bzw. für Silicium, welches für den Zweck der

Zellteilung in der Zelle gelagert wird. Die hier angewendete Methode erlaubte also zunächst die visuelle Beobachtung der Entstehung von biogenem Silica aus einem ^{29}Si angereicherten Silicium-Precursor, welcher den Zellen im Experiment zum Aufbau neuer Schalen zur Verfügung stand.

Außerdem konnten die entstehenden Silica-Spezies und der Grad der Kondensation mittels Festkörper-NMR untersucht werden, wie in Abbildung 2.11 gezeigt [85]. Die Signale der grünen Kurve zeigen deutliche Anteile verschiedener Si-Spezies (Q^2 - Q^4), die sich im Kondensationsgrad, also der Anzahl der sauerstoffverbrückten benachbarten Siliciumatome unterscheiden. Zum Vergleich sind die Anteile an Monokieselsäure Q^0 sowie an Dikieselsäure Q^1 dagegen sehr gering (vgl. schwarze Kurve). Die Signale stammen eindeutig von frisch synthetisiertem Silica, welches den ausgehungerten Zellen in Form von ^{29}Si zum Einbau zur Verfügung gestellt wurde und entsprechend des rechten Bildes anhand der grünen fluoreszierenden Farbe in der Zelle visualisiert werden konnte. Diese Studien befürworten insgesamt die Annahme, dass die in die Zelle transportierte Monokieselsäure nicht in Form von Organo-Silico-Komplexen gelagert wird, sondern sehr zügig vorpolymerisierte Silica-Spezies bildet.

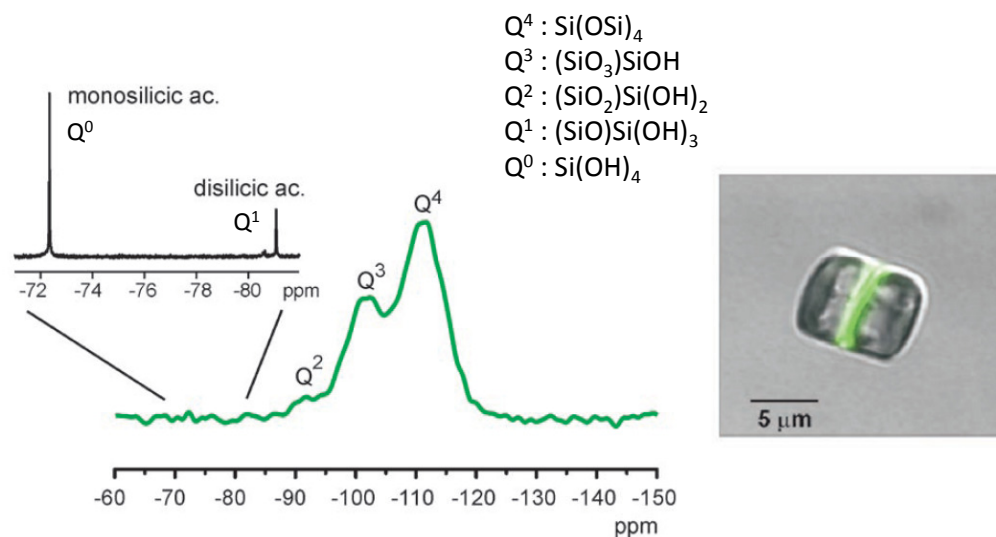


Abbildung 2.11: Ein ^{29}Si -NMR-Spektrum von Diatomeenzellen, die während des Zellteilungsprozesses mit ^{29}Si gekennzeichnet wurden. Sowohl ^{29}Si -NMR-Signale im Spektrum (grün) als auch die grün fluoreszierende Farbe der *T. pseudonana* während der Zellteilung im Bild rechts sind frisch synthetisiertem Silica zuzuordnen. Die Signale der grünen Kurve zeigen deutliche Anteile verschiedener Si-Spezies (Q^2 - Q^4), die Signale für anfänglich vorhandene Anteile an Monokieselsäure Q^0 sowie Dikieselsäure Q^1 sind dagegen zurückgegangen (vgl. schwarze Kurve oben links) [85].

Die Bildung der Schalen ist ein Vorgang, bei dem sehr komplexe und hoch strukturierte Gebilde entstehen. Für diesen Vorgang existiert ein Phasenseparationsmodell von SUMPER, welches zumindest für einige in Diatomeenspezies gefundene hochsymmetrische Porenanordnungen eine Erklärung sein könnte [73]. Neuere Annahmen gehen eher von einem Templatmechanismus aus supramolekularen Aggregaten aus, um den das Modell von SUMPER präzisiert wird [68,88]. Das Modell ist in Abbildung 2.12 dargestellt.

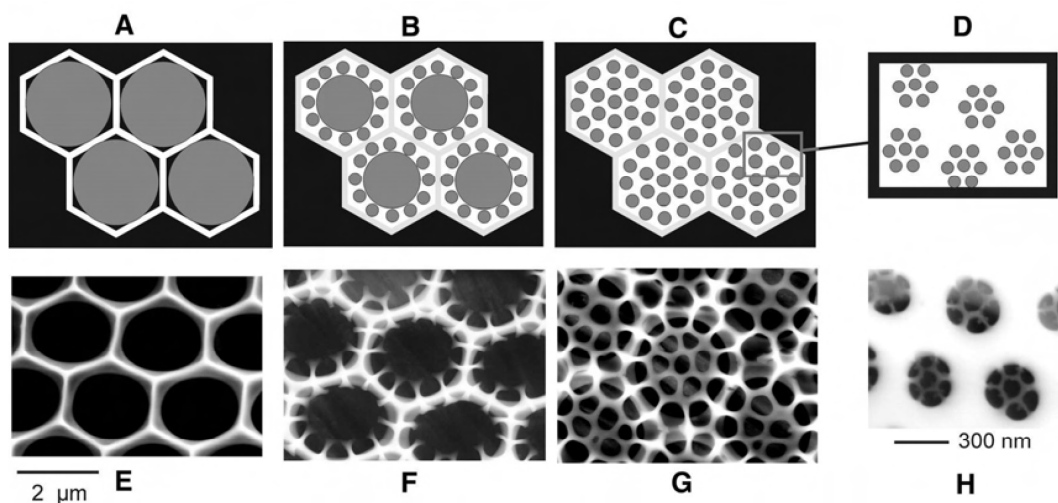


Abbildung 2.12: Phasenseparations-Modell nach SUMPER. Aus Lit. [73]. Oben: Schematische Darstellung des Modells. A: Hexagonale Anordnung der Mikrotröpfchen. Die Zwischenräume werden mit Silica ausgefüllt. B und C: Mehrfache Phasenseparation führt zu einer hoch symmetrischen Struktur. Unten: REM-Aufnahmen einer Diatomeenschale in verschiedenen Aufbauphasen.

Dabei sind die Amingruppen zumindest abwechselnd protoniert; da sie durch kurze Propyleneinheiten verbunden sind, wäre sonst elektrostatische Abstoßung die Folge. Deshalb kommt es in dem SDV der Diatomee zur Phasenseparation durch Mikrotröpfchen oder eben zur Bildung supramolekularer Templat-Aggregate aus Polyaminen. Da das SDV sehr flach ist, folgt aus dem engen Reaktionsraum eine hexagonale Anordnung dieser Mikrotröpfchen bzw. Templatmoleküle. Die Zwischenräume sind mit kieselensäurehaltiger, wässriger Lösung gefüllt. Hier scheidet sich festes Silica ab und es kommt zur hexagonalen Porenstruktur der Schale. Eine etwas genauere Darstellung dieser Vorgänge ist in Abbildung 2.13 gezeigt.

Untersuchungen von HELMECKE et al., die sich mit biomimetischer Silicaabscheidung in mikrostrukturierten Reaktionsräumen befassen, zeigen anhand des so

genannten Kaffeefleck-Effekts, wie die Silicaabscheidung in der Natur ablaufen könnte [89]. Dabei kommt es beim Trocknen von Mikrotröpfchen, welche neben Kieselsäure, Polyamin und Phosphat enthalten, wegen auftretender Kapillarkräfte zu einer Akkumulation des abgeschiedenen Materials am Rand des strukturierten Reaktionsraums.

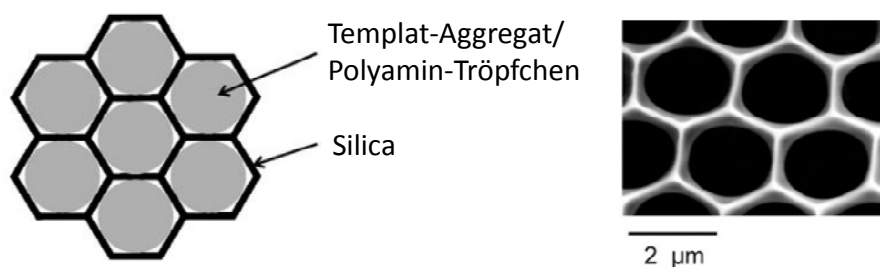


Abbildung 2.13: Links: Schematische Darstellung der wahrscheinlichen Rolle von Templat-Aggregaten während der Zellwandbiogenese nach dem Phasenseparationsmodell [73], entnommen aus Lit. [88]. Rechts: Hexagonales Porensystem der Zellwand, beobachtet während der Zellteilung; aus Lit. [73].

Da auch Polyamin in das präzipitierte Silica eingeschlossen wird, führt dies zur Verarmung an Polyamin in der Lösung und schließlich zur weiteren Phasenseparation. Dabei entstehen noch kleinere Tröpfchen bzw. kleinere Templat-Aggregate, so dass die neu gebildeten Zwischenräume erneut mit Silica ausgefüllt werden und eine dementsprechend feinere Strukturierung aufweisen. Diese Separationsschritte werden wiederholt bis eine regelmäßige, streng symmetrische Struktur entstanden ist. Dieses Modell weist gewisse Ähnlichkeiten zu den Syntheseprozessen der Herstellung geordneter mesoporöser silicatischer Materialien auf, wobei diese Materialien sich durch zylindrische, hexagonal angeordnete Poren auszeichnen [90,91]. Organische Moleküle, wie zum Beispiel Hexadecyltrimethylammonium-Ionen, führen als strukturdirigierende Agenzien zur Bildung zylindrischer Micellen, die dann nach Entfernung der organischen Bestandteile die Entstehung poröser Materialien ermöglichen. Die Strukturierung erfolgt allerdings auf sehr kleinen Längenskalen (5 - 10 nm).

Die morphologischen Eigenschaften der Silica-Schalen der Diatomeen wurden von LOSIC et al. mittels AFM untersucht [5]. In Abbildung 2.14 ist der schematische Aufbau einer Schale im Querschnitt vorgeschlagen, basierend auf die Auswertung

von REM-Aufnahmen. Danach besteht die Schale aus mehrlagigen Silicaschichten, die jeweils unterschiedliche Porengrößen sowie -musterungen und Schichtdicken aufweisen. Diese aufwendige strukturelle Architektur deutet nochmals auf die komplexen Vorgänge beim Aufbau der Schalen hin, die wohl durch nur einen Mechanismus nur unvollständig beschrieben werden können.

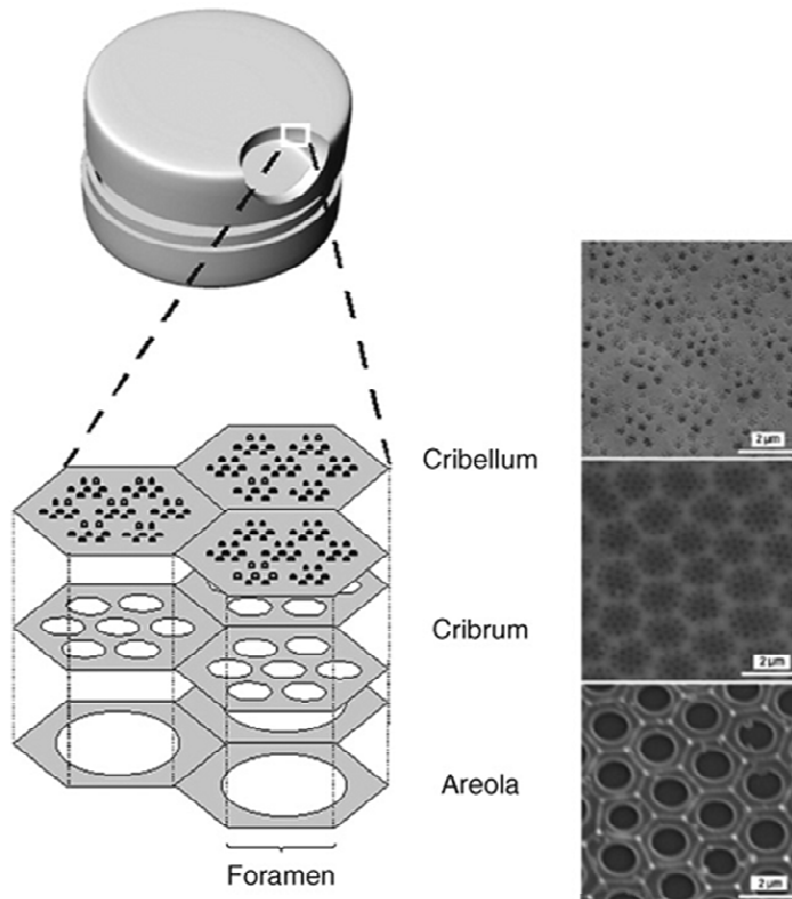


Abbildung 2.14: Querschnittsprofil einer radial-symmetrischen Diatomeenschale basierend auf REM-Daten, nach Lit. [5]. Die innere Schicht, die so genannte Areola, weist honigwabenartige Kammern mit großen Öffnungen in der Silicaplatte auf, auch Foramen genannt. Die Areolae wird mit dem Cribrum bedeckt, welches eine regelmäßige Porenanordnung besitzt. Die Schicht über dem Cribrum ist eine dünne kieselsäurehaltige Membran, das Cribellum, welche winzige Poren enthält.

Das Phasenseparationsmodell von SUMPER kann somit nicht allen Vorgängen in den SDVs der Diatomeen gerecht werden. Ein alternatives Modell zur Bildung der Schale wird von VRIELING et al. vorgeschlagen [92,93]. Der Ansatz des Modells liegt in der Annahme, dass lineare Polyamine und Silaffine die Bildung kleiner Silicapartikel aus niedermolekularen Kieselsäurespezies in der SDV induzieren.

Dabei werden diese organischen Moleküle in die Silicapartikel eingeschlossen. Zudem liegen in der SDV auch Aggregate größerer Peptide und Proteine vor, die mit den sich zunehmend verdichtenden Silicapartikeln wechselwirken. Daraus entstehen Strukturen im Bereich von 50 nm und es kommt im Folgenden zur Ausbildung einer Mesophase.

An dieser Stelle sind Parallelen zu dem erweiterten Phasenseparationsmodell von SUMPER zu sehen, da auch hier das Vorhandensein von Molekülaggregaten bei der Silicapräzipitation angenommen wird.

Die Partikel der Mesophase verdichten sich zu 100 nm großen Strukturen. Der weitere Zustrom an Kieselsäure und Peptid bewirkt den Aufbau der Silicaschale aus diesen Strukturen. Letztendlich werden die Proteinaggregate aus der fertig gebildeten Schale entfernt, was zum Entstehen der Porenöffnungen führt. Das Modell ist in Abbildung 2.15 schematisch dargestellt.

Das Modell von VRIELING gibt zumindest verfeinerte Vorstellungen von den Vorgängen, die zur Entstehung definierter Porensysteme in den Diatomeenschalen führen könnten. Frühere Ansätze, die nur auf den Einfluss kleiner organischer Moleküle wie Polyamine und Oligopeptide basierten, könnten nicht erklären, wie es zur Ausbildung von mehr als hundert Nanometer großen Poren in den Diatomeen kommt (siehe Abbildung 2.14). Demnach ist eine Annahme, die ausschließlich die Beteiligung nur sehr kleiner organischer Moleküle wie Polyamine oder Oligopeptide wie Silaffin-1A vorsieht, nicht ausreichend. Supramolekulare Templatmoleküle in die Vorgänge der Biogenese einzubeziehen ist sicherlich ein weiterer Schritt zum Verständnis des Zellwandaufbaus und der Entstehung der komplexen Strukturen.

Untersuchungen zu den biomimetischen Vorgängen in Diatomeen wurden bisher von KRÖGER und SUMPER durchgeführt und vorgestellt [13,18,74,94]. Ziel der Studien waren natürliche, in Diatomeen enthaltene lineare Polyamine sowie Silaffine in Präzipitationsversuchen. Die Experimente ergaben, dass eine Präzipitation nur in Anwesenheit von multivalenten Anionen zu beobachten war. Bei dem Präzipitat handelte es sich stets um sphärische Silicapartikel. Die Konzentration der multivalenten Anionen beeinflusste dabei entscheidend den Durchmesser der erhaltenen Partikel.

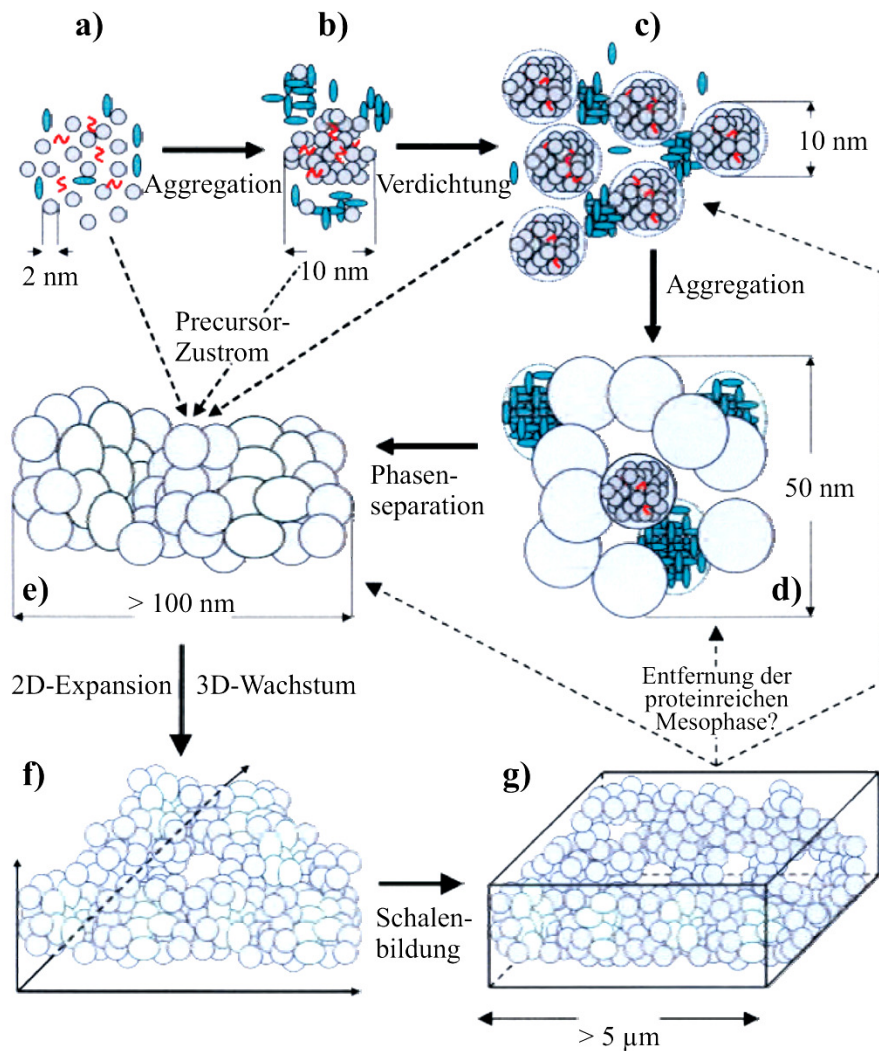


Abbildung 2.15: Modell zur Entstehung von Silica-Schalen in Diatomeen, basierend auf der polymer- und proteingesteuerten Silicasynthese. Nach Lit. [92]. a) In dem SDV liegen Peptide und/oder Polyamine (rote, gebogene Linien), größere organische Moleküle (grüne Ellipsen) sowie Kieselsäure vor. Dadurch entstehen schnell kleine Silicapartikel (graue Kreise). b) Silaffine und Polyamine sowie der kontinuierliche Zustrom von Kieselsäure induzieren beim vorherrschenden pH-Wert eine schnelle Aggregation der Silica-Partikel. In diesem Verdichtungsprozess werden die kleinen organischen Moleküle komplett eingeschlossen, während die großen Proteine mit den Silica-Partikeln auch untereinander wechselwirken. c) Die Aggregate aus Silaffinen, Polyaminen und Silica verdichten sich zu größeren Strukturen (blaue Kreise) und wechselwirken mit den wachsenden Aggregaten der größeren Proteine. d) Kontinuierliche Aggregation führt zu größeren Silica- und Silica-Protein-Aggregaten (grünliche Ovale) mit etwa 50 nm großen Strukturen. e) Verdichtete Mesophasenpartikel wachsen bis zu über 100 nm großen Gebilden heran. f) Aus dem ständigen Zustrom an Protein und Kieselsäure folgen eine zweidimensionale Expansion sowie ein dreidimensionales Wachstum. g) Die Proteinaggregate werden aus der fertig gebildeten Schale entfernt, was vermutlich zum Entstehen der Porenöffnungen führt.

2.1.5 Mechanismen der Kieselsäurekondensation

Zum Verständnis der komplizierten Chemie der Kieselsäuren sollen im folgenden Abschnitt die für diese Arbeit wichtigsten Eigenschaften der Kieselsäure herausgearbeitet werden. Ein umfassender Überblick über die Ergebnisse zur Kondensation der Kieselsäure ist den Arbeiten von ILER und BRINKER zu entnehmen [75,95].

Die monomolekulare Orthokieselsäure durchläuft im Rahmen der Kondensation verschiedenen Stadien. So sind verschiedene oligomere und polymere Kieselsäuren sowie festes amorphes Silica, die Polykieselsäure, bekannt.

2.1.5.1 Kondensationsverhalten der Kieselsäure

Bei der monomolekularen Orthokieselsäure handelt es sich um eine schwache Säure mit dem pK_S -Wert von 9.9. Der isoelektrische Punkt der Monokieselsäure liegt bei einem pH-Wert von 2 vor, hier befindet sich das Molekül in einem neutralen Zustand.

Eine kieselsäurehaltige Lösung kann durch die Hydrolyse von Alkoxysilanen wie dem Tetramethoxysilan (TMOS) und dem Tetraethoxysilan (TEOS) erhalten werden. Die Hydrolysegeschwindigkeit ist ähnlich wie die der Kondensationsreaktion abhängig vom pH-Wert [75,95]. Die Hydrolyse geht über einen nucleophilen Angriff eines Wassermoleküls oder eines Hydroxidions vonstatten. BRINKER et al. gehen bei diesen Vorgang von einem klassischen S_N2 -Mechanismus aus [95].

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Kondensation ist von der Temperatur, dem pH-Wert sowie der Konzentration der Kieselsäure abhängig. Für die Kondensationsreaktion sind ionische Mechanismen bestimmend. Die Kondensationsgeschwindigkeit ist am isoelektrischen Punkt ($pH = 2$) der Kieselsäure äußerst gering, da hier keine geladenen Spezies vorliegen. Unterhalb des pH-Wertes von 2 wird die Kondensationsreaktion durch Protonen katalysiert und die Kondensationsgeschwindigkeit nimmt mit sinkendem pH-Wert zu. Die ionische Spezies ist dann protonierte Monokieselsäure. Oberhalb dieses pH-Wertes erfolgt die Katalyse der Reaktion durch Hydroxidionen und die Geschwindigkeit der Kondensation steigt mit zunehmendem pH-Wert. Hier ist die ionische Spezies

deprotonierte Monokieselsäure. Die Konzentration der ionischen Spezies ist geschwindigkeitsbestimmend für die Kondensationsreaktion.

Die Kondensation geht vom Kieselsäuremonomer aus und verläuft über die Reaktion zu Oligomeren weiter zu höher kondensierten Spezies. Am Ende steht somit polymeres Silica. Bezeichnend für die Kondensationsreaktion ist, dass eine maximale Anzahl von Siloxangruppen angestrebt wird. Im Gegenzug wird die Zahl der Silanolgruppen möglichst reduziert. Daraus folgt eine günstige Entropiebilanz, da so eine große Anzahl an Wassermolekülen freigesetzt wird. Die Acidität der Kieselsäuren steigt mit dem Kondensationsgrad.

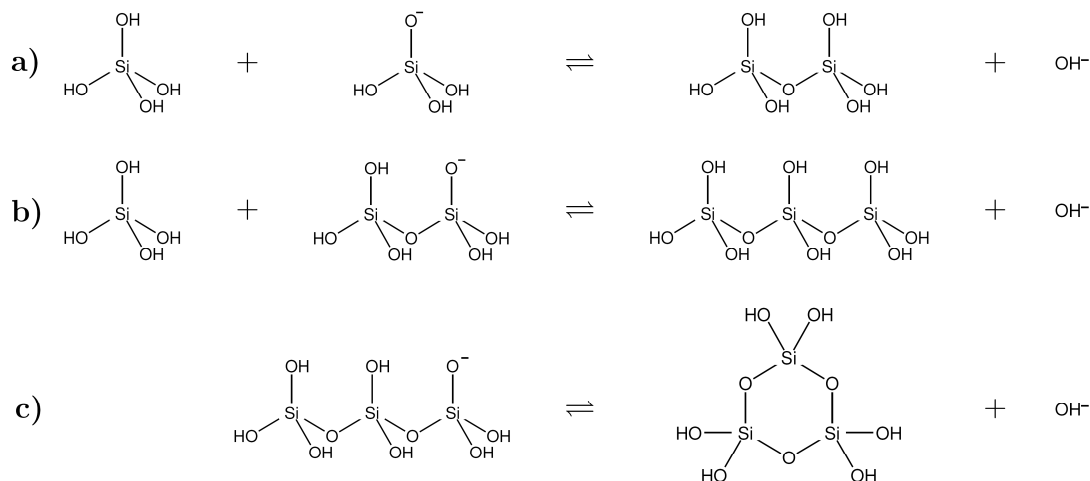


Abbildung 2.16: Oligomerisierung der Kieselsäure oberhalb eines pH-Wertes von 2; aus Lit. [96]. a: Für die Dimerisierungsreaktion ist deprotonierte Monokieselsäure erforderlich. b: Bei der Trimerisierungsreaktion ist die höher kondensierte Spezies der negativ geladene Reaktionspartner. c: Der Trimerisierung folgt eine mögliche Kondensation in Form eines intramolekularen Ringschlusses, wobei eine negative Ladung der Spezies erforderlich ist [75].

Der Ablauf der Kondensationsreaktion oberhalb von $\text{pH} = 2$ ist in Abbildung 2.16 gezeigt. Beim Dimerisierungsschritt reagiert deprotonierte Monokieselsäure mit einem ungeladenen Reaktionspartner. Aufgrund der höheren Acidität ist das Dimer bei der Reaktion zum Trimer die negativ geladene Spezies. Das Monomer ist somit immer neutral. Dementsprechend stellt die höher kondensierte Spezies stets den negativ geladenen Reaktionspartner dar. Schließlich folgt die Trimerisierung, wobei die Bildung cyclischer Oligomere energetisch bevorzugt ist.

2.1.5.2 Partikelwachstum

Für das Entstehen von Silicapartikeln ist das Vorhandensein größerer Oligomere von Nöten. An diese werden dann kleinere Kieselsäurespezies angelagert. Die Silanolgruppen werden im Verlauf der Kondensation immer acider, so dass das Oligomer ab einem bestimmten Kondensationsstadium permanent negativ geladen ist. Dies wirkt sich günstig auf die Reaktion mit neutralen Kieselsäuremolekülen aus. Somit wird die Kondensation bevorzugt durch die Anlagerung von kleinen Spezies an ein solches negativ geladenes Oligomer fortgeführt. Die direkte Reaktion niedermolekularer Kieselsäurespezies untereinander geht weitgehend zurück.

Von stabilen Silicapartikeln wird erst ab einem Durchmesser von mindestens 5 nm gesprochen. Das Partikel besteht dann aus etwa 1500 Kieselsäureeinheiten mit einer Molmasse von etwa 100.000 g/mol. Die Bildung kleinerer Partikel ist nicht bevorzugt, da in diesem Fall die ungünstige Oberflächenenergie destabilisierend wirkt. Diese werden im Laufe der Ostwald-Reifung wieder aufgelöst und sind als monomere Kieselsäure erneut für die Kondensationsreaktion verfügbar.

Auf der Oberfläche von Silicapartikeln befindet sich eine große Anzahl von Silanolgruppen, die mit dem Kondensationsfortschritt zunehmend acider werden. Dies hat zur Folge, dass ein gewisser Anteil der Silanolgruppen deprotoniert vorliegt und die Oberfläche der Partikel somit negativ geladen ist. Durch diese negative Ladung können sich die Partikel nicht einander annähern und zu größeren Teilchen kondensieren.

2.1.5.3 Grundlagen der Sol- und Gelbildung

Im Laufe der Kondensation und Ostwald-Reifung kann ein stabiles Silicasol erhalten werden. Dabei handelt es sich um in Lösung dispergierte Silicapartikel. Bei ihrer Betrachtung sehen Sole oft wie klare Lösungen aus, denn der Durchmesser der Partikel beträgt in der Regel deutlich unter 1000 nm. Sole lassen sich mit dem sogenannten TYNDALL-Effekt nachweisen. Laserlicht wird beim Durchstrahlen der Lösung an den Partikeln gestreut, so dass der Laserstrahl dann sichtbar wird.

Ein Gel wird über mehrere Kondensationsstadien gebildet. Zunächst entstehen im Sol kurze Ketten durch Zusammenlagerung einiger Partikel. Dabei kondensieren die oberflächlichen Silanolgruppen der Partikel zu gemeinsamen Siloxanbindungen.

Diese Ketten von Partikeln verbinden sich zu etwas größeren Gebilden, den Mikrogele. Mikrogele weisen die gleiche Zahl an Silicapartikeln pro Volumeneinheit auf wie das Sol, aus dem sie hervorkommen. Der Anteil der Mikrogele nimmt auf Kosten des vorhandenen Sols zu, bis bei einem Volumenanteil von ca. 50 % die Gelierung eintritt. Wenn das Stadium eines Gels erreicht ist, so haben sich die die Silicapartikel bereits zu einem Netzwerk zusammengeschlossen. Dabei können äußerst wasserreiche Gelnetzwerke entstehen. Der Volumenanteil der festen Komponente in stabilen Gelnetzwerken kann unter einem Prozent betragen. In Abbildung 2.17 ist die schematische Darstellung von Gelnetzwerken gezeigt. Für das Verständnis zum Aufbau von solchen Netzwerken wird das Kugelmodell herangezogen. Demzufolge ist es nicht möglich, ein Netzwerk aus einheitlich koordinierten Kugeln zu bilden. Da die Koordinationszahl 3 für die Raumerfüllung eines Gels zu hoch ist, setzt sich dieses aus einem Gemisch von zweifach und dreifach koordinierten Partikeln zusammen. Die Variation der Anteile der unterschiedlich koordinierten Partikel führt somit zu unterschiedlichen Volumenanteilen im Gel.

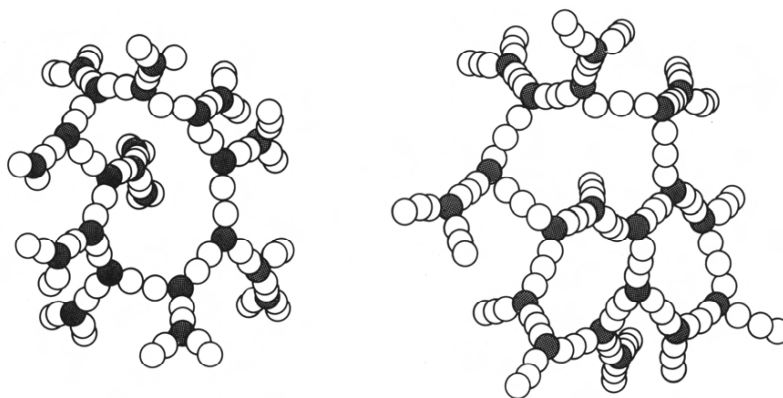


Abbildung 2.17: Schematische Darstellung von Gelnetzwerken; aus Lit. [75]. Gelnetzwerke sind aus unterschiedlich koordinierten Kugeln aufgebaut. Links: Die Koordination der Partikel ist hier 3,2,2,3. Rechts: Die Partikel in diesem Gelnetzwerk sind 3,2,2,2,3-koordiniert. Die weißen Kugeln sind zweifach koordiniert, die schwarzen Kugeln weisen eine Koordinationszahl von 3 auf.

Bei einem Präzipitat handelt es sich um ein Aggregat aus dicht gepackten Partikeln. Es ist somit wesentlich dichter gepackt als ein Gel. Dabei liegen die Teilchen ungeordnet vor. Für die Entstehung eines Präzipitates ist ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren von Bedeutung. Kleinere Partikel können sich weit besser verbinden als

dies große Partikel vermögen. Der Grund ist die erhöhte kinetische Energie von größeren Partikeln, die eine mögliche Kondensation verhindert.

Gleichsinnig geladene Silicapartikel stoßen sich ab, so dass ein Zusammenlagern der Partikel unterbleibt. Auf diese Weise entsteht ein stabiles Sol bei Kieselsäuresolen zum Beispiel bei pH-Werten oberhalb von 10. Für die Bildung eines Präzipitates muss die Ladung der Partikeloberflächen jedoch sehr gering sein, denn nur so können die Partikel sich annähern und dann dicht zusammenlagern. Dies erfordert einen niedrigen pH-Wert oder die Anwesenheit eines Salzes. So ist die Entstehung eines Präzipitates durch dichte Packung von Partikeln leicht möglich. Im Anschluss findet ein Alterungsprozess statt. Auch die Anwesenheit von Polymeren führt zur Bildung dichter Aggregate. Ein Polymer in Form eines positiv geladenen Polyelektrolyts wird durch elektrostatische Kräfte an die Oberfläche eines Partikels gebunden. Da das Polymer aufgrund seiner Länge nicht vollständig an die Oberfläche adsorbiert werden kann, ragt ein freier Rest des Moleküls in die Lösung. An diesen frei ragenden Rest kann ein zweites Partikel gebunden werden. Polymere wirken demnach verbrückend und führen zur Präzipitation.

In den nachfolgenden Kapiteln werden die allgemeinen Grundlagen zum zweiten Teil der Arbeit bezüglich der antibakteriellen Beschichtungen für den biomedizinischen Bereich dargestellt.

2.2 Anatomie des Mittelohres und Prinzipien der Schallübertragung

Das menschliche Ohr ist aus drei Teilen, dem äußeren Ohr, dem Mittelohr und dem Innenohr aufgebaut. Die anatomischen Verhältnisse sind in Abbildung 2.18 dargestellt. Die Ohrmuschel besteht aus einem mit Haut bedeckten Knorpel und hat die Aufgabe den ankommenden Schall einzufangen, zu fokussieren und an das Mittelohr weiterzuleiten. Dabei grenzt das Trommelfell das Außenohr ab vom Mittelohr, wo die schallbedingten Schwingungen des Trommelfells auf die Gehörknöchelchen übertragen und verstärkt an das Innenohr weitergegeben werden. Das flüssigkeitsgefüllte Innenohr verarbeitet die ankommenden Signale in Nervenimpulse, die schließlich zum Gehirn weitergeleitet und dort als Hörerlebnis interpretiert werden. Im Folgenden soll eine etwas genauere Betrachtung der einzelnen Vorgänge der Schallübertragung im Mittelohr erfolgen.

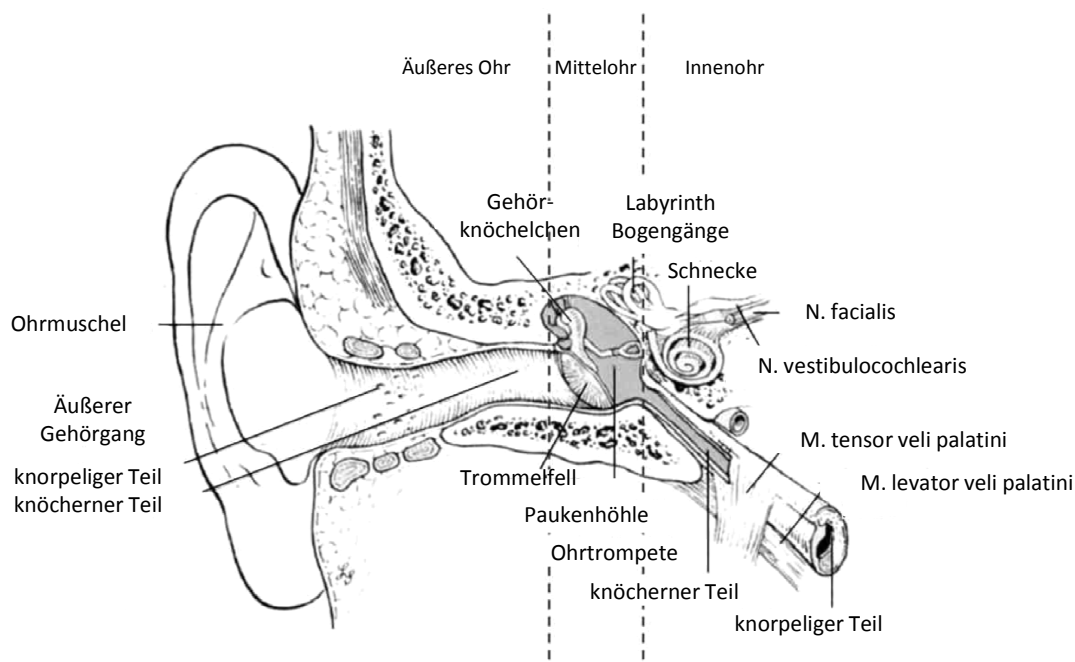


Abbildung 2.18: Anatomie des menschlichen Ohres im Querschnitt. Übersicht des äußeren Ohres, Mittel- und Innenohr, nach Lit. [97].

Das Mittelohr kennzeichnet sich besonders durch das Vorhandensein der Gehörknöchelchenkette bestehend aus Hammer, Amboss und Steigbügel aus, und umfasst die Innenseite des Trommelfells in der Paukenhöhle (siehe Abbildung 2.19). Diese ist ein luftgefüllter Raum, der durch das Trommelfell und das Innenohr (ovales Fenster) begrenzt wird. Die Ohrtrumpete (Eustachische Röhre) verbindet das

Mittelohr mit dem Nasenrachenraum, so dass ein Druckausgleich mit der Umgebung möglich ist.

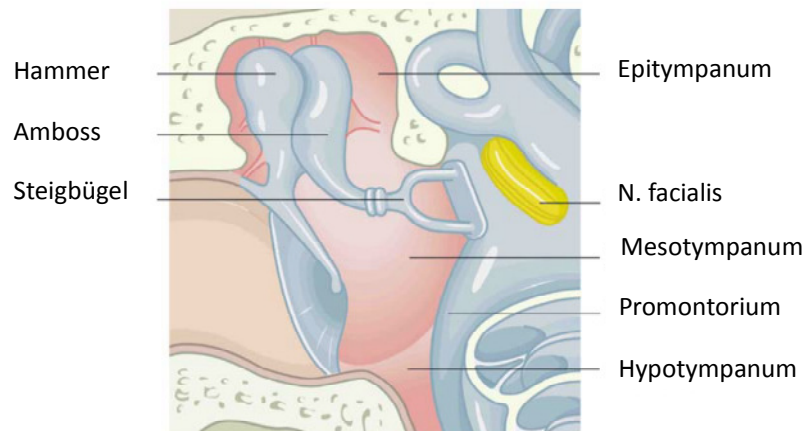


Abbildung 2.19: Schematische Darstellung der Gehörknöchelchenkette im Mittelohr, Schnitt durch die Paukenhöhle. Entnommen aus Lit. [98].

Die in der Paukenhöhle befindlichen Gehörknöchelchen sind von einer Schleimhaut überzogen. Eine detaillierte Darstellung der Gehörknöchelchen findet sich in Abbildung 2.20. Diese übertragen die Schwingungen des Trommelfells (Membrana tympanica) auf den Endolymphraum des Innenohrs, indem der aufgefangene Schalldruck auf das 22-fache verstärkt wird [99]. Erst durch diesen Mechanismus ist eine Impedanzanpassung von Luft auf das flüssigkeitsgefüllte Innenohr möglich [97]. Diese Umwandlung ist von Nöten, da Luft einen wesentlich geringeren Wellenwiderstand hat als Wasser. Ohne Gehörknöchelchen würden 98 % des Schalls reflektiert werden, so werden nur 40 % der ankommenden Informationen nicht verarbeitet [100]. Die beste Übertragung findet bei einer Frequenz von 1 - 2 kHz statt [99]. Der Hammer (Malleus) ist über Hammergriff und kurzem Fortsatz fest mit dem Trommelfell verwachsen. Die Verbindung zwischen Hammer und Amboss (Incus) wird durch ein Sattelgelenk hergestellt. Der Amboss ist seinerseits über einen Gelenkfortsatz mit dem Steigbügelköpfchen verbunden. Der Steigbügel (Stapes) besteht außerdem aus einem vorderen und hinteren Schenkel, die Fußplatte befindet sich auf dem ovalen Fenster zum Innenohr gerichtet. Mit Hilfe von Bändern und Sehnen sind die Gehörknöchelchen beweglich in der Paukenhöhle aufgehängt. Die Abbildung 2.21 gibt diese Verhältnisse schematisch wider.

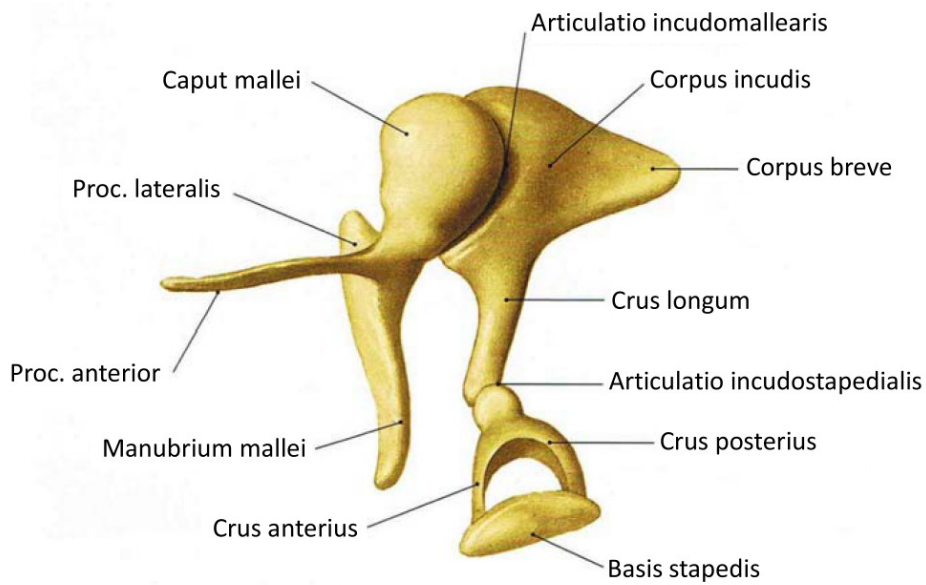


Abbildung 2.20: Detaillierte Darstellung der Gehörknöchelchen bestehend aus Hammer, Amboss und Steigbügel. Entnommen aus Lit. [101].

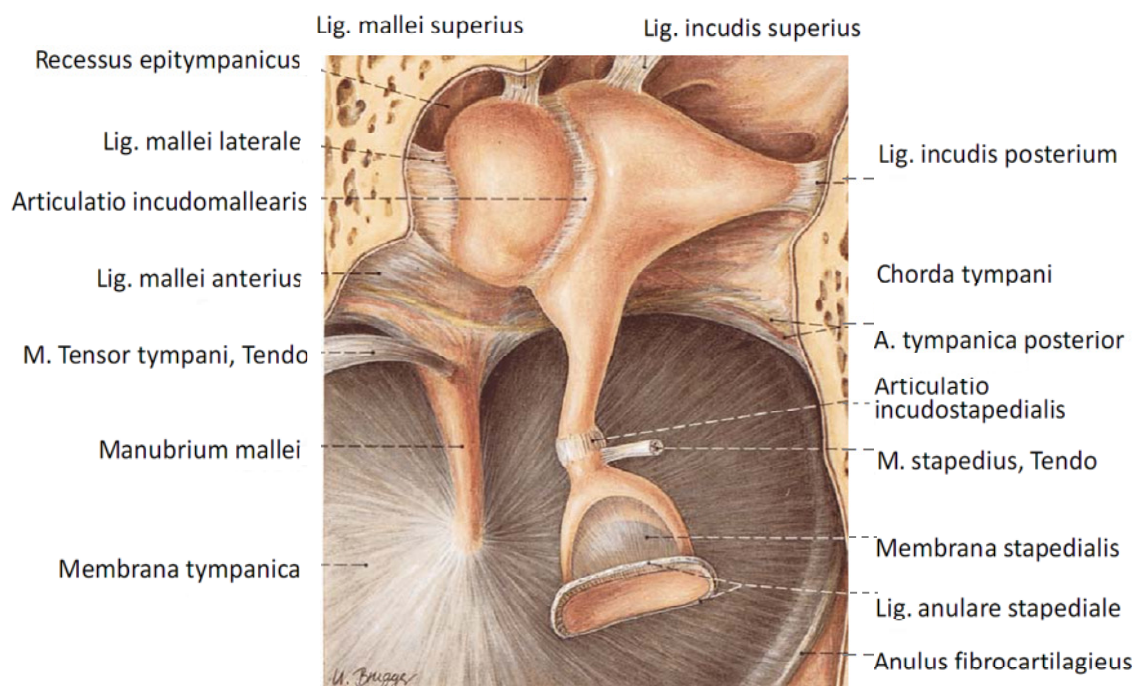


Abbildung 2.21: Bänder und Gelenke der Gehörknöchelchen. Entnommen aus Lit. [101].

2.2.1 Pathologie des Mittelohres

In diesem Abschnitt soll kurz auf Erkrankungen des Mittelohrs eingegangen werden, die eine alloplastische Rekonstruktion zur Therapie erfordern. Eine sehr häufige Erkrankung des Mittelohrs ist neben der akuten Form die chronische Mittelohrentzündung (Otitis media), die auf langanhaltende, oft frühkindliche Entzündungen im Bereich des Mittelohrs zurückzuführen ist. Die hierfür typischen pathogenen Erreger sind zum Beispiel *Pseudomonas aeruginosa* sowie diverse Staphylokokken- und Streptokokkenstämme [102]. Die entzündlichen Prozesse können soweit fortschreiten, dass es neben Eiterbildung (chronisch laufendes Ohr) zur Perforation des Trommelfells und langfristig zur Zerstörung der Gehörknöchelchen kommen kann. Dies führt zwangsläufig zu einer Schwerhörigkeit beim Patienten. Nach einer entsprechenden Antibiotikatherapie muss dann in der Regel die Rekonstruktion der Gehörknöchelchen durch ein geeignetes Implantat erfolgen (Tympanoplastik). Ebenso kann ein sogenanntes Cholesteatom, auch Perlgeschwulst genannt, im schlimmsten Verlauf zu der Zerstörung der Ossikel führen. Diese Geschwulst oder Zyste wird aus verhornendem Plattenepithel gebildet, das aus dem äußeren Gehörgang in die Paukenhöhle eindringt. Die Zyste wächst, da die Hornschüppchen nicht nach außen abgegeben werden können, und kann neben der Zerstörung der Gehörknöchelchen auch ins Innenohr und ins Schädelinnere durchbrechen. Die Geschwulst muss für die Therapie operativ entfernt werden, wonach eine sich eventuelle Rekonstruktion des Schalleitungsapparates anschließen kann.

Eine weitere recht häufige Erkrankung des Mittelohrs ist die Otosklerose, mit der eine Versteifung der Gehörknöchelchen gemeint ist. Bis zu 10 % der Bundesbürger sind davon betroffen, wobei tendenziell mehr Frauen erkranken. Die genauen Ursachen dieser Krankheit, die meist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr eintritt, sind bislang nicht bekannt. Die eintretende Schwerhörigkeit ist auf Umbauvorgänge im Felsenbein mit einhergehender Knochenneubildung im Bereich des ovalen Fensters zurückzuführen. Dadurch kommt es zur Versteifung und Unbeweglichkeit der Steigbügelplatte (Stapesankylose), so dass die Schwingungen des Mittelohrs nicht mehr auf das Innenohr übertragen werden können. Die Therapie besteht aus einem operativen Eingriff, wobei der Stapes entfernt und durch eine Prothese ersetzt wird.

2.2.2 Methoden zur Rekonstruktion des Schalleitungsapparates

Gehörverbessernde Operationen im Bereich des Mittelohres dienen der Wiederherstellung der mechanischen Schallübertragung zwischen Trommelfell und Innenohr. Je nach Situation müssen dabei verschiedene Distanzen zwischen Mittelohr und Fußplatte überbrückt werden. Nach WULLSTEIN (1986) werden fünf verschiedene Typen der Tympanoplastik unterschieden. Die Einteilung erfolgt nach dem Umfang des zu ersetzenden Bereichs durch die Prothese. Die Operationstechnik wird vor allem durch den Zustand der Kettenreste bestimmt. Dieser Abschnitt widmet sich im Besonderen tympanoplastischen Eingriffen des Typs III. In diesem Fall ist nur noch die knöcherne Fußplatte des Stapes erhalten. Hier ist eine TORP (Total Ossicular Replacement Prothesis) erforderlich (siehe Abbildung 2.22).

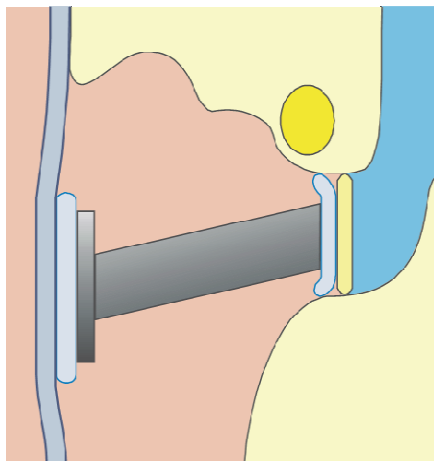


Abbildung 2.22: Schematische Darstellung der Total Ossicular Replacement Prothesis (TORP). Die Prothese wird zwischen Trommelfell und Fußplatte befestigt und dient der Schallübertragung anstelle der Gehörknöchelchen. Entnommen aus Lit. [103].

Zur Rekonstruktion der Gehörknöchelchen eignen sich besonders gut autogene Materialien wie Gehörknöchelchen, Kortikalisknochen oder Knorpel. Die letzten beiden Ersatzstoffe werden vom Körper leicht resorbiert, was nachteilig ist. Im Fall autogener Ossikel ist die Verfügbarkeit besonders im Fall der Ossikel begrenzt. Die zweite Möglichkeit in Form von allogenen Materialien (Gehörknöchelchen, Kortikalisknochen, Knorpel, Dentin) ist wegen der möglichen Übertragung von HIV und der Creutzfeld-Jacob-Krankheit in Verruf gekommen [104]. Aus diesen Gründen haben sich alloplastische Werkstoffe zur Rekonstruktion durchgesetzt und zunehmend gut bewährt. Die Materialauswahl ist vielfältig und muss mit Bedacht

erfolgen. In der Regel stehen aus verschiedenen Materialien gefertigte Prothesen kommerziell zur Verfügung und werden in analogen Operationsverfahren eingesetzt. Im Mittelohr werden besondere Ansprüche an das Knochenersatzmaterial gestellt. So sollte es biokompatibel, bio- und formstabil sein. Im Idealfall fördert eine Bioaktivität des Implantats die Besiedlung mit einer dünnen Schleimhautschicht (Mukosa) und damit einen stabilen Verbund mit den betreffenden Organen im Mittelohr [97]. Weiterhin zeichnet ein gutes Implantat eine Unempfindlichkeit gegen gelegentliche bakterielle Infektionen aus. Die luftgefüllte Pauke ist mit empfindlicher Schleimhaut ausgekleidet und wegen der Verbindung zum Rachenraum grundsätzlich nicht steril. Auch ein geringes Prothesengewicht bietet speziell bei der Schallübertragung im hohen Frequenzbereich seine Vorzüge [105]. Trotz der vielfältigen Auswahl bezüglich Material und Form weisen künstliche Prothesen auch zum Teil erhebliche Nachteile auf. So kommt es oft zur mangelnden Fixierung oder zum Teil zum vollständigen Verwachsen des Implantates mit den Mittelohrstrukturen, einhergehend mit einer schlechten Schallübertragung. Prothesenextrusionen kommen abhängig vom Material in bis zu 83 % der Fälle vor. Mit zunehmender Implantationszeit verschlechtert sich die Qualität des Hörergebnisses, welche bei allen Materialien zu Beginn recht günstig ausfällt. Häufig verwendete Werkstoffe sind Metalle, Keramiken und Kunststoffe.

Titan hat sich nicht nur auf dem Gebiet der HNO-Heilkunde als bewährtes Implantatmaterial erwiesen. Die hohe Oberflächenenergie begünstigt die schnelle Kolonisation mit Zellen [106]. Das Material lässt sich zwar nicht ohne Weiteres mechanisch bearbeiten und so den anatomischen Gegebenheiten des Patienten anpassen, durch verschiedene oder einstellbare Prothesenlängen lassen sich diese Probleme jedoch umgehen. Die Implantation gestaltet sich relativ einfach, da durch die filigrane Prothesenform Hindernisse in Form verbleibender Mittelohrstrukturen gut umgangen werden können. Ein sehr geringes Gewicht von 4 mg je 4 mm TORP zeichnet dieses Material aus, was sich positiv auf die Übertragung bei hohen Frequenzen auswirkt [105]. Goldprothesen wiegen dagegen im Schnitt um die 56 mg. *In vitro*-Studien konnten zeigen, dass Gold das Wachstum typischer Mittelohrkeime vermindert [107], die Prothesen werden in der Regel wie gewünscht mit Schleimhautepithel bewachsen [108].

Keramische Prothesen werden vor allem wegen ihrer Biokompatibilität und Langzeitstabilität geschätzt. Dabei können verschiedene Kategorien unterschieden werden: bioinerte Keramiken wie Aluminiumoxid, synthetische Kohlenwerkstoffe (z.B. Feinkorngraphit) sowie oberflächenaktive Keramiken wie Bioglas und Hydroxylapatit [109]. In der rekonstruktiven Mittelohrchirurgie sind Aluminiumoxidkeramiken, Hydroxylapatit und Biovitrokeramiken weit verbreitete Knochenersatzwerkstoffe. Aluminiumoxidkeramiken (Al_2O_3) zeigen als bioinerte Ersatzstoffe eine hervorragende Verträglichkeit, so dass die Prothesen nach sechs bis neun Monaten von normaler Mukosa bedeckt werden [110]. Durch spezielle Operationstechniken lässt sich die Extrusionsrate von 16 auf ca. 5 % reduzieren [111]. Die Verwendung von Aluminiumoxidkeramiken kann sich problematisch im Zusammenhang mit infizierten Mittelohrstrukturen gestalten und zu Fremdkörperreaktionen und Abstoßungen führen [112]. Insgesamt werden Aluminiumoxidkeramiken wegen ihre biokompatiblen Eigenschaften, geringen Extrusionsraten und guten Hörergebnisse geschätzt.

Im Gegensatz zu Aluminiumoxid ist Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) auch im entzündeten Mittelohrgewebe biokompatibel [113]. Obgleich eine Biodegradation des Materials bei chronischer Mittelohrentzündung oder bei Cholesteatombildung beobachtet wurde, gilt Hydroxylapatit als geeignetes Rekonstruktionsmittel in der Mittelohrchirurgie [114]. Für die Biofunktionalität des Hydroxylapatits spricht das bis zu acht Jahre stabil bleibende Hörvermögen von Patienten [113] und die extrem geringe Extrusionsrate [115,116]. Neben einer Biodegradation in 4 % der Fälle ist eine Fixierung der Prothese an die knöchernen Strukturen im Mittelohr wegen der hohen Bioaktivität des Materials ein großer Nachteil von Prothesen aus Hydroxylapatit [117].

Bioaktive Glaskeramiken wie zum Beispiel Ceravital[®] oder Bioverit[®] II bestehen bis zu einem Anteil von 40 - 50 % aus Silikatglas (SiO_2), Phosphat, Natrium, Kalium und Magnesium. Bei Ceravital[®] zeigten sich vor allem sehr gute Hörergebnisse einhergehend mit einer positiven Mittelohrkompatibilität. Die Biostabilität des Materials reicht für eine Verwendung im Mittelohrbereich jedoch nicht aus, nach langen Implantationszeiten stellte sich eine teilweise oder völlige Auflösung der Implantate ein [118]. Glaskeramiken aus Bioverit[®] II zeichnen sich ebenso durch eine gute Biokompatibilität sowie gute Fixierung an die Mittelohrstrukturen aus und

werden im Körper nicht abgebaut [117]. Eine übermäßige Fixierung kann durch Kontrolle der bioaktiven Oberfläche verhindert werden. So konnte im Kaninchenmodell gezeigt werden, dass eine mesoporöse Beschichtung aus Silica die Formation von Mukosa begünstigt, während unkontrolliertes Knochenwachstum tendenziell gehemmt wird [36].

Gängige Kunststoffprothesen werden aus Polyethylen oder Polytetrafluorethylen (PTFE, Teflon) angeboten. Im Falle des Polyethylens werden aus Ethylen unter hohem Druck und bei großer Hitze poröse Polymerisationsprodukte (Plastipore™, Polycel™) mit Porendurchmessern zwischen 20 und 40 µm erhalten. Die poröse Struktur der Materialien soll durch ein Einwachsen des Mittelohrgewebes die Stabilisierung des Implantats verbessern [117]. Proplast™ ist ein weiteres Kompositmaterial aus PTFE und Beimischungen aus Kohlenstoff, Aluminium oder Hydroxylapatit. Plastipore™ ist seit 1976 im Einsatz in der Mittelohrchirurgie [119]. Studien zur klinischen Anwendung zeigen zum Teil große Diskrepanzen zur Bewertung von Tauglichkeit und Verträglichkeit des Materials. Neben positiv bescheinigten Eigenschaften für den Einsatz in der Mittelohrrekonstruktion [120], [121] liegen auch zahlreiche negative klinische Ergebnisse hinsichtlich Fremdkörperreaktionen [122], Desintegration der Implantate und mikrobiellen Befall vor [123,124]. Zudem wird von hohen Extrusionsraten von bis zu 60 % [125] und schlechten Hörergebnissen nach langen Implantationszeiten berichtet [126]. Einige der für Polyethylen genannten Aspekte treffen auch auf Teflon als Rekonstruktionsmaterial zu. So werden regelmäßig Fremdkörperreaktionen konstatiert [124]. Auf der anderen Seite haben sich Kolbenprothesen aus Teflon als Steigbügelersatz in der Otosklerosechirurgie durch gute klinische Resultate bewährt [127].

2.2.3 Optimierungsstrategien für Mittelohrprothesen

Bisher liegen mehrere Ansätze zur Optimierung der Rekonstruktion des Schalleitungsapparates mittels Mittelohrprothesen vor. Das primäre Ziel ist nach wie vor die Verbesserung der Schallübertragung für den Patienten bei möglichst langen Implantationszeiten. Neben dem Materialtyp spielen auch Form und Geometrie bei der Gestaltung eines in seinen Eigenschaften optimierten Mittelohrimplantates eine wichtige Rolle [128]. Des Weiteren können auch topographische Effekte der

Implantatoberfläche nicht nur im Mikrometerbereich, [128] sondern auch auf der Nanometerskala [36,129,130] eine positive Auswirkung auf die Übertragungseigenschaften leisten. Für die vorliegende Arbeit sind vor allem Ansätze relevant, die sich mit der Funktionalisierung der Implantatoberfläche beschäftigen. Nach STIEVE und LENARZ ist das Basismaterial nicht der entscheidende Faktor für eine weitere Optimierung der Prothesen, denn das Übertragungsverhalten herkömmlicher Prothesen erwies sich in audiologischen Studien unabhängig vom Material als ähnlich [131,132]. Vielmehr gilt es, die Prothesen mit geeigneten Drug Delivery-Reservoirs, speziellen Oberflächenstrukturen, antibakteriellen Beschichtungen, immobilisierten Biomolekülen oder Wachstumsfaktoren auszustatten. Diese Modifizierungen können zur Infektionsbekämpfung dienen, zur besseren Implantatfixierung beitragen oder die Bildung eines überschießenden Narbengewebes verhindern. JAHNKE und Mitarbeiter sehen zukünftige Möglichkeiten, menschliche Gewebestrukturen auf der Implantatoberfläche durch Anbindung von Zellrezeptoren nachzuahmen und so die Verträglichkeit von Implantaten grundlegend zu verbessern [117].

Im Rahmen des Teilprojekts D1 „*Funktionalisierte Mittelohrprothesen*“ des Sonderforschungsbereichs 599 „*Zukunftsfähige bioresorbierbare und permanente Implantate aus metallischen und keramischen Werkstoffen*“ wurden mehrere der oben genannten Ansätze zur Modifizierung und Optimierung von Mittelohrprothesen entwickelt und verfolgt. In der Abbildung 2.23 ist das Konzept zur modularen Modifizierung von Mittelohrprothesen dargestellt.

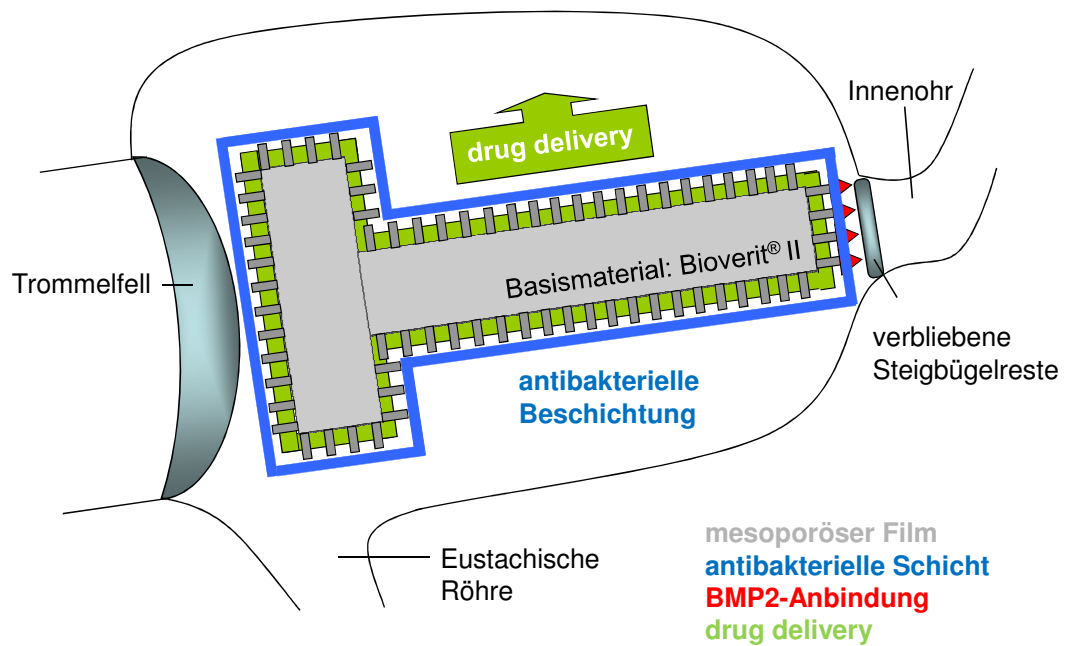


Abbildung 2.23: Konzepte zur modularen Modifizierung von Mittelohrprothesen. Das Basismaterial des Implantats kann individuell mit verschiedenen Modifizierungen ausgestattet werden.

Zunächst konnte mit Hilfe einer mesoporösen Silicabeschichtung die Bioaktivität des Basismaterials der Prothese aus Bioverit® II herabgesetzt werden [36]. Im Kaninchenmodell konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung zu einer gewünschten Mukosabildung um die Prothese herum führt. Eine unerwünschte unkontrollierte Knochenbildung konnte hingegen tendenziell zurückgedrängt werden (siehe Abbildung 2.24). Obwohl eine gute Fixierung der Prothese erwünscht ist, wäre ein Festwachsen der Prothese an der Paukenhöhlenwand oder ein durchgehend knöcherner Überzug, wie sie wegen der hohen Bioaktivität des Prothesenmaterials von diesem ausgelöst werden könnten, für die Schallübertragung von Nachteil. Darüber hinaus bieten sich ausgehend von den mesoporösen Silicabeschichtungen gute Möglichkeiten zur weiteren Funktionalisierung des Prothesenmaterials. Aufgrund der großen Oberfläche mit den reaktiven Silanolgruppen können solche Materialien gut für chemische Modifizierungen genutzt werden.

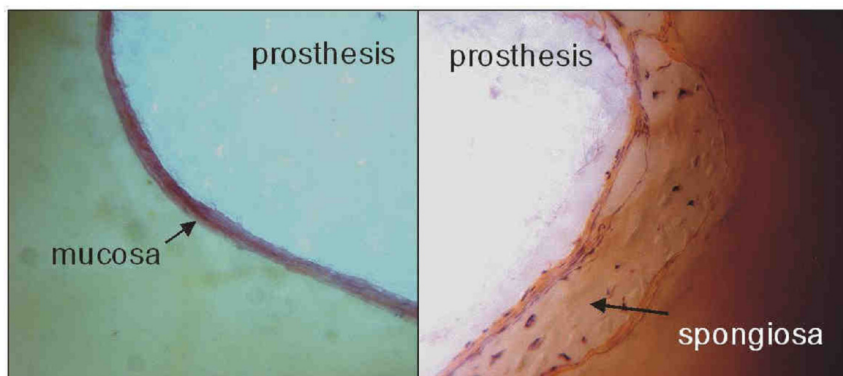


Abbildung 2.24: Bildung von Mukosa und Spongiosa auf einer Bioverit® II Mittelohrprothese im Kaninchenmodell. Entnommen aus Lit. [36].

So hat sich mesoporöses Silica zum Beispiel als Support für die Immobilisierung von Proteinen bewährt [133,134]. In dem Teilprojekt D1 wurde Alkaline Phosphatase als preisgünstiges und robustes Modellenzym auf mit mesoporösem Silica ausgestatteten Substraten immobilisiert. Nach Etablierung dieses Modells konnten modifizierte Bioverit® II-Oberflächen durch die Anbindung von BMP2 (*Bone Morphogenetic Protein 2*) funktionalisiert werden [103]. BMP2 ist ein Wachstumsfaktor, der die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Knochenzellen fördert und so die Fixierung der Prothese an die vorhandene Knochenreste des Stapes verbessern könnte. Im Laufe der Arbeiten konnten bis zu 150 ng cm^{-2} biologisch aktives BMP2 an die Oberflächen gebunden werden. Die biologische Aktivität wurde in Tierstudien geprüft und wird zurzeit evaluiert [135]. Auf der Basis von Ciprofloxacin wurde ein Drug Delivery-System entwickelt und etabliert, welches in die Mesoporen der Silicabeschichtung eingelagert wurde. Durch geschickte chemische Modifizierung der Schicht konnten die Beladung und die Wirkstofffreisetzungsraten deutlich beeinflusst werden (*controlled release*). Der antibakterielle Effekt konnte in Bakterienkulturen und in einem Mausmodell bewiesen werden [103].

Ein weiterer interessanter Aspekt zur Funktionalisierung einer Mittelohrprothese, dem sich diese Arbeit widmet, beschäftigt sich mit der Ausstattung des Implantatkörpers mit einer antibakteriellen Beschichtung. Die Implantation einer Mittelohrprothese findet in der Regel im infizierten Mittelohrgewebe statt. Dieses wurde durch oftmals chronischen Keimbefall entzündet, was zu der Zerstörung der

Gehörknöchelchenkette geführt hat. Ein typischer pathogener Erreger ist zum Beispiel *Pseudomonas aeruginosa*. Die Gabe von Antibiotika ist eine gängige und gute Therapiemöglichkeit. Die Nachteile regelmäßiger Antibiotikaeinnahmen, ob systemisch oder in Form eines lokalen Drug delivery, können jedoch gravierend sein: die Bildung resistenter Keime kann gefördert werden [102] und kann letztendlich zum Verlust des Implantats führen. Während die Behandlung der Infektion mit einem auf Drug Delivery basierten System vor allem die anfänglich kritische Situation (3 – 7 Tage) beherrschen helfen soll, könnte eine bakterizide Schicht inflammatorische Prozesse minimieren, das Implantat langfristig vor Keimbesiedlung schützen und würde im Idealfall auch die Schleimhautbildung fördern.

2.2.4 Antibakterielle Oberflächen

Die Ausstattung alltäglicher Gegenstände wie Türklinken, Fahrstühle, Telefone oder Kinderspielzeug mit antibakteriellen Beschichtungen erlangt in der heutigen Zeit eine steigende Bedeutung, da zum Beispiel Flugreisen in die ganze Welt Übertragungswege für zahlreiche Infektionskrankheiten zunehmend erhöhen. Bakterizide Oberflächen im Bereich des öffentlichen Lebens böten Schutz gegenüber krankmachenden Erregern und könnten die Übertragung infektiöser Erkrankungen verhindern. Somit ist das Verlangen nach antiseptischen Beschichtungen, die zu einer höheren Lebenserwartung beitragen könnten, groß.

Auch im medizinischen Bereich besteht ein immenses Interesse an antibakteriellen Beschichtungen. So ist die bakterielle Kontamination von permanenten Kathetern, Stents und Implantaten immer noch ein medizinisches Hauptproblem bei der Verwendung solcher Materialien und Hilfsmittel [27]. Dabei steigt die Anzahl der Patienten stetig an, die mit einem Implantat versorgt werden müssen [25,26]. Der bakterielle Befall von Dauerimplantaten führt oft dazu, dass diese letztendlich entfernt werden müssen, um die Infektion medikamentös zu behandeln. Hierfür ist meistens eine langwierige Behandlung mit Antibiotika nötig. Infektionen sind maßgeblich für das Versagen von Implantaten in der modernen Medizin verantwortlich. Für den Patienten ist dies eine nachteilige und beschwerliche Situation, auf der anderen Seite ist der entstehende volkswirtschaftliche Schaden immens [136,137].

Aus diesen Gründen sollte eine im Rahmen dieser Arbeit entwickelte bakterizide Beschichtung nach Möglichkeit auch auf weitere Anwendungsgebiete, insbesondere im Bereich keramischer Implantate, übertragbar sein. In Kooperation mit dem Teilprojekt D8 „*Dentale Abutments*“ des SFB 599 soll eine für den Einsatz im dentalen Bereich geeignete antibakterielle Schicht erarbeitet werden. Die Durchtrittsstelle zwischen Zahnfleisch und Mundhöhle stellt bei dentalen Implantaten einen Angriffsraum für Bakterien dar [138] (Abbildung 2.25). Wird die Prothese nicht eng vom Zahnfleisch umschlossen, kann sich eine sogenannte Zahnfleischtasche bilden, die dann von Bakterien besiedelt werden kann. Eine anschließende Biofilmformation führt nicht selten zu schwerwiegenden Entzündungen des Zahnhalteapparates und so letztendlich zum Verlust des Implantats.

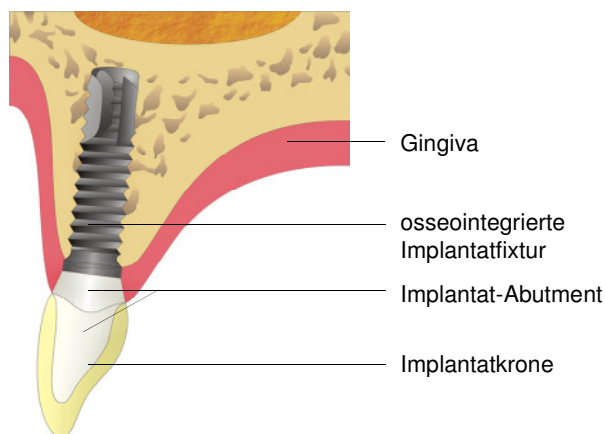


Abbildung 2.25: Dentales Implantat mit osseointegrierter Implantatfixtur, Implantat-Abutment und Implantatkrone. Nach Lit. [139].

Typische humane orale Keime sind *Streptococcus mutans* und *S. sanguinis*. Sie verursachen vornehmlich eine Dentalplaque, die dann zu Erkrankungen wie Karies und Parodontitis sowie Zahnfleiscentzündungen im Implantatbereich führen kann [140].

2.2.5 Biofilmformation

Die Adhäsion von Bakterien an medizinische Implantate und Hilfsmittel steht in einem engen Zusammenhang mit damit verbundenen Infektionen. Dabei spielt die Biokompatibilität der eingesetzten Materialien eine wichtige Rolle. Biokompatible Werkstoffe, wie zum Beispiel Titan, verursachen in der Regel eine minimale Immunantwort des Wirtgewebes. Somit weisen diese Materialien ein geringeres Infektionsrisiko auf als weniger kompatible Materialien [141,142].

Im Falle eines bakteriellen Befalls eines Implantatmaterials bilden adhärierte Bakterien eine komplex zusammengesetzte mikrobielle Lebensgemeinschaft, auch Biofilm genannt. Mit einem Biofilm ist eine Population verschiedener Bakterien gemeint, die in Symbiose miteinander existieren. Dadurch kommt es zu veränderten Eigenschaften der Bakterien, die auf die Koexistenz in der Bakteriengemeinschaft zurückzuführen sind. Innerhalb des bakteriellen Films reagiert die Population zum Teil ganz anders auf Umwelteinflüsse im Vergleich zu der Befindlichkeit eines für sich allein betrachteten Bakterienstamms. So sprechen Bakterien in einem Biofilm deutlich schlechter auf Antibiotika und antibakterielle Stressfaktoren an als planktonische Organismen der gleichen Spezies [33,143,144]. Unterdosierte Antibiotikagaben können die Situation sogar verschärfen, indem sie zu Resistenzen führen und die Biofilmformation so indirekt verstärken [145].

Die genauen Vorgänge bei der Entstehung von Biofilmen sind bislang nicht vollständig geklärt. Die grundlegende Voraussetzung ist jedoch die Möglichkeit der Bakterien an die entsprechende Oberfläche zu adhären. Es kommt zu Interaktionen in Form von elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen, VAN DER WAALS-Kräften sowie spezifischen Rezeptor-Adhäsion-Interaktionen zwischen Oberfläche und Bakterien [146]. Adhäsine sind von Bakterien produzierte Faktoren, die es den Bakterien ermöglichen, an Oberflächenstrukturen des Wirts anzuhaften. Die Adhäsion mittels Adhäsinen verhindert einen möglichen Abtransport der Bakterien und fördert somit das Entstehen eines Biofilms. Nach PASCUAL lässt sich die Adhäsion durch Bakterien in drei Stadien unterteilen (siehe Abbildung 2.26) [147].

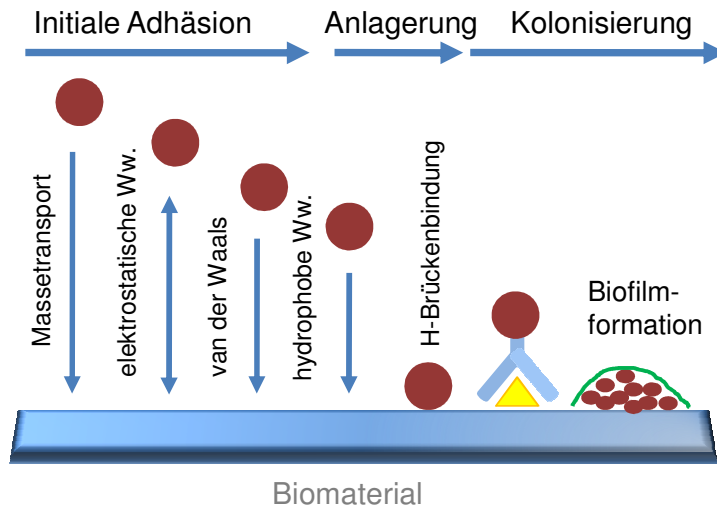


Abbildung 2.26: Schematische Darstellung der schrittweisen Besiedelung eines Biomaterials/Implantatmaterials mit Bakterien und anschließender Biofilmbildung. Nach Lit. [147].

Direkt nach dem Eintritt der Bakterien kommt es zu einem raschen Überzug der Oberfläche mit Plasmaproteinen, die von den Bakterien produziert werden. In der initialen Phase kommt es zum Antransport der Bakterien, die Interaktionen zwischen Bakterien und der adsorbierten Proteinschicht sind noch recht unspezifisch, hauptsächlich durch VAN DER WAALS-, Gravitations- und COULOMB-Kräfte dominiert [148]. Im zweiten Stadium binden Membranproteine und Membranpolysaccharide der Bakterien spezifisch an die zuvor abgelagerten Proteine auf der Substratoberfläche. Einige Spezies sondern im Anschluss ein extrazelluläres schützendes Sekret (Schleim) aus Exopolysacchariden aus, welches den enthaltenen Bakterien in Phase drei eine erhöhte Antibiotikaresistenz bietet. Nach O'TOOLE wird eine akkumulierte Biomasse von Bakterien, bedeckt mit ihrem extrazellulären Material, als Biofilm definiert [149].

Insgesamt beinhaltet der Prozess der bakteriellen Adhäsion also eine initiale physikochemisch dominierte Phase sowie weitere Phasen auf molekularer und zellulärer Ebene (Abbildung 2.27). Dabei kann in der ersten Phase zwischen Adhäsion an plasmafreie sowie plasmabedeckte Oberfläche unterschieden werden. Während im ersten Fall die Anhaftung der Bakterien vor allem durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen sowie VAN DER WAALS-Kräfte dominiert wird (Abbildung 2.27-Ia), wird die Adhäsion im zweiten Fall überwiegend durch chemische Faktoren wie Oligopeptide, Zucker und Aminosäuren gelenkt

(Abbildung 2.27-Ib). Im weiteren Verlauf adhären die Bakterien fest an die Oberfläche, wobei die Wechselwirkungen zwischen Bakterienmembran und Substrat dominieren. Hierfür sind die Bakterien mit speziellen Membranstrukturen wie Kapseln, Schleim oder Pili ausgestattet, die selektiv an die Substratoberflächen binden können. Diese Adhäsine werden von manchen Bakterienstämmen in Abhängigkeit der Umweltbedingungen exprimiert. *S. epidermidis* weist zum Beispiel mehrere Polysaccharidadhäsine auf, die die Anhaftung an verschiedene Oberflächen und Proteingewebe ermöglichen [150]. Generell präferieren Bakterien es, auf verfügbaren Oberflächen zu wachsen, statt in einem fließenden wässrigen Medium. Sobald die Bakterienzellen an die Oberfläche adhären sind, proliferieren sie und bilden mehrlagige Zellcluster (Abbildung 2.27-II).

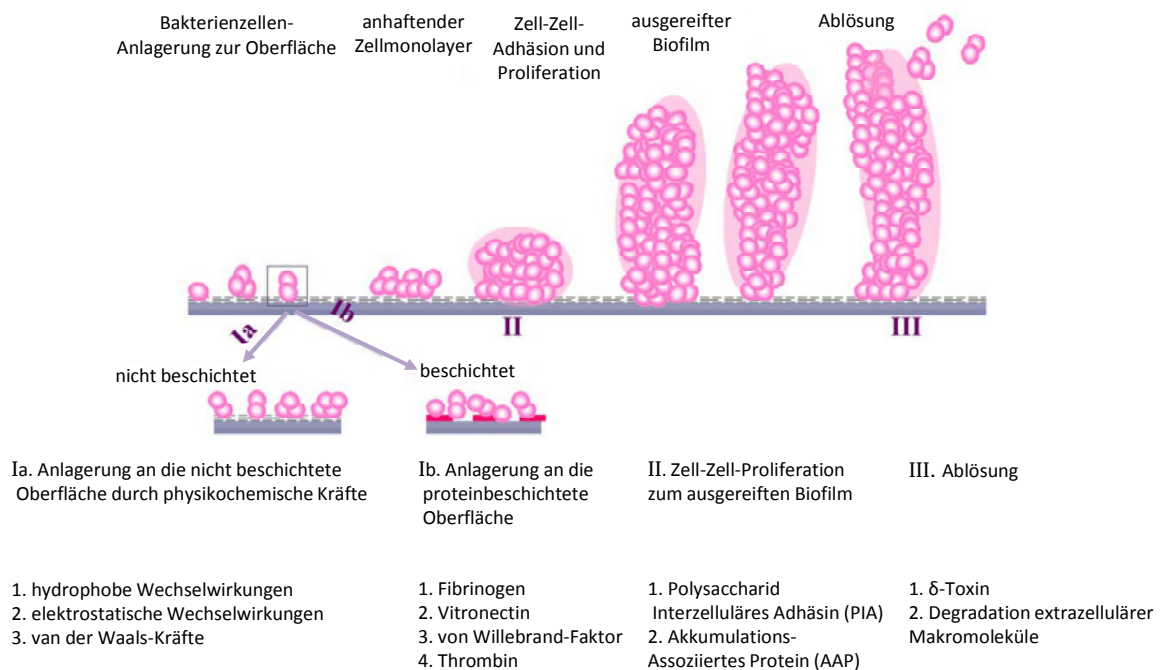


Abbildung 2.27: Schematische Darstellung der bakteriellen Adhäsion auf molekularer und zellulärer Ebene unter der Einbeziehung bakterieller Faktoren. Nach Lit. [148] entsprechend Lit. [151].

Dabei spielen nun interferierende Polysaccharide (PIA) und akkumulations-assoziierte Proteine (AAP) eine bedeutende Rolle und unterstützen die Akkumulation und den innerbakteriellen Zusammenhalt. Schließlich lösen sich unter anderem unter Einwirkung von eigens produzierten Toxinen einige adhärenente und nicht-adhärenente Tochterzellen vom ausgereiften Biofilm, um neue Flächen zu besiedeln und den

Kolonisationsprozess zu wiederholen (Abbildung 2.27-III). Der Biofilm schützt die Bakterien vor einer Ablösung und Abschwemmung und ermöglicht so eine dauerhafte Besiedlung einer Oberfläche (Wirt). Chronische Infektionen entstehen, wenn der bakterielle Befall eine kritische Grenze erreicht, so dass das Immunsystem des Wirts keine genügende Abwehr mehr leisten kann.

Bakterielle Adhäsion wird von unterschiedlichen Faktoren begünstigt. Generell müssen Umweltfaktoren wie Temperatur, Expositionszeit, Konzentration der Bakterien und eine Transportmöglichkeit von Nährstoffen und Metaboliten günstig ausfallen. Auch pH-Wert und Ionenstärke haben beträchtlichen Einfluss auf die Adhäsion. So konnten BUNT et al. zeigen, dass eine Anhaftung an hydrophobe Oberflächen durch eine für die Bakterien günstige Einstellung des pH-Wertes und der Ionenstärke wesentlich erleichtert werden kann [152]. Des Weiteren hängt das Ausmaß einer Adhäsion an ein Biomaterial von der chemischen Zusammensetzung des Materials, der Oberflächenladung und der Beschaffung der Oberfläche (Rauigkeit) ab. TEGOULIA und COOPER zeigten in ihren Studien, dass *S. aureus* aus unterschiedlich stark hydrophoben Oberflächen die am stärksten hydrophobe präferiert, während die hydrophilere Oberfläche deutlich weniger Keime aufwies (153). Raue Oberflächen werden zahlreichen Studien zufolge deutlich leichter mit Bakterien besiedelt, während ultraglatte Oberflächen für die Adhäsion von Bakterien und die Bildung von Biofilmen eher nicht favorisiert werden [154,155]. Die Gründe werden in den für die Kolonisierung günstigen Vertiefungen gesehen, die eine raue Oberfläche bietet. Darüber hinaus ergaben Untersuchungen zur Keimbesiedelung von porösen und dichten Implantaten, dass poröse Materialien wesentlich stärker von mikrobiellen Befall betroffen sind als nichtporöse [154,156]. Dabei fördern Vertiefungen, die den Bakterien in ihrer Größe entsprechen, die Adhäsion, während zu kleine Mulden die Anhaftung erschweren. Letztendlich hängt eine Adhäsion nicht nur vom Material, sondern auch von den Eigenschaften der jeweiligen Spezies ab.

Bakterielle Infektionen, die auf Biofilmbildung zurückzuführen sind, sind äußerst schwierig mit konventionellen Antibiotikatherapien zu behandeln. Die Gründe hierfür könnten in einer langsamen Wachstumsrate von adhärierten Bakterien im Biofilm liegen, des Weiteren wird ein eingeschränkter Transport sowie Abtransport von Nährstoffen, Metaboliten und Sauerstoff zum und vom Biofilm als Ursache für die Resistenz gegen Umwelteinflüsse vermutet [157-160]. Aus diesem Grund scheint

eine Vorbeugung gegen die bakterielle Adhäsion als eine sinnvolle Möglichkeit, die Bildung von Biofilmen schon beim Entstehen zu verhindern.

2.2.5.1 Bakterizide Beschichtungen auf der Basis von Polymeren

Bakterielle Infektionen können vor allem durch Inhibierung der bakteriellen Adhäsion im Anfangsstadium verhindert werden. Die Reduktion der Adhäsion von Bakterien in den ersten sechs Stunden nach der Implantation trägt bereits stark zur Vermeidung einer Infektion bei [161]. Aus diesem Grund wird intensive Forschung auf dem Einsatz bakterienabweisender Beschichtungen betrieben. Die Entwicklung einer geeigneten antiadhäsiven und antibakteriellen Beschichtung stellt dabei generell eine Herausforderung dar, denn häufig zeigen potentielle Beschichtungen aufgrund maskierender Effekte durch bakterielle Proteinschichten auf der Substratoberfläche eine ungenügende Effizienz *in vivo*. Die physikochemischen Eigenschaften der unterliegenden Substratoberfläche werden somit durch die anhaftenden bakteriellen Ausscheidungen ausgeschaltet, funktionelle Gruppen können ihr Ziel nicht erreichen. Dementsprechend gestaltet sich die Aufgabe schwierig, eine wirksame Beschichtung zu entwickeln, die nicht auf der Freisetzung etwa von Silberionen oder gar antibiotischen Substanzen basiert. Diese Stoffe zeigen wegen der zunehmenden Resistenzbildung große Nachteile im Zusammenhang mit dem geplanten Einsatzgebiet [162,163].

Potentielle Biozide, die nicht auf einem Freisetzungsmechanismus basieren, sind zum Beispiel antibakterielle Polymere. Sie bieten Vorteile wie Nichtflüchtigkeit, chemische Stabilität sowie keine Hautpermeabilität. Ein weiterer Vorteil ist die geringere Umweltbelastung, da sie nicht ohne Weiteres in die Umwelt entlassen werden. Resistenzen sind nach derzeitigem Stand der Forschung nicht bekannt, was ein enormer Vorteil gegenüber herkömmlichen Antibiotika ist [32]. Zudem kann eine langreichende Funktion der polymeren Beschichtung erwartet werden, da das Biozid in der Regel permanent in der Schicht verbleibt. Neben zahlreichen polymeren Bioziden ist ein breites Spektrum an kationischen amphiphilen Polymeren bekannt, die antiadhäsiv oder antibakteriell wirken (Abbildung 2.28).

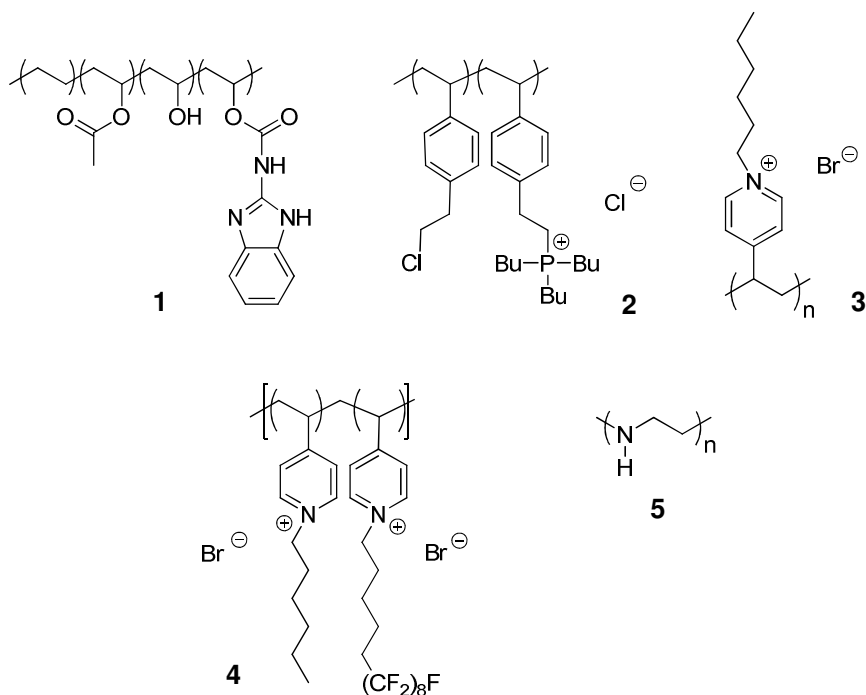


Abbildung 2.28: Beispiele für bakterizide Polymere: 1) EVOH-CBZ basierend auf antifugalen 2-Benzimidazolcarbamoylgruppen, 2) quartäre Phosphoniumverbindung, 3) quartäres Poly(4-vinyl-*N*-hexylpyridiniumbromid), 4) fluoriertes Poly(4-vinylpyridin)-*block-co*-Polymer, 5) Polyethylenimin (zeigt nach chemischen Modifizierungen antibakterielle Eigenschaften).

Der Fokus dieser Arbeit richtet sich vor allem auf quartäre Ammoniumverbindungen auf der Basis von Poly(4-vinylpyridin) (PVP). Dieses kommerziell erhältliche Polymer zeigt nach einer Hexylierung antibakterielle Eigenschaften (Abbildung 2.28-3) [33]. Die antibakterielle Funktion von kationischen Polymeren wie Poly(4-vinyl-*N*-hexylpyridiniumbromid) basiert auf einer disruptiven Einwirkung dieser Biozide auf die Zellmembran von Bakterien, die aus Phospholipiddoppelschichten aufgebaut ist. Die Zellmembran wird vornehmlich aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen angegriffen und zerstört. Die negativen Ladungen der Phosphatgruppen in der Lipiddoppelschicht interagieren mit den positiven Ladungen der Polymerketten. So können die flexiblen lipophilen Alkylketten des Polymers in die Lipidschicht eindringen und deren Struktur so stark penetrieren, bis sie dem Innendruck nicht mehr standhält und das Cytoplasma austritt. Dies führt zur Zerstörung der Zelle (siehe Abbildung 2.29).

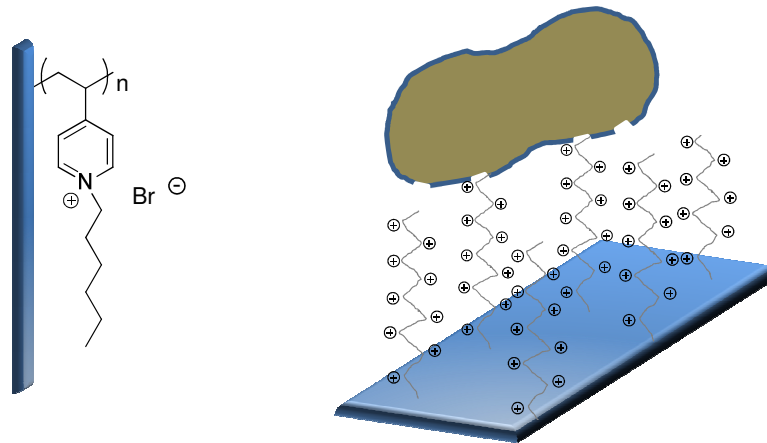


Abbildung 2.29: Schematische Darstellung der antibakteriellen Funktionsweise von kationischen Polymeren. Links: Struktur des kovalent gebundenen Poly(4-vinyl-*N*-hexylpyridiniumbromids) an eine Implantatoberfläche. Rechts: Hypothetischer Abwehrmechanismus durch das bakterizide Polymer, die flexiblen hydrophoben Seitenketten penetrieren die Bakterienzellwand.

Ein weiterer vorgeschlagener Abwehrmechanismus beruht auf der Annahme, dass die Phosphatgruppen der Phospholipiddoppelschicht zum Ladungsausgleich zweiwertige Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} benötigen, da sie sich sonst aufgrund ihrer negativen Ladungen abstoßen würden. Werden diese Kationen nun durch das positiv geladene Polymer verdrängt, wird die Ordnung im Aufbau der Membran erheblich gestört und geschädigt [164]. Demnach hängt die bakterizide Wirksamkeit von quartären, polymeren Ammoniumverbindungen von der Hydrophobie und Ladungsdichte des Polymers ab. Weitere Faktoren wie Molekulargewicht, Spacerlänge zwischen den aktiven Seiten im Polymer sowie die Natur des Gegenions bestimmen die antibakterielle Aktivität entscheidend und könnten je nach Bakterienstamm eingestellt werden. So bietet sich zum Beispiel für die Bekämpfung grampositiver Bakterien mit der (im Vergleich zu gramnegativen Bakterien) dickeren Zellmembran der Einsatz hydrophoberer Polymere an. Im Falle von Poly(4-vinylpyridin) zeigte die hexylierte Variante im Vergleich zu kürzeren und längeren Alkylresten die höchste antibakterielle Wirksamkeit [34].

Für eine funktionale und dauerhafte antibakterielle Beschichtung ist eine zuverlässige Anbindung an das Implantatmaterial erforderlich. Hierfür eignen sich neben einem direkten Einbau des polymeren Biozids in das Implantatmaterial verschiedene Strategien. Eine zuverlässige Methode für eine langfristige Bindung an

silicatische Oberflächen ist die kovalente Anbindung mit Hilfe von Silanen [33,34, 165]. In der Abbildung 2.30 ist ein Schema zur kovalenten Anbindung von Poly(4-vinylpyridin) an eine Silicaoberfläche gezeigt [34]. Der Vorteil in diesem Fall ist, dass die Oberfläche keiner langwierigen Vorbereitung bedarf, die Anbindung von 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS) sowie die weiteren Syntheseschritte können unter Luftatmosphäre ablaufen.

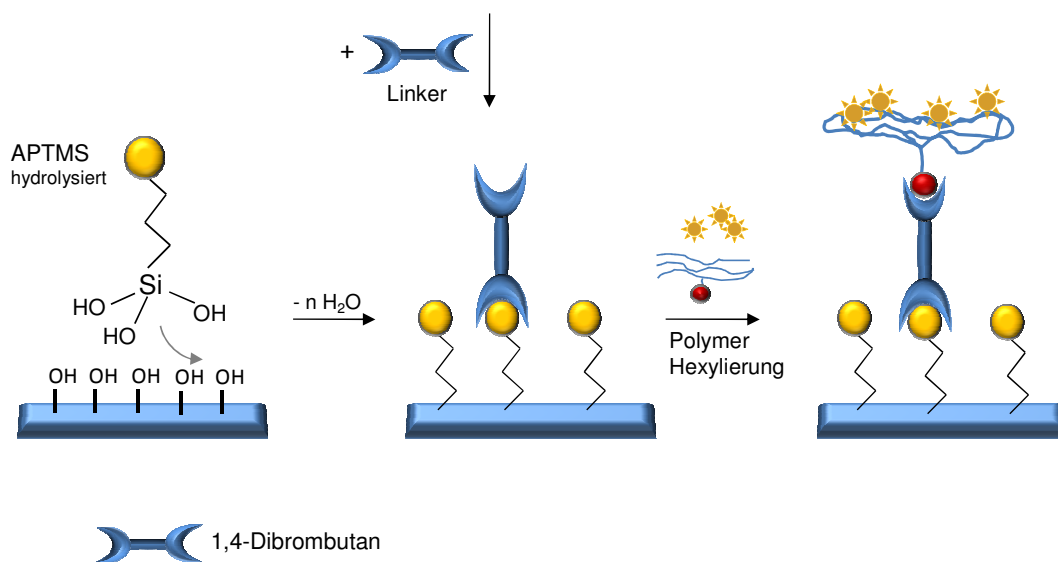


Abbildung 2.30: Schema zur kovalenten Anbindung von Poly(4-vinylpyridin) an eine Silicaoberfläche mit Hilfe von APTMS und 1,4-Dibrombutan als Linkermolekül. Durch die Alkylierung des Polymers erhält dieses antibakterielle Eigenschaften.

Weitere übliche Methoden für die Anbindung von Polymeren ist eine Anbindung durch eine oberflächeninduzierte Polymerisation (*Grafting from*) [166-169] oder die kovalente Anbindung durch funktionalisierte reaktive Gruppen an Kettenenden des Polymers (*Grafting onto*) [165,170]. In der Abbildung 2.31 ist schematisch die Anbindung von PVP durch Grafting onto mit Hilfe von Methoxysilangruppen durch vorherige Umsetzung mit 3-Brompropyltrimethoxysilan (BPTMS) dargestellt. Auch in diesem Fall kann die Anbindung unter Luftatmosphäre erfolgen.

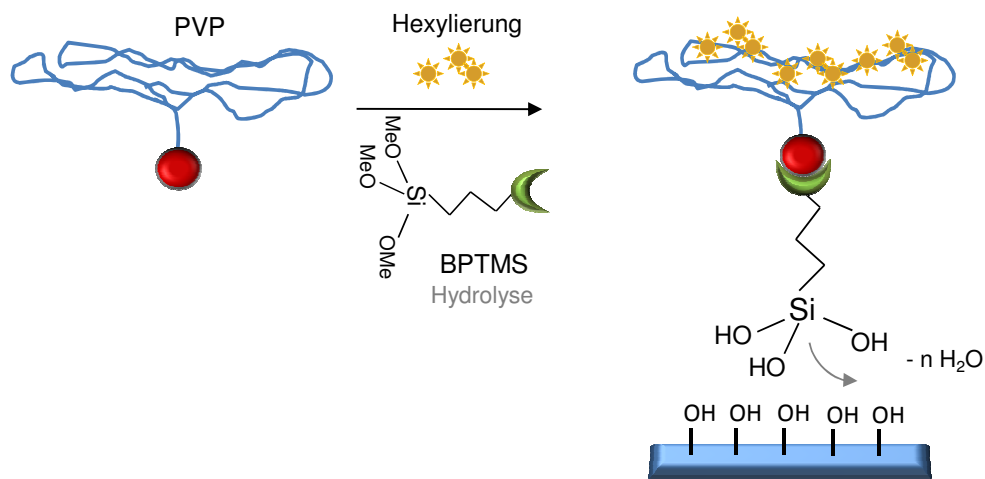


Abbildung 2.31: Schema zur kovalenten Anbindung von Poly(4-vinylpyridin) an eine Silicaoberfläche mit Hilfe von BPTMS als reaktive Gruppe. Die N-Atome der Pyridinringe werden sowohl zum Verlinken mit BPTMS als auch für die gleichzeitige Alkylierung genutzt, bei der antibakterielle Eigenschaften entstehen.

Ein großer Nachteil von Grafting-Methoden ist, dass in der Regel eine komplexe, streng kontrollierte Reaktionsführung unter Ausschluss von Wasser und Luft notwendig ist. Die eben vorgestellte Reaktionsführung von SAMBHY [165] (Abbildung 2.31) wurde im Rahmen dieser Arbeit dahingehend modifiziert, dass die Silanisierung und die Alkylierung unter Luftatmosphäre durchgeführt werden konnten und die Anbindung des silanmodifizierten Polymers im Anschluss mittels Spin Coating erfolgte. Das nach beiden Methoden angebundene Polymer soll idealerweise eine langlebige antibakterielle und antiadhäsive Wirkung aufrechterhalten und so einer Biofilmformation entgegenwirken.

Eine weitere Möglichkeit zur Präparation biozid ausgestatteter Implantate ist zum einen die direkte Einlagerung des entsprechenden Polymers in das Implantatmaterial (zum Beispiel Polymercatheter) bei dessen Herstellung. Für die äußere Modifizierung einer Implantatoberfläche bietet sich im Rahmen dieser Arbeit neben kovalenter Anbindung die Herstellung einer Beschichtung auf der Basis eines Silica-Polymer-Hybridmaterials an, wobei das antibakterielle Polymer (und weitere Additive) in eine Silicamatrix eingebettet wird (siehe Abbildung 2.32). Verfahren ausgehend von der Sol-Gel-Chemie bieten bereits etablierte Verfahren zur

Herstellung anorganisch-organischer Hybridmaterialien, (Nano)-Komposite, Nanopartikel sowie Beschichtungen und Fasern [171-173].

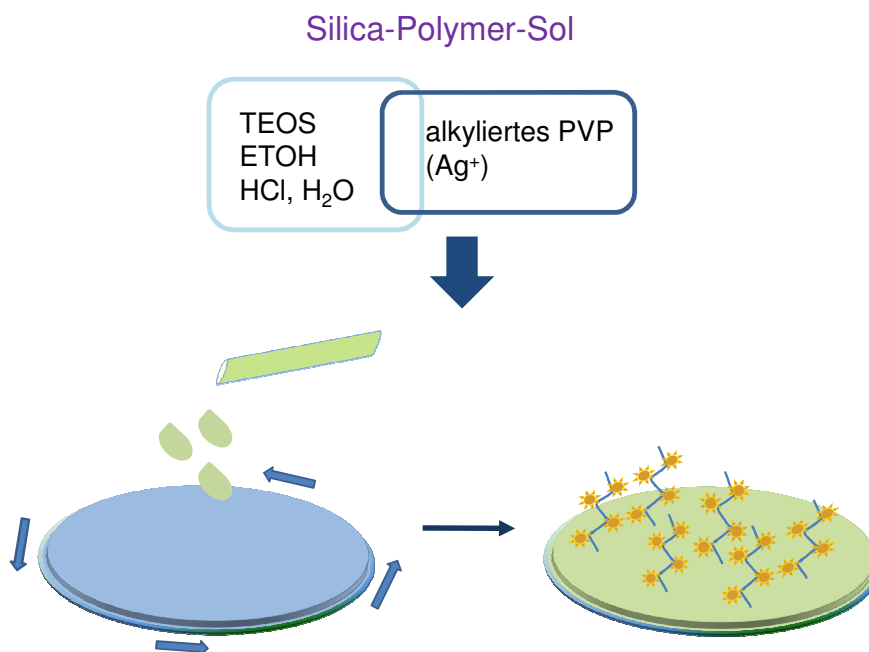


Abbildung 2.32: Schema zur Präparation polymerhaltiger Silicafilme mit Hilfe des Spin Coating. Das Polymer (PVP) wird vorher separat alkyliert und in einem Silicasol gelöst. Zusätzlich können Additive wie Ag⁺ oder nanoskaliges Silber in das Silica-Hybridmaterial eingearbeitet werden.

Der Vorteil von Sol-Gel-Synthesen ist die gute Verfügbarkeit von Alkoxiden (TEOS, TMOS) als Precursoren, die nach der Hydrolyse ein oxidisches Netzwerk bilden. Davon ausgehend können zwei Klassen von Hybridmaterialien erhalten werden [174, 175]. Zum einen Materialien, die eingebettete organische Moleküle, polymerisierbare Monomere oder auch Polymere im oxidischen Netzwerk enthalten und während der Kondensation der anorganischen Phase entstehen. Dabei liegen nur schwache Bindungen zwischen den beiden Phasen vor. Im anderen Fall bestehen kovalente Bindungen zwischen der anorganischen und organischen Komponente. Unter den in der Regel milden Reaktionsbedingungen können leicht Alkoxysilane in das oxidische Netzwerk inkorporiert werden, die polymerisierbare Gruppen (Epoxy-, Vinyl-, Methacryloxygruppen) tragen können. Eine weitere Modifizierung kann dann zum Beispiel durch photochemisch induzierte Polymerisationsreaktionen (*cross-linking*) eingebracht werden.

2.2.6 Geordnete mesoporöse Materialien

Die Entwicklung poröser Materialien ist bereits seit Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Die Einsatzgebiete solcher Materialien, die generell eine große spezifische Oberfläche und eine enge Porenweitenverteilung aufweisen, sind vielseitig, ihre Forschung ist daher sehr attraktiv. Bedeutende Anwendungsgebiete für poröse Materialien sind zum Beispiel im Bereich Adsorption, Katalyse und Gasspeicherung angesiedelt. Die Entwicklung einer neuen Klasse periodisch mesoporöser Silicas, M41S genannt, durch die Mobil Oil Company im Jahre 1992 wies der Forschung einen neuen Ansatz, mesoporöse Festkörper mit Porendurchmessern im Bereich von 2 – 50 nm zu erhalten [90,91]. Charakteristisch für diese Materialien ist, dass auf Grund der Porengröße und der amorphen silicatischen Wände zwischen den Poren in der Röntgen-Beugung nur im unteren 2θ -Bereich Reflexe erhalten werden. Typische Vertreter dieser Klasse sind Materialien wie MCM-41 (hexagonal), MCM-48 (kubisch) sowie MCM-50 (lamellar). In Abbildung 2.33 sind die Strukturen dieser Materialien schematisch dargestellt.

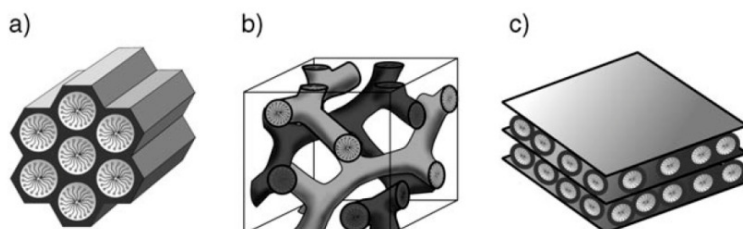


Abbildung 2.33: Beispiele für Strukturen mesoporöser Materialien, a) MCM-41 (zweidimensional-hexagonal), b) MCM-48 (kubisch), c) MCM-50 (lamellar). Entnommen aus Lit. [176].

Die Neuheit bei der Präparation der mesoporösen Substanzen war die Einstellung der Porenweite bzw. der Porenanordnung mit Hilfe supramolekularer Aggregate, bestehend aus amphiphilen ionischen Tensidmolekülen, als strukturdirigierende Agentien (SDAs). Dabei wird die Selbstorganisation von Tensiden in wässrigen Lösungen ausgenutzt. Die hydrophoben Reste der Tenside können vom Wasser abgeschirmt werden, indem Micellen in Form von Kugeln, Stäbchen oder Lamellen gebildet werden. Bei ausreichender Konzentration des Tensids kommt es zur Ausbildung höherer Strukturen, wobei die Micellen als Bausteine dienen. In diesen

lyotropen Phasen kommt zur Ausbildung von Packungen, wobei die Micellen hexagonal oder kubisch angeordnet sein können. In Abbildung 2.34 ist der SDA-Mechanismus zur Bildung mesoporöser Materialien dargestellt.

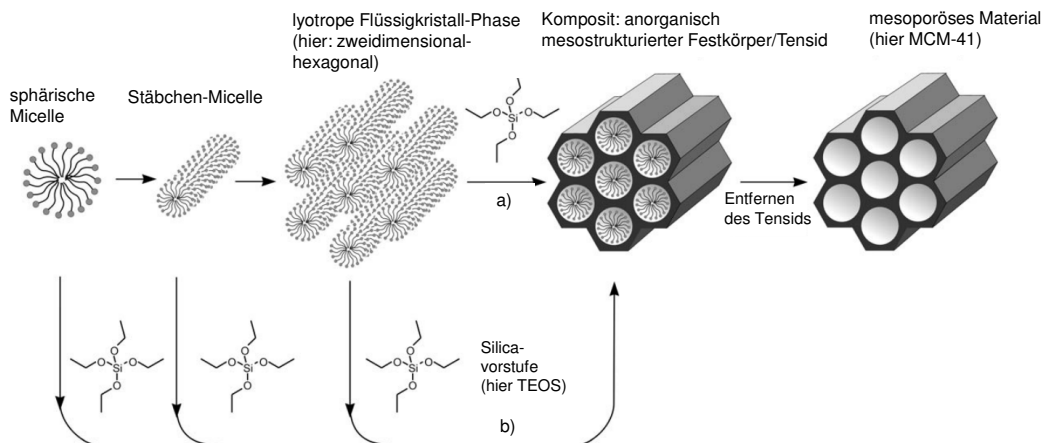


Abbildung 2.34: Bildung mesoporöser Materialien durch strukturdirigierende Agentien (SDA) am Beispiel von MCM-41; a) echter Flüssigkristall-Templat-Mechanismus, b) kooperativer Flüssigkristall-Templat-Mechanismus. Entnommen aus Lit. [176].

Dabei wird zwischen zwei Mechanismen unterschieden, der echte Flüssigkristall-Templat-Mechanismus geht unter der Voraussetzung einer hohen Tensidkonzentration vom Modell der lyotropen flüssigkristallinen Phase aus (Abbildung 2.34 a). Nach dieser Vorstellung stellt die Mesophase das Kristallisationsgerüst. In den wässrigen Zwischenräumen dieses Gerüsts kondensieren die silicatischen Komponenten.

Bei geringen Tensidkonzentrationen ist der kooperative Flüssig-Kristall-Mechanismus wahrscheinlicher, da die Konzentration an Tensid zu gering ist, um eine konzentrationsinduzierte lyotrope Phase auszubilden (Abbildung 2.34 b). Die zugesetzte anorganische Spezies erhöht in diesem Fall die selbstorganisierenden Eigenschaften des SDAs und es kommt so dennoch zur Ausbildung einer lyotropen Phase. Das mesopore Endprodukt kann schließlich durch Extraktion oder Calcination, wodurch das SDA entfernt wird, erhalten werden.

2.2.6.1 Präparation dünner Silicafilme: EISA-Mechanismus

Die Ausstattung des Basismaterials der Mittelohrprothese mit einem mesoporösen Film bietet vor allem Zugang zu zahlreichen Möglichkeiten der chemischen Modifizierung. Eine praktische und schnelle Methode ist die Herstellung der Filme nach dem von BRINKER vorgeschlagenen EISA-Prozess (*evaporation-induced self-assembly process*) [177]. Dieser beruht analog zu Abschnitt 2.2.6.1 auf Selbstorganisationsprozessen amphiphiler, langkettiger Tenside mit vorkondensierten Silicaspezies, die in diesem Fall durch die Verdampfung des Lösungsmittels ausgelöst und beeinflusst werden. Die Herstellung der Filme kann mittels Dip Coating oder Spin Coating erfolgen (Abschnitt 3.6 und 3.7). Im Synthesegel aus Ethanol, Wasser und einem löslichen Silicaprecursor liegt die SDA-Konzentration unterhalb der kritischen Micellenkonzentration (*cmc*), somit liegen freie Tensidmoleküle in der Lösung vor. Beim Herausziehen des Trägermaterials aus der Lösung während des Dip Coating-Prozesses verdunstet das Lösemittel, wobei die *cmc* erreicht wird und es zur durch Selbstorganisation der Tensidmoleküle zur Ausbildung von Micellen in der Lösung kommt. Die weitere Verdunstung des Lösemittels durch Herausziehen des Trägers und dessen Trocknung führt zu einem organisierten Film. Diese Vorgänge sind schematisch in Abbildung 2.35 dargestellt.

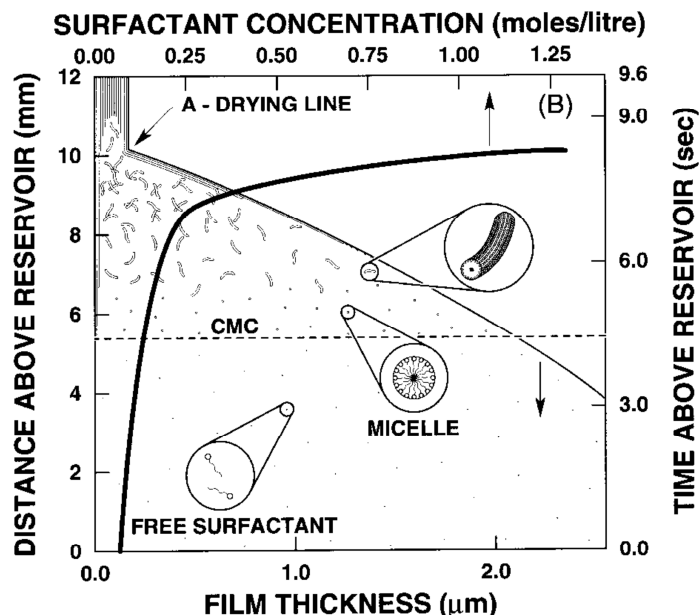


Abbildung 2.35: Verschiedene Stadien beim Dip Coating-/ Spin Coating-Prozess einer komplexen Flüssigkeit aus Silica-Sol, Tensid, Alkohol und Wasser. Entnommen aus Lit. [177].

Ein vergleichbarer Prozess läuft auch beim Spin Coating ab. Hier verdunstet bereits beim Abschleudern des Synthesegelüberschusses ein großer Teil des Lösungsmittels, wobei es zu selbstorganisierenden Effekten der Tensidmoleküle kommt. Eine vorschnelle Kondensation der anorganischen Phase wird durch die Einstellung der Syntheselösung am isoelektrischen Punkt von kolloidalem Silica verhindert.

Die Wahl des SDAs, der Temperatur, die Luftfeuchtigkeit und die Einstellung der Verdampfungsrate sowie die Ziehgeschwindigkeit (beim Dip Coating-Prozess) bzw. die Rotationsgeschwindigkeit (beim Spin Coating-Verfahren) beeinflussen wesentlich das Entstehen einer bestimmten Mesostruktur sowie die Schichtdicke.

3 Analytischer Teil

In diesem Kapitel werden die für diese Arbeit verwendeten analytischen Methoden und Geräte erläutert. Hier soll lediglich auf die Grundlagen der einzelnen Methoden eingegangen werden. Die genaue Handhabung einiger Geräte sowie die Durchführung der Messungen werden in Kapitel 4 beschrieben.

3.1 Molybdat-Methode

Mit der Molybdat-Methode kann die Konzentration der Monokieselsäure bestimmt und damit die Kinetik der Kieselsäurekondensation untersucht werden. Das Prinzip beruht auf zeitabhängigen Messungen, wodurch ein Konzentrations-Zeit-Diagramm erhalten wird. Dieses kann dann für kinetische Untersuchungen herangezogen werden. Die hier eingesetzte Molybdat-Methode wurde 1953 von ALEXANDER vorgestellt und ist zum Nachweis von Kieselsäure in wässriger Lösung bestimmt [178]. Für die praktische Durchführung wird zunächst eine schwefelsaure Ammoniumheptamolybdatlösung hergestellt. Der pH-Wert der erhaltenen Lösung beträgt ungefähr 1. In saurer Lösung entsteht unter Kondensation des Heptamolybdations, welches aus sieben kantenverknüpften Molybdatoktaedern besteht, das Dodecamolybdation mit KEGGIN-Struktur (siehe Abbildung 3.1).

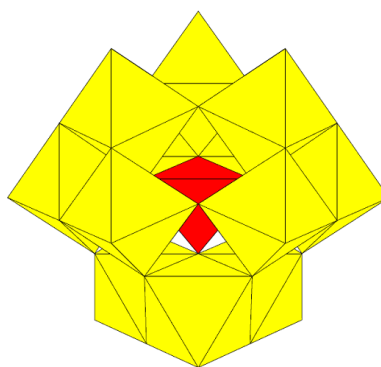


Abbildung 3.1: Struktur des KEGGIN-Ions, aus Lit. [96]. Ein von vier Sauerstoffatomen koordiniertes Heteroatom ist von zwölf Molybdat-Oktaedern umgeben.

Die KEGGIN-Struktur entsteht aus jeweils drei kantenverknüpften Oktaedern, die insgesamt vier eckenverknüpfte Gruppen bilden. Diese Struktur weist in der Mitte

einen Hohlraum auf, der tetraedrisch von Sauerstoffatomen koordiniert ist. Das Isopolyanion weist zwei Hydroniumionen im Hohlraum auf [179]. In diesen Hohlraum wird in kieselsäurehaltiger Lösung Monokieselsäure eingelagert, wobei die Struktur eines Heteropolyanions gebildet wird. Bei diesem Heteropolyanion handelt es sich um einen Silicomolybdat-Komplex, der Licht der Wellenlänge um 400 nm absorbiert. Die Lösung ist intensiv gelb gefärbt. Die Konzentration der Kieselsäure kann zuverlässig bestimmt werden, wenn ein großer Überschuss an Molybdat vorliegt, so dass die Konzentration des Silicomolybdat-Komplexes nur von der Kieselsäurekonzentration abhängig ist.

Mit Hilfe der Molybdat-Methode kann unter Anwendung des LAMBERT-BEERSchen Gesetzes (Gleichung 3.1) die Kieselsäurekonzentration photometrisch bestimmt werden. Danach ist die Absorption A proportional zur Konzentration c der absorbierenden Spezies. Bei I und I_0 handelt es sich um die gemessene Lichtintensität und die Intensität der Blindprobe. ε_λ steht für den wellenabhängigen Extinktionskoeffizienten und d für die Länge des durchstrahlten Messvolumens.

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad (3.1)$$

Das Messprinzip beruht auf der Tatsache, dass nur ein Monokieselsäuremolekül in den Hohlraum des Dodecamolybdations eingelagert werden kann. Bei Zugabe von kondensierter Kieselsäurespezies zur Molybdatlösung sollte daher keine Reaktion zum Silicomolybdat-Komplex eintreten. Allerdings befinden sich oligomere und polymere Kieselsäuren im Gleichgewicht mit monomerer Kieselsäure, so dass durch Entzug der monomeren Spezies aus der Lösung in Folge der Reaktion zum gelben Komplex, die höher kondensierten Kieselsäuren verstärkt zerlegt werden. Dies führt zur Verlagerung des Kondensationsgleichgewichts der Kieselsäure zugunsten des Monomers. Die Gleichgewichtseinstellung zwischen Monomer und Dimer verläuft recht schnell, wohingegen die Rückreaktion des Trimers oder höher kondensierten Spezies deutlich langsamer verläuft. Wegen der schnellen Rückreaktion des Dimers zur monomeren Kieselsäure können diese beiden Spezies durch die Molybdat-Methode nicht getrennt voneinander betrachtet werden [180-182]. Eine längere Reaktionszeit bewirkt jedoch, dass auch höhere Spezies eine Rückreaktion zum Monomer eingehen und den Farbkomplex bilden. Daraus folgt ein stetiger Absorptionsanstieg, der eine höhere Konzentration an Monokieselsäure vortäuscht.

Um richtige Ergebnisse zu erzielen, ist es daher notwendig die Messung der Absorption an einem definierten Zeitpunkt vorzunehmen, an dem die Absorption nur noch langsam ansteigt. In dieser Arbeit wurde bei den Messungen das von ALEXANDER vorgeschlagene Zeitintervall von zehn Minuten eingehalten [178,183,184]. Diesem Vorgehen folgend zeigen Untersuchungen von JAHNS, dass vollständig molybdatreaktive Kieselsäurespezies nicht mehr als 30 Siliciumatome enthalten [96]. Die praktische Durchführung der Messungen ist in Abbildung 4.8 dargestellt.

Für die kinetischen Messungen wurde ein UVmini-1240 UV-Vis-Photometer von der Firma SHIMADZU verwendet. Dieses Einstrahlphotometer weist einen Wellenlängenbereich von 190 bis 1100 nm auf. Als Lichtquellen dienen eine 20-W-Halogenlampe sowie eine Deuteriumlampe. Bei dem Monochromator handelt es sich um ein aberrationskorrigiertes, holographisches Gitter. Für die Detektion wird eine Silicium-Photodiode eingesetzt.

Während der kinetischen Messungen ist eine mehrmalige Überprüfung des pH-Wertes der Reaktionslösung erforderlich. Hierfür wird ein pH-Meter 765 Calimatic von KNICK benutzt. Bei der pH-Elektrode handelt es sich um eine Blueline 18 pH von SCHOTT.

3.2 Dynamische Lichtstreuung

Mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung ist es möglich, den hydrodynamischen Radius von dispergierten Partikeln in Lösung zu bestimmen. Dieser erfasst auch die Solvathülle, die das zu untersuchende Partikel umgibt. Bei geladenen Partikeln ist damit auch die Ionen-Doppelschicht bzw. die NERNST- und HELMHOLTZ-Schicht miteinbezogen. Es wird also von einem sphärischen Partikel ausgegangen, das sich im untersuchten Medium mit der gleichen Geschwindigkeit bewegt wie das zu messende Teilchen.

Das Messprinzip der Dynamischen Lichtstreuung macht sich die BROWNSche Molekularbewegung von Teilchen in Lösung zunutze. Die Teilchen sind demnach in ständiger Bewegung, wobei kleine Partikel sich weit schneller bewegen als größere Partikel. Durch die Molekularbewegung kommt es ständig zu Fluktuationen der

gemessenen Streuintensitäten. Diese Unterschiede in der Stärke der Messsignale werden mit Hilfe einer Korrelationskurve bestimmt. Aus dem Verlauf der Korrelationskurve kann dann die Größenverteilung der Teilchen mit Hilfe bestimmter Algorithmen berechnet werden [185].

Für Messungen der Dynamischen Lichtstreuung wurde ein Zetasizer Nano ZS der Firma MALVERN Instruments verwendet. Für die Filtration der Lösungen wurden Spritzenfilter Puradisc 25 TF mit einer Membran aus Polytetrafluorethylen (PTFE) und 0.45 µm Porendurchmesser der Firma WHATMAN benutzt. Die Messungen erfolgten in Polystyrol-Küvetten der Firma SARSTEDT. Des Weiteren wurden für das Aufziehen der Lösungen PP-Spritzen verwendet.

3.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) ist eine Methode, um Oberflächen bzw. räumlich strukturierte Festkörper zu untersuchen. Sie bietet viele Vorteile gegenüber der Lichtmikroskopie, da eine um vielfach bessere Auflösung und außerdem auch eine wesentlich bessere Tiefenschärfe der Abbildungen erreicht wird. Beim Rasterelektronenmikroskop werden anstelle von Licht Elektronen sowie elektrische Spulen anstelle von Linsen verwendet, um Abbildungen zu erhalten. Die Proben werden mit Hilfe eines gebündelten Elektronenstrahls punktuell abgerastert. Die von den Elektronen erfassten Atome werden dazu angeregt, Sekundärelektronen abzugeben, die dann detektiert und in ein Bild umgewandelt werden. Für die REM wird eine stabförmige Wolframkathode mit einer sehr dünnen Spitze (100 nm oder weniger) verwendet.

Die REM-Aufnahmen wurden mit dem JSM-6700F der Firma JEOL angefertigt. Die Probe wurde hierfür auf ein leitfähiges Graphit-Pad aufgebracht, das auf einem Messingträger befestigt wurde. Der Arbeitsabstand betrug 8 mm, die Beschleunigungsspannung 2 kV. Die Aufnahmen wurden von Frau Dr. BRITTA HERING erstellt.

3.4 Simultane Thermoanalyse

Bei der Simultanen Thermoanalyse wird die Masse einer Probe in Abhängigkeit der Temperatur untersucht. Durch die Temperaturerhöhung bis 1000 °C kommt es zu Zersetzungs- und Oxidationsreaktionen sowie Verdampfung und Sublimation in der Probe. Dadurch tritt ein Massenverlust auf, der als Kurve aufgezeichnet wird. Aus dieser Änderung der Masse können Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Probe und deren thermische Stabilität gezogen werden. Ferner wird die Differentialthermoanalyse (DTA) durchgeführt, um exotherme und endotherme Prozesse beim Aufheizen der Probe zu verfolgen. Die gemeinsame Durchführung beider Methoden bezeichnet man als simultane Thermoanalyse.

Für die Messungen wurde ein Gerät vom Typ Simultaneous Thermal Analyser 429 von NETZSCH verwendet. Als Probengefäße dienten Korundtiegel. Zur Auswertung der erhaltenen Daten wurde die Software Proteus Thermal Analysis 4.3.1 verwendet.

3.5 Kontaktwinkel

Durch die Messung des Kontaktwinkels lassen sich die Benetzungseigenschaften einer Festkörperoberfläche mit einer Flüssigkeit charakterisieren. Ferner können Untersuchungen mittels Kontaktwinkel Informationen zur Oberflächenenergie geben. Dabei wird der Winkel zwischen dem Rand des Tropfens und der Oberfläche als Kontaktwinkel Θ definiert. Die Größe dieses Winkels ist abhängig von der Wechselwirkung zwischen der zu benetzenden Oberfläche und der Flüssigkeit, wobei der Kontaktwinkel mit abnehmender Wechselwirkung größere Werte annimmt. Dies wird durch die YOUNG'sche Gleichung beschrieben (Gleichung 3.2).

$$\cos \Theta = \frac{\sigma_s - \sigma_{LS}}{\sigma_L} . \quad (3.2)$$

Dabei ist σ_s die freie Oberflächenenergie des Festkörpers, σ_{LS} die Grenzflächenenergie zwischen Flüssigkeit und Festkörper und σ_L die Oberflächenspannung der Flüssigkeit. Bei der Verwendung von Wasser als Benetzungsflüssigkeit bezeichnet man bei geringen Kontaktwinkeln um 0° die Oberfläche als hydrophil, bei Winkeln größer als 90° als hydrophob (> 120°: superhydrophob).

Die Kontaktwinkelmessungen wurden mit dem Gerät Surfens universal der Firma OEG, Frankfurt/Oder durchgeführt. Die Messungen wurden jeweils dreifach auf Glasobjektträgern No. 2400 der Firma ELKA, Sondheim vorgenommen.

3.6 Spin Coating

Diese Methode eignet sich hervorragend, um dünne Schichten auf runden Substraten aus Glas, Silicium-Wafern oder Metallen, wie Titan, zu erzeugen. Dabei wird ein bestimmtes Volumen einer Flüssigkeit auf einem rotierenden Substrat aufgebracht und beschleunigt. Die Flüssigkeit, zum Beispiel eine Polymerlösung, wird vorher entweder manuell oder automatisch mittels einer Zutropffunktion möglichst mittig auf das Substrat aufgetragen.

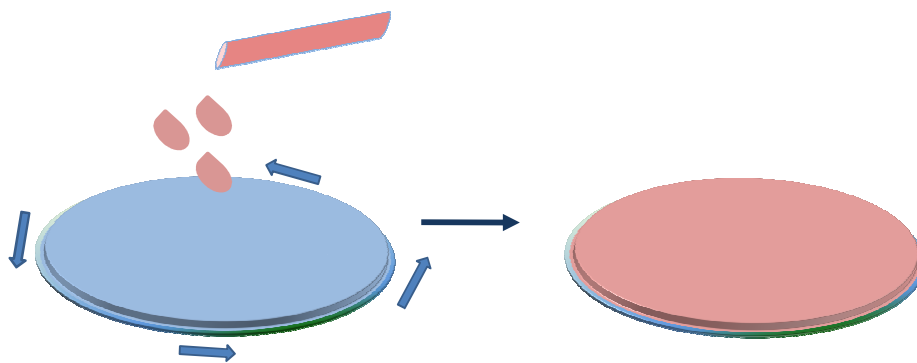


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Prinzips beim Spin Coating. Die aufgebraute Flüssigkeit verteilt sich durch die Rotation des Substrats.

Die bestimmenden Parameter beim Spin Coating-Prozess sind die Viskosität der Lösung, die Winkelgeschwindigkeit und die Rotationszeit. Die durch die Rotationsgeschwindigkeit bedingten Zentrifugalkräfte sowie die durch das Lösemittel bedingten viskosen Eigenschaften bestimmen den Entstehungsprozess der Filme. Die Filmdicke H ist indirekt proportional zur Rotationsgeschwindigkeit (Gleichung 3.3).

$$H \sim w^{-N} \quad (3.3)$$

Dabei ist w die Rotationsgeschwindigkeit, N ist von der Evaporation des jeweiligen Lösemittels abhängig. Die Schichtdicke der hergestellten Filme kann von einem

Monolayer im Bereich weniger Nanometer bis zu Schichtdicken mehrerer Mikrometer betragen [186,187].

Die Herstellung der Dünnschichten erfolgte auf mit einem WS-400-6NPP-LITE Spin Coater mit automatischer Zutropffunktion der Firma LAURELL. Als Substrate dienten runde Glasplättchen mit einem Durchmesser von 13 mm (MENZEL-Gläser, Thermo Fisher Scientific).

3.7 Dip Coating

Dieses Verfahren wurde zum Beschichten von Glasobjektträgern (No. 2400, ELKA, Sondheim) eingesetzt. Das verwendete Gerät ist ein DC Small Dip Coater von NIMA, Coventry, England. Die Tauchprozedur fand in einer Klimakammer bei konstanter Luftfeuchte von 80 % statt, die mit einer 50 %igen Glucoselösung eingestellt worden war [177,188]. Für die mesoporöse Silicabeschichtung wurden die Objektträger für 30 s eingetaucht und mit einer Geschwindigkeit von 15 mm/min herausgezogen und für 5 min luftgetrocknet. Bei der Herstellung der amorphen Silicafilme wurden die Objektträger mit einer Geschwindigkeit von 25 mm/min herausgezogen bei einer Tauchzeit von 2 min. Nach einer fünfminütigen Vortrocknung wurden bei beiden Verfahren die Objektträger über Nacht bei 60 °C vorgetrocknet und danach bei 415 °C 4 h calciniert (Aufheizrate 1 °C/min).

3.8 Zellviabilität

Die Zellkompatibilität der Proben wurde an NIH3T3-Zellen am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig geprüft. Die Untersuchungen wurden von MUHAMMAD BADAR durchgeführt. Die mit kovalent angebundenem, hexyliertem Poly(4-vinylpyridin) beschichteten Plättchen wurden zunächst in eine 24-Lochplatte überführt und mit 1 mL einer verdünnten NIH3T3-Zellsuspension überschichtet, als Kontrolle dienten unbehandelte Glasplättchen sowie Zellkulturplastik. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Plättchen bei 37 °C. Nach Zeitintervallen von jeweils 24 und 72 h wurden Aufnahmen der Zellen mit einem ZEISS Axio Observer.A1 Mikroskop gemacht.

Des Weiteren wurden im Rahmen der Kooperation mit dem Teilprojekt D8 „*Dentale Implantat-Abutments*“ im SFB 599 *in vitro*-Studien hinsichtlich der Zelladhäsion und

Zellproliferation humaner Gingivafibroblasten auf den mit Poly(4-vinyl-N-hexylpyridiniumbromid) beschichteten Glasproben (runde Glasplättchen) unternommen. Die Untersuchungen wurden an der Prothetischen Zahnklinik der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) von LYSANN RINGENBERG durchgeführt. Für die Anzahl der adhärenen Gingivazellen wurden die mit Polymer beschichteten Glasplättchen gegen unbeschichtetes Glas sowie Zellkulturplastik als Kontrolle an zwei Zeitpunkten untersucht. Hierfür wurde der Lactatdehydrogenase-Test (LDH-Test) herangezogen; die beobachtete Aktivität kann zur Anzahl der lebenden, Stoffwechsel betreibenden Zellen in Korrelation gesetzt werden, denn nur lebende Zellen produzieren diese Substanz. Dazu wurden humane Gingivafibroblasten der Zelllinie HGFib in einer Konzentration von 1.5×10^4 Zellen pro Loch einer 24-Loch-Platte auf die Probekörper sowie Kontrolle ausgesät. Nach 24 und 72 h wurden drei der beschichteten und drei der unbeschichteten Glasplättchen aus den Zellkulturschalen entnommen und mit HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) abgespült. Die anhaftenden Zellen wurden mit 10 %-iger Triton X-100 Lösung (nichtionisches Tensid) terminiert und die Konzentration der Lactatdehydrogenase kolorimetrisch bei 490 nm bestimmt. Parallel dazu erhobene Standardkurven ermöglichten nun die Bestimmung der Zellkonzentration.

3.9 Bakterielle Aktivität

Die Untersuchung der bakteriellen Adhäsion auf den polymerbeschichteten Glasproben gegen Glaskontrollproben erfolgte am Modell zweier Plaque-bildender Keime (*S. sanguinis* als Vertreter der Initialbesiedler und *S. mutans* als frühen Folgebesiedler). Diese Untersuchungen wurden innerhalb der Kooperation mit der Prothetischen Zahnklinik der MHH von LYSANN RINGENBERG durchgeführt. Die jeweilige Bakterienart wurde in Tryptic Soy Broth Medium angeimpft und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Probekörper mit *S. mutans* mit einer optischen Dichte (OD) von 1.242 oder mit *S. sanguinis* bei einer OD von 1.193 beschichtet und 1 Stunde unter Rotation bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein sechsmaliges Waschen der Probekörper mit jeweils 1 ml Reinwasser, um nicht adhärenen Keime zu entfernen. Für die Fixierung der Keime auf der Oberfläche, wurden die Proben für 30 Minuten bei 4 °C vollständig mit 2.5 %-iger Glutardialdehydlösung (ROTH) bedeckt. Die Plättchen wurden anschließend mit 1 mL Phosphate buffered saline (BIOCHROM) gewaschen, über Nacht bei 4 °C

gelagert und am folgenden Tag mit 1 %iger Acridine Orange-Lösung (ROTH) für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Die Proben wurden durch sechsmaliges Waschen mit Reinwasser von Farbstoffresten befreit und mit PBS bedeckt. Die Analyse und Dokumentation der adhärenierten Bakterien auf den Beschichtungsarten erfolgte mit dem Confocal Laser Scanning Mikroskop LEICA TCS SP5 bei 40-facher und 63-facher Vergrößerung.

Zusätzlich erfolgten Untersuchungen der beschichteten Proben auf ihre antibakteriellen Eigenschaften anhand eines für das Mittelohr typischen Erregers (*Pseudomonas aeruginosa*) hin. Diese Tests wurden von MUHAMMAD BADAR am HZI in Braunschweig durchgeführt. Dazu wurden die Glasplättchen mit *P. aeruginosa* (PA14-Wildstamm) bei 25 °C für 30 Minuten in Lysogeny Broth (LB) inkubiert, mit destilliertem Wasser gewaschen und mit dem Live/Dead Backlight Bacterial Viability Kit L13152 (INVITROGEN) der Herstelleranweisungen entsprechend angefärbt. Während die lebenden Bakterien grün angefärbt werden, nehmen abgetötete Bakterien eine rote Farbe an und können so voneinander unterschieden werden. Die Plättchen werden dann mit einem ZEISS Axio ObserverA.1 Fluoreszenzmikroskop nach lebenden und abgetöteten Bakterien bei 400-facher Vergrößerung untersucht.

4 Experimenteller Teil

Dieses Kapitel dient zur Erläuterung der Durchführung der praktischen Arbeiten und Messungen. Die Pipettierarbeiten im ersten Teil der Arbeit werden bei allen Versuchen auf gleiche Weise durchgeführt, so dass eine gute Vergleichbarkeit der Experimente gewährleistet ist. Dabei wird für Volumina bis 500 μL eine Eppendorf research 20-200 μL -Pipette verwendet, Volumina von 0.5 bis 1 mL wurden mit einer Eppendorf research 100-1000 μL -Pipette abgemessen. Für Volumina ab einem Milliliter wird eine Transferpette S 100 -1000 μL von BRAND benutzt. Die für die verschiedenen Reaktionen und Reaktionssysteme benötigten Lösungen werden grundsätzlich mit Reinstwasser angesetzt.

Die verwendeten Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Eine Liste aller verwendeten Substanzen befindet sich im Anhang.

4.1 Synthese und Charakterisierung der Additive

Die in Abbildung 4.1 dargestellten Additive wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die Kieselsäurekondensation untersucht. Die längste Polyaminkette beträgt hierbei acht Polypropylenimineinheiten beim PPI_8 , die kürzeste vier Einheiten im Falle des unmethylierten und methylierten Spermins, welches somit PPI_4 bzw. PMPI_4 entspricht. Die beiden Varianten des Hexaazadocosans HAD/MHAD entsprechen hier analog PPI_6 bzw. PMPI_6 . Bei den hier aufgeführten Substanzen handelt es sich um lineare Polyamine mit unterschiedlichem Polymerisationsgrad P_n . Während die von Spermin ausgehend synthetisierten Substanzen durch bekannte Polymerisationsreaktionen nicht mehr zugänglich sind, wurde das langkettigere PPI_8 von Frauke Cornelius [24] aus der Arbeitsgruppe MENZEL der Technischen Universität Braunschweig synthetisiert und für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

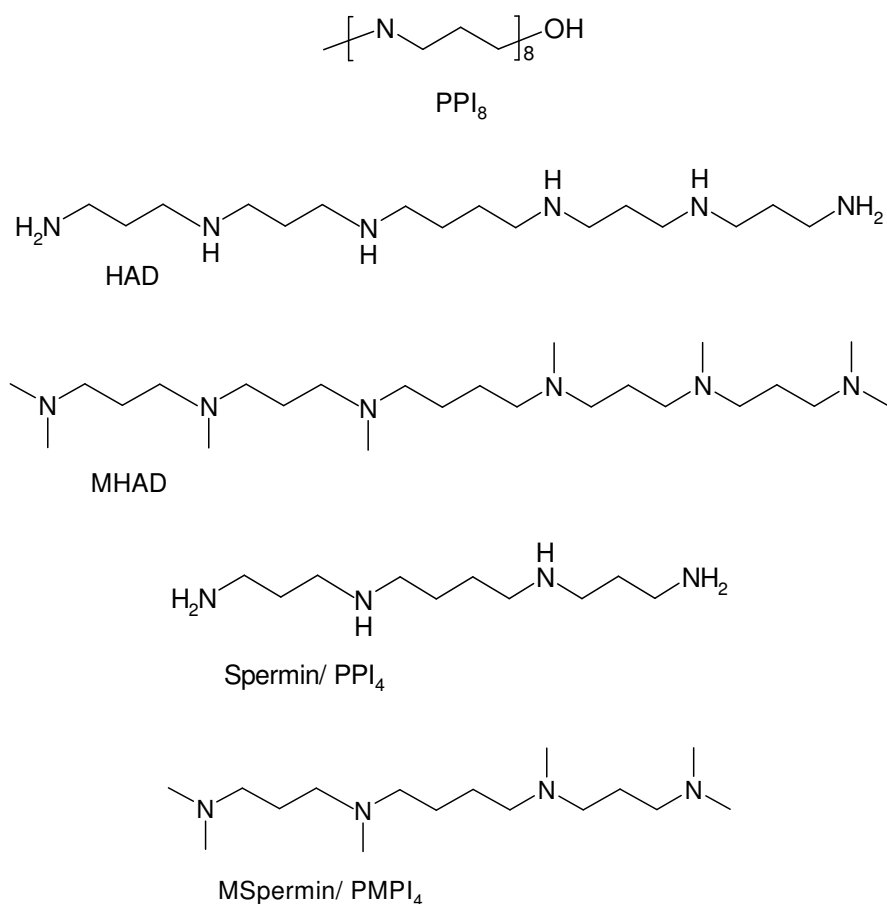


Abbildung 4.1: Im Hinblick auf ihren Einfluss auf die Kieselsäurekondensation untersuchte Polyamine, von oben nach unten nach absteigender Anzahl von Polypropyleniminingruppen angeordnet: PPI₈, HAD, MHAD, Spermin sowie die methylierte Variante MSpermin.

Prinzipiell wird für die Darstellung linearer Polyamine mit einer Mindestlänge von acht Propylenimineinheiten die kationische ringöffnende Polymerisationsreaktion angewendet [189-191]. Der Syntheseweg ist schematisch in Abbildung 4.2 dargestellt. Diese Art der Reaktionsführung ermöglicht eine relativ genaue Einstellung des Polymerisationsgrades in einer engen Verteilung. So entspricht der angegebene Grad der Polymerisation stets dem Verteilungsmaximum.

Insgesamt war es bei den Untersuchungen von besonderem Interesse, eine Mindestlänge der Polyaminketten festzustellen, die für die Aktivität und die Wechselwirkungen der Polyamine mit Kieselsäure entscheidend sein könnte.

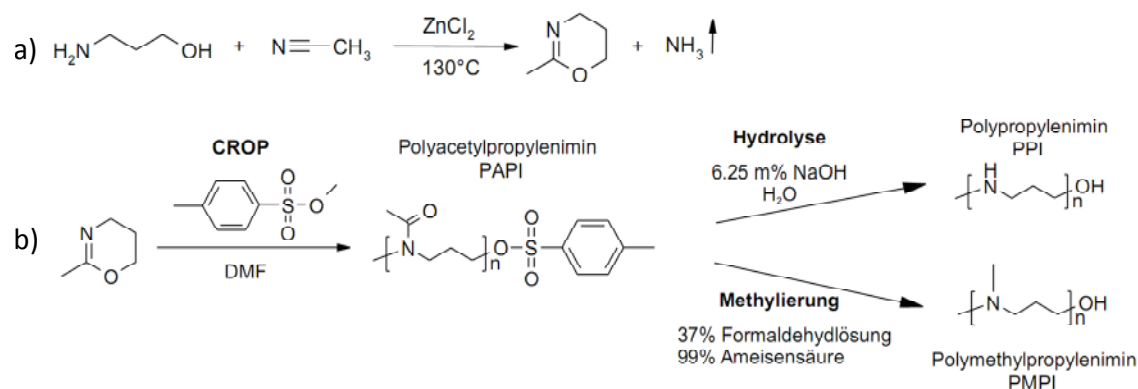


Abbildung 4.2: Schema zur Darstellung linearer Polyamine nach CORNELIUS [24], aus Lit. [96].
a) Synthese der Vorstufe; b) Synthese von PPI und PMPI durch CROP (cationic ring-opening polymerization).

4.1.1 Darstellung des Hexaazadocosans

Das Polyamin Hexaazadocosan wird in Anlehnung zu der Vorschrift von ILKA KRUEGER gemäß der nachfolgenden Abbildung 4.3 aus dem käuflich erhältlichen Vorläufer Spermin (**2**) synthetisiert [192].

Hierzu wird das kurzkettige Amin in mehreren Stufen nach einer Vorschrift von DIETRICH et al. um zwei Propylimingruppen verlängert [193], wobei zunächst die vorliegenden Aminogruppen nach der Beschreibung von BERGERON et al. mit Tosylschutzgruppen versehen werden [194]. Dies ermöglicht nun die selektive Verlängerung der Aminkette an den beiden primären Aminogruppen zum Dinitril (**4**) durch MICHAEL-Kondensation. Dieses wird im Anschluss in einer Reaktion mit Boran in THF reduziert und erneut mit Tosylschutzgruppen versehen. Im letzten Schritt werden dann in einer Reaktion mit Bromwasserstoffsäure in Eisessig mit Hilfe von Phenol die Schutzgruppen entfernt, wobei ein Hydrobromid erhalten wird. Um das freie Hexaazadocosan zu erhalten, wird dieses über eine basische Anionentauschersäule gegeben.

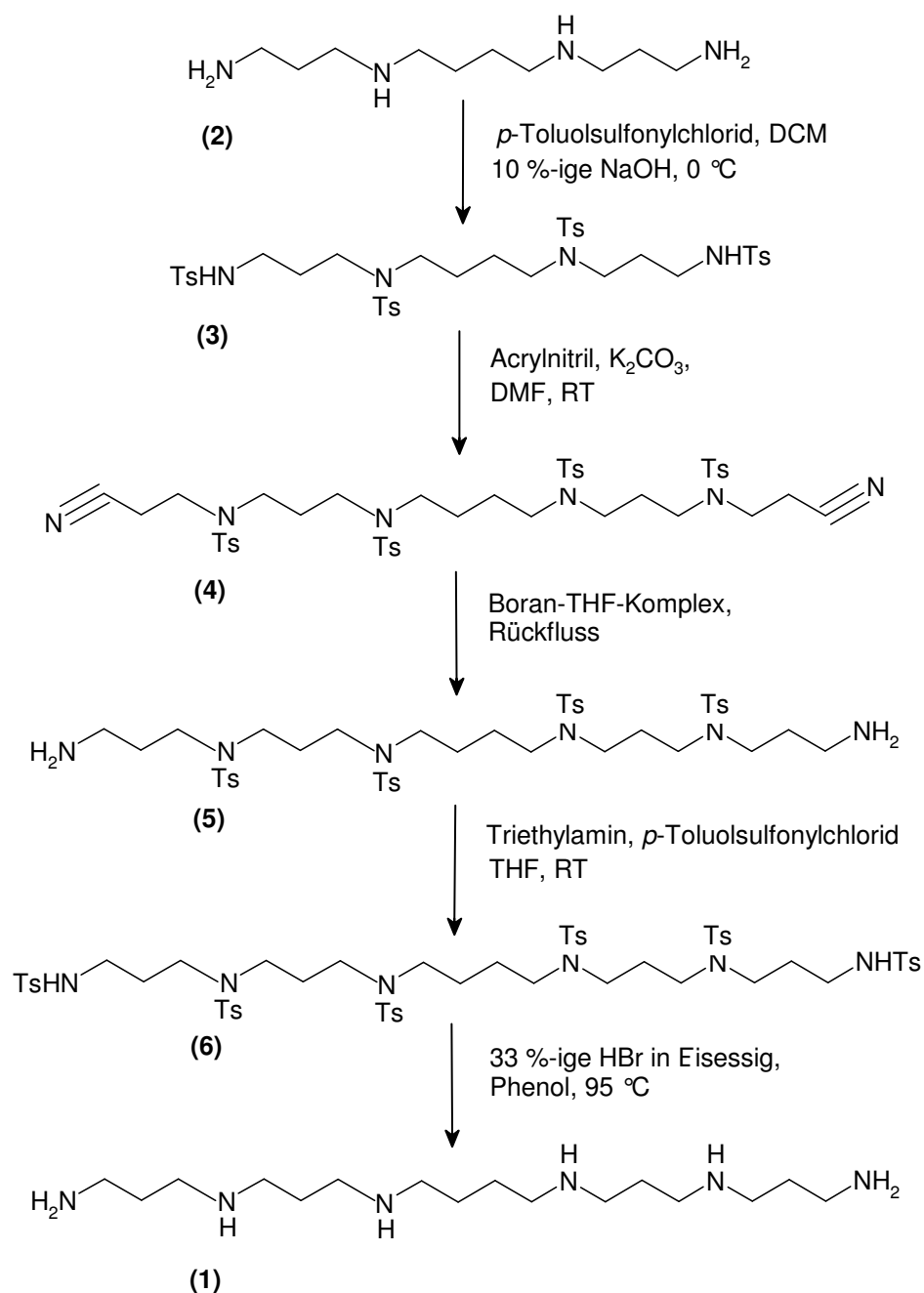


Abbildung 4.3: Schema zur Darstellung des Hexaazadocosans (1).

4.1.2 Darstellung von N^1, N^4, N^9, N^{12} -Tetratosylspermin (3)

5.26 g Spermin (2) (26.0 mmol) werden in 400 mL 10 %-iger NaOH-Lösung und 7.7 mL 37 %-iger HCl gelöst. Das Gemisch wird auf 0 °C heruntergekühlt, danach wird über 90 min eine Lösung aus 19.96 g p -Toluolsulfonylchlorid (104.6 mmol, 4 Äq.) in 400 mL Dichlormethan (DCM) hinzutropft. Die Reaktionslösung wird dann weitere 2 h gut gekühlt, danach noch 37 h bei RT gerührt. Nach Ende der Reaktionszeit werden die Phasen getrennt, die wässrige Phase wird zwei Mal mit je

40 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden nacheinander mit jeweils 200 mL (0.5 N) HCl, 200 mL Millipore Wasser und 200 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach der Trocknung über Natriumsulfat und der Entfernung des Lösemittels können 13.4 g eines farblosen kristallinen Produkts gewonnen werden, was einer Ausbeute von 63 % entspricht.

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 : δ 1.5-1.7 ppm (m, 8 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.4 ppm (s, 12 H, CH_3); 3.1 ppm (m, 12 H, $\text{CH}_2\text{-NTs}$); 5.3 ppm (t, 2 H, H-NTs); 7.3 ppm (m, 8 H, arom.); 7.7 ppm (m, 8 H, arom.)

4.1.3 Darstellung des Dinitrils (4)

6.5 g Tetratosylspermin (**3**) (7.98 mmol) werden unter Argonschutzgas in 90.5 mL Dimethylformamid (DMF) gelöst. Nach der Zugabe von 7.72 g Kaliumcarbonat (55.92 mmol; 7 Äq.) werden mit Hilfe einer Spritze in einem Zeitraum von 40 min 1.64 mL Acrylnitril (1.32 g; 24.74 mmol; 3.1 Äq.) in 9 mL DMF zum Reaktionsgemisch getropft. Während dieser Prozedur färbt sich die Lösung unter Schaumbildung leicht bräunlich gelb. Im Anschluss an die Zugabe wird das Reaktionsgemisch noch weitere 2.5 Tage bei RT gerührt, wobei es eine dunkelbraune Farbe annimmt. Nach der Entfernung des Lösemittels wird der Rückstand mit 150 mL DCM aufgenommen und nachfolgend mit jeweils 150 mL Millipore-Wasser, 150 mL (2 N) HCl sowie 150 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel abdestilliert, wobei 4.1 g (4.58 mmol) dunkelbraunes, pastöses Produkt mit einer Ausbeute von 57 % erhalten wird.

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 : δ 1.7 und 1.9 ppm (m, 12 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.4 ppm (s, 12 H, CH_3); 2.8 ppm (t, 4 H, $\text{CH}_2\text{-CN}$); 3.1 ppm und 3.3 ppm (m, 16 $\text{CH}_2\text{-NTs}$); 7.3 ppm (m, 8 H, arom.); 7.6 ppm (m, 8 H, arom.)

4.1.4 Darstellung des Diamins (5)

4.1 g des Dinitrils (**4**) (4.43 mmol) werden unter Argon mit 59 mL (1M) Diboran in Tetrahydrofuran (THF) (60.18 mmol; 13.6 Äq.) versetzt und 15 h unter Rückfluss erhitzt. Bei 5 °C Reaktionstemperatur werden nacheinander 29.5 mL THF sowie vorsichtig 29.5 mL Millipore-Wasser zugegeben. Das Gemisch wird 20 min gerührt, bevor die Lösemittel entfernt werden. Der erhaltene Rückstand wird mit 118 mL (6

N) HCl aufgenommen und weitere 13 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels werden 4.72 g (4.35 mmol) eines gelbbraunen Feststoffs mit einer Ausbeute von 98 % erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 : δ 1.3 ppm (s, 4 H, 2 NH_2); 1.6 ppm und 1.9 ppm (m, 12 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.4 ppm (s, 12 H, CH_3); 2.8 ppm (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 3.1 ppm (m, 16 $\text{CH}_2\text{-NTs}$); 7.3 ppm (m, 8 H, arom.); 7.7 ppm (m, 8 H, arom.)

4.1.5 Darstellung der Hexatosylverbindung (6)

2 g der Tetratosylverbindung (5) (21.58 mmol) werden vorgelegt und unter Argon in 30.3 mL THF gelöst. Unter Kühlung im Wasserbad werden zunächst 1.8 mL Triethylamin, dann 2.84 g *p*-Toluolsulfonylchlorid (14.93 mmol; 6.9 Äq.) gelöst in 10 mL DCM, innerhalb von 30 min zugegeben. Nach Beendigung der Zugabe wird die Reaktion weitere 55 h bei RT gerührt. Die erhaltene gelbliche Suspension wird eingengt und der Rückstand mit 30 mL (2 N) HCl aufgenommen. Die wässrige Phase wird nun zwei Mal mit je 30 mL DCM extrahiert, die vereinigten organischen Phasen danach mit 30 mL Millipore-Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Entfernung der Lösemittel liegen 2.43 g Rohprodukt in Form eines braunen Öls vor. Die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgt über 200 g Kieselgel und DCM mit 1 % Ethanol als Laufmittel. Das Produkt ist ein hellbraunes Öl, welches mit 40 % Ausbeute (1.74 g; 1.4 mmol) vorliegt.

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 : δ 1.6 ppm, 1.7 ppm und 1.8 ppm (m, 12 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.4 ppm (s, 18 H, CH_3); 3.0 ppm und 3.1 ppm (m, 20 H, $\text{CH}_2\text{-NTs}$); 5.4 ppm (t, 2 H, H-NTs); 7.3 ppm (m, 8 H, arom.); 7.6 ppm (m, 8 H, arom.)

4.1.6 Darstellung des *N,N'*-Bis-[3-(3-amino-propylamino)-propyl]-butan-1,4-diamins (1)

1.5 g der Hexatosylverbindung (6) (1.2 mmol) sowie 1.13 g Phenol (12 mmol; 10 Äq.) werden in 80.3 mL 33 %-iger Bromwasserstoffsäure in Eisessig gelöst und die Reaktionslösung anschließend vorsichtig auf 95 °C erhitzt. Die Lösung färbt sich schnell orange, danach geht die Farbe in ein dunkles Braun über. Die Reaktionsmischung wird 18 h unter Rückfluss erhitzt, wobei am Ende ein

Niederschlag erhalten wird, welcher abfiltriert und mit Diethylether gewaschen wird. Das Hydrobromid liegt in Form von 1 g eines hellbraunen Feststoffs vor, der in ein wenig Wasser gelöst und mit Hilfe einer Anionentauschersäule in das freie Hexaazadocosan überführt wird (stationäre Phase: DOWEX 1x8, 100-200, mesh, OH-Form). Nach Entfernung des Wassers liegen 381 mg (1.21 mmol) Produkt vor, was einer Ausbeute von 100 % entspricht.

$^1\text{H-NMR}$ in D_2O : δ 1.5 ppm (s, 8 H, NH); 1.6 ppm (m, 12 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.7 ppm (m, 16 H, $\text{CH}_2\text{-N}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ in D_2O : δ 28.83 ppm ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 30.38 ppm ($\text{HN-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$); 34.21 ppm ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$); 40.11 ppm ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$); 48.78 ppm ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$); 48.82-48.88 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$); 49.06 ppm ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$)

4.1.7 Darstellung des *N,N,N',N',4,8,13,17*-Octamethyl-4,8,13,17-tetraaza-eicosan-1,20-diamin (**1a**) (MHAD)

Aus Kieselalgen wurden überwiegend die methylierten Spezies der Polyamine isoliert (65). Deshalb wäre es vor allem interessant, Untersuchungen an der methylierten Variante des Hexaazadocosans durchzuführen. Dazu wird das HAD mit Hilfe der Leuckart-Wallach-Reaktion mit Formaldehyd und Ameisensäure zum MHAD methyliert (siehe Reaktionsschema in Abbildung 4.4). Die Überführung in die freie Aminform erfolgt wieder durch Anionenaustausch. Als alternative Reaktionsführung wäre noch eine Umsetzung mit Methyljodid zu nennen [194].

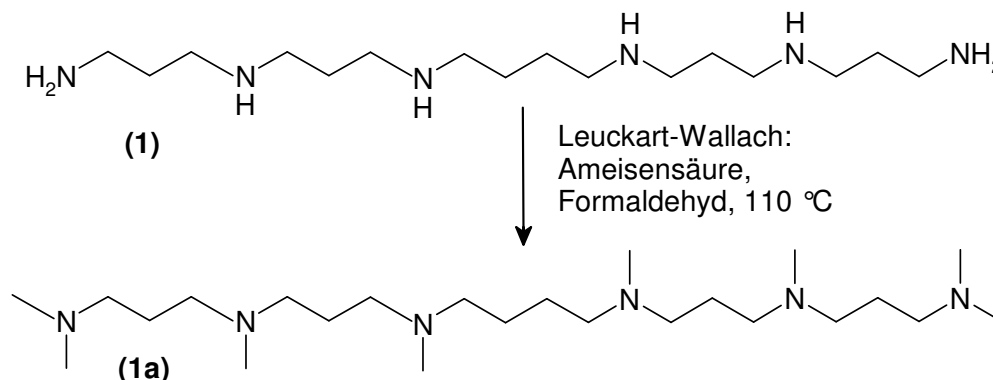


Abbildung 4.4: Synthese von MHAD (**1a**) ausgehend von HAD (**1a**).

190 mg HAD (**1**) (0.6 mmol) werden mit 5 mL (1.58 mmol) 99%-iger Ameisensäure und 2.5 mL (132 mmol) 37%-iger Formaldehydlösung versetzt und 19 h unter Rückfluss erhitzt. Zu der abgekühlten Lösung wurden 2 mL konz. HCl gegeben und schließlich die Lösemittel abdestilliert. Die Aufarbeitung erfolgt über eine Anionentauschersäule mit Wasser als Laufmittel. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird das Produkt in Form eines wachsartigen, hellbraunen Feststoffs mit einer Ausbeute von 48 % erhalten (123 mg, 0.3 mmol).

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 : δ 1.46 ppm (q, 4 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 1.64 ppm (q, 8 H, - $\text{NCH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$); 2.20 - 2.22 ppm (m, 24 H, - NCH_3 , $\text{N}(\text{CH}_3)_2$); 2.23 - 2.36 ppm (m, 20 H, $\text{CH}_2\text{-NCH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NCH}_3$)

4.1.8 Methylierung von Spermin (**2**) zum *N,N,N',N',4,9*-Hexamethyl-4,9-diazadodecan-1,12-diamin (**2a**) (MSpermin)

Mit der Methylierung von Spermin (**2**) ist der Zugang zu einer extrem kurzkettigen Polyaminspezies möglich. Die Umsetzung zur methylierten Variante erfolgt auch hier über die Leuckart-Wallach-Reaktion (siehe Abbildung 4.5). Die Aufarbeitung erfolgt auch hier analog über eine Anionentauschersäule.

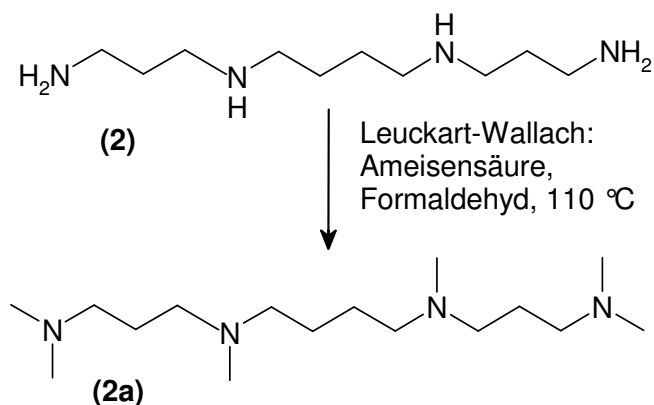


Abbildung 4.5: Darstellung von MSpermin (**2a**) ausgehend von HAD (**2**).

2 g Spermin (9.88 mmol) werden in 20 mL (6.32 mmol) 99 %-iger Ameisensäure sowie 10 mL (528 mmol) 37 %-iger Formaldehydlösung gelöst und unter Rückfluss bei 110 °C 22 h erhitzt. Die abgekühlte tiefbraune Lösung wird vorsichtig mit 8 mL konz. HCl versetzt, nach 15 min werden die Lösemittel abdestilliert. Der braune

Rückstand wird in wenig Wasser gelöst und über eine Anionentauschersäule gegeben. Das Produkt liegt als dunkelbraunes Wachs mit einer Ausbeute von 98 % vor (1.78 g, 6.2 mmol).

$^1\text{H-NMR}$ in D_2O : δ 1.39 ppm (q, 4 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 1.49 ppm (q, 4 H, $\text{NCH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3)_2$); 2.28 – 2.37 (m, 30 H, NCH_3 , $\text{N(CH}_3)_2$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3)_2$)

4.2 Kondensationsreaktionen der Kieselsäure

Zu Beginn der Versuche wird eine Pufferlösung hergestellt. Als Puffersystem dient in dieser Arbeit das System Propionsäure/Propionat, das auf einen pH-Wert von 5.5 eingestellt wurde. Hierfür werden zu 100 mmol der Propionsäure 85 mL (85 mmol) 1 M Natronlauge gegeben. Das Gemisch wird auf einen Liter aufgefüllt. In der Abbildung 4.6 ist ein Schema zur generellen Vorgehensweise bei der Untersuchung der Kondensationsreaktionen gezeigt.

Für den Einsatz in Kondensationsreaktionen werden die Additive aus Abbildung 4.1 in der Pufferlösung gelöst. Zusätzlich werden jeweils Referenzmessungen ohne Additiv durchgeführt. Da die zu untersuchenden Polyamine in der Pufferlösung unterschiedlich gut löslich sind, wurde zur Sicherheit mindestens einen Tag bis zur vollständigen Auflösung gewartet. Die zu untersuchenden Polyamine werden mit der theoretischen Monomerenkonzentration $c_N = 2.3 \text{ mM}$ bzw. mit der Konzentration $c = 132 \text{ mg/L}$ im Falle der Polypropylenimine sowie mit $c = 165 \text{ mg/L}$ im Falle der Methylpropylenimine eingesetzt. Die Molmasse einer Monomereinheit der Polyamine beträgt bei den PPIs $M_N = 57 \text{ g/mol}$, die Konzentration bezogen auf die Masse 0.017 m-%. Im Falle der PMPIs ist $M_N = 71 \text{ g/mol}$, die Konzentration bezogen auf die Masse beträgt hier 0.013 m-%. Die Konzentrationen der eingesetzten Additive sind auch in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Tabelle 4.1: Konzentrationen der verschiedenen eingesetzten Additive. Angegeben sind die Molmasse bezogen auf eine Monomereinheit M_N , die Konzentration c bezogen auf die Masse und die theoretische Monomerenkonzentration c_N .

| Polyamin | Molmasse | Konzentration | | |
|------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | $M_N / \text{g/mol}$ | $c / \text{mg/L}$ | c_N / mM | $c / \text{m-\%}$ |
| PPI ₈ | 57 | 132 | 2.3 | 0.017 |
| PPI ₆ /HAD | 57 | 132 | 2.3 | 0.017 |
| PMPI ₆ /MHAD | 71 | 165 | 2.3 | 0.013 |
| PPI ₄ / Spermin | 57 | 132 | 2.3 | 0.017 |
| PMPI ₄ / MSpermin | 71 | 165 | 2.3 | 0.013 |

Die Versuche werden in Schnappdeckelgläsern durchgeführt, eine Adsorption des Additivs an die Glaswand des Reaktionsgefäßes wird verhindert, indem etwa 16 mL der Additivlösung in das zu benutzende Gläschen gegeben und für drei Stunden zum Benetzen stehen gelassen werden. Danach wird das Glas gründlich mit Reinstwasser abgespült und an der Luft getrocknet. Mit Hilfe dieser Methode sollte eine Passivierung des Glases durch Adsorption des Additivs eintreten.

Nach Trocknung werden 200 μL Salzsäure (0.01 M) in das Schnappdeckelglas gegeben sowie 400 μL TMOS hinzugefügt. Danach erfolgt die Hydrolyse von TMOS für etwa eine Minute. Die so erhaltene Monokieselsäure ist kurzzeitig gegen Kondensation stabil. Nach der Hydrolyse erfolgt die Zugabe von 16 mL Pufferlösung, was mit der gleichzeitigen Anhebung des pH-Wertes den Start der Reaktion auslöst. Das Reaktionsgemisch wird danach noch für eine Minute stark gerührt, bevor weiter gemäß des Reaktionsschemas in Abbildung 4.6 verfahren wird. Die Kieselsäurekonzentration der Reaktionslösung beträgt in allen Fällen 163.5 mM/L.

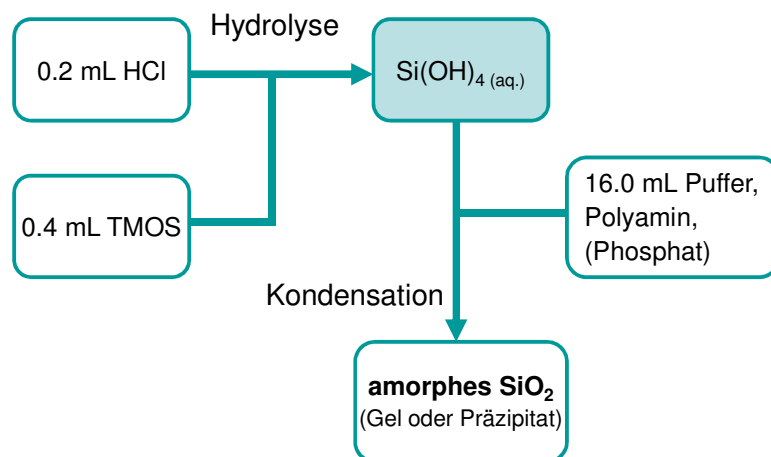


Abbildung 4.6: Genereller Ansatz zur Vorgehensweise bei der Untersuchung der Kondensationsreaktionen, nach Lit. [96].

4.3 Kinetik der Kieselsäurekondensation

4.3.1 Kalibration der Molybdat-Methode

Für die Bestimmung der Kieselsäurekonzentration bei den Kondensationsreaktionen ist zuvor die Kalibration der Molybdat-Methode durchzuführen. Dazu werden verschiedene Lösungen bekannter Standardkonzentrationen an Kieselsäure vermessen. Diese Kalibrationslösungen bestehen aus jeweils 0, 100, 200, 300 und 400 μL TMOS, die mit 0.01 molarer Salzsäure aufgefüllt werden. So wird in den Lösungen ein pH-Wert von 2 eingestellt. Unter diesen Bedingungen läuft die Kondensationsreaktion praktisch kaum ab und die gesamte vorgelegte Kieselsäure kann durch die Molybdat-Methode bestimmt werden. Die Messungen der Konzentrationen werden analog der Beschreibung im Abschnitt über die Molybdat-Methode durchgeführt. Für die Kalibration wurden jeweils drei Messpunkte für jede Konzentration aufgenommen und ein Mittelwert gebildet. Die so erhaltene Kalibrationsgerade mit Geradengleichung ist in Abbildung 4.7 dargestellt.

Dementsprechend liegt im untersuchten Konzentrationsbereich ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Absorption vor. Die Berechnung der Kieselsäurekonzentration kann somit mit den aus der Molybdat-Methode erhaltenen Messwerten anhand der Geradengleichung erfolgen.

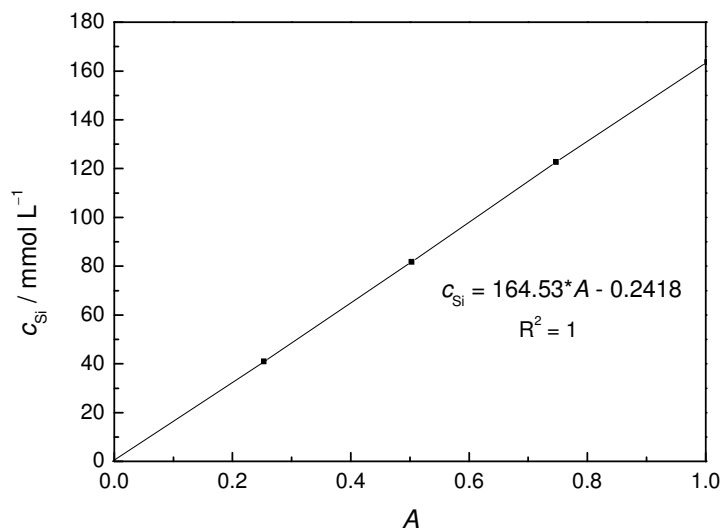


Abbildung 4.7: Kalibrationsgerade zur Bestimmung der Kieselsäurekonzentration mit der Molybdat-Methode.

4.3.2 Durchführung der Messungen

Vor Beginn der Messungen wird die Molybdatlösung hergestellt und in Schnapdeckelgläschen vorgelegt. Diese Lösung setzt sich aus 8 mL Wasser, 0.5 mL Schwefelsäure (1.5 M) und 2 mL Ammoniumheptamolybdatlösung (0.03 M) zusammen.

Die Kondensationsreaktion wird nach der Beschreibung in Abschnitt 4.2 vorbereitet und zur Temperierung auf 25 °C in ein thermostatisiertes Wasserbad gestellt. Für die Messpunkte werden aus der Reaktionslösung in definierten Zeitabständen 100 μL Probe entnommen und in 0.6 mL Wasser verdünnt. Durch die Verdünnung wird die Reaktion in der Probe quasi zum Stillstand gebracht. Die verdünnte Lösung wird gründlich durchmischt. Zuletzt werden dieser Lösung 200 μL entnommen und in ein vorbereitetes Gläschen mit Molybdatlösung gegeben. Nach Verschließen des Gläschens wird die Lösung durch Schütteln gut durchmischt. Gleichzeitig beginnt hiermit das Zeitintervall für die Bildung des Silicomolybdat-Komplexes. Nach genau 10 Minuten wird die Messung der Absorption des Farbkomplexes mit einem UV-Vis-Spektrometer vorgenommen. Die Vorgehensweise bei dieser Methode ist in Abbildung 4.8 gezeigt. Zwecks Reproduzierbarkeit wurden alle Messungen mindestens zweimal durchgeführt.

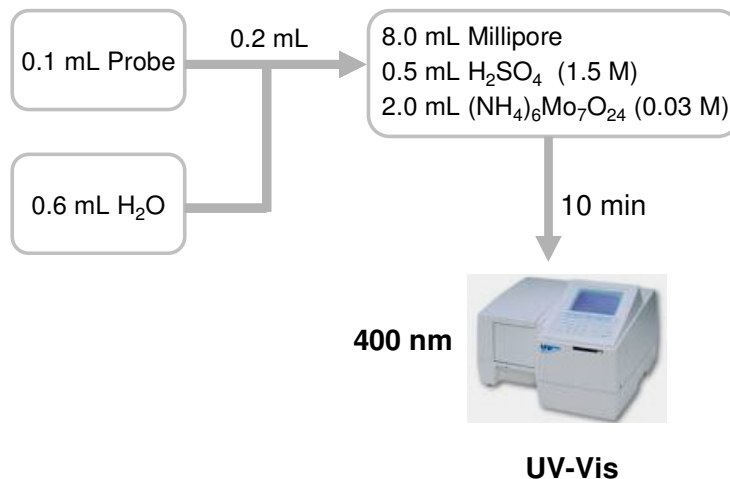


Abbildung 4.8: Allgemeine Vorgehensweise bei den kinetischen Messungen nach der Molybdat-Methode, nach Lit. [96].

Zu Beginn der Kondensationsreaktion werden Proben in Abständen von vier Minuten aus der Reaktionslösung entnommen. Im Verlauf der Reaktion ist die Wahl längerer Zeitintervalle bis hin zu 30 Minuten sinnvoll. Es wurden Kinetikmessungen aller in Abbildung 4.1 genannten linearen Polyamine durchgeführt sowie Referenzmessungen ohne Additiv.

4.4 Partikelbildung und Partikelwachstum

Für die Untersuchungen der Partikeldurchmesser mit der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) wird ein Viertel des Ansatzes gemäß Abbildung 4.6 verwendet. Die vorbereitete Reaktionslösung wird in eine PP-Spritze aufgezogen und zur Reinigung mit einem Spritzenfilter filtriert. Dazu werden zuerst der Filter sowie nachfolgend die Messküvette mit je 1 mL der Reaktionslösung vorgespült. Für die Messung werden 1.2 mL Reaktionslösung in die Küvette gefüllt, wonach diese mit einem Deckel verschlossen wird. Mögliche Luftblasen sind vor Messbeginn unbedingt zu entfernen. Nach diesen Vorbereitungen wird die Küvette in das Messgerät für Dynamische Lichtstreuung eingesetzt und die Messung begonnen.

Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Messungen zu gewährleisten, wird das DLS-Gerät stets auf gleiche Messparameter eingestellt. Der Laser wird auf die Mitte der Küvette positioniert. Für einen Messwert werden 12 Scans mit einer Dauer von je zehn Sekunden durchgeführt und gemittelt. Wie in dem Schema aus Abschnitt 4.3.2

gezeigt, wurden auch Kondensationsreaktionen mit Zugabe von Phosphat angesetzt und untersucht. Die Phosphatzugabe erfolgt nach der Hydrolyse zusammen mit dem Puffer. In Tabelle 4.2 sind die durchgeführten Messungen aufgeführt. Sämtliche Messungen wurden mindestens zweimal vorgenommen und die Messwerte über die Anzahl der Messungen gemittelt.

Tabelle 4.2: Übersicht über die mit der Dynamischen Lichtstreuung durchgeführten Messungen.

| Polyamin | Phosphatkonzentration c_P / mM | | | | | | | | | | | |
|------------------|----------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 150 |
| Referenz | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PPI ₈ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| HAD | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + |
| MHAD | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Spermin | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + |
| MSpermin | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + |

4.5 Präzipitationsaktivität der Additive

Die erste Überprüfung der Präzipitationsaktivität der verschiedenen Additive in Abhängigkeit von der Kettenlänge wurde durch visuelle Beobachtung der Kondensationsreaktionen vorgenommen. Die Reaktion wird nach den Angaben in Schema aus Abbildung 4.6 vorbereitet und in einem Wasserbad auf 25 °C temperiert. Additive, die nach einer Stunde Beobachtungszeit zu deutlich sichtbarer Trübung der Lösung führen, die eine Isolierung eines Präzipitates ermöglicht, werden als präzipitationsaktiv eingestuft. Als „trübungsaktiv“ werden Additive eingestuft, wonach nach einer beobachteten Trübung die Isolierung des Präzipitates nicht möglich war. Die durchgeführten Präzipitationsuntersuchungen sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Dabei wurde die Zugabe an Phosphat von 10 bis 150 mM variiert. Zudem wurden entsprechende Referenzversuche ohne Phosphat durchgeführt.

In den nachfolgenden Kapiteln werden die experimentellen Arbeiten an den antibakteriellen Beschichtungen beschrieben und erläutert.

4.6 Mesoporöse Beschichtungen

Für die Herstellung mesostrukturierter Beschichtungen wurde eine Lösung aus Ethanol, Wasser, Salzsäure, Tetraethoxysilan (TEOS) als Silicaquelle und Poly(ethylen glycol)-poly(propylen glycol)-*block-co-polymer* (SIGMA-ALDRICH, Germany, EO₂₀PO₇₀EO₂₀, mittlere Molmasse $M_n \sim 5.800 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, analog zu Pluronic[®] P-123 von BASF) als strukturdirigierendes Agens angesetzt. Die molaren Verhältnisse betragen Literatur [195] zufolge TEOS:EtOH:H₂O:HCl:EO₂₀PO₇₀EO₂₀ = 1 : 48.9 : 26.9 : 0.06 : 0.0135. Hierzu wurde das Polymer zunächst in Ethanol, Wasser und Salzsäure gelöst, bevor TEOS hinzugefügt und für 10 min gerührt wurde. Es wurden Glasplättchen (MENZEL-Gläser, THERMO FISHER SCIENTIFIC) durch ein Spin Coating-Verfahren beschichtet und bei 60 °C über Nacht getrocknet. Die amorphe Beschichtung wurde analog erzeugt, jedoch ohne das strukturdirigierende Agens (SDA) einzusetzen. Die Auftragung der Syntheselösung erfolgte bei 400 rpm für 18 s, das Ausdünnen der Filme wurde bei 5500 rpm und 15 s durchgeführt. Glasobjektträger (No. 2400, ELKA, Sondheim) wurden durch Dip Coating beschichtet. Für die mesoporöse Silicabeschichtung wurden die Objektträger für 30 s eingetaucht und mit einer Geschwindigkeit von 15 mm/min herausgezogen. Im Fall der amorphen Silicafilme betrug die Geschwindigkeit von 25 mm/min bei einer Tauchzeit von 2 min. Das organische Material wurde anschließend durch Calcination bei 415 °C (Aufheizrate 1 °C/min) entfernt.

4.7 Kovalente Anbindung von Poly(4-vinylpyridin)

Poly(4-vinylpyridin) (SIGMA-ALDRICH, $M_n = 160.000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) wird auf die unterschiedlich modifizierten Glasoberflächen (mesoporöse Beschichtung, amorphe Beschichtung und unbehandeltes Glas) durch mehrere Linkermoleküle kovalent aufgebracht und hexyliert [34]. Zusätzlich werden in einem analogen Prozess polymerbeschichtete Glasplättchen als Kontrolle präpariert, das Polymer wird hierbei allerdings nicht hexyliert.

Vor der Synthese werden die unbeschichteten Glasplättchen stets mit Aceton und Ethanol für jeweils 10 Minuten im Ultraschallbad gereinigt und an Luft getrocknet. Mesoporös bzw. amorph beschichtete Plättchen werden nach der Calcination nicht weiter gereinigt (siehe Abschnitt 4.6).

4.7.1 Anbindung von 3-Aminopropyltrimethoxysilan

Die Glasplättchen werden jeweils für 2 min in eine 10%ige wässrige 3-Aminopropyltrimethoxysilan-Lösung gegeben. Nach Ablauf der Zeit werden die Proben gründlich mit Reinstwasser und Aceton abgespült.

4.7.2 Umsetzung mit 1,4-Dibrombutan

Die Glasplättchen werden in einem Glaskolben mit 0.9 mL (7.5 mmol) 1,4-Dibrombutan, 9 mL (0.165 mol) Nitromethan (CH_3NO_2) und 20 μL (0.14 μM) Triethylamin für 2 h bei 65 °C unter Rückfluss vorsichtig gerührt. Im Laufe der Reaktion verfärbt sich die Lösung gelb. Nach Reaktionsende werden die Plättchen mit Nitromethan abgespült und an Luft getrocknet.

4.7.3 Anbindung von Poly(4-vinylpyridin) und Hexylierung

Die beschichteten Plättchen werden in eine Lösung aus 0.9 g (5.6 μM) Poly(4-vinylpyridin), 0.82 mL 1-Bromhexan (5.8 mmol) und 8.18 mL (0.15 mol) Nitromethan gegeben und bei 75 °C über Nacht vorsichtig gerührt. Die anfangs farblose Lösung färbt sich dabei blaugrün. Die Plättchen werden dann gründlich mit Methanol gewaschen und an Luft getrocknet.

Analog hierzu wurden auch Proben mit einem Octyl- bzw. Decylrest hergestellt, indem 0.82 mL (4.75 mmol) 1-Bromoktan bzw. 0.82 mL (3.95 mmol) 1-Bromdecan eingesetzt wurden.

4.8 Präparation von Silica-Hybrid-Filmen

Hierzu wird zunächst Poly(4-vinyl-*N*-hexylpyridinium)bromid hergestellt, indem 0.9 g (5.6 μmol) Poly(4-vinylpyridin), 0.82 mL 1-Bromhexan (5.8 mmol) und 8.18 mL (0.15 mol) Nitromethan bei 75 °C über Nacht unter Rückfluss gerührt werden. Das Lösemittel wird abgedampft, wobei ein braun gefärbtes, viskoses Polymer erhalten wird. Analog werden auch die entsprechenden octylierten und decylierten Verbindungen erhalten.

Für die Filmpräparation werden im Verhältnis 5:1 die in Abschnitt 4.6 beschriebene Silicalösung für die amorphe Silicabeschichtung und das betreffende Polymer miteinander vermischt und das Polymer aufgelöst. Die Präparation der Filme erfolgt

dann mit Spin Coating, wobei das Synthesegel 25 s lang bei 100 rpm aufgetragen und 15 s bei 5500 rpm abgeschleudert wird. Die so hergestellten Proben werden dann bei 70 °C für 72 h getrocknet, um die Kondensation des Silicas voranzutreiben.

4.8.1 Präparation silberhaltiger Silica-Hybrid-Materialien

Die Filme werden gemäß Abschnitt 4.8 hergestellt. Die Silberkomponente wird jeweils bei der Herstellung des Synthesegels aus Polymer und Silicasol hinzugefügt, nachdem sich das Polymer aufgelöst hat.

Als Silberzusatz werden silberausgetauschter Sodalith, Zeolith A sowie polyvinylpyrrolidonstabilisiertes nanoskaliges Silber verwendet. Diese Substanzen wurden von Dipl.-Chem. TAMMO LÜBENHOP im Rahmen seiner Diplomarbeit hergestellt und zur Verfügung gestellt [196]. Die Synthese der Sodalithe erfolgt unter hydrothermalen Bedingungen in Stahlautoklaven mit Tefloneinsätzen nach Literatur [197]. Hierzu wird feinpulvriges Kaolinit ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$) in eine Natriumhydroxid-Lösung gegeben und im Umluftofen umgesetzt. Der so erhaltene basische Hydroxy-Sodalith wird dann mittels Extraktion in den nicht basischen Hydro-Sodalith überführt [198]. Die Darstellung von Zeolith A erfolgt aus Aluminiumnanopulver und kolloidalem SiO_2 mit Hilfe von Methylcellulose als thermoreversibles Polymerhydrogel im Umluftofen bei 80 °C [199,200]. Der Austausch der Natriumionen gegen Silberionen erfolgt durch Suspension der Verbindungen in einer AgNO_3 -Lösung wiederum in Autoklaven bei 100 °C [198].

Für das polyvinylpyrrolidonstabilisierte Silber wird nanoskaliges Silber [201] portionsweise mit Polyvinylpyrrolidon in einer Lösung aus Wasser und Aceton umgesetzt. Das erhaltene braune Gel wird getrocknet, der bernsteinfarbene Feststoff ist in Wasser und Ethanol redispergierbar. Für die Herstellung der silberhaltigen Filme wird eine kolloidale Dispersion des polyvinylpyrrolidonstabilisierten Silbers verwendet, welche durch Reaktion des polymerstabilisierten Silbers (1 g) in 10 mL Wasser oder Ethanol bei 70 °C erhalten wird. Typische Verhältnisse der Synthesegele in Gewichtsanteilen m-% für das Auftragen mit dem Spin Coating-Verfahren sind 5:1:0.0125 bezüglich Silicalösung: Polymer: Silberkomponente im Falle von Sodalith / Zeolith A und 5:1:0.5 im Fall des polyvinylpyrrolidonstabilisierten-Ag.

Es wurden Stabilitätstests an den hergestellten Proben in phosphate buffered saline (PBS) und *simulated body fluid* (SBF) durchgeführt. Hierfür wurden die Proben in Polyethylenbehältern im jeweiligen Medium für zwei bis fünf Tage bei 37 °C gelagert.

4.9 Kovalente Anbindung von Poly(4-vinylpyridin) via 3-Brompropyltrimethoxysilan

Typischerweise wird für die Darstellung des Synthesegels 0.5 g (3.1 μmol) Poly(4-vinylpyridin) (PVP) in 7.5 mL (0.14 mol) trockenem Nitromethan gelöst. Anschließend werden 1-Bromhexan und 3-Brompropyltrimethoxysilan (BPTMS) zu der Reaktionslösung gegeben, die dann über Nacht bei 65 °C unter Rückfluss erhitzt wird. Das erhaltene blaugrüne und hochviskose Synthesegel (5 g) wird im Anschluss in 20 mL Methanol gelöst und mit Spin Coating auf Glasplättchen aufgetragen. Die Auftragungsgeschwindigkeit beträgt hierbei 200 rpm, das Abschleudern erfolgt bei 5500 rpm für jeweils 15 s. In Tabelle 4.3 sind die Ansätze der durchgeführten Versuche dargestellt.

Tabelle 4.3: Übersicht der durchgeführten Syntheseansätze mit BPTMS.

| Probe | BPTMS/ mL (mmol) | 1-Bromhexan/ mL (mmol) |
|--------------|-------------------------|-------------------------------|
| a | 0.08 (0.87) | 0.215 (1.53) |
| b | 0.20 (2.18) | 0.215 (1.53) |
| c | 0.25 (2.72) | 0.500 (3.55) |
| d | 0.25 (2.72) | 0.215 (1.53) |
| e | 0.25 (2.72) | 0.680 (4.83) |
| f | 0.25 (2.72) | 0.800 (5.68) |
| g | 0.25 (2.72) | 0.950 (6.74) |
| h | 0.25 (2.72) | 1.150 (8.16) |

Anschließend werden die Proben bei 60 °C 72 h getrocknet und danach gründlich mit Wasser und Ethanol gewaschen, um etwaige Rückstände der Reaktionsbestandteile zu entfernen.

Zusätzlich zu den Synthesen unter Rückfluss werden zum Vergleich einige Ansätze in der Mikrowellensynthese getestet. Bei der verwendeten Mikrowelle handelt es sich um das Gerät DiscoverS mit einem Zwölfachwechsler Explorer12Hybrid der Firma CEM. Mit Hilfe eines Gas-Addition-Kits können Synthesen unter Schutzgas erfolgen. Die Synthese erfolgte in 10 mL Durangläschen unter Argonatmosphäre (1 bar) und trockenem Nitromethan (CH_3NO_2). Eine Übersicht über die durchgeführten Synthesen ist in Tabelle 4.4 gegeben.

Tabelle 4.4: Übersicht über die durchgeführten Mikrowellensynthesen.

| Probe | PVP / g | CH_3NO_2 / mL | BPTMS / mL | 1-Bromhexan / mL | $T / ^\circ\text{C}$ |
|--------------|----------------|---|-------------------|-------------------------|--|
| a | 0.250 | 3.75 | 0.125 | 0.575 | 75 |
| b | 0.500 | 7.50 | 0.250 | 1.150 | 65 |
| c | 0.375 | 5.63 | 0.188 | 0.860 | 65 |

Das erhaltene grüne Synthesegel wird, wie in Abschnitt 4.9 beschrieben, mittels Spin Coating auf Glasplättchen aufgebracht. Diese werden entsprechend getrocknet und mit Wasser und Ethanol gereinigt.

4.10 Fluorescein-Test

Zur quantitativen Bestimmung gebundener quartärer Aminogruppen auf den verschieden modifizierten Glaträgern (amorph, mesoporös, unbehandeltes Glas) eignet sich der Fluorescein-Farbstofftest (34). Unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei $\text{pH} = 8$ bindet der rote Farbstoff elektrostatisch selektiv an positiv geladene Ammoniumgruppen (siehe Abbildung 4.9) [202].

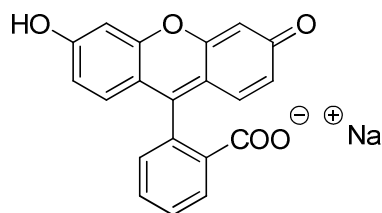


Abbildung 4.9: Struktur (links) und eine Fotografie (rechts) des Natriumsalzes von Fluorescein.

Die Anbindung des Farbstoffs und dessen Detektion laufen folgendermaßen ab. Die zu testenden Substrate (Glasplättchen oder Glasobjektträger) werden für 5 Minuten in eine wässrige 1%-ige Fluorescein-Lösung getaucht. In dieser Zeit bindet der Farbstoff an die Aminogruppen des Trägermaterials. Anschließend werden die Substrate gründlich mit destilliertem Wasser abgespült. Die Substrate sind im Falle eines positiven Tests mehr oder weniger intensiv gefärbt. Nach Trocknung an der Luft wird das Substrat in 25 mL einer 0.1 %-igen Cetyltrimethylammoniumchlorid-Lösung gegeben. Das Substrat wird in dieser tensidischen Lösung 10 Minuten leicht gerührt, wobei der zuvor angebundene Farbstoff wieder desorbiert. Die Lösung mit dem nun desorbierten Farbstoff wird mit 2.5 mL eines wässrigen Phosphatpuffers (pH = 8) versetzt und der enthaltene Farbstoff photometrisch bei $\lambda = 501 \text{ nm}$ bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Kalibrationsgerade, die zuvor mit Hilfe einer Verdünnungsreihe einer Fluoresceinstammlösung (1.0 mmol, 0.75 mmol, 0.5 mmol, 0.25 mmol, 0.1 mmol Fluorescein in 0.1 %-iger Cetyltrimethylammoniumchlorid-Lösung) ermittelt wurde. Die Absorption wurde jeweils in einer Dreifachmessung ermittelt.

5 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel sollen die im Laufe der Arbeit erhaltenen Ergebnisse zum einen hinsichtlich der Kondensationsreaktionen der Kieselsäure unter Einfluss kurzketziger Polyamine im Hinblick auf die Präzipitationsaktivität, Kinetik, Morphologie sowie die Zusammensetzung der Präzipitate dargestellt und diskutiert werden.

Der zweite Teil des Kapitels dient der Präsentation und der Diskussion der Ergebnisse zur Entwicklung einer antibakteriellen Beschichtung auf der Basis eines Polymers, welches mit Hilfe unterschiedlicher Verfahren eine geeignete Beschichtung für den biomedizinischen Bereich ergeben sollte.

5.1 Präzipitationsaktivität der Polyamine

Die Präzipitate werden analog zu den Studien von JAHNS und KUFELT innerhalb von 14 Minuten erhalten und nach einer Stunde aufgearbeitet [96,203]. Phosphationen werden hier als Modellsubstanzen zu den in Biosilica der Diatomeen natürlich vorkommenden multivalenten Spezies herangezogen. Untersuchungen von SUMPER zeigen, dass serinphosphatreiche Peptide, die Silacidine, als natürliche Polyanionen dienen, die für die Polyamin- und/oder Silaffin-gerichtete *in vivo*-Silicabildung ausschlaggebend sind [18]. Die Ergebnisse der Präzipitationsuntersuchungen in Gegenwart der verschiedenen Polyamine in Abhängigkeit der Phosphatkonzentration sind in Tabelle 5.1 zusammengestellt. Die Referenzversuche ohne Additiv (Polyamin und/oder Phosphat) zeigen keine Präzipitatbildung. Weiterhin wird aus der Übersicht der durchgeführten Präzipitationsversuche ersichtlich, dass bei den hier untersuchten kurzen Polyaminen nur in wenigen Fällen ein Niederschlag erhalten wird. Nur im Fall von PPI₈, welches das längste Polyamin in der hier untersuchten Reihe darstellt, kann ab der Zugabe von 30 mM Phosphat ein Präzipitat erhalten und nach einer Aufarbeitung isoliert werden. Bei der Konstellation von mindestens 30 mM Phosphat als multivalentes Anion und acht Propylenimineinheiten kommt es zur Bildung von Aggregaten aus den Phosphationen und den Polyaminen. Der Bildung größerer Aggregate förderlich sind elektrostatische Anziehungskräfte zwischen den negativ geladenen Phosphatanionen und den teilweise protonierten Polyaminen und auch Wasserstoffbrückenbindungen. Allerdings ist hierfür eine Kettenlänge von mindestens acht Imineinheiten notwendig, damit ein Präzipitat entsteht. Zum

Vergleich zeigen PMPI_9 , welches wegen einer breiten Verteilung des Polymerisationsgrades strukturell PPI_8 stark ähneln dürfte, und PMPI_{20} eine Präzipitationsaktivität, wie sie für längere Polyamine typisch ist [96,203].

Tabelle 5.1: Ergebnisse der Präzipitationsexperimente verschiedener Polyamine in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration c_p . Werte für PMPI_9 und PMPI_{20} wurden Lit. [96,203] entnommen.

| Polyamin | Phosphatkonzentration c_p / mM | | | | | | |
|--------------------|----------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | 50 | 100 | 150 |
| Referenz | Gel | Gel | Gel | Gel | Gel | Gel | Gel |
| PMPI_{20} | – | Gel | Präzip. | Präzip. | Präzip. | Präzip. | Präzip. |
| PMPI_9 | Gel | Präzip. | Präzip. | Präzip. | Präzip. | Präzip. | Präzip. |
| PPI_8 | Gel | Gel | Gel | Präzip. | Präzip. | Präzip. | Präzip. |
| HAD | Gel | Gel | – | Gel | Gel | Gel | Gel |
| MHAD | Gel | Gel | Gel | Trüb. | Trüb. | Trüb. | Trüb. |
| Spermin | Gel | Gel | – | Gel | Gel | Gel | Gel |
| MSpermin | Gel | Gel | Gel | Gel | Gel | Gel | Gel |

In den übrigen Fällen kann aufgrund der hier durchgeführten Experimente keine uneingeschränkte Präzipitationsaktivität der Polyamine festgestellt werden. Im Fall der Experimente mit MHAD, welches die methylierte Variante von Hexaazadocosan (HAD) darstellt, kann jedoch in Gegenwart von mindestens 30 mM Phosphat eine gut sichtbare Trübung der Lösung beobachtet werden. Nach der Definition für die Präzipitationsaktivität für Additive in Abschnitt 4.5 ist MHAD zwar nicht als präzipitationsaktives sondern lediglich als „trübungsaktives“ Additiv einzustufen, da kein Präzipitat isoliert werden konnte. Dies ist eine interessante Tatsache, denn das HAD in seiner unmethylierten Form zeigt keinen so starken Einfluss auf das Kondensationsverhalten von Kieselsäure, es werden durchgehend Gele erhalten. Des Weiteren sind sowohl Spermin als auch die methylierte Variante MSpermin nach den Ergebnissen der Präzipitationsexperimente als nicht präzipitationsaktiv zu betrachten, da durchgehend nur die Gelierung als alleinige Reaktion festgestellt werden kann. Demzufolge kann in dieser Arbeit MHAD, welches quasi PMPI_6 mit

sechs Methylpropylenimino-Gruppen entspricht, als das kürzeste Polyamin mit einer nachweislichen Präzipitationsaktivität im Rahmen der Präzipitationsexperimente festgestellt werden. Kürzere Polyamine wie „PPI₄“/„PMPI₄“ zeigen im Rahmen der Experimente, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, keine Präzipitationsaktivität.

Aufgrund der hier erhaltenen Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass methylierte Polyamine stärker mit Phosphatanionen interagieren und so leichter Polyamin-Aggregate ausbilden können. Methylierte Polyamine können im Vergleich zu ihren unmethylierten Varianten unter den gegebenen Bedingungen (pH = 5.5) leichter protoniert werden und entsprechend stärker mit den multivalenten Phosphatanionen wechselwirken. Dies kommt bei den kürzeren Polyaminen, bei denen die Eigenschaften eines typischen Polyamins nicht mehr vordergründig sind, besonders stark zum Tragen.

5.1.1 Kinetik der Kondensationsreaktionen

Im folgenden Abschnitt wird zunächst die Kinetik der Kieselsäurekondensationsreaktion unter Einfluss der zu untersuchenden Polyamine mit der Molybdat-Methode betrachtet. In Abbildung 5.1 ist die Konzentration der molybdatreaktiven Kieselsäure in Abhängigkeit von der Reaktionszeit aufgetragen. Es handelt sich hierbei um jeweils propionat-gepufferte Systeme (pH = 5.5). Der Verlauf der kinetischen Kurven zeigt, dass die Initialphasen der betrachteten Kondensationsreaktionen sowie bei der Referenzmessung ohne Amin offensichtlich vergleichbar lang sind. Sie beträgt in allen Fällen etwa 14 Minuten. In dieser Phase tritt so gut wie keine Abnahme der Kieselsäurekonzentration auf, auch wenn bei genauer Betrachtung ein etwas schnellerer Abfall nach zehn Minuten zu beobachten ist. Auch die Abnahme der Konzentration der höher kondensierten Kieselsäurespezies ab diesem Zeitpunkt nach dem Ende der Initialphase verläuft dann sehr ähnlich. Hier sind lediglich einige geringfügige Abweichungen bei der Geschwindigkeit der Abnahme zu beobachten. So verläuft im Bereich von etwa 20 Minuten Reaktionszeit die Kurve der Kondensationsreaktion unter HAD-Einfluss etwas schneller als die der übrigen Systeme. Diese Abweichungen liegen jedoch nur geringfügig oberhalb der Fehlertoleranz der Molybdat-Methode und können daher in deren Messungenauigkeit begründet sein.

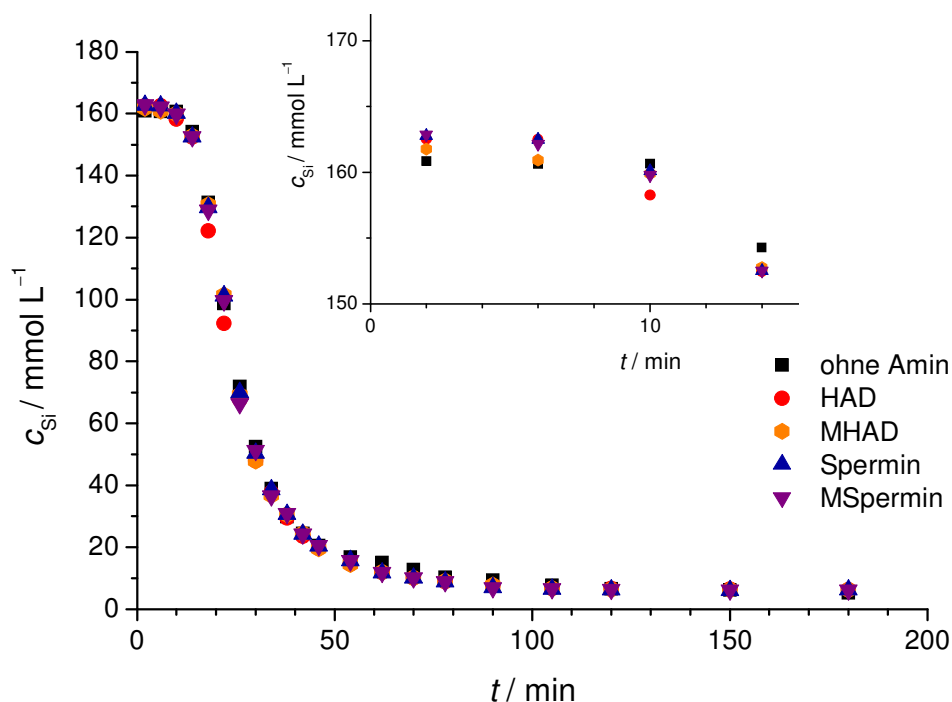


Abbildung 5.1: Kinetik der Kieselsäurekondensation unter Einfluss von HAD/MHAD und Spermin/MSpermin im Vergleich zu einer Reaktion ohne Amin. Dargestellt ist der Verlauf der Konzentration molybdatreaktiver Kieselsäurespezies in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bei pH = 5.5.

Sehr wahrscheinlich unterliegen die hier gefundenen Abweichungen der Messwerte kleinen Auslenkungen des pH-Wertes; pH-Wert-Veränderungen üben bekanntermaßen einen großen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Kieselsäurekondensation aus. Dies wurde bereits in früheren Studien in unserem Arbeitskreis, als noch in ungepufferten Systemen gearbeitet wurde, festgestellt [204-206]. Diese Studien ergaben, dass die mit der Molybdat-Methode ermittelten Unterschiede in der Geschwindigkeit der Kondensationsreaktion allein auf die Basizität der untersuchten Amine zurückzuführen sind. So laufen Kondensationsreaktionen bei höheren pH-Werten deutlich schneller ab. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Struktur der Amine und dem Ablauf der Reaktionen kann somit nicht bestätigt werden. Spermine und deren Analoga wurden von Forschern um PERRY auf ihre katalytische Aktivität in Abhängigkeit von der Kettenlänge untersucht [23]. Dort konnte lediglich ein sehr schwacher Effekt auf die Kondensationsreaktion festgestellt werden, auch die natürlichen Substanzen zeigten keine besonderen Effekte. JAHNS kommt in seiner Arbeit ebenfalls zu

entsprechenden Ergebnissen [96]. Er stellt fest, dass strukturelle Eigenschaften der Amine keinen Einfluss auf die Kinetik der Kieselsäurekondensation aufweisen. Diese Studien lieferten nicht nur Ergebnisse zu linearen Polyaminen, wie Polypropylenimine (PPI₁₂) und Polymethylpropylenimine (PMPI₁₂ und PMPI₂₀), sondern auch bezüglich verzweigter Polymere im malonat-gepufferten System (pH = 5.5). Der pH-Wert wird als die bestimmende Konstante für die Geschwindigkeit von Kieselsäurekondensationen herausgestellt.

Dies kann mit dieser Arbeit bestätigt werden und steht im Einklang vorhergehender Untersuchungen mit ähnlichen Polyamine (PMPI₉-PMPI₂₀) [203]. Bei den hier durchgeführten Messungen konnte teilweise eine Auslenkung des pH-Werts von bis zu 0.06 pH-Einheiten beobachtet werden. Zwar sind dies nur sehr geringfügige Unterschiede, die allerdings wegen der starken Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Kondensationsreaktion vom pH-Wert doch zu einer veränderten Abnahme der Kieselsäurekonzentration führen können. Somit kann auch hier durch Messungen mit der Molybdat-Methode wiederum kein Einfluss auf die Kieselsäurekondensationsreaktion festgestellt werden.

5.1.2 Partikelbildung und Partikelwachstum

Dieser Abschnitt dient der Präsentation und der Diskussion der Ergebnisse der Dynamischen Lichtstreuungsmessungen. Der hier im Laufe der Diskussion verwendete Begriff „Partikeldurchmesser“ bezieht sich auf den in Abschnitt 3.2 definierten Begriff des hydrodynamischen Durchmessers.

Die Dynamische Lichtstreuung bietet die Möglichkeit, das Partikelwachstum während der Kieselsäurekondensationsreaktionen in Abhängigkeit von der Zeit zu untersuchen und darzustellen. Bei diesen Messungen werden nur Ergebnisse vor dem Gelpunkt des Systems betrachtet, da die Gelierung zu erheblichen Störungen der Messungen führt.

5.1.2.1 Partikelbildung und Partikelwachstum unter Einfluss von Polyaminen

Messungen mit Dynamischer Lichtstreuung liefern zunächst Verteilungen der Streuintensität auf die Partikeldurchmesser. Somit können in der Reaktionslösung vorhandene Partikelpopulationen anhand ihrer Durchmesser bestimmt werden. In der Regel wird der Verlauf einer Kondensationsreaktion von Beginn der Reaktion an bis

zur Gelierung verfolgt. Somit werden Daten zu verschiedenen Zeitpunkten und Stadien der Reaktion erhalten und können bei Bedarf für sich allein betrachtet werden.

Kondensationsreaktionen in Abwesenheit von Phosphat führen wie in Abschnitt 5.1 erläutert nicht zur Präzipitation. Hier kann mit zeitlichem Fortschreiten der Reaktion die Bewegung eines Signals zu immer größeren Durchmessern festgestellt werden. In Abbildung 5.2 ist eine exemplarische Auftragung der Verteilungen anhand der Anzahl der vorliegenden Partikelgrößen in Prozent gegen den Partikeldurchmesser gezeigt. Diese Kurven werden aus den gemessenen Intensitätsverteilungen abgeleitet und algorithmisch berechnet.

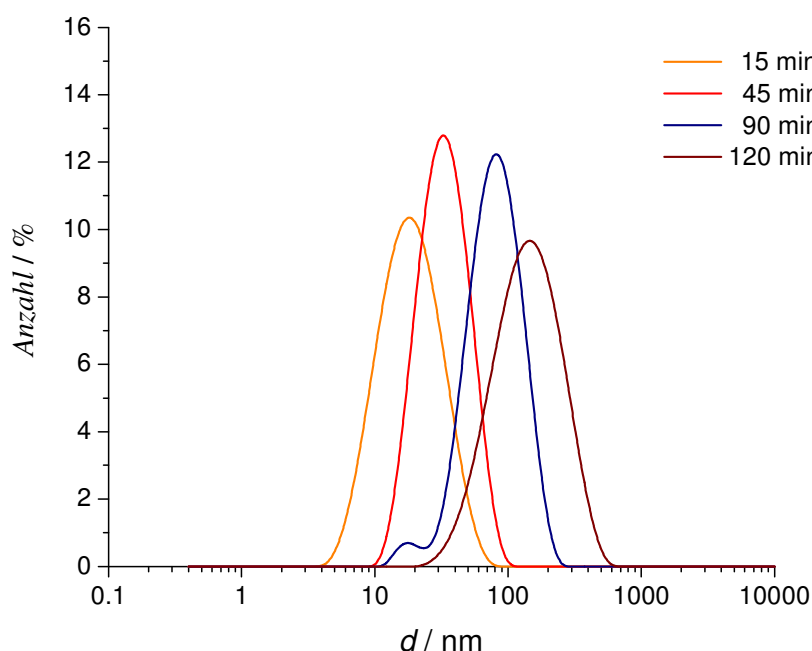


Abbildung 5.2: Exemplarische Auftragung der Anzahlverteilungen gegen den Partikeldurchmesser einer Kondensationsreaktion unter Einfluss von PMPI_0 . Die Messkurven werden zu bestimmten Zeitpunkten 15, 45, 90 und 120 min der Reaktion herausgegriffen.

Es ist in vielen Fällen sinnvoll, anstelle der Intensitätsverteilung die Partikelgrößen nach ihrem prozentualen Verhältnis zu vergleichen, da so auch kleine Partikelpopulationen, die nur eine geringe Streuintensität verursachen, erfasst werden können. Diese Art der Auftragung ermöglicht außer der Beobachtung der Bewegung vorhandener Peaks zudem die genaue Betrachtung der prozentualen Anteile bestimmter Partikelgrößen im Verlauf der Kondensationsreaktion (Abbildung 5.2). Sollen viele Messungen miteinander verglichen werden, zum Beispiel bei langen

Reaktions- und Beobachtungszeiten, wird diese Auswertungsmethode jedoch unübersichtlich, da sehr viele Verteilungskurven in den Graphen aufgenommen werden müssten. Darum wird eine Auswertungsmethode sinnvoll, die einen umfassenden Gesamtüberblick über den Verlauf der Kondensationsreaktionen verschafft. Dies ist durch Mittelung aller an der Probe beobachteter Partikeldurchmesser möglich, welche dann anhand der so genannten Z-Mittel dargestellt werden.

In der Abbildung 5.3 sind die Anzahlverteilungen in Gegenwart der zu untersuchenden Polyamine zu gegebenen Reaktionszeiten in Abhängigkeit von dem Partikeldurchmesser gegeben. Die Messung ohne Polyamine zeigt einen sehr langsamen Wachstumsverlauf, im Laufe der Kondensation wandert der Peak zu größeren Durchmessern. Zu Beginn der Kondensation liegen nach 15 min ausschließlich etwa 1 nm große Partikel vor, nach 2 h liegt die Partikelgröße bei etwa 10 nm.

In Gegenwart der Polyamine wirken unterschiedliche Einflüsse auf den Verlauf der Kondensationsreaktionen ein. Der Verlauf des Wachstums ist in allen Fällen grundsätzlich ähnlich. Bereits etwa 15 Minuten nach Reaktionsbeginn wird ein Partikeldurchmesser zwischen 1 - 4 nm in den Lösungen beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt sind die Streuintensitäten hoch genug, um zuverlässige Werte zu liefern. Kurz nach Reaktionsbeginn können zwar auch Partikeldurchmesser (0.9 bis 10 nm) ermittelt werden, jedoch sind zu diesem Zeitpunkt der Reaktion die Streuintensitäten sehr gering und die Ergebnisse variieren sehr stark, so dass vermutlich eher Verschmutzungen für die Messergebnisse verantwortlich sind. Messungen von reinen Aminlösungen ohne Silica weisen sehr schlechte Streuintensitäten auf, so dass die Polyamine nicht in Form von Aggregaten vorliegen können.

Im Falle von PPI₈ sind nach 15-minütiger Reaktion etwa 4 nm große Partikel in der Lösung zu finden, nach 45 Minuten ist die Reaktion im Vergleich zur Referenz um Einiges weiter fortgeschritten, geht aber danach ebenfalls nur noch langsam voran. Nach 2 h Reaktionszeit liegen die Partikeldurchmesser hier dennoch bereits bei durchschnittlich 20 nm, während aus der Referenzmessung Partikel um 10 nm für den gleichen Zeitraum hervorgehen. Die Gegenwart von PPI₈ beschleunigt also nicht

nur gleich zu Beginn den Kondensationsprozess, auch die Wachstumsgeschwindigkeit wird gesteigert.

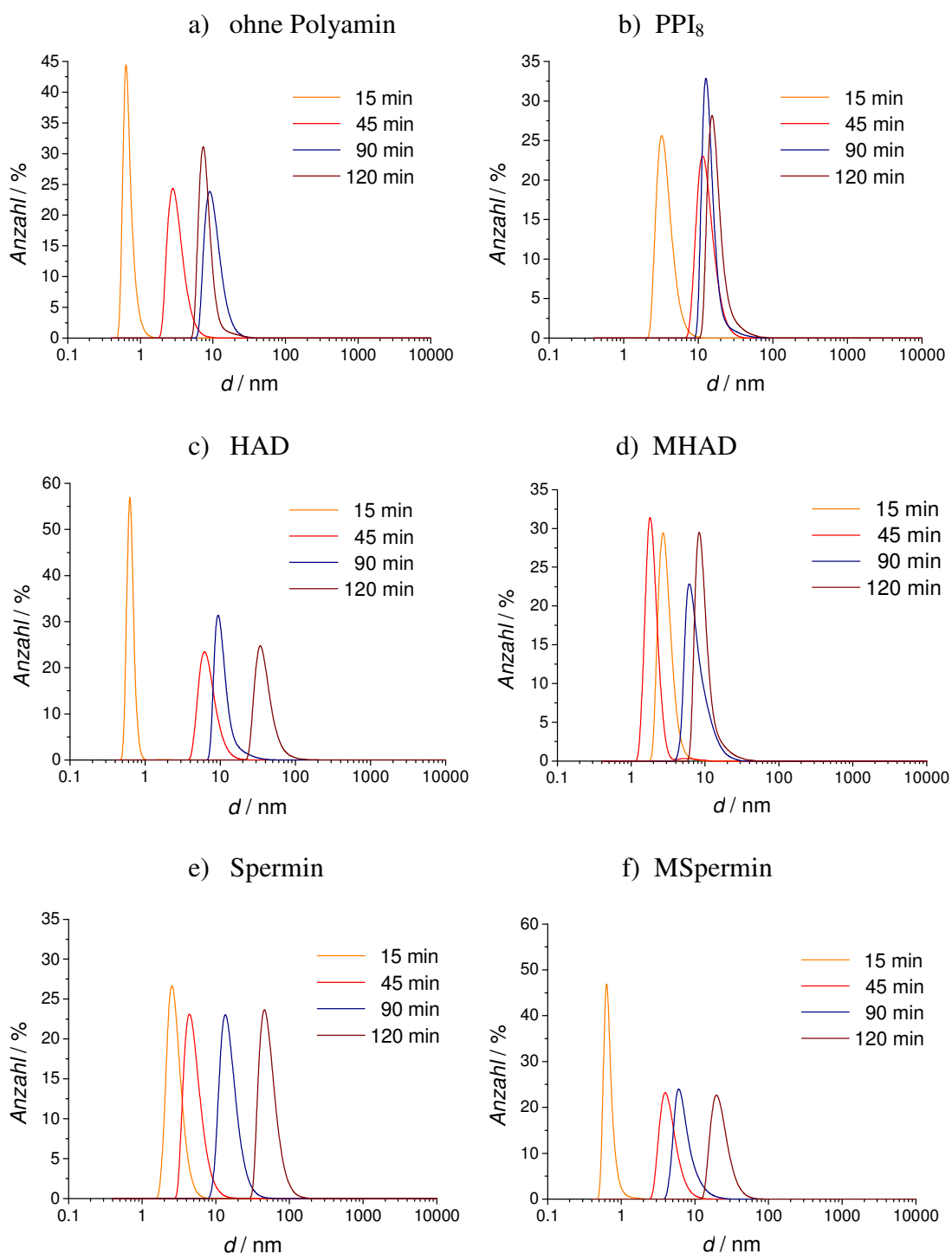


Abbildung 5.3: Ergebnisse der Dynamischen Lichtstreuung für Kieselsäurekondensationsreaktionen ohne Polyamin sowie in Gegenwart von PPI₈, HAD, MHAD, Spermin und MSpermin in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Die Referenzmessung zeigt den üblichen Sol-Gel-Prozess, das Wachstum der Solpartikel wird durch die Anwesenheit der Polyamine leicht beschleunigt.

In Gegenwart von Hexaazadocosan (HAD) und dessen methylierte Variante MHAD sind die Ergebnisse nicht ganz so konsistent. Während im Fall von HAD zu Beginn der Reaktion ähnlich der Nullmessung sehr kleine Partikel vorliegen, wird die weitere Kondensation durch die Anwesenheit des Polyamins beschleunigt. In Gegenwart von MHAD liegt die Partikelgröße nach 15 min hingegen eher schon im Bereich von PPI_8 bei ungefähr 4 nm. Die weitere Kondensation verläuft dann ebenfalls eher langsam im Vergleich zu HAD. Diese Ergebnisse spiegeln die Erfahrungen aus den Präzipitationsexperimenten wider (Tabelle 5.1), denn auch hier zeigte sich ein ähnlicher Einfluss auf die Kondensationsreaktion seitens PPI_8 und MHAD, da diese beiden Polyamine als einzige eine Präzipitationsaktivität zeigten. Deshalb ist es auch nicht verwunderlich, wenn die DLS ebenso einen ähnlichen Einfluss auf die Kieselsäurekondensation feststellen zu können.

Auch die Ergebnisse der Kondensationsreaktionen in Gegenwart von Spermin und MSpermin folgen dem Trend, dass das Wachstum der Sol-Partikel in Gegenwart von Polyaminen im Vergleich zur Nullmessung beschleunigt stattfindet. Zu Beginn der Reaktion zeigen sich dennoch Unterschiede, denn in Gegenwart von MSpermin liegen sehr kleine Partikel vor, wie sie auch in der Referenzmessung sowie in der Reaktion unter Einfluss von HAD beobachtet wurden. In Gegenwart von Spermin konnten nach 15 min hingegen bereits etwa 4 nm große Partikel beobachtet werden, die sonst bei den Reaktionen in Gegenwart von PPI_8 und MHAD aufgefallen sind.

Insgesamt gesehen liefert die Auswertung der Einzelmessungen aus der DLS Erkenntnisse über den direkten Einfluss der Polyamine auf den Verlauf der Kieselsäurekondensation. Tendenziell läuft diese in Gegenwart von Polyaminen etwas rascher ab; dann kann man davon ausgehen, dass bereits im Anfangsstadium der Kondensationsreaktion kleinere Aggregate zwischen Kieselsäureoligomeren und Polyamin vorliegen. Diese Ergebnisse korrelieren mit jenen, die von JAHNS und KUFELT in früheren Arbeiten erhalten wurden [96,203]. Dort zeigen Untersuchungen mit der DLS einen noch deutlicheren Unterschied zwischen der Referenzmessung und den Messungen unter Polyamineinfluss zu Beginn der Kondensationsreaktionen. Im späteren Verlauf der Kondensation waren allerdings kaum Unterschiede in der Geschwindigkeit des Wachstums im Vergleich zur Nullmessung erkennbar. Nach etwa zwei Stunden verliefen die betrachteten Kondensationen quasi deckungsgleich.

Einen guten Überblick über den Verlauf der betrachteten Kondensationsreaktionen unter dem Einfluss der verschiedenen Additive liefern die bereits erläuterten Z-Mittelwerte. In Abbildung 5.4 sind die Z-Mittel für die Kieselsäurekondensation in Gegenwart der verschiedenen Polyamine sowie für eine Referenzmessung gezeigt. Sowohl ohne Polyamin als auch in Gegenwart der zu untersuchenden Polyamine kann auf den ersten Blick ein kontinuierliches, langsames Partikelwachstum im Rahmen des Sol-Gel-Prozesses beobachtet werden. Im Verlauf der Reaktion wachsen die Partikel bis zum Gelpunkt auf etwa 300 - 600 nm heran. Die einsetzende Gelierung zeigt sich in stark streuenden Messsignalen.

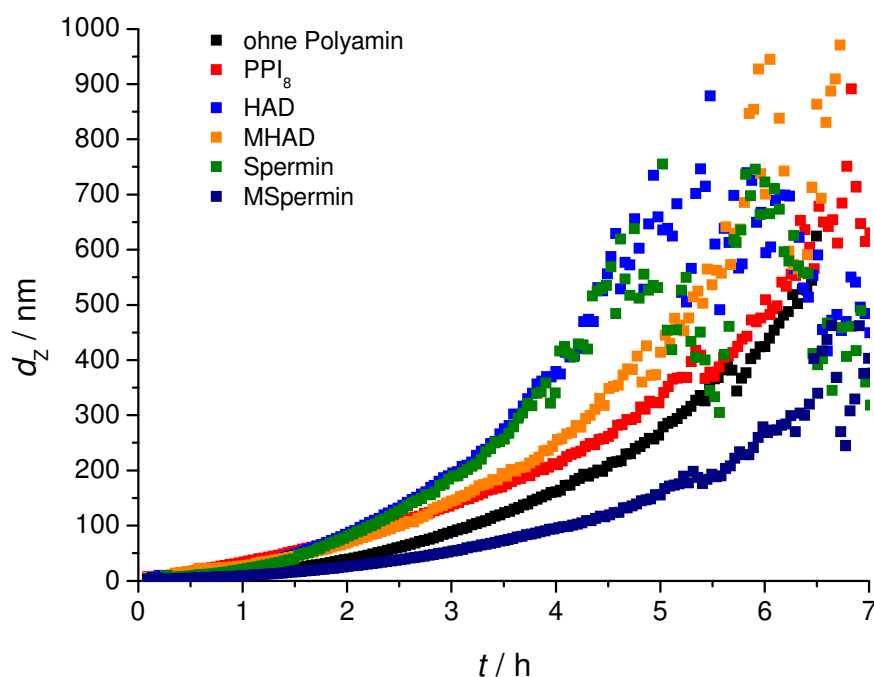


Abbildung 5.4: Ergebnisse der DLS-Messungen für die Kieselsäurekondensation in Gegenwart der zu untersuchenden Polyamine in Form der erhaltenen Z-Mittel d_z .

Die Unterschiede zeigen sich hier vor dem Hintergrund der bereits erläuterten DLS-Ergebnisse sinngemäß in der Geschwindigkeit im Verlauf der Kondensationsreaktionen. Die Darstellung der Z-Mittel bietet dabei den Vorteil, die Wachstumskurven der betrachteten Kondensationsreaktionen direkt miteinander vergleichen zu können. Wie zuvor schon festgestellt, zeigt die Anwesenheit der Polyamine eine tendenziell beschleunigende Wirkung auf den Sol-Gel-Prozess. Unter Einfluss von PPI₈ ist eine signifikante Steigerung der Kondensations-

geschwindigkeit zu verzeichnen, die Anwesenheit von HAD und Spermin führt sogar nahezu zu einer Verdopplung der Kondensationsgeschwindigkeit. Da diese Additive keine Präzipitationsaktivität zeigten (Abschnitt 5.1), ist dies ein erstaunliches Ergebnis. Noch auffälliger ist allerdings, dass in Gegenwart von MSpermin der allgemein beobachtete Trend umgekehrt wird. Hier liegt eine eindeutig verringerte Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zur Referenz und vor allem zu den Wachstumskurven der anderen Polyamine vor. Dies ist ein ungewöhnliches Ergebnis, denn zuvor benannte Studien haben bereits gezeigt, dass in Gegenwart von Polyaminen in der Regel eine raschere Kondensationsgeschwindigkeit beobachtet wird [96,203]. Die Auftragung der Z-Mittel in einem engeren Fenster zeigt allerdings, dass im frühen Reaktionsstadium (bis drei Stunden) die Wachstumskurven der in den Präzipitationsexperimenten aktiven Polyamine PPI₈ und MHAD über denen der inaktiven Polyamine liegen (siehe Abbildung 5.5). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch keine Erklärung für den ungewöhnlichen Wachstumsverlauf in Gegenwart von MSpermin gefunden werden.

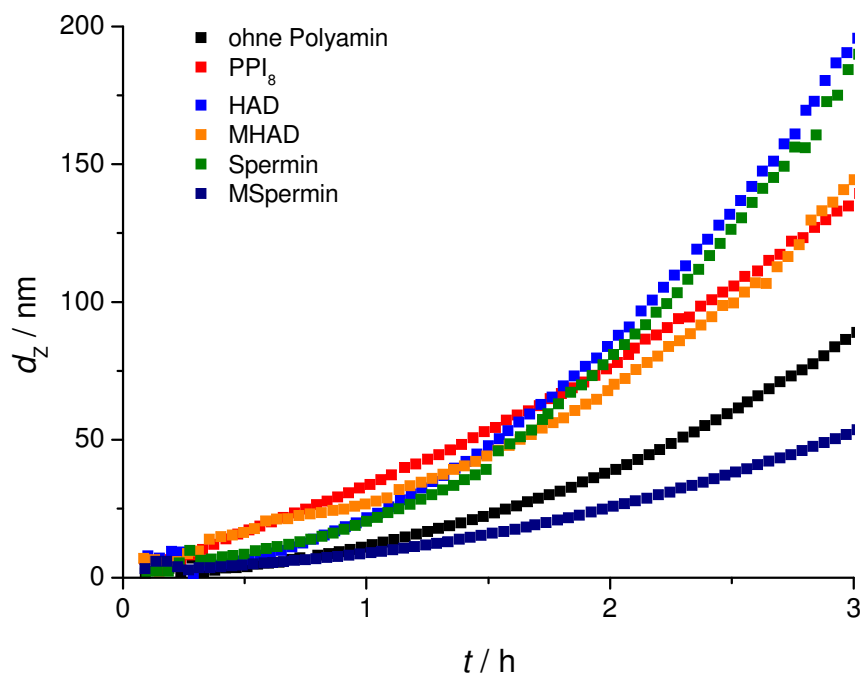


Abbildung 5.5: Z-Mittel aus den DLS-Messungen in Gegenwart von Polyaminen sowie aus der Referenzmessung ohne Polyamin. Die Kurven von PPI₈ und MHAD liegen im frühen Stadium der Reaktion über denen der anderen Polyamine.

Mit der Molybdat-Methode konnte kein Unterschied bei den kinetischen Kurven der verschiedenen Polyamine festgestellt werden. Die Ergebnisse der Dynamischen Lichtstreuung zeigen hingegen zu Beginn der Kondensationsreaktionen einen deutlichen Unterschied zwischen der Referenz und den Reaktionsabläufen in Gegenwart der Polyamine. JAHNS zufolge liegt dies hauptsächlich daran, dass mit diesen beiden Methoden zwei grundsätzlich unterschiedliche Prozesse der Kieselsäurekondensation betrachtet werden [96]. Die Molybdatmethode ist geeignet, um die Oligomerisierung der Kieselsäure zu untersuchen, während mit der Dynamischen Lichtstreuung die Partikelbildung beobachtet wird. Die hier erhaltenen DLS-Ergebnisse und die von JAHNS erzielten zeigen, dass erst nach Ende der Initialphase Partikel in den Lösungen mit Polyamin gefunden werden, so dass erst höher kondensierte Kieselsäurespezies in der DLS als Partikel in Erscheinung treten. Diese Teilchen sind jedoch nicht mehr molybdatreaktiv. Ihre Umwandlung zu Polyamin-Silica-Partikeln kann daher mit der Molybdatmethode nicht erfasst werden. Aus diesem Grund ist in den mit dieser Methode erhaltenen kinetischen Kurven weitgehend kein Unterschied zu beobachten.

Der Unterschied des Partikelwachstums in Gegenwart von Polyaminen zu Beginn der Reaktionen im Vergleich zur Referenz kann einer gewissen Aminaktivität zugesprochen werden. Aufgrund der Abwesenheit mehrfach geladener Anionen führt diese jedoch nicht zur Bildung von Polyamin-Aggregaten, die dann durch Kieselsäure mineralisiert würden. Da Polyamine jedoch eine hohe Affinität zur Kieselsäure aufweisen, werden in Abwesenheit von multivalenten Anionen einzelne Polyaminmoleküle von Silica eingeschlossen [96]. Bei diesen „silicatisierten Polyaminen“ handelt es sich wohl um jene kleine Partikel, die zu Beginn der Kondensation gefunden werden und die im weiteren Verlauf der Reaktion als Kondensationskeime fungieren. Bei der Reaktion einer Lösung ohne Amin konnten Partikel dieser Größe hingegen nicht festgestellt werden (siehe Abbildung 5.3a). Deshalb beginnt das Partikelwachstum in Gegenwart von Polyaminen zunächst schneller als bei der Referenz. In der Lösung ohne Polyamin fehlen die Kondensationskeime, dementsprechend ist die Partikelbildung verlangsamt.

Auch bei den Kondensationsreaktionen in Gegenwart von Polyaminen erfolgt das weitere Wachstum nach der anfänglichen Keimbildung durch Wechselwirkungen zwischen Amin und Kieselsäure durch normale Kondensationsreaktionen. Im

weiteren Reaktionsverlauf gehen die DLS-Kurven stark auseinander, so dass das Wachstum in Gegenwart aller Polyamine außer MSpermin zu höheren Werten für die Durchmesser führt als bei der Referenzmessung (Abbildung 5.5). Dieses Resultat ist vermutlich einerseits darauf zurückzuführen, dass bei den Reaktionen in Gegenwart von PPI₈, HAD, MHAD und Spermin gleich zu Beginn größere Kondensationskeime vorlagen als in der Reaktion unter Einfluss von MSpermin sowie ohne Polyamin. Im Laufe des weitergehenden Wachstumsprozesses ist daher vorstellbar, dass sich größere Solpartikel zusammenlagern und es so zur Bildung größerer Partikel kommt.

Mit der DLS lässt sich also zu Beginn der Reaktion ein schnelleres Partikelwachstum feststellen, wenn Polyamine zugegen sind. Dies gilt auch für die kurzkettigen Vertreter. Interessanterweise weisen aber die präzipitationsaktiven Amine PPI₈ und MHAD vor allem im frühen Stadium der Kondensation ein besonders schnelles Wachstum auf (siehe Abbildung 5.5). Dies könnte bedeuten, dass präzipitationsaktive Polyamine auch ohne multivalente Ionen eine außerordentlich starke Affinität zu Kieselsäure besitzen. So entstehen gleich nach Reaktionsstart besonders schnell von Silica eingeschlossene Polyaminmoleküle; diese können dann mit der DLS gemessen werden (Abbildung 5.3b und d). Diese Silicateilchen können sich dann im weiteren Verlauf zusammenlagern und so das Partikelwachstum im Rahmen des Sol-Prozesses beschleunigen. Dieser Effekt kann vermutlich auch mit der Kettenlänge dieser Polyamine in Zusammenhang gebracht werden. In Abbildung 5.6 ist der Einfluss von Polyaminen verschiedener Kettenlängen auf die Silicabildung schematisch dargestellt. Danach führt die Anlagerung von sehr kurzen Polyaminketten an negativ geladene Silicapartikel zur teilweisen Neutralisation von deren Ladung durch das positiv geladene Amin und folglich zur Destabilisierung des Sols [22,23]. Dem entspricht, dass auch für das kurze Spermin sowie das stark strukturverwandte HAD eine Steigerung der Partikelwachstumsgeschwindigkeit gemessen wurde. Längere Polyaminketten können hingegen sogar verbrückend wirken und so die Aggregation von Partikeln fördern; dadurch steigt die Partikelwachstumsgeschwindigkeit. Diese Annahme könnte somit erklären, warum im Falle des längeren PPI₈ ein besonders schnelles Partikelwachstum in einem sehr frühen Stadium der Reaktion beobachtet werden konnte. Im Falle des MHAD könnte zudem der hydrophobe Charakter aufgrund der Methylierung des Moleküls zu stärkeren Wechselwirkungen geführt haben.

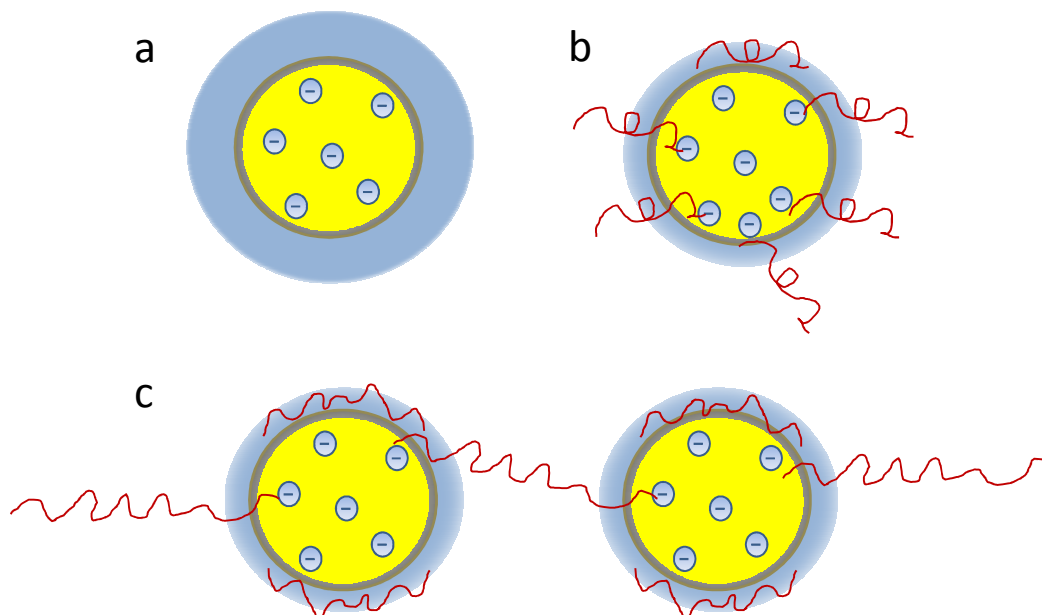


Abbildung 5.6: Schematische Darstellung des Effekts von Polyaminen auf die Silicabildung: a) Silicapartikel mit Doppelschicht bei der Abwesenheit jeglicher Additive; b) reduzierte Doppelschicht bei Anwesenheit kurzer Polyamine; die Reduktion der Doppelschicht fördert die Aggregation der Partikel; c) Brückenbildung zwischen den Partikeln bei Anwesenheit längerer Polyamine; die Brückenbildung fördert die Aggregation der Partikel stark. Nach Lit. [23].

Insgesamt gesehen kann zwar bei allen untersuchten Reaktionen ein langsames Partikelwachstum im Rahmen eines Sol-Gel-Prozesses beobachtet werden. Die Anwesenheit von Polyaminen übt dennoch eindeutig einen beschleunigenden Einfluss auf das Wachstum der Partikel aus. Bei den Reaktionen mit Polyamin werden in Abwesenheit multivalenter Anionen einzelne Polyaminmoleküle von Silica umschlossen, so dass schneller Kondensationskeime entstehen als in der Lösung ohne Polyamin. Hier ist allein der Sol-Gel-Prozess bestimmend.

5.1.3 Präzipitationsaktivität in Gegenwart von Phosphat

In diesem Abschnitt soll der Einfluss der Phosphatkonzentration auf den Verlauf von Kieselsäurekondensationsreaktionen in Gegenwart der zu untersuchenden Polyamine diskutiert werden. Die Polyamine wurden jeweils in der Konzentration $c_N = 2.3 \text{ mM}$ eingesetzt.

Wie schon zuvor erläutert, führt die Anwesenheit multivalenter Anionen durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken sowie durch elektrostatische Anziehung der

negativen Ladung der Anionen und den zum Teil protonierten Stickstoffatomen der Amine zur Bildung von Polyamin-Aggregaten. Diese Aggregate werden dann durch Kieselsäure mineralisiert und bilden ein Präzipitat. Für die Präzipitatbildung sind multivalente Anionen also zwingend erforderlich [68]. Als einfaches Modell für solche multivalenten Anionen kann Phosphat dienen, das beim hier relevanten pH-Wert überwiegend als Dihydrogenphosphat-Anion vorliegt. Zur Untersuchung dieses Effekts werden den Reaktionslösungen der Abbildung 4.6 entsprechend Phosphat-Anionen in Form von Natriumdihydrogenphosphat zugegeben und der Einfluss dieser Komponente mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung verfolgt. Diese Messungen sollen insbesondere Aufschluss über die Präzipitationsaktivität kurzkettiger Polyamine geben, die eine Kettenlänge von minimal vier bis acht Propylenimineinheiten aufweisen sowie über ihre methylierten Varianten. Diese Experimente sollen demnach vor allem zeigen, ob Polyamine kurzer Kettenlänge es vermögen, mineralisierbare Polyamin-Aggregate zu formen, wie es in Gegenwart längerer Polyamine in früheren Studien von JAHNS [96] gezeigt werden konnte.

Für die Darstellung der Ergebnisse der DLS-Messungen wird im Folgenden die Auswertung in Form der Z -Mittel gewählt, wobei über alle in der Lösung vorhandenen Partikeldurchmesser gemittelt und ein durchschnittlicher Wert erhalten wird. Auf diese Weise können mehrere Messungen in einfacher Weise miteinander verglichen werden. In Abbildung 5.7 ist der Verlauf der Z -Mittel der Reaktion in Gegenwart von PPI_8 in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration gezeigt, die Abbildung 5.8 zeigt die Anzahlverteilungen für diese Reaktion in Gegenwart von 10 und 100 mM Phosphat. Während bei der Zugabe von bis zu 20 mM Phosphat lediglich der übliche Sol-Gel-Prozess zu beobachten ist, kann bei größeren Phosphatkonzentrationen recht schnell nach dem Reaktionsbeginn die Bildung von Präzipitat beobachtet werden, also die Bildung von Polyamin-Phosphat-Aggregaten, die bei der Adsorption von Kieselsäure im weiteren Verlauf ein Präzipitat bilden. Diese Ergebnisse decken sich mit denjenigen aus den Präzipitationsexperimenten, auch hier konnte erst ab einer Zugabe von 30 mM Phosphat ein Präzipitat isoliert werden (siehe Tabelle 5.1).

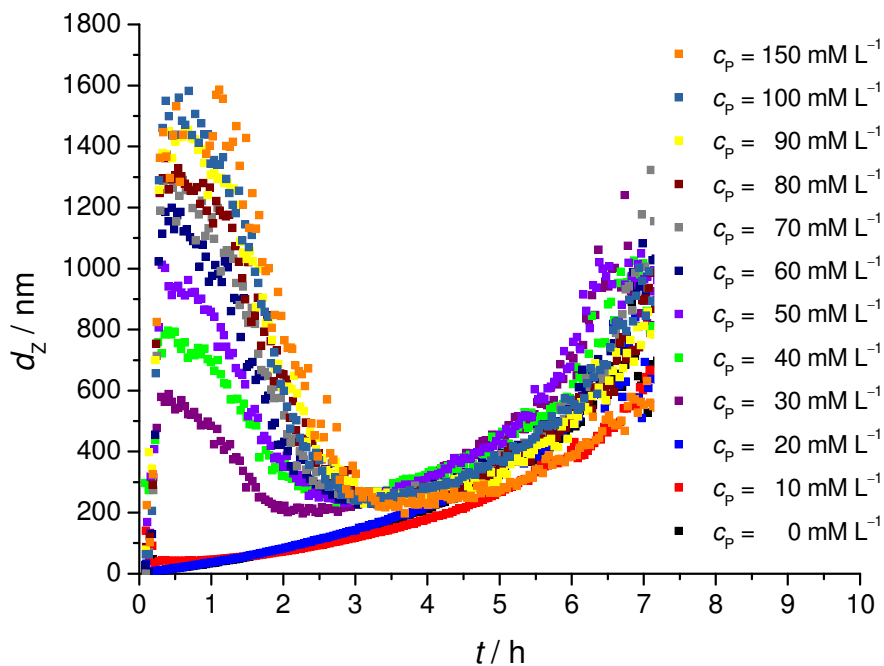


Abbildung 5.7: Aus DLS-Messungen erhaltenen Z-Mittel für die Kieselsäurekondensation in Gegenwart von PPI_8 in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration.

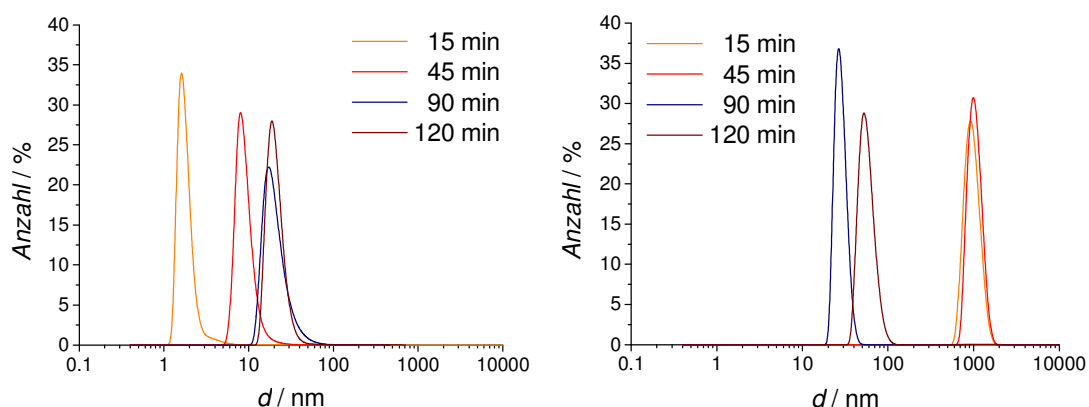


Abbildung 5.8: Anzahlverteilungen der Partikelgrößen aus der Dynamischen Lichtstreuung für die Reaktionen in Gegenwart von PPI_8 sowie 10 bzw. 100 mM Phosphat in Abhängigkeit von der Zeit. Langsames Partikelwachstum in Gegenwart von 10 mM Phosphat (links); bei Zugabe von 100 mM Phosphat sind bereits nach 15 min etwa 1000 nm große Partikel vorhanden (rechts).

Bei den Anzahlverteilungen bewirkt der Zusatz hoher Phosphatmengen einen rapiden Anstieg der Partikelgrößen, in Gegenwart von 100 mM Phosphat können bereits nach 15 min Partikel um 1000 nm beobachtet werden. Die Auswertung der Messungen in Abhängigkeit von der Zeit zeigt im Vergleich zu den Z-Mitteln (Abbildung 5.7) deutlich, dass mit steigender Phosphatkonzentration auch die

Wachstumsgeschwindigkeit bei der Bildung der Partikel steigt. Diese Geschwindigkeit könnte dementsprechend eine Aktivität des betrachteten Polyamins repräsentieren.

Des Weiteren zeigt sich wie in früheren Untersuchungen, dass der Partikeldurchmesser strikt von der Phosphatkonzentration bestimmt wird [74,96]. Lediglich bei der höchsten Phosphatkonzentration von $c_P = 150$ mM erfolgt kein weiterer Anstieg der Partikeldurchmesser. Auch JAHNS stellte bei der Untersuchung von PMPI_{20} im acetat-gepufferten System ($\text{pH} = 4.7$) fest, dass ab einer bestimmten Höhe der Phosphatkonzentration keine größeren Partikeldurchmesser mehr resultieren [96]. Bei den Wachstumskurven, die bei Zugaben von mehr als 30 mM Phosphat erhalten wurden, ist zu Beginn der Reaktion ein steiler Anstieg auf einen Maximalwert zu beobachten. Auch dies spricht dafür, dass hier von einer Aggregatbildung in den Lösungen auszugehen ist. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, zum Beispiel mit PMPI_9 [203], zeigen die Kurven keinen plateauähnlichen Verlauf, sondern fallen nach Erreichen des Maximalwertes relativ schnell wieder ab; es liegt eher ein spitzbogenförmiger Verlauf der Kurven vor. Bei Wachstumskurven ab 60 mM Phosphat ist diese Form noch ausgeprägter. Die Partikeldurchmesser sinken im weiteren Verlauf der Reaktion, da die jeweils größten Partikel auf den Boden der Küvette sedimentieren und nicht mehr vom Laserstrahl erfasst werden. Werden bei hohen Phosphatkonzentrationen sehr schnell sehr große Partikel gebildet, so sind die maximalen Größen nur sehr kurz zu beobachten. Nach jeweils etwa sechs bis sieben Stunden ist eine zunehmende Streuung der Messwerte zu beobachten, die mit der beginnenden Gelierung zu begründen ist.

Insgesamt ist das Präzipitationsverhalten bzw. die -aktivität von PPI_8 sicherlich noch eher den Eigenschaften langkettiger Polyamine (zehn bis zwanzig Propylenimineinheiten) zuzuordnen, wenn die Auswertung der DLS-Messungen auch leichte Unterschiede zum Präzipitationsverhalten von zum Beispiel PMPI_9 oder längeren Polyaminen aufweist [203]. So konnte dort schon mit der Zugabe von 10 mM Phosphat ein ausgeprägtes Präzipitationsverhalten beobachtet werden, mittels DLS werden für diese Konstellation Partikeldurchmesser im Bereich von 1200 nm konstatiert. Im Falle von PPI_8 bildet sich erst ab 30 mM Phosphatzugabe ein Präzipitat mit einer Partikelgröße von etwa 600 nm. In Tabelle 5.2 sind die erhaltenen Partikeldurchmesser d_Z und $d_{Z_{\max}}$, wie sie in Gegenwart einiger linearer

Polyamine erhalten werden, einander gegenüber gestellt. Dabei handelt es sich bei d_Z um die Z -Mittel bei der gegebenen Phosphatkonzentration c_P , $d_{Z_{\max}}$ gibt die maximalen ermittelten Z -Mittel im betreffenden Polyamin-Phosphat-System an. Daraus ist zu entnehmen, dass längere Polyamine bereits in Gegenwart geringerer Phosphatkonzentrationen Präzipitatbildung induzieren und die Partikeldurchmesser insgesamt auch größere Maximalwerte erreichen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sie größere Aggregate bilden, die dann zu größeren Partikeln mineralisiert werden. Die Abnahme der Kettenlänge führt zudem zu verminderten hydrophoben Eigenschaften der Polyamine, ein Einfluss, der bei der Bildung von stabilen Polyamin-Aggregaten nicht zu vernachlässigen ist. Im Gegenteil, Arbeiten von PERRY et al. zeigen, dass mit steigender Zahl der Aminogruppen sowie steigender Länge des Alkylspacers stabilere Polyamintröpfchen in Lösung entstehen [21,22].

Tabelle 5.2: Übersicht über aus DLS-Messungen erhaltene Partikeldurchmesser d_Z bei gegebener Phosphatkonzentrationen c_P sowie die in dem betreffenden Polyamin-Phosphat-System beobachteten maximalen Partikeldurchmesser $d_{Z_{\max}}$ in Gegenwart von verschiedenen langen Polyaminen. Werte für PMPI₁₄ und PMPI₉ wurden aus Lit. [203] entnommen.

| Polyamin | c_P / mM | d_Z / nm | $d_{Z_{\max}}$ / nm |
|--------------------|------------|------------|---------------------|
| PMPI ₁₄ | 10 | 2400 | 2000 |
| PMPI ₉ | 10 | 1250 | 2600 |
| PPI ₈ | 30 | 600 | 1600 |
| MHAD | 30 | 230 | 500 |
| HAD | * | – | – |

*bei allen untersuchten Phosphatkonzentrationen

Die etwas verminderte Aggregations- und Präzipitationsaktivität von PPI₈ könnte auch in der Struktur des Polyamins begründet sein, denn es liegt unmethyliert vor. Dementsprechend sollten die Aminogruppen weniger leicht protonierbar sein, als bei den zuvor diskutierten methylierten PMPIs. Für die Bildung von Polyamin-Aggregaten als Folge von elektrostatischen Wechselwirkungen ist das Vorhandensein solcher positiver Ladungen jedoch unabdingbar [65,68]. Weiterhin bestimmt der Methylierungsgrad wesentlich den hydrophoben Charakter eines

Polyamins. Hier zeigen Untersuchungen an Polyaminen mit diversen Methylierungsgraden, dass mit Erhöhung der Methylierungsdichte stabilere Polyamintröpfchen gebildet werden [21]. Daher ist es durchaus denkbar, dass das unmethylierte PPI₈ aufgrund dieser Faktoren nicht im gleichen Maße fähig ist, mineralisierbare Polyamin-Aggregate zu formen, wie methylierte Polyamine, wie zum Beispiel PMPI₉, welches nur um eine Imineinheit verlängert ist. Dafür spricht auch, dass erst bei etwas höheren Phosphatkonzentrationen Präzipitatbildung auftritt. Daher lassen sich die Ergebnisse der Dynamischen Lichtstreuung im Fall von PPI₈ nicht ausschließlich auf die kürzere Kettenlänge zurückführen.

Umfassendere Erkenntnisse über die Präzipitationsaktivität von kurzen Polyaminen lassen sich über die Betrachtung weiterer kurzkettiger Polyamine gewinnen. In den nachfolgenden Abbildungen sind die Ergebnisse aus der Dynamischen Lichtstreuung für den Verlauf der Z-Mittel der Reaktionen in Gegenwart von Hexaazadocosan (HAD) und dessen methylierter Variante MHAD in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration gezeigt. Diese Polyamine entsprechen strukturell PPI₆ bzw. PMPI₆ und weisen einen Putrescin-Rest in der Mitte des Moleküls auf (siehe Abschnitt 2.1.3). Im Vergleich zum vorher diskutierten PPI₈ sind diese Polyamine jeweils um zwei Propylenimineinheiten reduziert, wobei aufgrund der Herstellung von PPI₈ durch eine Polymerisationsreaktion eine breite Verteilung des Polymerisationsgrades zu berücksichtigen ist, die zu einem Polyamingemisch führt, das auch etwas längere Polyminketten enthält. Die in diesem Polyamingemisch enthaltenen längeren Polyaminketten tragen in gewissem Umfang zum Aggregations- und Präzipitationsverhalten von PPI₈ bei. In Abbildung 5.9 ist anhand der Z-Mittel für die Kondensationsreaktion in Gegenwart von Phosphat und HAD lediglich ein normales Sol-Gel-Wachstum zu beobachten. Die Anzahlverteilungen aus der Dynamischen Lichtstreuung sind zeitabhängig in der Abbildung 5.10 dargestellt. Sie zeigen hier ein etwas schnelleres Wachstum von Solpartikeln mit der Steigerung der Phosphatkonzentration. Obwohl dieses Polyamin in den Präzipitationsexperimenten keine Aktivität gezeigt hatte, scheint die Anwesenheit von multivalenten Ionen dennoch einen Einfluss auf die Kondensation zu haben. Aus der Verkürzung des zu untersuchenden Polyamins um zwei Imineinheiten folgt also insgesamt ein signifikanter Abfall der Präzipitationsaktivität im Vergleich zu PPI₈. Polyamine dieser Kettenlänge sind somit nicht in der Lage unter den gegebenen Reaktionsbedingungen mineralisierbare Polyamin-Phosphat-Aggregate zu bilden.

Verbunden mit der Reduktion der Kettenlänge ist auch die Reduktion des hydrophoben Charakters des Polyamins. Dies macht mögliche Polyamin-Phosphat-Aggregate instabiler, so dass diese nicht mehr aufgrund elektrostatischer Interaktionen zwischen den protonierten Aminogruppen und den Phosphationen stabilisiert werden können. Wie mit Hilfe der Abbildung 5.6 bereits erläutert, führt die sinkende Kettenlänge wahrscheinlich zu weniger verbrückten Teilchen wie es in Gegenwart längerer Polyamine der Fall ist. Im Laufe der Kondensationsreaktion bildet sich dann ein Gel. Aus diesen Ergebnissen lässt sich somit weiter schlussfolgern, dass für die Präzipitationsaktivität von Polypropylenimininen (PPIs) die Kettenlänge von größter Relevanz ist. Während PPI₈ noch ausgeprägte Präzipitationsaktivität zeigt, kann diese unter analogen Bedingungen im Fall von PPI₆ nicht mehr beobachtet werden. Laut PERRY bestimmt das Verhältnis des hydrophoben Charakters zur Ladung des betreffenden Amins entscheidend seine Kontrolle über die Kondensationsreaktion und die Morphologie der Produkte [21]. So ließen sich durch Änderungen des pH-Wertes der Protonierungsgrad und damit verbunden das Verhältnis der Hydrophobizität zur Ladung einstellen und somit die Aktivität eines Polyamins modulieren.

Bezeichnenderweise ändert sich das Verhalten beim Übergang von HAD zu dessen methylierter Variante. Mit Hilfe der DLS kann in der Reaktionslösung die Bildung eines Aggregates verfolgt werden (Abbildung 5.11): Die Wachstumskurven zeigen kurz nach Reaktionsbeginn einen dafür typischen steilen bogenförmigen Verlauf auf. Analog zu den Beobachtungen aus der Reaktion in Gegenwart von PPI₈ kann ab der Zugabe von 30 mM Phosphat ein solcher Anstieg in den Wachstumskurven festgestellt werden. Die Partikelgröße erreicht einen maximalen Wert von etwa 500 nm, also nur ein Drittel so groß wie im Fall von PPI₈. Typischerweise steigen auch hier die erhaltenen Partikeldurchmesser mit der Phosphatkonzentration an.

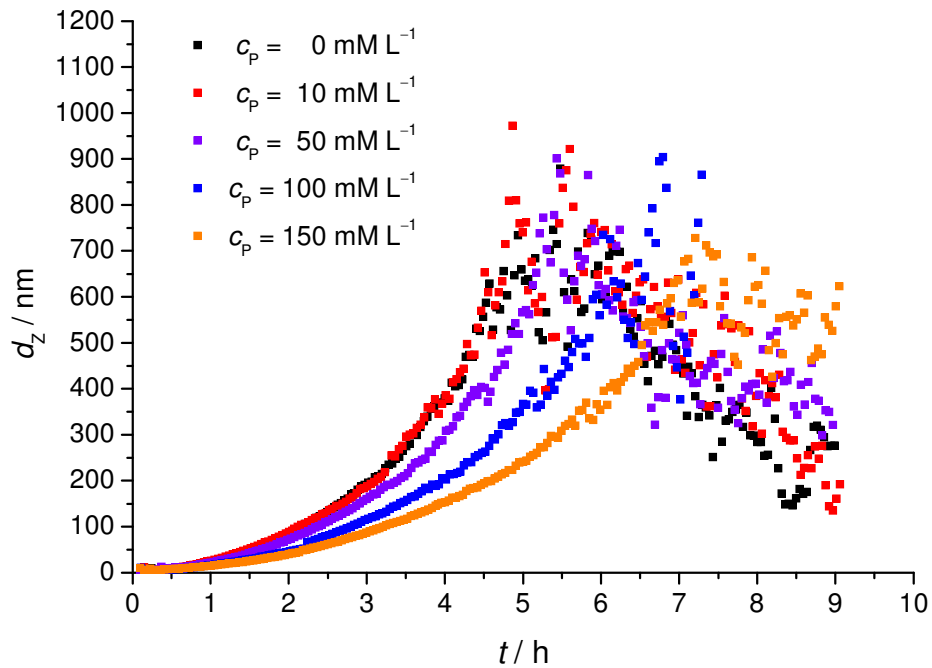


Abbildung 5.9: Ergebnisse der DLS-Messungen in Form der erhaltenen Z-Mittel für die Kieselsäurekondensation in Gegenwart von HAD in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration.

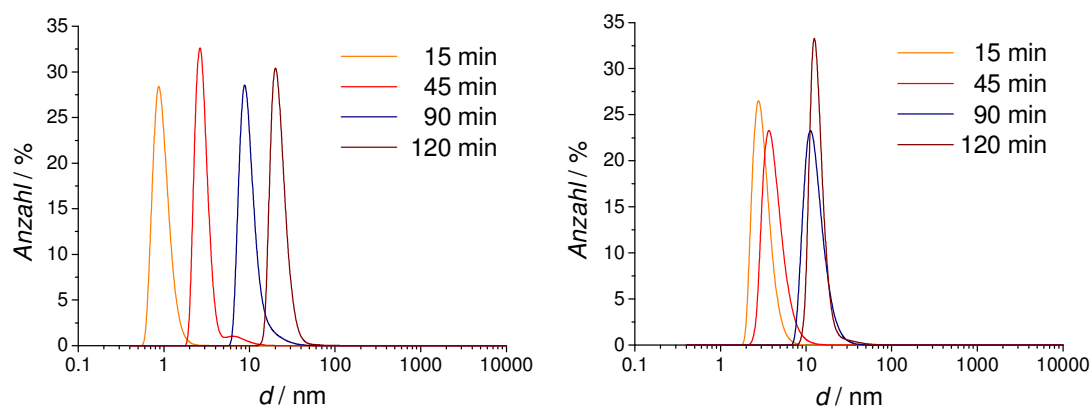


Abbildung 5.10: Anzahlverteilungen der Partikelgrößen aus der Dynamischen Lichtstreuung für die Reaktionen in Gegenwart von HAD in Gegenwart von 10 bzw. 100 mM Phosphat. Obwohl HAD sich als präzipitationsinaktives Polyamin gezeigt hat, ist in Gegenwart hoher Phosphatkonzentration (rechts) schnelleres Partikelwachstum zu beobachten.

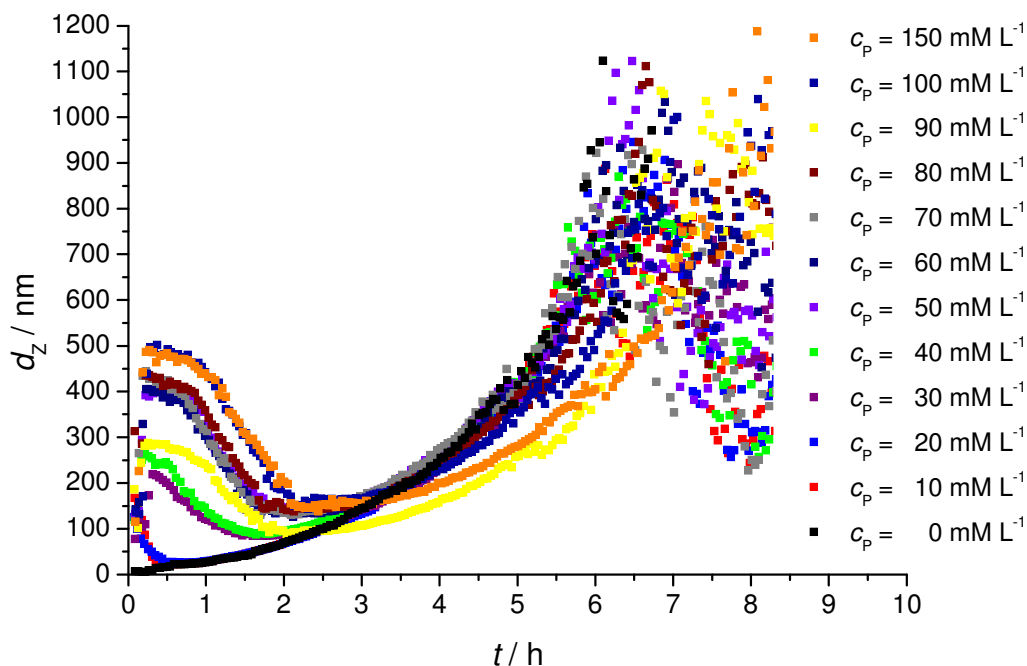


Abbildung 5.11: Ergebnisse der DLS-Messungen in Form der erhaltenen Z-Mittel für die Kieselsäurekondensation in Gegenwart von MHAD in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration.

Die Anzahlverteilungen für MHAD zeigen analog zu den Resultaten aus den Messungen für PPI₈ eine hohe Beschleunigung für das Wachstum der Partikel in Gegenwart von 100 mM Phosphat (Abbildung 5.12).

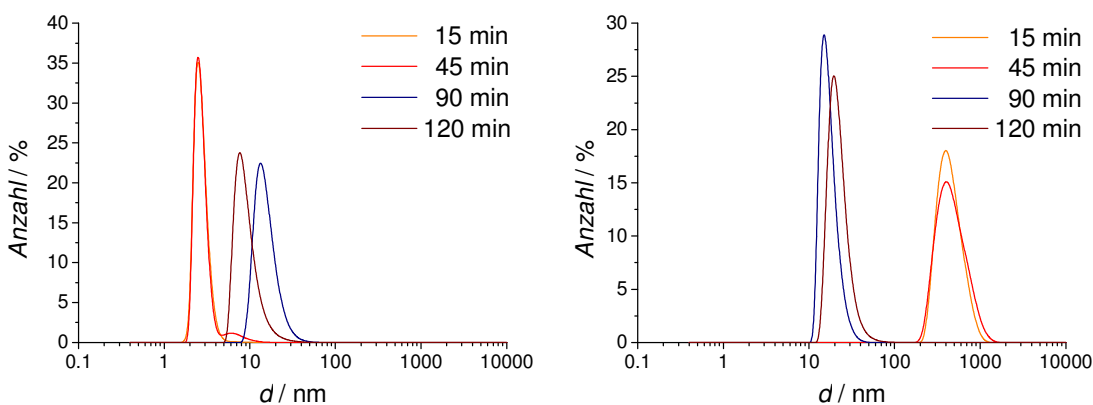


Abbildung 5.12: Anzahlverteilungen der Partikelgrößen aus der Dynamischen Lichtstreuung für die Reaktionen in Gegenwart von MHAD sowie 10 bzw. 100 mM Phosphat. Nach anfänglicher Reaktion verschiebt sich bei der Zugabe von 10 mM der Peak nur langsam Richtung größerer Partikel (links), das Partikelwachstum geht relativ langsam vonstatten. Bei der Reaktion mit 100 mM Phosphat sind die Partikel nach 15 min rapide auf durchschnittlich 900 nm angewachsen (rechts).

Aus diesen Erkenntnissen heraus können an dieser Stelle verschiedene Aspekte für die Präzipitationsaktivität von kurzen Polyaminen diskutiert werden. Zum einen gibt es im Falle der PPIs offensichtlich eine Mindestkettenlänge, die bei wenigstens acht Propylenimineinheiten liegt. In Gegenwart kürzerer PPIs kommt es nicht zur Ausbildung von Polyamin-Aggregaten mit anschließender Mineralisation. Bedingt sowohl durch die kurze Kettenlänge als auch durch den somit reduzierten hydrophoben Charakter können sich vermutlich keine knäuelartigen Templatstrukturen formieren, die dann in Folge der Kondensation mineralisiert würden. Der hydrophobe Effekt reguliert zum Beispiel *in vivo*-Prozesse wie Proteinfaltung sowie Protein-Substrat-Interaktionen [207,208]. BRAIBANTI et al. sprechen in ihren Arbeiten von einem kooperativen Effekt aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen für die Einführung von Ladungen in Polyaminketten [209]. Dieser ist von der Länge des Moleküls abhängig, wobei bei kurzen Molekülketten die Gegenwart einer positiven Ladung die Einführung weiterer positiver Ladungen erschwert. Wenn dann zudem nur wenige Aminogruppen protoniert vorliegen, können kurze Polyamine wahrscheinlich zusätzlich konformationsbedingt schlechter miteinander wechselwirken als längere Polyamine, die sich stärker verformen können.

Zum anderen zeigen die Ergebnisse, dass für PMPIs andere Gesetzmäßigkeiten vorherrschen. Hier ist die Kettenlänge von sechs Propylenimineinheiten noch ausreichend, um eine Präzipitatbildung zu induzieren. Dieses kann nur in der Struktur der PMPIs begründet sein, die methylierte Aminogruppen enthalten, welche beim vorliegenden pH-Wert von 5.5 leichter protonierbar sind als nicht methylierte Aminogruppen. Dies führt also zu höher geladenen Molekülen. Aber auch die bereits zuvor diskutierten hydrophoben Effekte werden verstärkt. Untersuchungen von PERRY ergaben, dass Ladungsverhältnisse und hydrophobe Eigenschaften methylierter Polyamine durch den pH-Wert beeinflusst werden können, was hauptsächlich auf den Protonierungsgrad zurückgeführt wird. So kann die Ladungsdichte methylierter Polyamine, die unter neutralen Bedingungen lediglich bis zu 50 % geladen vorliegen, bei Absenken des pH-Wertes auf 5.6 auf bis zu 70 % gesteigert werden [21]. Dabei bleibt der hydrophobe Charakter bis zu 85 % bestehen. Diese Ergebnisse beruhen auf algorithmischen Berechnungen basierend auf der chemischen Strukturtheorie der entsprechenden Verbindungen beim gegebenen pH-Wert. Auch Untersuchungen von SOMASUNDARAN an Polyethylenimininen zeigen,

dass mit sinkendem pH-Wert die Protonierung der primären, sekundären und tertiären Aminogruppen zunimmt [210].

Interessant ist auf jeden Fall, dass die in Reaktionen mit MHAD beobachteten Partikelgrößen wesentlich kleiner sind als im Fall von PPI₈, wie ein Vergleich der in Tabelle 5.3 aufgeführten Werte zeigt: absteigend mit der Anzahl der Imineinheiten der betrachteten Polyamine sinken auch die maximal erhaltenen Partikeldurchmesser. Somit bilden sich mit kürzerer Kettenlänge der Polyamine anscheinend auch kleinere mineralisierbare Polyamin-Aggregate bzw. kleinere Templatstrukturen. Aufgrund dessen liegt die Vermutung nahe, dass sich durch die Kettenlänge der Polyamine die Größe der entstehenden sphärischen Partikel regulieren lässt. Studien von SUMPER und JAHNS zeigten in Experimenten mit Additiven wie Poly(allylamin)hydrochlorid (PAH) [211] sowie linearen Polyaminen [96], dass in Abwesenheit von Phosphationen wesentlich kleinere Silica-Partikel entstehen, die in ihrer Größe wahrscheinlich einzelnen silifizierten Additivmolekülen entsprechen könnten. Somit könnte die Partikelgröße nicht nur mit der Phosphatkonzentration korrelieren, sondern auch von der Molekülgröße bzw. der Kettenlänge der Additive abhängen. Zahlreiche Präzipitationsuntersuchungen zeigten bereits, dass die Durchmesser der erhaltenen Partikel sowohl von der eingesetzten Menge an multivalenten Ionen als auch von der Zusammensetzung des eingesetzten Polyamingemisches abhängen [13,15,17,65,74]. Somit wäre es durchaus möglich, Partikelgrößen während des Sol-Prozesses auch durch die Molekülgröße der eingesetzten Polyamine einzustellen.

Um abschließende Aussagen über eine mögliche kettenlängenabhängige Grenzaktivität von Polyaminen treffen zu können, wurden Untersuchungen an noch kürzeren Polyaminen wie Spermin und an dessen methylierter Form MSpermin vorgenommen. Die vorher diskutierten Ergebnisse aus den Experimenten mit HAD und MHAD haben gezeigt, dass auch kürzere Polyamine durchaus noch präzipitationsaktiv sein können. Für weitere Untersuchungen eignen sich also Additive wie Spermin, welches strukturell als „PPI₄“ bezeichnet werden könnte, aber wie das Hexaazadocosan einen Putrescin-Rest beinhaltet. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass Putrescin-Abkömmlinge wie Spermin und Spermidin in den Diatomeen häufig vertreten sind [66]. Spermine und deren Abkömmlinge tragen konsequente Propyleniminingruppen, wie sie auch für langkettige Polyamine

charakteristisch sind [13,14]. Methyliertes Spermin („PPI₄“) wurde gemäß Abschnitt 4.1.8 synthetisch dargestellt.

Die Ergebnisse der DLS-Messungen für Spermin und für dessen methylierte Variante sind in Abbildung 5.13 und 5.15 dargestellt. Die Ergebnisse der DLS-Messungen zeigen in beiden Fällen kein starkes anfängliches Partikelwachstum, wie dies im Fall von MHAD noch deutlich beobachtet werden konnte. Dies entspricht den Ergebnissen der Präzipitationsexperimente. Für Spermin ergibt die Betrachtung der Anzahlverteilungen ein ähnliches Wachstumsverhalten wie im Fall von HAD (Abbildung 5.14). Der Sol-Gel-Prozess geht nur langsam voran, auch wenn zu Beginn die Reaktion etwas schneller voranschreitet als ohne Phosphatzusatz (Abbildung 5.3e). Für MSpermin ergibt sich ein beschleunigtes Wachstum der Solpartikel in Gegenwart niedriger Phosphatkonzentrationen. Die Erhöhung der Phosphatkonzentration auf 100 mM führt zu Beginn zu einer leichten Herabsetzung der Wachstumsgeschwindigkeit (Abbildung 5.16). Auch in diesem Fall gilt, dass das präzipitationsinaktive MSpermin von Phosphatzusätzen beeinflusst wird. Insgesamt wird die Kondensation im Vergleich zur Referenzmessung und zu den Ergebnissen in Gegenwart von Spermin und HAD beschleunigt.

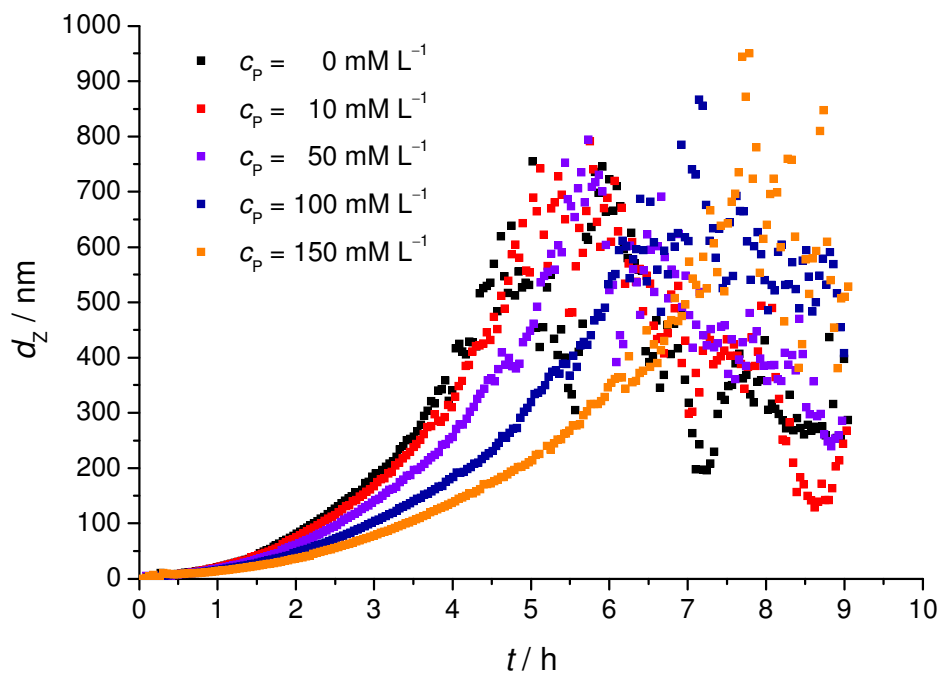


Abbildung 5.13: Ergebnisse der DLS-Messungen in Form der erhaltenen Z-Mittel für die Kieselensäurekondensation in Gegenwart von Spermin in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration.

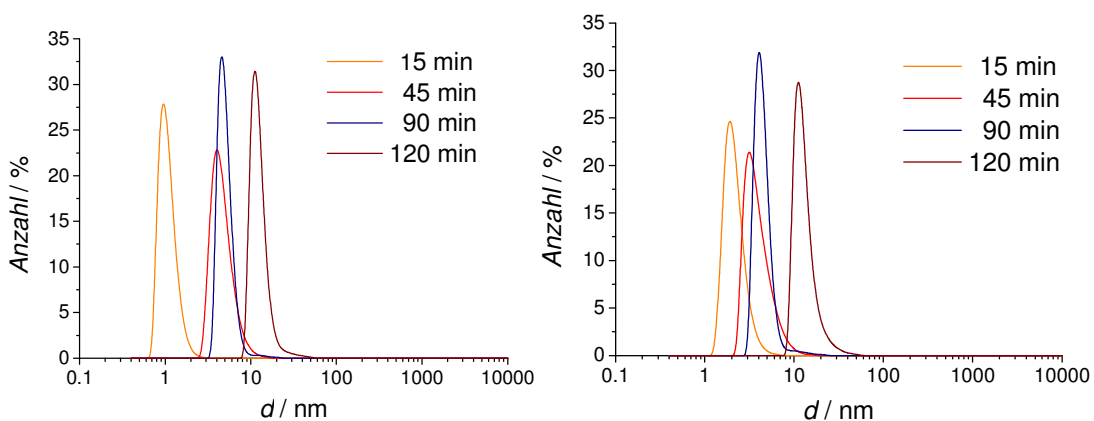


Abbildung 5.14: Anzahlverteilungen der Partikelgrößen aus der Dynamischen Lichtstreuung für die Reaktionen in Gegenwart von Spermin sowie 10 bzw. 100 mM Phosphat. In Gegenwart von 10 mM Phosphat (links) kann ein etwas schnelleres Partikelwachstum als unter Einfluss der höheren Konzentration festgestellt werden (rechts).

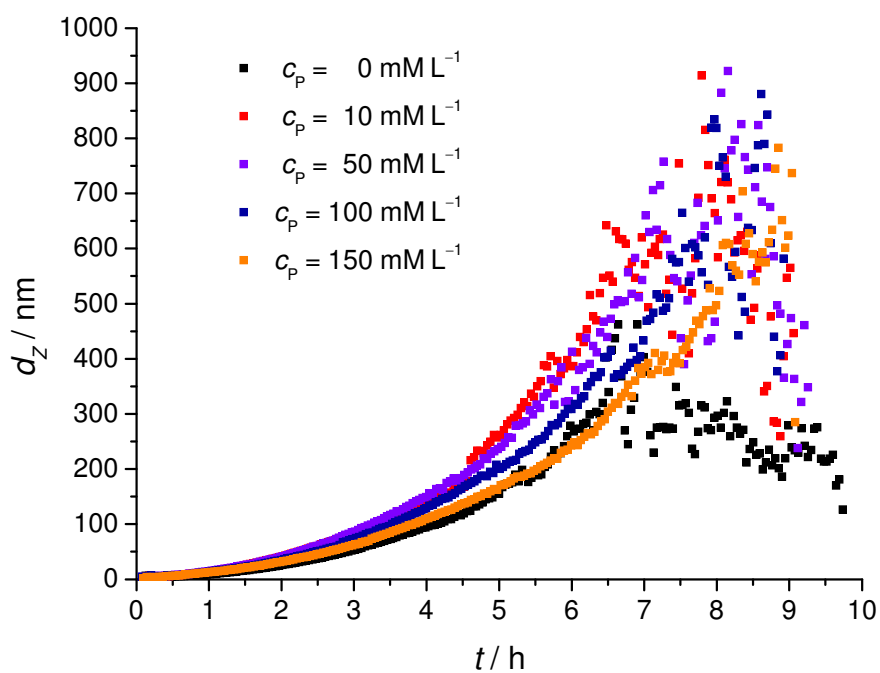


Abbildung 5.15: Ergebnisse der DLS-Messungen in Form der erhaltenen Z-Mittel für die Kieselsäurekondensation in Gegenwart von MSpermin in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration.

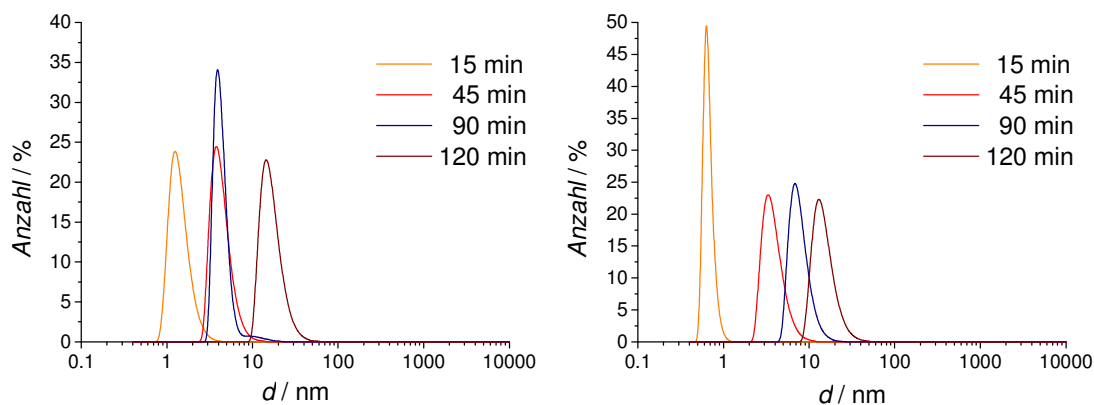


Abbildung 5.16: Anzahlverteilungen der Partikelgrößen aus der Dynamischen Lichtstreuung für die Reaktionen in Gegenwart von MSpermin sowie 10 bzw. 100 mM Phosphat. In Gegenwart von 10 mM Phosphat (links) kann zu Beginn ein etwas schnelleres Partikelwachstum als unter Einfluss der höheren Konzentration festgestellt werden (rechts). Auf lange Sicht läuft die Kondensation mit 100 mM Phosphat im Vergleich schneller ab.

Die Reduktion der Kettenlänge auf vier Propylenimineinheiten bzw. Methylpropylenimineinheiten in linearen Polyaminen wie Spermin bzw. MSpermin ist also mit einem signifikanten Verlust der Präzipitationsaktivität verbunden. Eine ähnliche Beobachtung wurde von PERRY und Mitarbeitern bei der Untersuchung von Putrescin-Homologen gemacht [22]. Dort wurde bei Untersuchungen an Kieselsäurekondensationsreaktionen von 1,4-Diaminobutan und 1,6-Diaminohexan unter neutralen Reaktionsbedingungen ein rapider Abfall beim Wachstum von Solpartikeln für das erstere Molekül festgestellt. Dieser unterschiedliche Einfluss auf die Bildung der Solpartikel wurde überwiegend dem kettenlängenabhängigen hydrophoben Effekt zugesprochen, der im Fall von 1,4-Diaminobutan relativ gering sein sollte.

So kann in beiden Fällen lediglich eine langsame Gelierung im Rahmen des Sol-Gel-Prozesses beobachtet werden. Auffällig ist allerdings, dass im Fall von Spermin mit steigender Phosphatkonzentration im Vergleich zur Referenzmessung ohne Phosphat ein langsames Sol-Gel-Wachstum gemessen wird. Die Solpartikel wachsen in Gegenwart von Phosphat wesentlich langsamer, die Gelierungszeit wird durch den Zusatz quasi verlängert. Dies ist vor allem daran zu sehen, dass die Werte der Messungen für die Reaktionen mit Phosphat sehr viel später anfangen zu streuen als die der Referenzmessung. Im Falle von MSpermin liegen umgekehrte Verhältnisse vor. Die steigende Phosphatkonzentration scheint die Wachstumsreaktionen im Vergleich zur Referenzmessung leicht zu beschleunigen. Ein Grund hierfür könnte

wiederum ein etwas stärkerer hydrophober Effekt der methylierten Spezies sein, der dann leichter zur Bildung von Kondensationskeimen führt. Zusammenfassend zeigen die Messungen mittels Dynamischer Lichtstreuung für PPI₈ und der methylierten Variante von Hexaazadocosan, MHAD, eine schnelle Bildung größerer Partikel an. Auch bei den Präzipitationsexperimenten wurde für diese beiden Polyamine eine Aktivität beobachtet, die sich in Form einer Silicafällung äußerte, auch wenn im Falle von MHAD kein Präzipitat isoliert werden konnte (Abschnitt 5.1). In beiden Fällen zeigen die Kurvenverläufe der Z-Mittel eindeutig die Entstehung von großen Partikeln, wohingegen die Messungen unter Einfluss von Hexaazadocosan keine Anzeichen für eine Aktivität dieses Polyamins lieferten. Als Schlussfolgerung folgt daraus, dass im Falle der PPIs ein Polypropylenimin aus mindestens acht Imineinheiten bestehen muss, um bei pH = 5.5 aggregations- und präzipitationsaktiv zu sein. Die PMPIs sind den Ergebnissen zufolge mit sechs Methylimineinheiten immer noch aktiv, wobei diese Aktivität bereits deutlich eingeschränkt ist, wenn man bedenkt, dass die Partikel gegenüber PPI₈ sehr viel kleiner sind und die Isolierung eines Präzipitates nicht mehr gelingt. Eine wesentliche Begründung dafür, warum hier unterschiedliche Kettenlängen für die Polyaminaktivität relevant sind, könnte der hydrophobe Charakter der Polyamine sein, der im Falle von MHAD sicherlich etwas ausgeprägter ist [21].

Die Messungen an Hexaazadocosan, Spermin sowie an methyliertem Spermin zeigten, dass Phosphat auch hier einen gewissen Einfluss auf den Verlauf der Kieselsäurekondensation aufweist. Obwohl diese Polyamine keine Aggregations- und Präzipitationsaktivität aufwiesen, wurde durch steigende Konzentrationen an Phosphat die Kondensationsgeschwindigkeit im Fall von HAD und Spermin vermindert, während jene von MSpermin eine Steigerung erfuhr.

5.1.4 Morphologische Untersuchung der Präzipitate

In den Abbildungen 5.17 bis 5.20 sind die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Präzipitate gezeigt, die aus Präzipitationsversuchen in Gegenwart von PPI_8 bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen erhalten wurden. PPI_8 ist mit seinen acht Propylenimineinheiten ein sehr kurzes Polyamin, welches dennoch unter den gegebenen Bedingungen fähig ist, Silica auszufällen (siehe Abschnitte 5.1 und 5.1.3). Die Anwesenheit multivalenter Anionen ist ausschlaggebend für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken und der elektrostatischen Anziehung zwischen der negativen Ladung der Anionen und den teilweise protonierten Stickstoffatomen der Amine, die zur Bildung von Polyamin-Aggregaten führen. Diese Aggregate werden dann durch Kieselsäure mineralisiert und bilden ein Präzipitat.

In Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration, welche zwischen 10 und 150 mM variiert wurde, konnten in einigen Fällen sphärische Partikel isoliert werden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit früheren Resultaten aus unserer Gruppe von JAHNS und KUFELT, die ebenfalls Untersuchungen an Präzipitaten unternahmen, die unter Einfluss verschiedener linearer Polyamine isoliert wurden [96,203]. In der Abbildung 5.20 ist eine REM-Aufnahme eines Präzipitates gezeigt, welches in Gegenwart von PMPI_9 und 100 mM Phosphat erhalten wurde [203]. Diese Partikel sind hinsichtlich der Morphologie und der Partikelgröße vergleichbar mit den Eigenschaften jener Partikel, die in Gegenwart von PPI_8 und 100 mM Phosphat entstanden sind. PMPI_9 ist hinsichtlich der Kettenlänge im ähnlichen Bereich wie PPI_8 einzuordnen, wobei es allerdings aus methylierten Propylenimineinheiten besteht. Die in diesen beiden Fällen erhaltenen Partikel weisen neben einigen Verwachsungen eine recht gut definierte, sphärische Partikelform auf. Ein methyliertes Polyamin dieser Kettenlänge zeigt also hinreichend viele Wechselwirkungen mit Phosphatanionen, um Silica auszufällen.

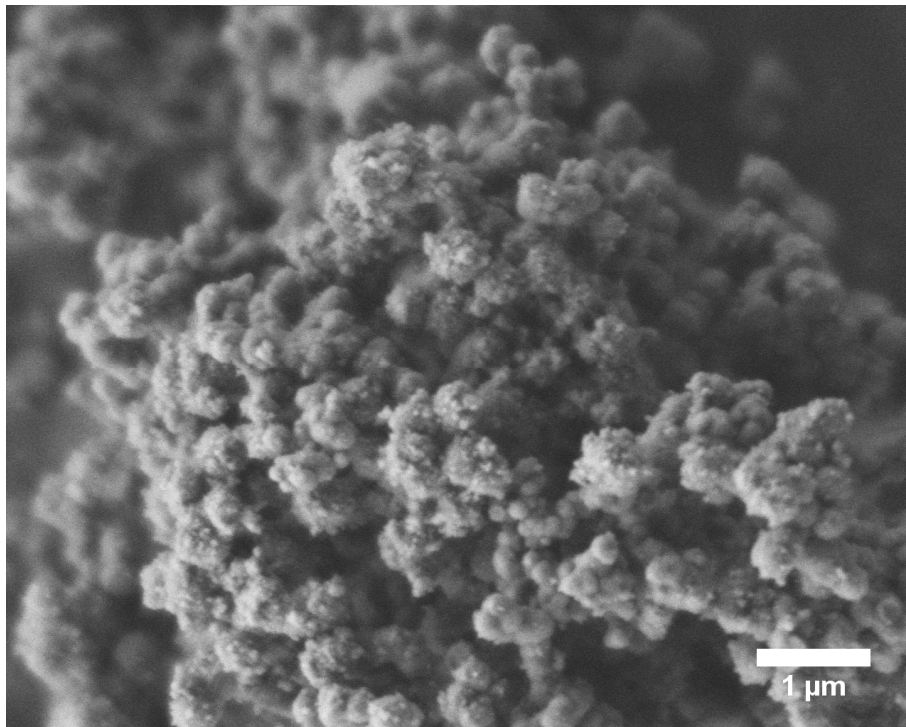
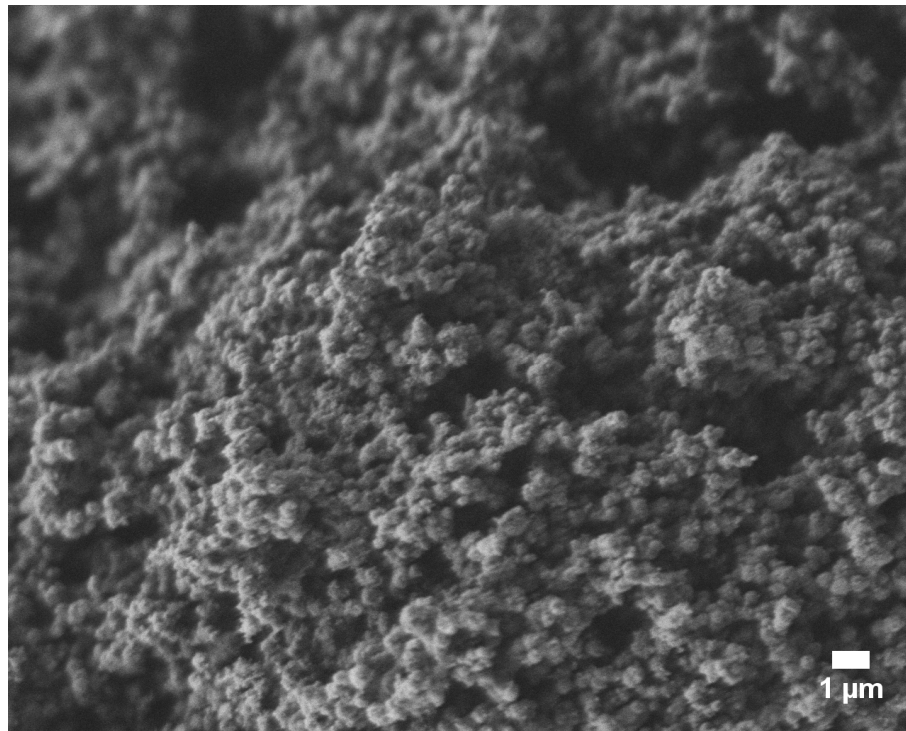


Abbildung 5.17: REM-Aufnahmen des Präzipitates aus der Reaktion in Gegenwart von PPI_8 bei einem Phosphatzusatz von 50 mM. Die Partikel sind sehr stark aggregiert und weisen nicht die übliche sphärische Form auf.

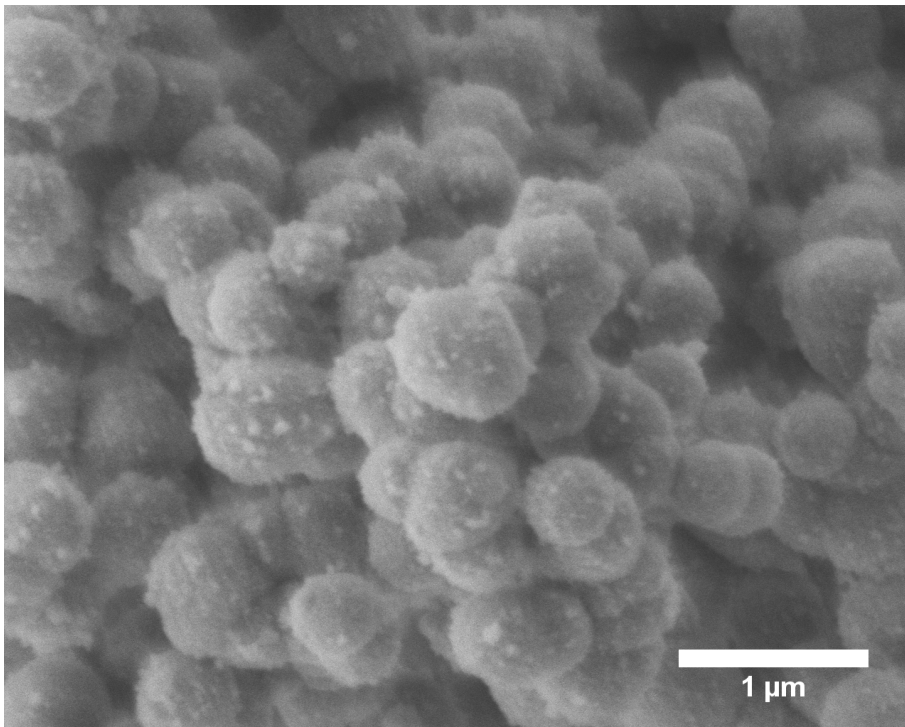
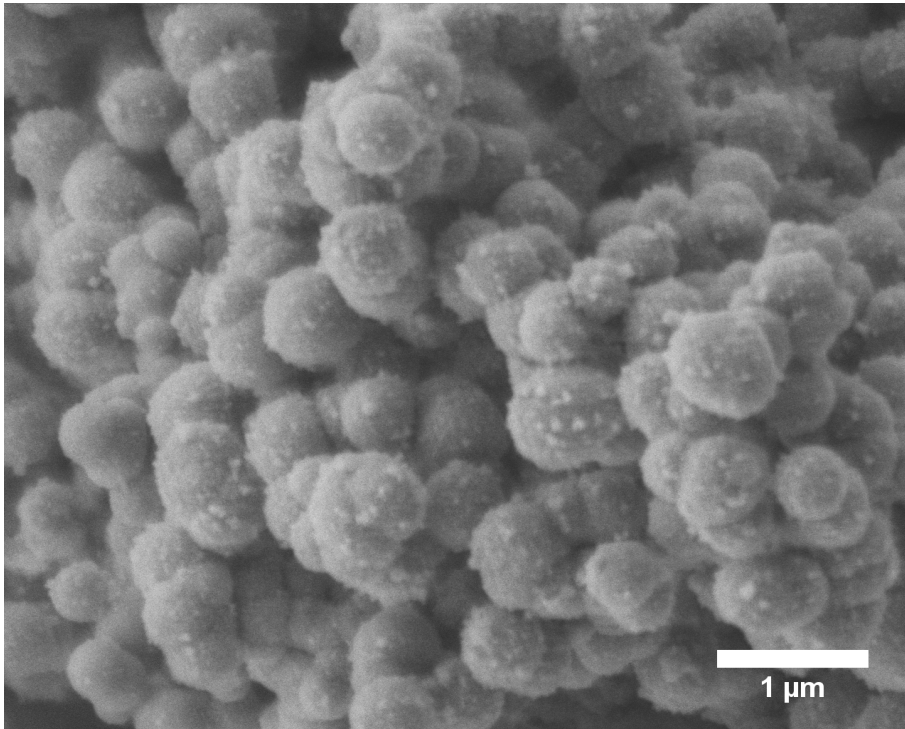


Abbildung 5.18: REM-Aufnahmen des Präzipitates aus der Reaktion in Gegenwart von PPI_8 bei einem Phosphatzusatz von 100 mM. Neben zum Teil stark aggregierten sind vor allem sphärische Partikel zu beobachten.

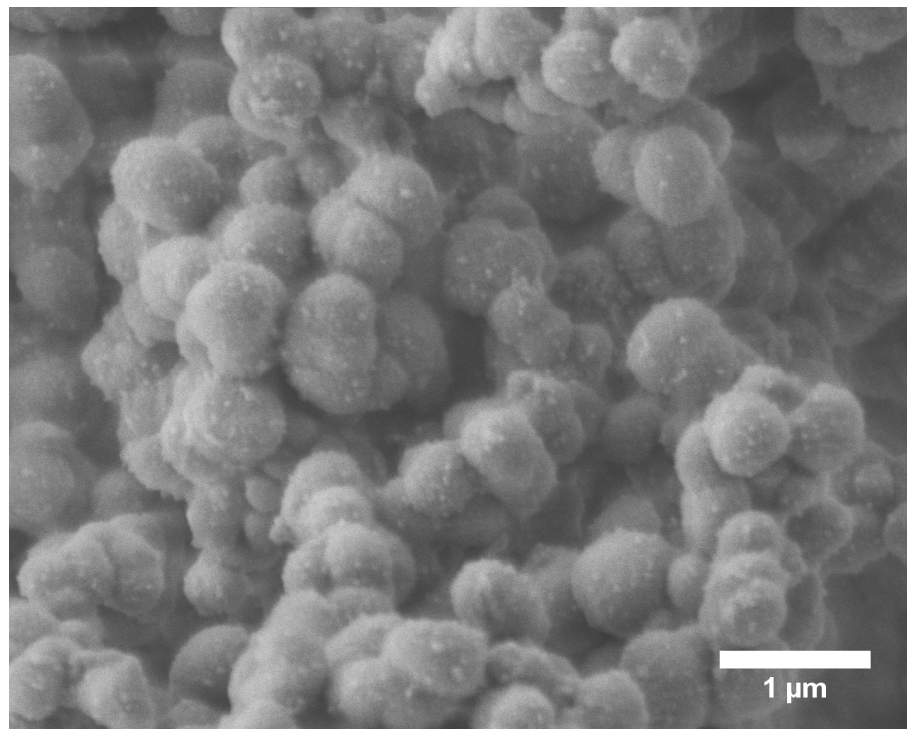
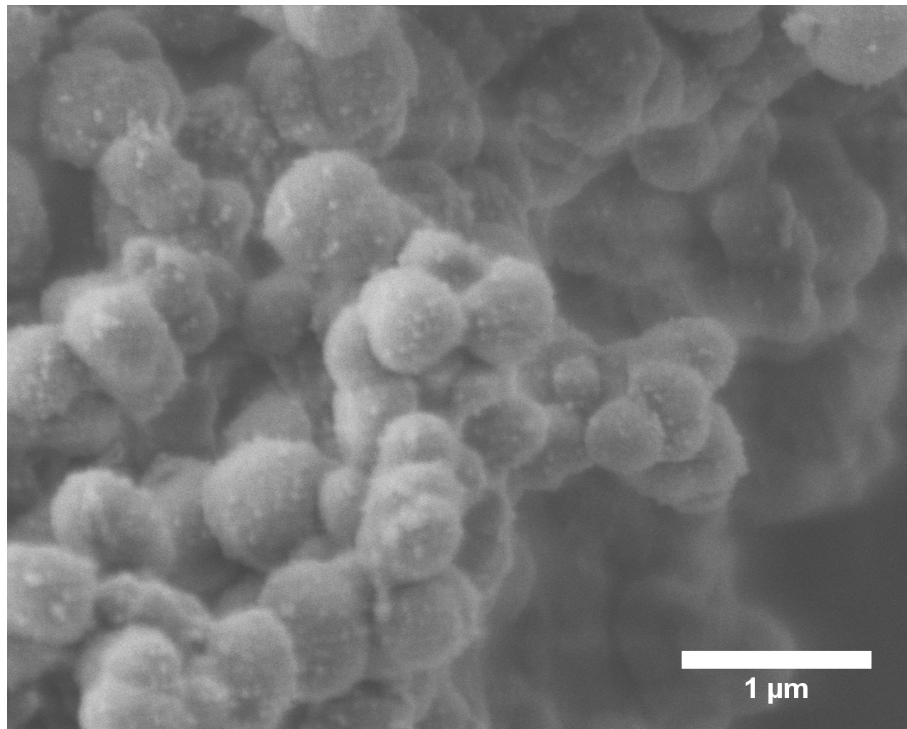


Abbildung 5.19: REM-Aufnahmen des Präzipitates aus der Reaktion in Gegenwart von PPI_8 bei einem Phosphatzusatz von 150 mM.

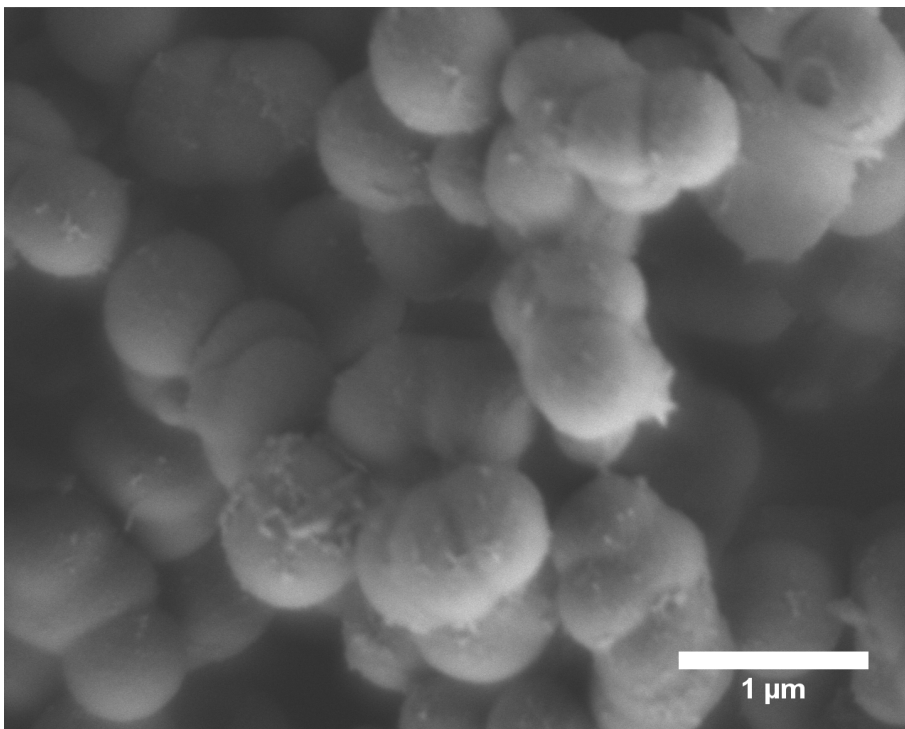
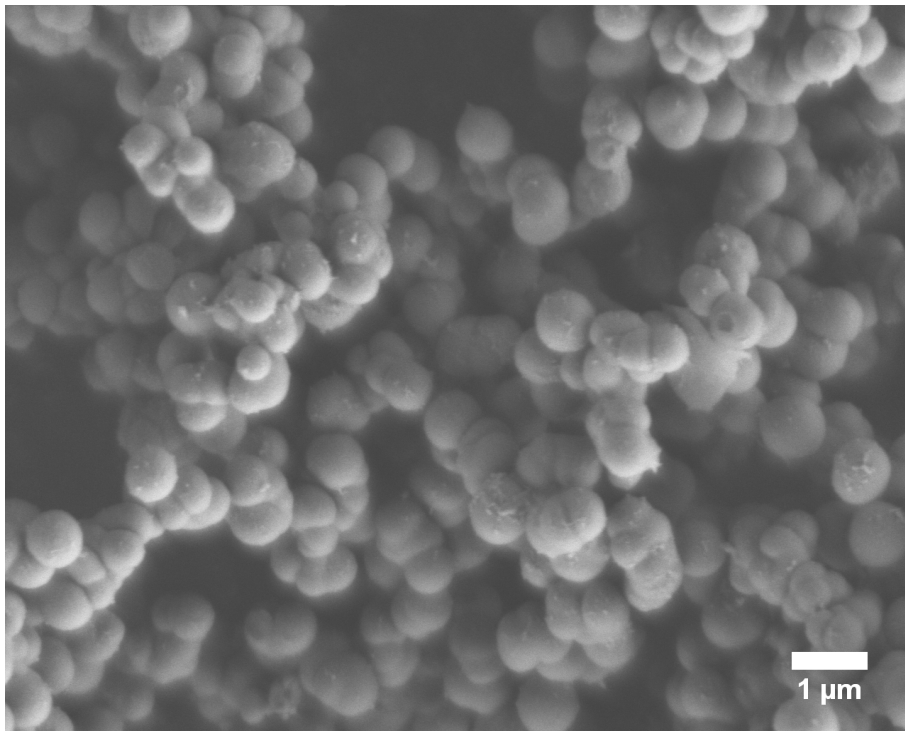


Abbildung 5.20: REM-Aufnahmen des Präzipitates aus der Reaktion in Gegenwart von PMPI₉ bei einem Phosphatzusatz von 100 mM; entnommen aus Lit. [203].

Im Falle der PPI₈-Reihe sind die Partikel, die aus der Reaktion in Gegenwart von 50 mM Phosphat erhalten wurden, stark aggregiert, so dass die sphärische Partikelform nur angedeutet ist. Die Partikelgröße kann daher auch nicht genau

gemessen werden, geschätzt liegt sie zwischen 100 und 200 nm. Wird die Phosphatzugabe auf 100 mM erhöht, sind die Partikel zwar teilweise aggregiert und es treten Inhomogenitäten auf, dennoch ist überwiegend eine gut definierte runde Partikelform auszumachen. Die Partikelgröße erstreckt sich auf einen Bereich zwischen 350 und 600 nm, was einen signifikanten Anstieg gegenüber der Partikelgröße bedeutet, die in Gegenwart von 50 mM Phosphat beobachtet werden konnte. Eine weitere Erhöhung der Phosphatkonzentration auf 150 mM führt zu ungefähr 500 bis 600 nm großen Partikeln, die zum Teil stark aggregiert, aber dennoch gut definiert sind. Somit steigt die Partikelgröße mit steigender Phosphatkonzentration stetig an, wenn die höchste Zugabe von 150 mM Phosphat auch nicht zu wesentlich größeren Partikeln führt. Diese Ergebnisse spiegeln sich ebenfalls in den früheren Studien von JAHNS [96] und KUFELT [203] wider, wo eine eindeutige Abhängigkeit der Partikelgröße mit steigender Phosphatkonzentration nachgewiesen werden konnte, wobei ab einer Obergrenze der Phosphatkonzentration die Partikelgröße ebenfalls nicht mehr ansteigt.

Verglichen mit den Studien von JAHNS und KUFELT fällt neben den Gemeinsamkeiten bezüglich der Partikelgröße in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration auf, dass im Falle von PPI_8 eine Erhöhung der Phosphatkonzentration die Bildung größerer Polyamin-Aggregate nicht in dem Maße hervorruft, wie zum Beispiel in den hier schon beschriebenen Fällen von PMPI_9 und PMPI_{20} [96,203]. In Tabelle 5.3 sind die erhaltenen Partikeldurchmesser der Präzipitate, in Gegenwart verschieden langer Polyamine in Abhängigkeit der Phosphat-konzentration dargestellt. Daraus lässt sich entnehmen, dass sowohl langkettige Polyamine wie PMPI_{20} als auch relativ kurze Polyamine wie PMPI_9 bei einer ähnlichen Phosphatzugabe zu Präzipitaten mit wesentlich höheren Partikeldurchmessern führen. Besonders im Falle von PMPI_{20} ist der Unterschied signifikant, da bei 20 mM Phosphat bereits 570 nm große Partikel entstehen, bei 100 mM sind es sogar 1200 nm.

Tabelle 5.3: Vergleich der aus REM-Untersuchungen erhaltenen Partikeldurchmesser d , die an Präzipitaten beobachtet wurden, die aus Reaktionen in Gegenwart von PPI₈, PMPI₉ und PMPI₂₀ bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen c_P erhalten wurden. Werte für PMPI₉ und PMPI₂₀ wurden früheren Arbeiten [96,203] entnommen.

| Polyamin | PPI ₈ | | PMPI ₉ | | PMPI ₂₀ | |
|----------|------------------|-----------------|-------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| | $c_P /$ | d / nm | c_P / mM | d / nm | $c_P /$ | d / nm |
| | 50 | 100-200 | 40 | 360 ± 50 | 5 | 70 |
| | 100 | 350-500 | 100 | 860 ± 100 | 20 | 570 |
| | 150 | ≈ 500 | | | 100 | 1200 |

So liegt anhand dieser Übersicht die Vermutung nahe, dass die kurze Kettenlänge von PPI₈ doch eine entscheidende Rolle bei der Bildung des Präzipitates spielt. Hier liegt vermutlich generell ein unterschiedliches Verhalten bzw. eine andere Form von Polyamin-Aggregaten vor als bei jenen Polyaminen, die längere Ketten aufweisen. In einem einfachen Modell werden die gebildeten Polyamin-Phosphat-Aggregate durch Kieselsäure mineralisiert und geben somit die Form des späteren Präzipitates vor. Daher wäre es denkbar, dass im Falle des PPI₈ die kurzen Propyleniminketten unter Zugabe von geringen Phosphatmengen (bis 50 mM) nicht in der Lage sind, sphärische Polyamin-Aggregate zu bilden, die dann mineralisiert würden. Vielmehr entstehen vermutlich undefinierte Polyamin-Phosphat-Gebilde, die dann im Rahmen der Mineralisation zu stark verwachsenen Partikeln führen. Dafür sprechen auch die REM-Aufnahmen in Abbildung 5.17, das Präzipitat besteht aus einem undefinierten silicatischen Material. Erst bei Zugabe höherer Phosphatkonzentrationen entstehen sphärische Partikel, die in Abbildung 5.18 und 5.19 zu sehen sind, und in Form und Aussehen ungefähr jenen Partikeln entsprechen, wie sie in den Präzipitaten langkettiger Polyamine beobachtet werden. Es scheint eine hohe Konzentration an multivalenten negativen Ladungsträgern von Nöten zu sein, damit aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den protonierten Amingruppen des Polyaminen und den Phosphationen Polyamin-Aggregate entstehen können, die dann zu sphärischen Partikeln mineralisiert werden.

Die im REM gemachten Beobachtungen korrelieren gut mit den Ergebnissen der DLS-Messungen, da auch hier ein Anstieg der Partikelgröße mit der Erhöhung der

Phosphatkonzentration einhergeht. Die Untersuchungen im REM liefern in Anbetracht dessen, dass Präzipitate aus nur einer Konzentrationsreihe in Gegenwart von PPI_8 betrachtet werden konnten, zumindest Hinweise auf die Kontrolle der Silicamorphogenese durch ein kurzes Polyamin. So zeigen die Aufnahmen insgesamt veränderte Morphologien im Vergleich zu Präzipitaten, die unter Einfluss längerer linearer Polyamine entstanden sind. Die sphärische Partikelform, die charakteristisch für solche Präzipitate ist, wird hier nur in Gegenwart einer bestimmten Phosphatmenge (100 mM) beobachtet. Bei Konzentrationen darunter bzw. darüber werden stark aggregierte, nur teilweise sphärische Partikel erhalten, was vermutlich auf ein insgesamt reduziertes Vermögen des kurzen Polyamins deutet, auf die morphologiebestimmenden Mechanismen einzuwirken.

5.1.5 Thermogravimetrische Untersuchungen

Die Zusammensetzung der Präzipitate, die bei Reaktionen in Gegenwart von PPI_8 isoliert werden konnten, wurde thermogravimetrisch untersucht. Da nur im Fall von PPI_8 ein Präzipitat isoliert werden konnte, ist es leider nicht möglich, einen kettenlängenabhängigen Einbau von Polyamin in das Silica zu untersuchen. Daher wurden zusätzlich Fällungen in Gegenwart von PPI_{12} vorgenommen und die zugehörigen thermogravimetrischen Untersuchungen zum Vergleich herangezogen. Die Messungen finden in Luftatmosphäre statt, dabei kommt es in bestimmten Temperaturbereichen zu Masseverlusten infolge der Verbrennung organischer Bestandteile. Weitere Masseverluste ergeben sich bei silicatischen Proben durch die Kondensation von Silanolgruppen infolge der Temperaturerhöhung. In Abbildung 5.21 und 5.22 sind exemplarisch Messungen an Proben gezeigt, die unter Einsatz von PPI_8 bzw. PPI_{12} und 100 mM Phosphat entstanden sind.

Grundsätzlich treten bei allen Messungen jeweils drei Stufen des Masseverlustes auf. Die erste Stufe verläuft in allen Fällen endotherm und ist auf einen Masseverlust aufgrund der Desorption von Wasser zurückzuführen. Dieses ist an Silanolgruppen an der Oberfläche des Präzipitates gebunden und wird bei Temperaturerhöhung freigesetzt. Die zweite Stufe im Temperaturbereich von 150 °C bis 300 °C ist ein exothermer Verbrennungsprozess. In diesem Temperaturbereich erfolgt vermutlich die Zersetzung und Oxidation organischer Substanzen mit geringer Molmasse, wie zum Beispiel die Moleküle des Puffers. JAHNS fand bei thermogravimetrischen

Messungen an Proben, die aus malonat-gepufferter Lösung erhalten wurden, Hinweise auf den Einbau von Malonatmolekülen in die Präzipitate [96]. Dies konnte durch das Auftreten einer vierten Stufe, die der Abspaltung von Kohlenstoffdioxid an den Malonat-Anionen entsprach, belegt werden. Die dritte Stufe ab 300 °C entspricht aller Wahrscheinlichkeit nach der exothermen Verbrennung der Polyamine. Während der genannten Prozesse schreitet simultan die Kondensation der Silanolgruppen fort, so dass fortwährend Wasser freigesetzt wird, was zum Masseverlust beiträgt.

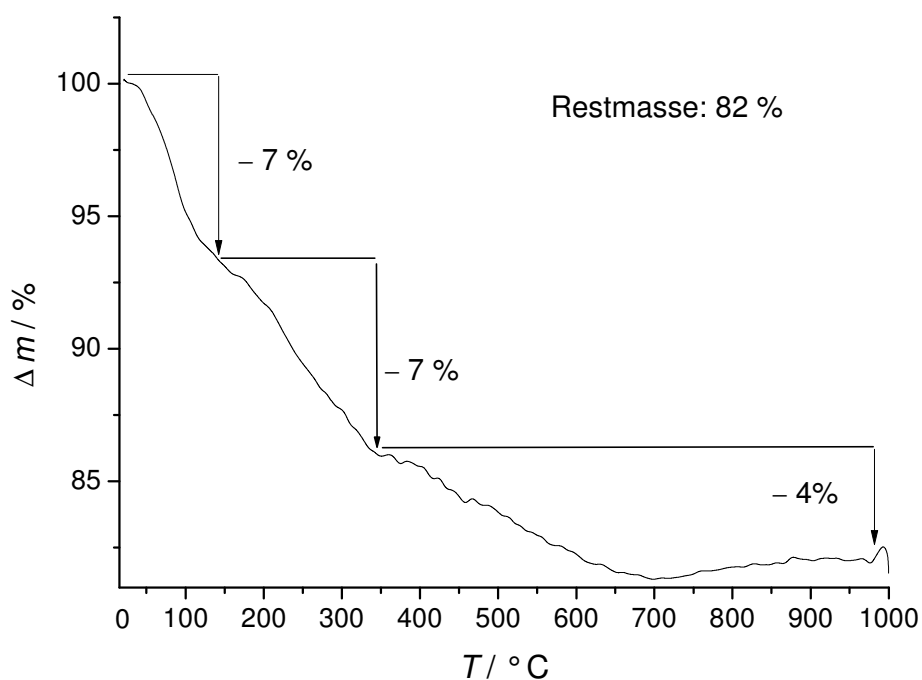


Abbildung 5.21: Thermogravimetrische Messung an einem Präzipitat, das aus einer Kondensationsreaktion in Gegenwart von PPI_8 und 100 mM Phosphat erhalten wurde.

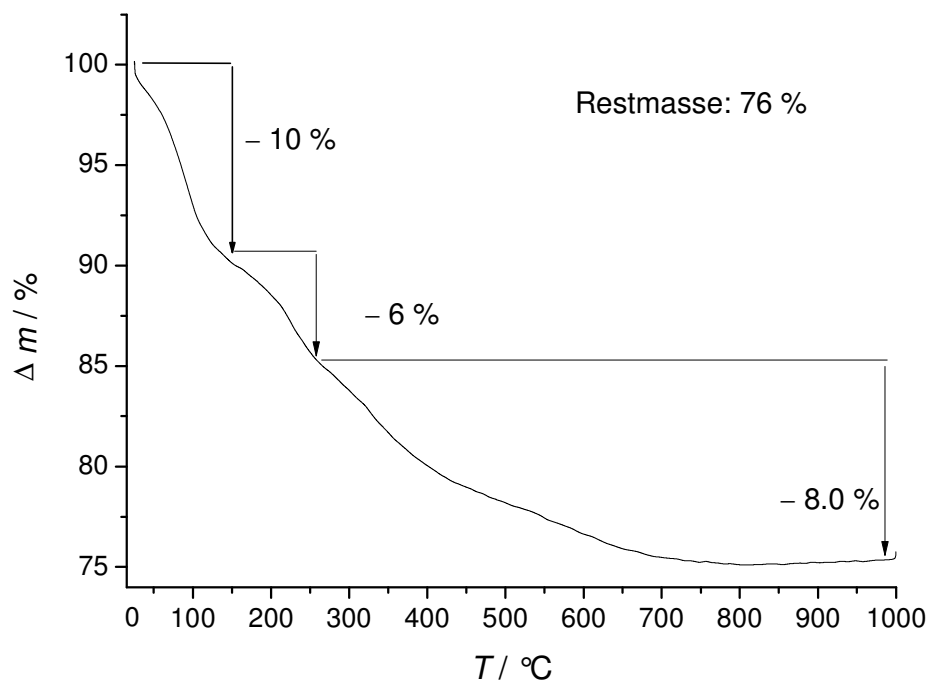


Abbildung 5.22: Thermogravimetrische Messung an einem Präzipitat, das aus einer Kondensationsreaktion in Gegenwart von PPI_{12} und 100 mM Phosphat erhalten wurde.

Die Unterschiede in den Messungen an den Proben, die in Gegenwart verschieden langer Polyamine entstanden sind, liegen vor allem in der ersten und der letzten Stufe. In Abbildung 5.23 sind die Ergebnisse der thermogravimetrischen Messungen zusammengefasst dargestellt. In der PPI_8 -Reihe beträgt der Masseverlust für die Verbrennungsstufe des Polyamins etwa vier bis sechs Prozent, insgesamt resultiert eine Restmasse von rund 80 Masse-Prozent. Im Falle der PPI_{12} -Reihe beträgt der Masseverlust für diese Verbrennungsstufe etwa acht Prozent, insgesamt resultiert eine Restmasse von rund 75 Masse-Prozent. Dies könnte einerseits als Hinweis dafür gewertet werden, dass langkettige Polyamine infolge von dichter Polyamin-Phosphat-Aggregatbildung, bei der die Polyaminketten größtenteils in die Silicapartikel eingebaut werden, wesentlich umfassender von Silica umschlossen werden als kurze Polyaminketten. Diese bilden eher kleinere und diffusere Aggregate, wobei verhältnismäßig viel Material außerhalb der Partikel in den Gelierungsprozess eingebunden wird und so nicht direkt in die Partikel eingeschlossen wird. Andererseits enthalten die Proben aus der PPI_{12} -Reihe tendenziell mehr Wasser als die Proben, die in Gegenwart von PPI_8 erhalten wurden. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass längere Polyaminketten eine höhere

Gesamtionenzahl aufweisen und demzufolge stärker hydratisiert werden, so dass insgesamt mehr Wasser im Präzipitat eingeschlossen wird.

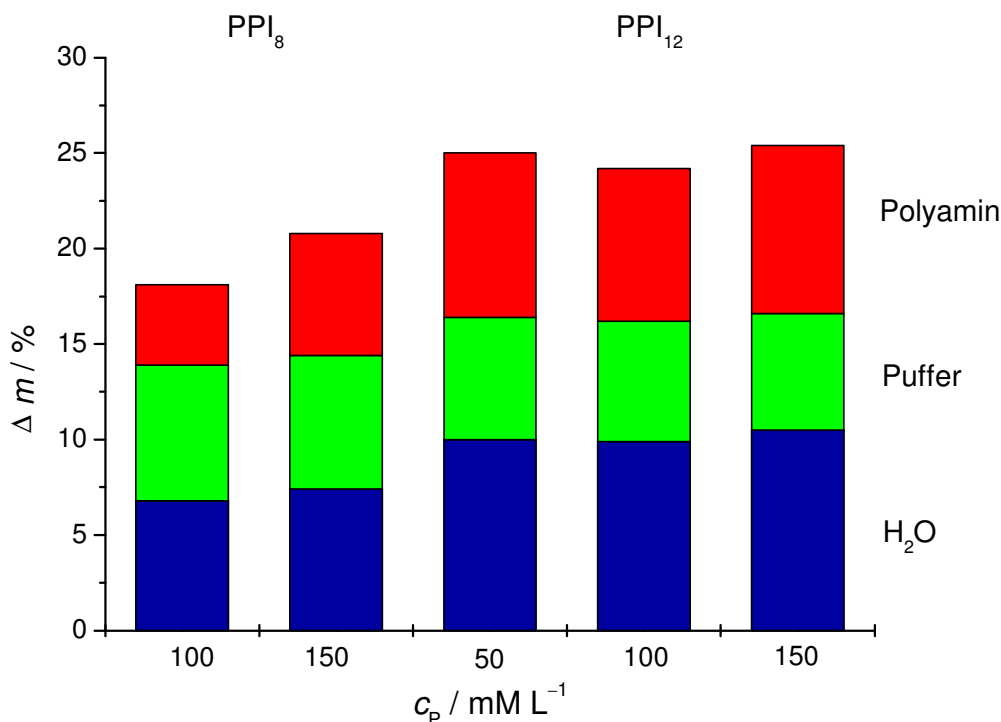


Abbildung 5.23: Graphische Gegenüberstellung der erhaltenen thermogravimetrischen Stufen aus Messungen an Proben, die in Gegenwart verschiedener Phosphatmengen und PPI_8 bzw. PPI_{12} erhalten wurden.

Diese Ergebnisse korrelieren auch mit den im vorhergehenden Abschnitt diskutierten REM-Aufnahmen, die im Falle von PPI_8 doch recht verwachsene und undefinierte Partikel zeigen, deren Polyamin-Phosphat-Aggregate vor der Mineralisation in einem recht diffusen Zustand vorgelegen haben dürften. Im Gegensatz dazu zeigen REM-Aufnahmen von Partikeln, die in Gegenwart längerer Polyamine entstanden sind eher besser definierte, sphärische Partikel [96,203].

In Abbildung 5.24 ist schematisch dargestellt, wie der Silifizierungsprozess in Gegenwart langkettiger bzw. kurzer Polyamine ablaufen könnte. Während die langen Polyaminketten eher stark verknäuelte supramolekulare Aggregate ausbilden und einzelne Polyaminketten überwiegend eingebunden werden, entstehen im Falle der kurzen Polyamine aufgrund schwächerer elektrostatischer Anziehung eher diffusere und kleinere Aggregate. Die Abschwächung der elektrostatischen Wechselwirkungen

ist darauf zurückzuführen, dass die kürzeren Ketten an sich schon nicht mehr so viele Ladungsträger aufweisen wie lange Polyaminketten. Zudem können konformationsbedingte Einschränkungen auftreten, ohne die sich die Molekülketten sonst dicht zusammenlagern ließen. Dadurch kann es zum Beispiel zu weniger ausgeprägten Interaktionen kommen, die normalerweise von VAN DER WAALS-Kräften begünstigt werden. Die anschließende Mineralisation führt zu kleineren Silicapartikeln, die auch stark verwachsen sein können. Dabei wird auch eine große Menge an Polyamin nicht in die Partikel eingeschlossen und beim Aufarbeitungsprozess entfernt.

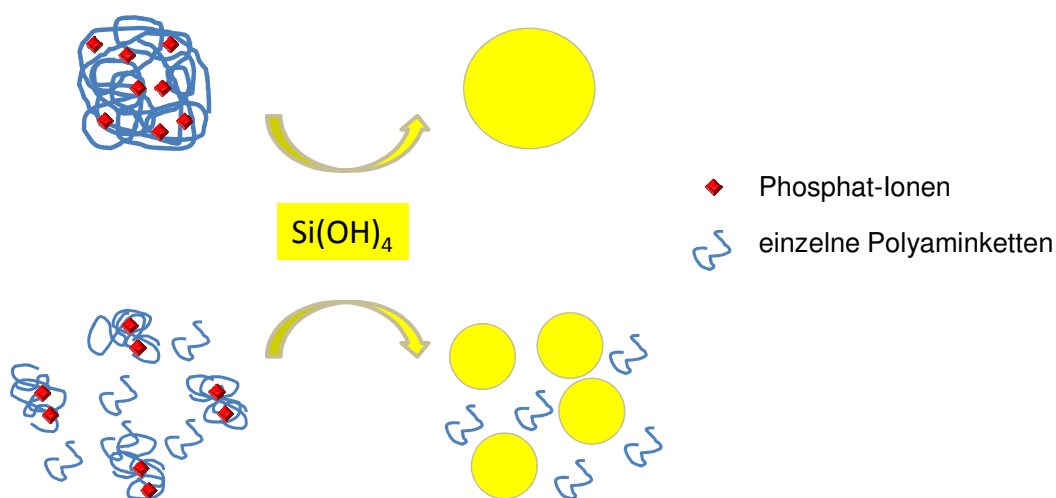


Abbildung 5.24: Schematische Darstellung der Vorgänge während der Silifizierung in Gegenwart von langen Polyaminketten (oben) bzw. kurzen Polyaminen (unten).

Anhand des gerade diskutierten Ansatzes ließe sich erklären, warum mit absteigender Kettenlänge signifikant kleinere Silicapartikel entstehen. Nicht nur Messungen mit Dynamischer Lichtstreuung, sondern auch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Präzipitate hatten ja eine Abnahme der Partikeldurchmesser im Vergleich zu den Partikelgrößen, die aus Experimenten mit längeren Polyaminen erhalten wurden, gezeigt.

Im folgenden Teil der Arbeit werden die Ergebnisse an den antibakteriellen Beschichtungen präsentiert und diskutiert.

5.2 Charakterisierung der Silicabeschichtungen

Wie nicht anders zu erwarten, zeigen unbehandeltes Glas in Form von Glasplättchen sowie die amorphe Silicabeschichtung wegen fehlender periodischer Anordnung in ihrer Strukturierung keinerlei Röntgen-Reflexe im zu erwartenden 2θ -Bereich. Der mittels Spin Coating hergestellte mesoporöse Silicafilm zeigt einen intensiven, scharfen Reflex bei $2\theta=0.9$ und einen schwachen, breiten Reflex bei $2\theta=1.8$ (siehe Abbildung 5.25). Die Reflexe sind auf einen Elektronendichtekontrast zwischen den von der Organik befreiten Poren und den silicatischen Seitenwänden des Materials zurückzuführen. Die wenigen Reflexe deuten auf wenig strukturiertes Material ohne bevorzugte Orientierung mit statistisch verteilten Porenöffnungen hin. Anhand von Tierversuchen konnte früher die Biokompatibilität solcher mesoporösen Materialien auf üblichen Biomaterialien (Bioverit[®] II) gezeigt werden [36,129,130].

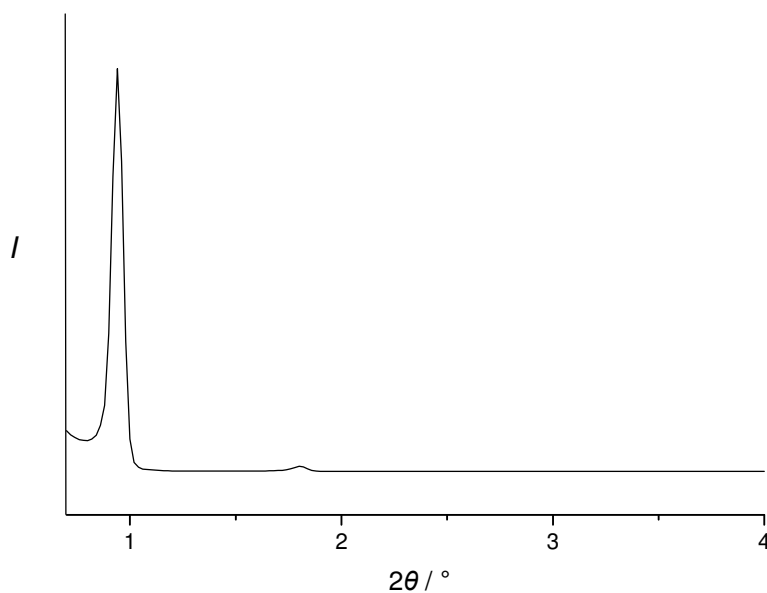


Abbildung 5.25: Röntgen-Diffraktogramm eines calcinierten mesoporösen Silicafilms. Der Film wurde mit Hilfe von Spin Coating auf runde Glasplättchen aufgebracht.

5.2.1 Kovalent gebundenes Poly(4-vinyl-*N*-hexylpyridinium)bromid – Herstellung und Charakterisierung

Das potentiell bakterizide Polymer Poly(4-vinylpyridin) (PVP) wurde auf verschieden modifizierte Glasplättchen kovalent angebunden. Als Untergrund für die antibakterielle Schicht diente jeweils pures Glas sowie mit amorphem bzw. mesoporösem Silica beschichtete Glasplättchen. Die dreistufige Synthese wurde zunächst mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen auf ihren Erfolg hin untersucht. Hierfür wurden Proben aus reinem Glas als Untergrund herangezogen und es wurde in mehreren Reaktionsschritten nacheinander mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS), 1,4-Dibrombutan, PVP und anschließend mit hexyliertem PVP beschichtet. Als Referenz dienten reine Glasplättchen, die vor der Messung mit Aceton und Ethanol jeweils für 10 min im Ultraschallbad gereinigt wurden. In der Abbildung 5.26 sind die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen zusammengefasst.

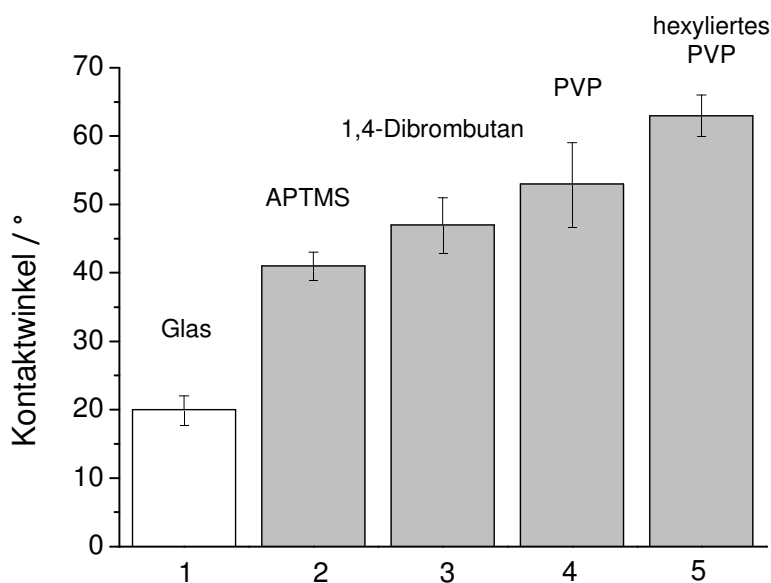


Abbildung 5.26: Kontaktwinkelmessungen zur Kontrolle des Reaktionserfolgs bei der Anbindung von PVP. Die Messungen erfolgten jeweils nach der Anbindung von APTMS, 1,4-Dibrombutan, PVP und hexyliertem PVP. Als Referenz sowie als Probenuntergrund diente gereinigtes Glas.

Die Kontaktwinkelmessungen ergeben im Verlauf der Reaktionsschritte insgesamt eine deutliche Tendenz zu höheren Kontaktwinkeln. Nach der Beschichtung mit APTMS kann ein signifikanter Anstieg des Kontaktwinkels beobachtet werden, der sich auf die Erhöhung der Hydrophobie aufgrund eingeführter Propylenreste

zurückführen lässt. Die Ergebnisse der darauffolgenden Reaktionen geben ebenfalls ausreichende Hinweise für ein erfolgreiches Ablaufen des Reaktionsschritts, auch wenn die Kontaktwinkel nicht mehr so stark ansteigen. Das hexylierte PVP ergibt die höchsten Werte, was auf die erfolgreiche Einführung der Hexylreste zurückgeführt werden kann.

Eine weitere Charakterisierung der beschichteten Proben erfolgte mit Hilfe des Farbstofftests auf der Basis von Fluorescein (siehe Abschnitt 4.10). Dieser Farbstoff bindet selektiv an positiv geladene bzw. quartäre Aminogruppen, die nach der Hexylierung des Polymers vorhanden sein sollten. Aus diesem Grund wurde zunächst auch hier die Anbindung des Farbstoffs nach jedem Reaktionsschritt überprüft. Bis zum Quarternisierungsschritt von PVP dürfte demzufolge kein Farbstoff gebunden werden. Tabelle 5.4 enthält die Ergebnisse dieser Untersuchungen in Form der gemessenen Absorptionen und Konzentrationen des Fluoresceins $c(\text{Fluo})$ sowie die jeweiligen Konzentrationen der geladenen Aminogruppen $c(\text{A}^+)$ pro cm^2 Substratfläche.

Tabelle 5.4: Ergebnisse des Fluorescein-Farbstofftests jeweils nach der Anbindung von APTMS, 1,4-Dibrombutan, PVP und hexyliertem PVP. Es sind die gemessenen Absorptionen, die jeweilige Fluorescein-Konzentration $c(\text{Fluo})$ und die Konzentrationen der geladenen Aminogruppen $c(\text{A}^+)$ pro cm^2 Substrat angegeben. Als Referenz sowie Probenuntergrund diente gereinigtes Glas.

| Probe | Absorption | $c(\text{Fluo}) /$ $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ | $c(\text{A}^+) / \text{cm}^2$ $\mu\text{mol L}^{-1}$ |
|-----------------|-------------------|--|---|
| Referenz | 0.000 ± 0.000 | 0.00 | 0.00 |
| APTMS | 0.007 ± 0.001 | 1.00 | 0.4 |
| 1,4-Dibrombutan | 0.004 ± 0.001 | 0.65 | 0.3 |
| PVP | 0.007 ± 0.001 | 1.00 | 0.4 |
| hexyliertes PVP | 0.043 ± 0.020 | 6.40 | 4.9 |

Den Ergebnissen aus Tabelle 5.4 zufolge werden nach den einzelnen Reaktionsschritten keine signifikanten Mengen an Fluorescein gebunden. Lediglich

nach der Hexylierung des Polymers kann ein signifikanter Messwert für die Fluoresceinkonzentration gemessen werden. Die gemessene Absorption entspricht $4.9 \mu\text{mol L}^{-1}$ an quartären Ammoniumgruppen pro cm^2 Substratfläche. Ein leichter Anstieg der Absorptionswerte nach der Anbindung von APTMS bzw. PVP kann mit nach diesen Reaktionsschritten vorhandenen Stickstoffatomen erklärt werden, die bei den gegebenen Bedingungen des Farbstofftests ($\text{pH} = 8$) zu einem geringen Anteil protoniert vorliegen können. Der Rückgang der Absorptionswerte nach der Anbindung von 1,4-Dibrombutan bestätigt diese Annahme. Insgesamt gesehen konnten die Versuche aus Tabelle 5.4 zeigen, dass die Bindung des Farbstoffs tatsächlich nur bei Vorhandensein quartärer Ammoniumgruppen in signifikantem Maße abläuft. In der Abbildung 5.27 sind hierzu Probenplättchen mit hexyliertem und unhexyliertem PVP nach der Behandlung mit Fluorescein gezeigt. Nach dem Abwaschen des Farbstoffüberschusses bleibt nur die hexylierte Probe rot gefärbt.

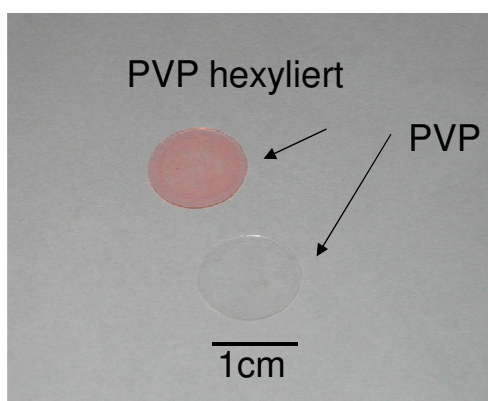


Abbildung 5.27: Probenplättchen mit angebundenem hexyliertem PVP sowie mit nicht hexyliertem PVP. Als Untergrund diente unmodifiziertes Glas. Die hexylierte Probe ist durch Fluorescein rot gefärbt.

Wie schon oben erläutert, wurden des Weiteren Proben mit amorphem und mesopösem Silica als Substratuntergrund hergestellt. Die Tabelle 5.5 fasst die Ergebnisse der Farbstofftests an Proben mit kovalent gebundenem, hexylierten PVP zusammen. Den Ergebnissen der Farbstoffmessungen zufolge konnten auf den drei verschiedenen Substratuntergründen vergleichbare Mengen an Fluorescein gebunden werden. Somit betragen die NH_4^+ -Konzentrationen für die Oberflächen zwischen $4.5 - 4.9 \mu\text{mol L}^{-1}$ pro cm^2 . Die drei verschiedenen Untergründe eignen sich zunächst prinzipiell gleich gut für die Anbindung von hexyliertem Poly(4-vinylpyridin). Die

Bioverträglichkeit und die antibakteriellen Eigenschaften der Materialien werden im Folgenden diskutiert.

Tabelle 5.5: Ergebnisse des Fluorescein-Tests an Proben mit kovalent angebundenem, hexylierten PVP. Als Untergrund dienten unbehandeltes Glas sowie amorphe und mesoporöse Silicabeschichtungen. Die Referenzproben bestehen aus unbehandeltem Glas.

| Probe | <i>Absorption</i> | $c(\text{Fluo}) / 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ | $c(\text{A}^+) / \text{cm}^2 \mu\text{mol L}^{-1}$ |
|-------------------|-------------------|---|--|
| Referenz | 0.000 ± 0.000 | 0.0 | 0.0 |
| amorph | 0.039 ± 0.002 | 5.8 | 4.5 |
| mesoporös | 0.042 ± 0.002 | 6.2 | 4.8 |
| nicht modifiziert | 0.043 ± 0.001 | 6.4 | 4.9 |

Des Weiteren wurden Versuche unternommen, verschieden alkylierte PVP-Varianten herzustellen und die Kettenlänge des hydrophoben Rests zu variieren. Mit Hilfe dieser Versuche sollte die Dichte geladener Aminogruppen unterschiedlich alkylierter PVP-Proben miteinander verglichen werden. Tabelle 5.6 enthält die Ergebnisse octylierter und decylierter, kovalent angebundener PVP-Filme auf unbehandeltem Glas hinsichtlich Farbstoffuntersuchungen sowie Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen. Die photometrischen Untersuchungen mit Fluorescein zeigen im Fall der octylierten und decylierten Proben einen signifikanten Abfall der Aminogruppenkonzentration im Vergleich mit der hexylierten Variante. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von TILLER et al. überein, die die geringere Konzentration mit sterischer Hinderung der immer länger werdenden Alkylketten begründen [34]. Da die Wirksamkeit antibakterieller Beschichtung auf der Basis von PVP vor allem von Konzentration der Aminogruppen abhängt, scheint die Alkylierung mit längeren hydrophoben Ketten zunächst kein vielversprechender Ansatz für eine aktivere antibakterielle Oberfläche zu sein. Auf der anderen Seite zeigen die Messungen der Kontaktwinkel eine leichte Steigerung der Hydrophobizität der Oberfläche durch die länger werdenden Alkylketten, die einen Einfluss auf die antibakteriellen Eigenschaften haben könnte.

Tabelle 5.6: Ergebnisse der Farbstoffuntersuchungen und Kontaktwinkelmessungen an Proben mit kovalent angebundenem, hexylierten, octylierten bzw. decylierten PVP. Als Untergrund und als Referenzprobe diente unbehandeltes Glas.

| Probe | <i>Absorption</i> | $c(\text{Fluo}) / 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ | $c(\text{A}^+) / \text{cm}^2 \mu\text{mol L}^{-1}$ | Kontaktwinkel |
|-----------|-------------------|---|--|---------------|
| Referenz | 0.000 ± 0.000 | 0.00 | 0.00 | 20 ± 4 |
| hexyliert | 0.043 ± 0.002 | 6.4 | 4.9 | 63 ± 6 |
| octyliert | 0.014 ± 0.003 | 2.1 | 1.6 | 67 ± 2 |
| decyliert | 0.017 ± 0.001 | 2.5 | 1.9 | 74 ± 2 |

5.2.1.1 Viabilitätstests mit Maus- und Gingivafibroblasten

Die Biokompatibilität des hexylierten Polymers PVP wurde in Experimenten an Mausfibroblasten (Abbildung 5.28) sowie an humanen Gingivafibroblasten (Abbildung 5.29) hinsichtlich Adhäsion, Zellmorphologie und Viabilität geprüft (Abschnitt 3.8). Es wurden analog Proben mit gebundenem hexylierten Polymer sowie Proben mit angebundenem, nicht hexylierten Polymer als Kontrolle untersucht. Zur weiteren Kontrolle dienten unbehandelte Glasplättchen sowie zusätzlich Zellkulturplastik (ZKP) im Fall der Mausfibroblasten.

Die Untersuchungen der Proben in Experimenten an Mausfibroblasten in Abbildung 5.28 zeigen nach drei Tagen eine dichte Besiedelung des Zellkulturplastiks mit Zellen typischer Morphologie. Auch die nicht hexylierten Proben auf Glas sind vergleichbar gut kolonisiert. Proben mit hexyliertem PVP auf Glas (B) sowie auf mesoporösem Silica (D) sind im Vergleich zum Plastik und den Proben A insgesamt weniger dicht besiedelt, zeigen jedoch eine zufriedenstellende Adhäsion. Eine deutliche Ausnahme hinsichtlich Adhäsion und Morphologie zeigen die Proben mit der amorphen Silicabeschichtung (C). Die Zellanzahl ist im Vergleich zu den anderen hexylierten Proben deutlich reduziert. Darüber hinaus wirken die Zellen sehr abgerundet und gedrungen, was auf eine schlechte Adhäsion schließen lässt.

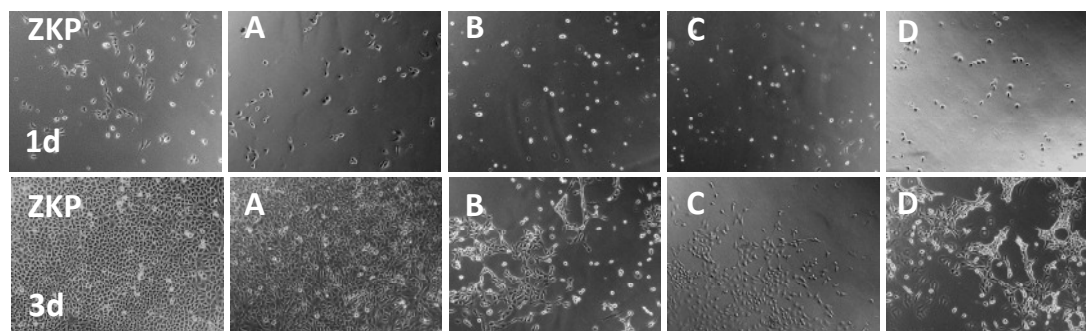


Abbildung 5.28: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellmorphologie von Mausfibroblasten auf unterschiedlich modifizierten Glasproben nach einem Tag und drei Tagen Beobachtungszeit. Als Kontrolle dienten Proben aus Zellkulturplastik (ZKP) und auf Glas angebundenes, nicht hexyliertes PVP (A). Hexyliertes Poly(4-vinylpyridin) wurde auf Glas (B) sowie auf amorph (C) bzw. mesoporös (D) beschichteten Untergründen kovalent angebunden.

Die Experimente an Gingivafibroblasten zeigen ähnliche Resultate. In der Abbildung 5.29 ist die Zellmorphologie von humanen Gingivafibroblasten nach der Inkubationszeit von einem und drei Tagen gezeigt. Im Falle der Kontrolle und der Probe A sind bereits nach einem Tag vollständig adhärierte Fibroblasten zu sehen, ein für Zellkulturplastik übliches Verhalten. Diese Beobachtungen passen gut zu den Ergebnissen mit den Mausfibroblasten. Die Proben B (hexyliertes PVP auf Glas) und C (mit amorpher Beschichtung) zeigen deutlich weniger ausgebreitete Zellen, teilweise sind sie zudem stark abgerundet. Da sie auch durch mehrmaliges Waschen während der Präparation nicht abgelöst wurden, scheint trotzdem eine gute Anlagerung vorzuliegen. Dem visuellen Eindruck nach scheinen weniger Zellen als in der Kontrolle und Probe A vorzuliegen. Dies kann aber zunächst nicht genau bestimmt werden, da die Zellen aufgrund der unvollständigen Adhäsion vor allem im Fall der amorphen Beschichtung teilweise kleiner und gedrungener wirken. Die mesoporös beschichtete Probe zeigt entschieden die geringste Anzahl adhärierter Zellen, die zusätzlich ebenfalls eine unvollständige Anlagerung aufweisen. Demzufolge ist an dieser Stelle ein signifikanter Unterschied in der Zellreaktion hinsichtlich Zellmorphologie und Adhäsion festzustellen.

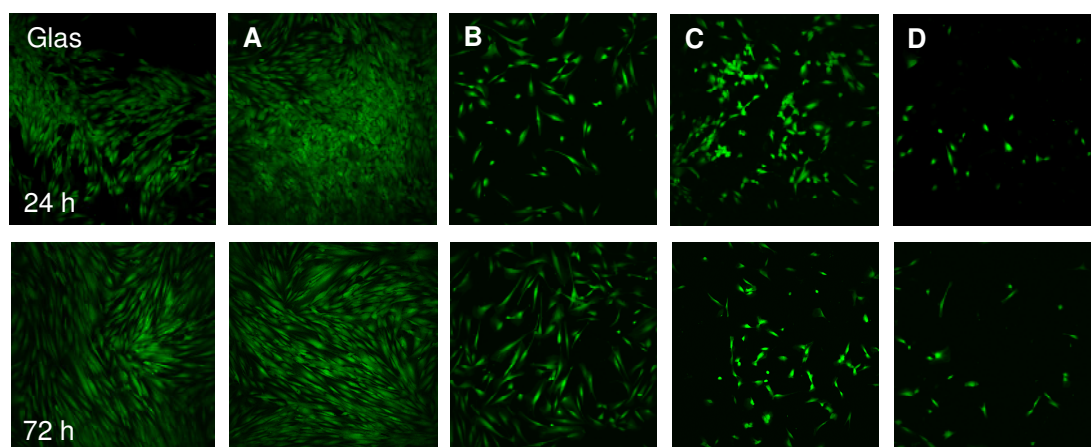


Abbildung 5.29: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellmorphologie von Gingivafibroblasten auf unterschiedlich modifizierten Glasproben nach 24 h und 72 h Beobachtungszeit. Als Kontrollen dienten Glas und auf Glas angebondenes, nicht hexyliertes PVP (A). Hexyliertes Poly(4-vinylpyridin) wurde auf Glas (B) sowie auf amorph (C) bzw. mesoporös (D) beschichteten Untergründen kovalent angebonden.

Mit Hilfe von REM-Aufnahmen reiner amorpher Silicabeschichtungen auf Glas ließ sich die Ursache für die im Verhältnis schlechtere Biokompatibilität der amorphen Proben auf eine zersplitterte Silicabeschichtung zurückführen (Abbildung 5.30). Die Aufnahmen zeigen eine abgeplatzte Beschichtung, deren Bruchstücke scharfkantig sind und für die Besiedelung mit Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit keinen geeigneten Lebensraum darstellen. Somit sind die schlechteren Resultate der amorphen Proben in beiden Experimenten (Maus- und Gingivafibroblasten) auf ungeeignetes Probensubstrat zurückzuführen, eine homogene unbeschädigte amorphe Silicabeschichtung wäre in diesen Versuchen vermutlich unproblematisch gewesen.

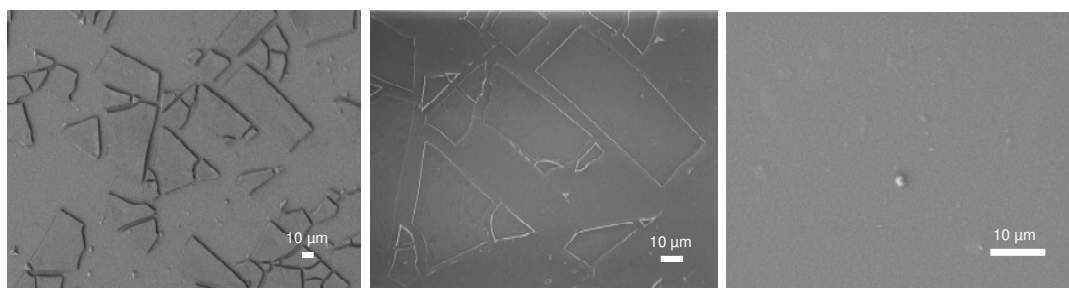


Abbildung 5.30: REM-Aufnahmen zerbröckelter amorpher Silicabeschichtungen auf Glassubstraten (links und Mitte). Die abgebrochenen Stücke weisen zum Teil sehr scharfkantige Oberflächen auf. Nach Optimierung des Spin Coating-Prozesses werden homogene Silicabeschichtungen erhalten (rechts).

Die Probleme im Falle der amorphen Silicabeschichtung konnten durch Optimierung des Spin Coating-Prozesses beseitigt werden, so dass für die nachfolgenden Experimente der Arbeit gleichmäßige homogene Schichten erhalten werden konnten (Abbildung 5.30 rechts).

Eine qualitative Bewertung der untersuchten Proben an Maus- und Gingivafibroblasten ist in Tabelle 5.7 und 5.8 als Übersicht zusammengestellt, wobei im Fall der amorphen Proben auf Grund der abgesplitterten Silicaschicht keine tatsächliche Einschätzung möglich war.

Tabelle 5.7: Zusammenfassung zur Bewertung der Biokompatibilität in Bezug auf Mausfibroblasten von Proben mit kovalent angebundenem, nicht hexyliertem PVP auf Glas (A) sowie von hexyliertem PVP, das auf Glas (B) sowie auf amorphe (C) bzw. mesopörose (D) Silicabeschichtungen angebunden wurde. Als Kontrolle wurden unbehandeltes Glas sowie Zellkulturplastik (ZKP) herangezogen.

| Material | Adhäsion | Ausbreitung | Wachstum |
|----------|----------|-------------|----------|
| ZKP | ++ | +++ | ++++ |
| Glas | ++ | + | ++ |
| A | ++ | ++ | ++++ |
| B | ++ | + | ++ |
| C | * | * | * |
| D | ++ | + | + |

* keine Bewertung möglich

Tabelle 5.8: Zusammenfassung zur Bewertung der Biokompatibilität in Bezug auf Gingivafibroblasten von Proben mit kovalent angebundenem, nicht hexyliertem PVP auf Glas (A) sowie von hexyliertem PVP, das auf Glas (B) sowie auf amorphe (C) bzw. mesopöröse (D) Silicabeschichtungen angebunden wurde. Als Kontrolle wurde unbehandeltes Glas herangezogen.

| Material | Adhäsion | Ausbreitung | Wachstum |
|----------|----------|-------------|----------|
| Glas | +++ | +++ | +++ |
| A | +++ | +++ | ++++ |
| B | + | + | ++ |
| C | * | * | * |
| D | + | + | +++ |

* keine Bewertung möglich

Neben den optischen Methoden zur Beurteilung der Probenkompatibilität bietet der Lactatdehydrogenase-Test (LDH-Test) die Möglichkeit einer Bewertung auf Zellebene. Dieses Enzym wird von lebenden Zellen produziert, die Konzentration an LDH kann in Korrelation zur Anzahl der Zellen gesetzt werden. Die Abbildung 5.31 zeigt das Ergebnis der LDH-Tests an humanen Gingivafibroblasten auf den verschieden modifizierten Proben nach 72 h Inkubationszeit. Die Experimente wurden von LYSANN RINGENBERG an der Zahnklinik der MHH durchgeführt (Abschnitt 3.8).

Die Ergebnisse der einzelnen Probenmaterialien lassen folgende Aussage zu: Die nicht hexylierten Proben (A) zeigen hinsichtlich der Zellanzahl und der Zellmorphologie vergleichbare Biokompatibilität wie das Zellkulturplastik. Die hexylierten Proben auf unmodifiziertem Glas (B) und auf mesoporös beschichteten Proben (D) sowie die Kontrolle weisen im Gegensatz dazu weniger Zellen auf, zeigen untereinander jedoch ein ähnliches Ergebnis. Im Fall der amorph beschichteten Proben (C) ist die Anzahl der angelagerten Zellen deutlich reduziert.

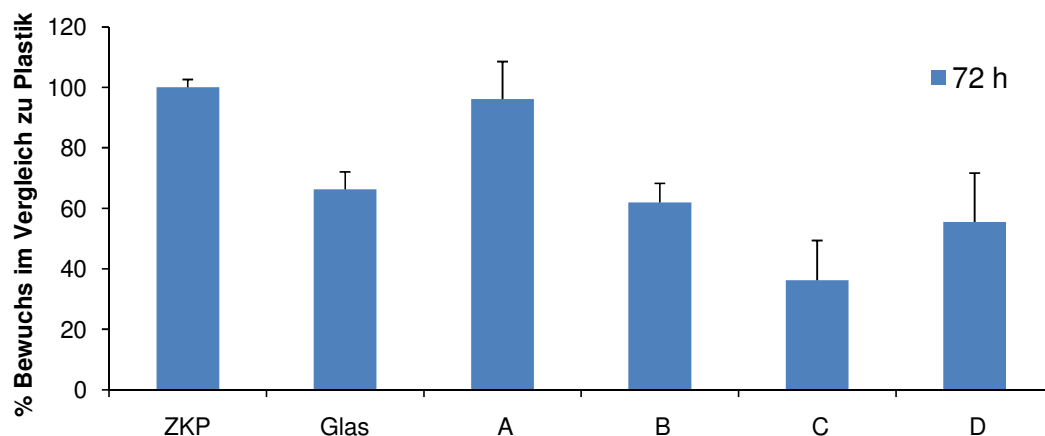


Abbildung 5.31: Ergebnisse der LDH-Assays für humane Gingivafibroblasten auf nicht hexyliertem PVP (A) auf Glas, hexyliertem PVP auf Glas (B) bzw. auf einer amorphen (C) bzw. auf einer mesoporösen (D) Beschichtung nach 72 h Inkubationszeit. Zur Kontrolle wurden Zellkulturplastik und Glas herangezogen.

Der LDH-Test zeigt und bestätigt insgesamt, dass die Zellen zwischen den nicht hexylierten Proben, die deshalb auch besser verträglich sein sollten, und den hexylierten Proben unterscheiden und mit unterschiedlichem Adhäsionsverhalten reagieren. Weiterhin zeigen die unhexylierten Proben ähnlich gute Eigenschaften wie Zellkulturplastik, das als ideales Kulturmedium angesehen wird. Hierfür ist vermutlich die angebundene Polymerschicht verantwortlich, die den Probenuntergrund bedeckt und im Vergleich zu reinem Glas eine verbesserte Biokompatibilität aufweist. Eine weitere Beurteilung der Biokompatibilität der polymerbeschichteten Proben lässt sich über die Proliferationsrate der Zellen abgeben (Abbildung 5.32).

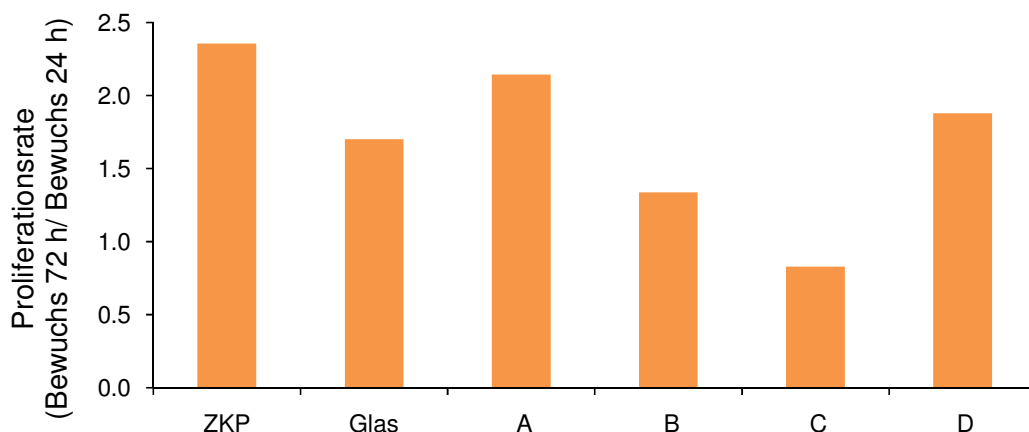


Abbildung 5.32: Proliferationsrate von Gingivafibroblasten auf nicht hexyliertem PVP (A) auf Glas, hexyliertem PVP auf Glas (B) bzw. auf einer amorphen (C) bzw. auf einer mesoporösen (D) Beschichtung nach 72 h Inkubationszeit. Zur Kontrolle wurden Zellkulturplastik und Glas herangezogen.

Die Auswertung des Wachstumsverhaltens im Vergleich der beiden Zeitpunkte (24 h und 72 h) anhand der jeweiligen ermittelten Zellanzahl auf den Probekörpern bestätigen im Wesentlichen die Beobachtungen für den Bewuchs nach 72 h Inkubationszeit (Abbildung 5.32). Das Zellkulturplastik zeigt die besten Voraussetzungen für die Proliferation der Zellen. Die mit nicht hexyliertem PVP beschichtete Proben (A) zeigen eine ähnlich gute Proliferation gefolgt von der Glaskontrolle. Beide weisen unter dem Mikroskop eine typische Zellmorphologie und einen dichten Bewuchs mit Zellen auf. Die Anzahl der Zellen auf den hexylierten Polymerproben auf Glas (B) und auf amorphem Silicauntergrund (C) ist im Vergleich dazu deutlich geringer. Die im Mikroskop beobachtete schlechte Anlagerung der Zellen zeigt einen direkten also Einfluss auf das Wachstumsverhalten. Bei den Proben mit der amorphen Silicabeschichtung (C) erklärt sich die im Vergleich schlechtere Zelladhäsion und Proliferation höchstwahrscheinlich durch die zerbröckelte Beschichtung (Abbildung 5.30), die aus diesem Grund scharfe Ecken und Kanten aufweist und somit keinen geeigneten Untergrund für das Zellwachstum darstellt. Eine unerwartete Ausnahme bildet die hexylierte Polymerbeschichtung auf mesoporösem Silica (D). Obwohl nach 24 h deutlich weniger Zellen als bei den anderen Proben adhärirt sind (Abbildung 5.29) und der morphologische Eindruck eher negativ zu bewerten ist, liegt nach 72 h eine recht gute Proliferation der Zellen, vergleichbar mit Glas und den Proben A vor.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Zelltests keine toxischen Effekte des untersuchten Polymers. Besonders die nicht hexylierten Proben zeigen eine sehr gute Biokompatibilität im Vergleich zum Zellkulturplastik. Die Hexylierung führt zwar zu geringerer Zelladhäsion, die jedoch nicht gravierend ist und den Unterschied zwischen den verschiedenen chemischen Modifizierungen deutlich macht. Somit ist der Einsatz von alkyliertem Poly(4-vinylpyridin) im dentalen Bereich prinzipiell möglich.

5.2.1.2 Antibakterielle Eigenschaften

Die verschieden modifizierten Glasoberflächen (reines Glas, amorphe oder mesoporöse Silicabeschichtung) mit kovalent angebundenem, hexyliertem Poly(4-vinylpyridin) wurden am Beispiel zweier humanpathogener, oraler, plaquebildender Keime hinsichtlich ihrer antibakteriellen Aktivität untersucht (siehe Abbildung 5.33). Bei *Streptococcus sanguinis* handelt es sich um einen Vertreter der Initialbesiedler während *Streptococcus mutans* einen frühen Folgebesiedler darstellt. Die Experimente wurden von LYSANN RINGENBERG an der Zahnklinik der MHH durchgeführt (Abschnitt 3.9).

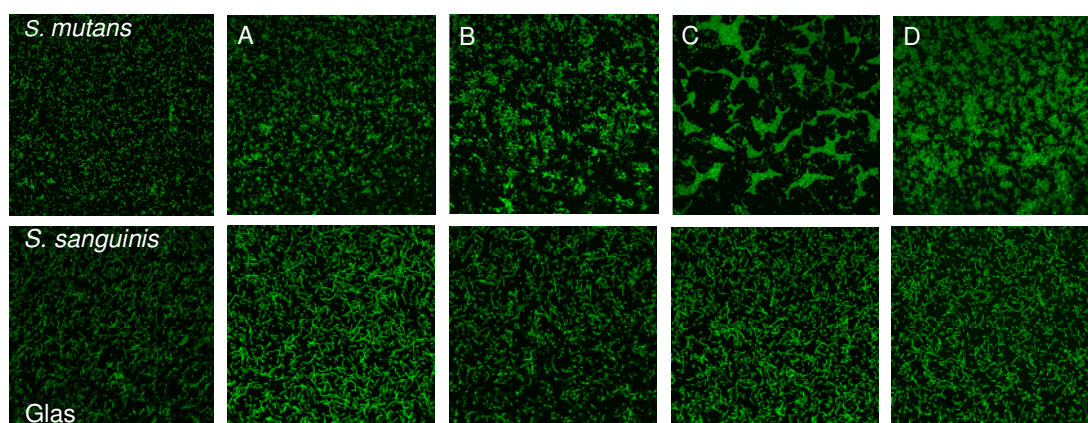


Abbildung 5.33: Überprüfung der antibakteriellen Eigenschaften der unterschiedlich modifizierten Glasproben mit *S. mutans* und *S. sanguinis* auf nicht hexyliertem PVP (A) auf Glas, hexyliertem PVP auf Glas (B) bzw. auf einer amorphen (C) bzw. auf einer mesoporösen (D) Beschichtung nach 1 h Inkubationszeit. Als Kontrolle diente reines Glas.

Die Kontrollproben aus Glas und die Proben A (nicht hexyliertes PVP auf Glas) zeigen im Fall von *S. mutans* kurze Bakterienketten, eine gleichmäßige Aussaat sowie eine dichte bakterielle Adhäsion. Die Proben A weisen eine höhere

Bakteriendichte als die Kontrolle auf. Auch die hexylierten Proben auf Glas (B) zeigen eine gleichmäßige Aussaat, hohe Bakteriendichte und Bakterienadhäsion mit leichter Aggregatbildung. Auf den hexylierten Proben auf amorphem Silica (C) lässt sich eine geringere Bakterienadhäsion im Vergleich zu den Proben A, B und D beobachten. Während die Probekörper eine gleichmäßige dichte Aussaat im mittleren Bereich aufweisen, zeigen die Randbereiche ein anderes bakterielles Verhalten. Dort sind dichte Aggregatbildungen und eine geringere Bakterienadhäsion zu beobachten (Abbildung 5.33 C). Um diese Aggregate befinden sich größere bakterienfreie Areale. Dieses Verhalten kann als bakterieller Stress interpretiert werden, der aufgrund der Natur der Beschichtung auf die Bakterien einwirkt. Auf der mesoporösen Beschichtung der Proben D zeigt sich die höchste bakterielle Adhäsion. Zwar liegt kein dichter Bakterienrasen vor, jedoch sind die Bakterien stark aggregiert und es liegen dichtgedrängte Bakterienpopulationen vor. Die Forschergruppe um IVANOVA hat sich intensiv mit Interaktionen von Bakterien und nanostrukturierten Oberflächen beschäftigt. Sie stellten ebenfalls eine bevorzugte Besiedelung nanostrukturierter Substrate fest [212]. Auch besonders glatte Oberflächen wurden von den Bakterien favorisiert.

Die quantitative Analyse des Flächenbewuchses der Probekörper mit *S. mutans* zeigt, dass dieser auf den Proben A (unhexyliertes PVP auf Glas), B (hexyliertes PVP auf Glas) und C (hexyliertes PVP auf amorphem Silica) vergleichbar ist (Abbildung 5.36). Etwaige Abweichungen sind auf wohl Unterschiede in der Versuchsdurchführung zurückzuführen. Der quantitativen Auswertung zufolge schließt sich das Ergebnis im Falle der mesoporösen Proben (D) an die Ergebnisse aus der Fluoreszenzmikroskopie an und es wird eine deutlich höhere Bakterienanzahl bestätigt. Die Kontrolle aus Glas weist im Vergleich den geringsten bakteriellen Flächenbewuchs auf.

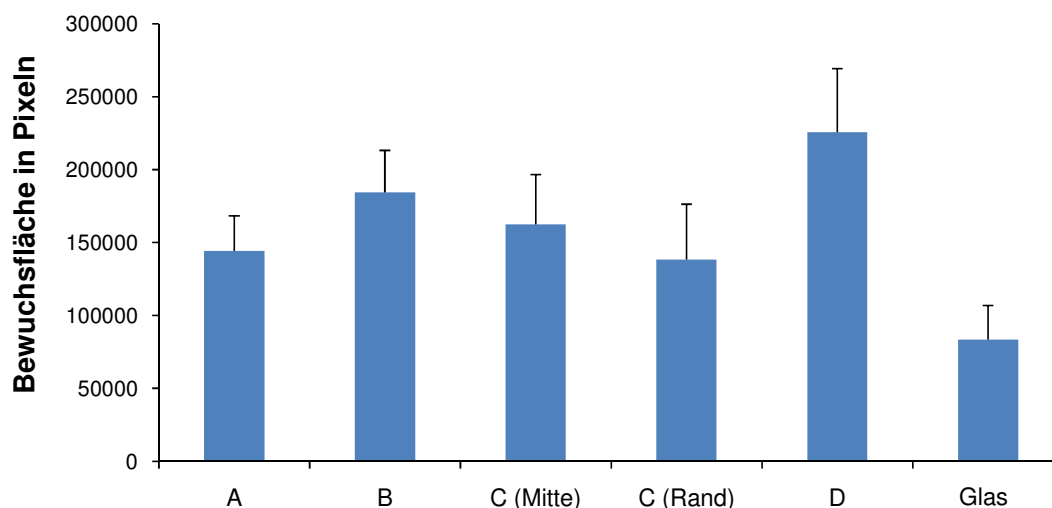


Abbildung 5.34: Bakterienanlagerung (*S. mutans*) an die mit PVP beschichteten Proben auf nicht hexyliertem PVP (A) auf Glas, hexyliertem PVP auf Glas (B) bzw. auf einer amorphen (C) bzw. auf einer mesoporösen (D) Beschichtung nach 1 h Inkubationszeit. Als Referenz diente unbehandeltes Glas.

Die Untersuchungen mit *S. sanguinis* zeigen auf allen Proben ein einheitliches Bild einer gleichmäßigen Aussaat und dichten bakteriellen Adhäsion. Die Probekörper der nicht hexylierten Proben (A), der hexylierten Glasproben (B) und der Kontrolle zeigen lange typische Ketten der Bakterien. Die Kontrollprobe weist die geringste Bakteriendichte und eine relativ gleichmäßige Bakterienaussaat auf. Ein besonderer Effekt konnte bei den Proben mit hexyliertem PVP auf amorphem Silicauntergrund (C) beobachtet werden, hier scheint es, als würden die Bakterien sich teilweise aufrichten. Die Abbildung 5.35 zeigt die Situation etwas genauer, wobei gut zu erkennen ist, dass die Ketten der Bakterien sich nicht auf der Probe ausbreiten, wie in den anderen Fällen, sondern eine senkrechte Position zur Oberfläche einnehmen. Ob dies eine Reaktion auf die Beschichtung ist, kann nicht eindeutig bestimmt werden, da die Bildung von Ketten ein typisches Verhalten dieser Bakterienspezies repräsentiert. Trotz alledem konnte in beiden Experimenten mit verschiedenen Keimen eine besondere Reaktion der Bakterien auf die amorphe Beschichtung beobachtet werden (in diesem Fall lagen homogene amorphe Silicabeschichtungen vor im Vergleich zu den Viabilitätsexperimenten).

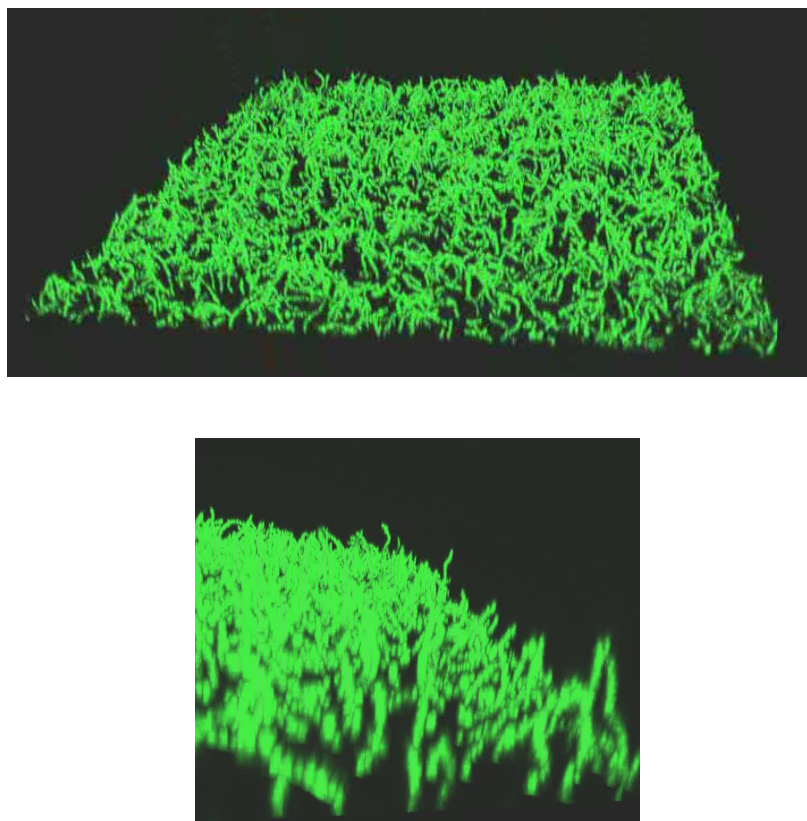


Abbildung 5.35: Auffällige Bakterienadhäsion von *S. sanguinis* im Randbereich von amorph beschichteten Proben mit hexyliertem PVP. Oben: Die Aufsicht auf den Bakterienrasen von oben zeigt wenig adhärierte Bakterienketten. Unten: Eine seitliche Aufnahme zeigt, dass die Bakterienketten teilweise senkrecht zur Oberfläche abstehen.

In der quantitativen Analyse mit *S. sanguinis* sind keine auffälligen Unterschiede zu erkennen. Im Vergleich zum Kontrollglas weisen alle Probekörper eine höhere Bakterienadhäsion auf (Abbildung 5.36). Somit zeigen die Proben mit kovalent angebundenem hexyliertem PVP zwar Unterschiede in den Reaktionen der Bakterien, ein konkreter antibakterieller Effekt konnte jedoch nicht beobachtet werden. Einen entscheidenden Einfluss auf den Nachweis der antibakteriellen Eigenschaften könnte die Versuchsdurchführung der Tests gehabt haben, da sich hierbei die Bakterien in einem nährstoffreichen Nährmedium befinden, welches sie vor einem direkten Kontakt mit der antibakteriellen Schicht wie ein Puffer schützen könnte. Da die antimikrobiellen Eigenschaften des kovalent angebundenen, alkylierten Polymers vor allem auf die direkte Interaktion zwischen Oberfläche und Bakterium basieren, könnte dies zu einer stark verminderten Wirkung der antibakteriellen Schicht geführt haben.

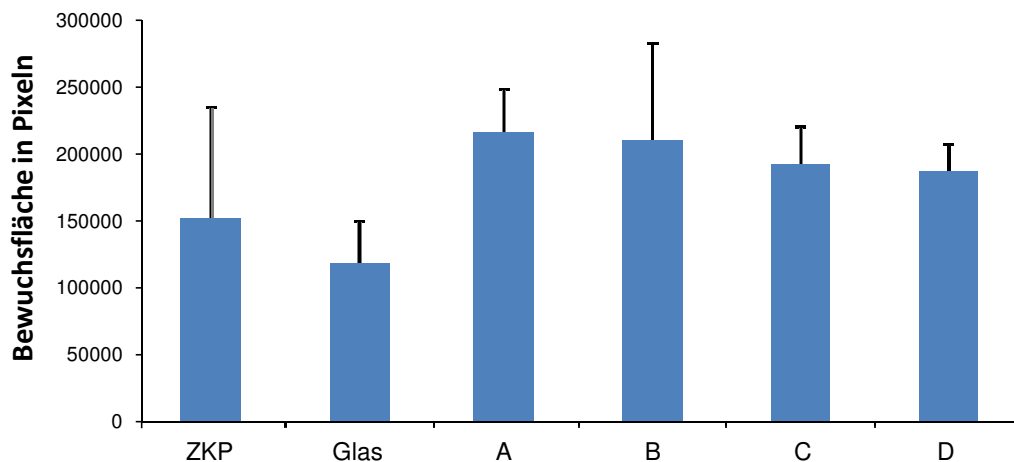


Abbildung 5.36: Bakterienanlagerung (*S. sanguinis*) an die mit PVP beschichteten Proben auf nicht hexyliertem PVP auf Glas (A), hexyliertem PVP auf Glas (B) bzw. auf einer amorphen (C) bzw. auf einer mesoporösen (D) Beschichtung nach 1 h Inkubationszeit. Als Referenz dienten Zellkulturplastik und unbehandeltes Glas.

Zweiwertige Ionen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} können bei ihrer Anwesenheit im Test den Permeabilisierungseffekt empfindlich stören, da diese Kationen mit dem kationischen Gruppen des Biozids um die gleichen Bindungsstellen auf der negativen Bakterienzellwand konkurrieren. Im Nachhinein muss sicherlich in Frage gestellt werden, ob das Polymer in ausreichender Menge angebunden wurde, um eine ansprechende antibakterielle Wirkung zu erzielen. Während das ungebundene, wasserlösliche hexylierte Poly(4-vinylpyridin) für seine antibakterielle Wirkung bekannt ist [213], könnte das kovalente Anbinden den Wirkungsmechanismus dahingehend verändern, dass die Effizienz deutlich herabgesetzt wird [214,215]. Forscher um KENAWY untersuchten die antibakteriellen Eigenschaften quartärer Ammonium- und Phosphoniumverbindungen mit dem Resultat, dass die Wirkung auf grampositive Bakterien deutlich geringer war als auf gramnegative Bakterien [216]. Die hier untersuchten oralen Keime sind ebenfalls grampositiv. Weiterhin ist zu konstatieren, dass die Wirkung auf jeden keim individuell unterschiedlich stark ist.

5.2.2 Silica-Hybridmaterialien

Es wurden insgesamt drei Gruppen von Silica-Hybridmaterialien hergestellt, wobei als Grundlage jeweils reines hexyliertes, octyliertes und decyliertes PVP, eingebettet in Silica, diente. Beschichtungen auf der Basis von jeweils hexyliertem, octyliertem und decyliertem PVP in Silica wurden zusätzlich in Varianten mit Silbersodalith und nanoskaligem Silber ausgestattet. In der Abbildung 5.37 ist eine REM-Aufnahme eines homogenen Hybridfilms bestehend aus Silica und octyliertem Polymer im Verhältnis 5:1 gezeigt. Bei der zweiten Gruppe wurden diese Materialien mit Silbersodalith ausgestattet, die dritte Gruppe der Proben enthält eingebettetes nanoskaliges Silber. In der Tabelle 5.9 sind die Ergebnisse der Farbstofftests für die reinen alkylierten PVP-Silicafilme im Vergleich zu den verschiedenen alkylierten, kovalent angebondenen PVP-Proben dargestellt.

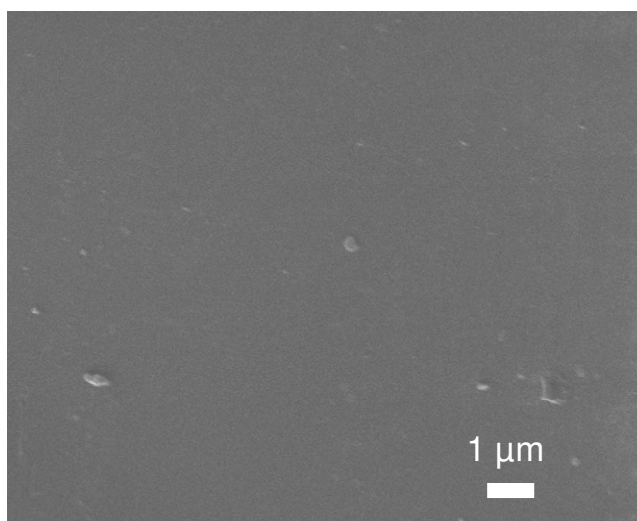


Abbildung 5.37: REM-Aufnahme eines Hybridfilms aus octyliertem PVP und Silica (Verhältnis Silica zu Polymer 5:1). Das Hybridmaterial ergibt einen homogenen Film.

Der Tabelle 5.9 ist klar zu entnehmen, dass die Dichte der quaternären Ammoniumgruppen bei den Polymer-Silica-Hybridmaterialien deutlich höher liegt als bei Proben, bei denen das alkylierte PVP kovalent angebunden ist. Insgesamt konnte die Anzahl der Ammoniumgruppen bis auf das Sechsfache (im Fall der hexylierten Proben) gesteigert werden. Somit eignet sich die Einbettung des Polymers in eine Silicamatrix prinzipiell, um die Konzentration an quartären Ladungsträgern zu erhöhen und so möglicherweise die antibakterielle Aktivität zu

steigern. Diese hängt bei bioziden quartären Ammoniumverbindungen stark von der Dichte dieser Ladungsträger ab [164]. Hier zeigte das hexylierte PVP-Silica-Hybrid die höchste Konzentration an Ammoniumgruppen und von diesem Gesichtspunkt her zunächst die beste Voraussetzung für eine antibakterielle Wirksamkeit.

Tabelle 5.9: Vergleich der mit dem Fluorescein-Test gemessenen Dichte von Ammoniumgruppen für unterschiedlich alkylierte PVP-Silica-Hybrid-Proben und Proben mit kovalent angebundenem PVP, das ebenfalls auf unterschiedliche Weise alkyliert ist.

| Probe | Absorption | $c(\text{Fluo}) / 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ | $c(\text{A}^+) / \text{cm}^2 / \mu\text{mol L}^{-1}$ |
|-------------------------|-------------------|---|--|
| Hexyl-PVP-Silica-Hybrid | 0.078 ± 0.003 | 11.5 | 28.8 |
| Octyl-PVP-Silica-Hybrid | 0.069 ± 0.003 | 10.1 | 25.3 |
| Decyl-PVP-Silica-Hybrid | 0.062 ± 0.004 | 9.1 | 22.8 |
| kov. angebun. Hexyl-PVP | 0.043 ± 0.002 | 6.4 | 4.9 |
| kov. angebun. Octyl-PVP | 0.014 ± 0.003 | 2.1 | 1.6 |
| kov. angebun. Decyl-PVP | 0.017 ± 0.001 | 2.5 | 1.9 |

Darüber hinaus wurden silberhaltige Hybridmaterialien hergestellt, die den Vorteil bieten, die ansonsten in Pulverform vorliegenden silberhaltigen Substanzen (Silbersodalith und -zeolith) in einer antibakteriellen Beschichtung nutzen zu können. In der Abbildung 5.38 ist die homogene Verteilung von Silber in einem Polymer-Silicafilm im Vergleich zum Silicium gezeigt. Die antibakteriellen Eigenschaften der reinen alkylierten Polymer-Silicafilme sowie der mit Silbersodalith und nanoskaligem Silber ausgestatteten Hybridmaterialien wurden in Experimenten an *P. aeruginosa* getestet (Abbildung 5.39).

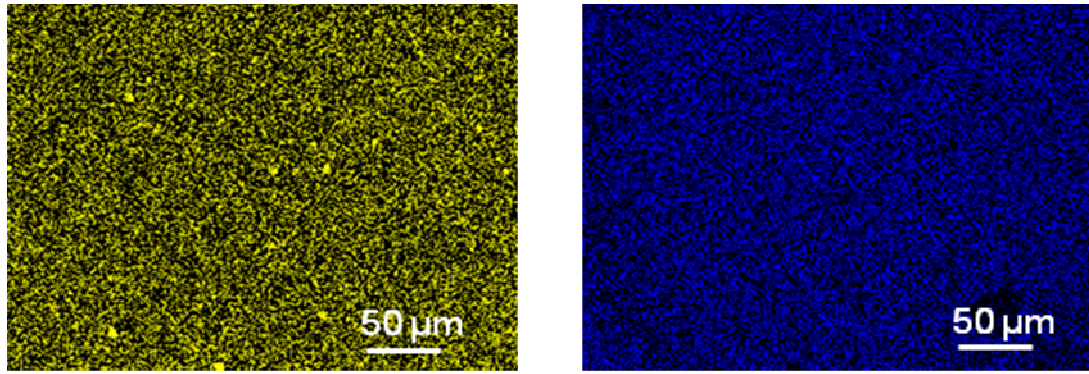


Abbildung 5.38: Ergebnis der Röntgenfluoreszenzanalyse eines silberhaltigen Polymer-Silica-Hybridfilms. Auf dem linken Bild ist die homogene Verteilung des Silbers in der Beschichtung dargestellt, das rechte Bild zeigt zum Vergleich die Verteilung des Siliciums.

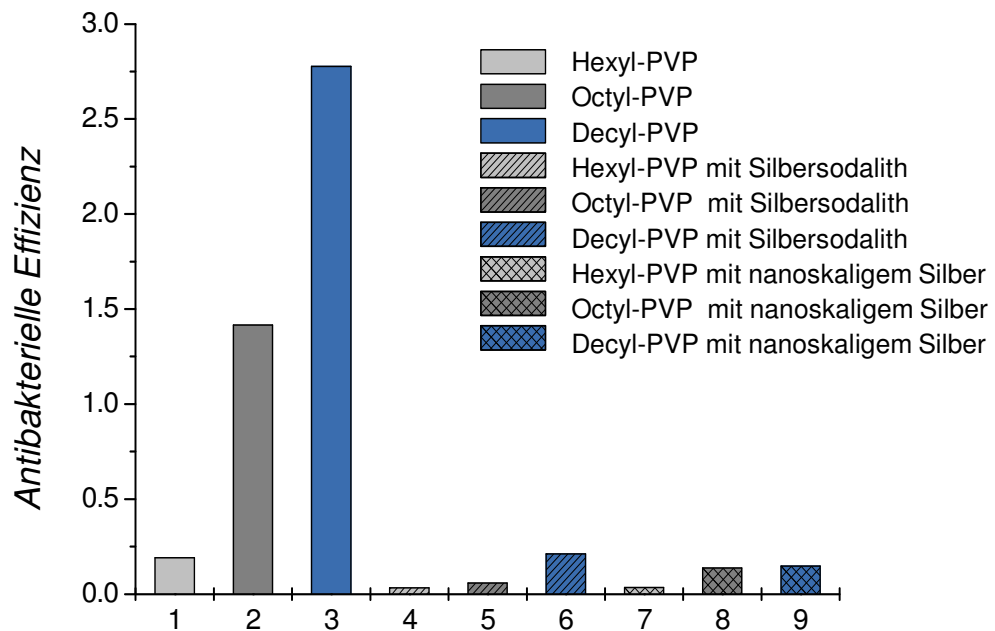


Abbildung 5.39: Ergebnisse bakterieller Tests mit *P. aeruginosa* an verschiedenen PVP-Silicabeschichtungen. Im Vergleich zu reinen alkylierten PVP-Filmen wurde auch die antibakterielle Effizienz silberhaltiger Polymer-Silica-Filme untersucht. Unterhalb von 1.0 gilt ein Material als antibakteriell.

Die Experimente bezüglich der antibakteriellen Eigenschaften der hergestellten Hybridmaterialien zeigen für die Gruppe der reinen alkylierten Polymer-Silicafilme nur im Falle des hexylierten PVP eine gute antibakterielle Wirkung. Die decylierte Variante schneidet im Vergleich am schlechtesten ab und das octylierte Polymer liegt von der Effizienz her betrachtet in der Mitte. Die silberhaltigen Proben zeigen in

diesem Test alle ausnahmslos ausgezeichnete antibakterielle Eigenschaften unabhängig von der eingesetzten Silberquelle. Im Vergleich mit den silberhaltigen Materialien zeigen die reinen hexylierten Polymer-Silica-Proben eine ähnlich starke antibakterielle Aktivität, die in diesem Fall auf eine nicht genügende Stabilität des hexylierten Hybridmaterials beruht. Im Laufe der Experimente löst sich die Polymer-Silicaschicht auf, so dass Polymer in gelöster Form die Bakterien abtöten kann. Somit basierten die guten antibakteriellen Eigenschaften vornehmlich auf einem Freisetzungsmechanismus des Biozids wie er wahrscheinlich auch im Fall der silberhaltigen Proben auf der Freisetzung von Silberionen beruht. Stabilitätsversuche mit den reinen Polymer-Silica-Hybridfilmen in Phosphatpuffer (PBS) und *simulated body fluid* (SBF) bestätigen die Instabilität der hexylierten Proben (Tabelle 5.10). Die simulierte Körperflüssigkeit wurde nach einer Vorschrift von KOKUBO et al. hergestellt [217].

Tabelle 5.10: Ergebnisse der Stabilitätstests verschieden alkylierter Polymer-Silica-Hybridbeschichtungen in PBS und SBF für eine Dauer von 5 d. Bei der Kontrolle handelt es sich um einen reinen amorphen Silicafilm.

| Substanz | PBS | SBF |
|-----------------|-----|-----|
| Hexyl-PVP (1:8) | – | – |
| Octyl-PVP (1:5) | + | + |
| Decyl-PVP (1:5) | + | + |
| Kontrolle | + | + |

Somit sind die hinsichtlich ihrer bakteriellen Potenz vielversprechenden hexylierten PVP-Silica-Hybridmaterialien auf Grund mangelnder Stabilität nicht für den Einsatz als Beschichtung geeignet. Die octylierte Variante ist nicht ausreichend antibakteriell, die decylierte Variante zeigte keinerlei bakterizide Effekte. Beide könnten jedoch als Matrix für die Einlagerung biozider Substanzen wie Silbersodalith oder nanoskaliges Silber und anderer Faktoren genutzt werden.

5.2.3 PVP-Anbindung durch Modifizierung mit BPTMS

Mit Hilfe von 3-Bromopropyltrimethoxysilan (BPTMS) war es möglich, das potentiell bakterizide PVP mit reaktiven Methoxysilylgruppen zu versehen und so auf gereinigten Glasoberflächen kovalent anzubinden. Um die bakterizide Wirkung zu generieren, wurde das Polymer im gleichen Reaktionsschritt hexyliert. Bei der Herstellung der Proben wurde vor allem die Konzentration des eingesetzten Alkylierungsmittels des Polymers variiert, da die so eingeführten quartären Ammoniumgruppen für die antibakterielle Wirkung essentiell sind (Tabelle 5.11).

Tabelle 5.11: Ergebnisse des Fluorescein-Tests an PVP-beschichteten Proben in Abhängigkeit des eingesetzten Alkylierungsmittels. Das PVP wurde nach der Derivatisierung mit BPTMS auf Glasplättchen angebunden und mit verschiedenen Konzentrationen des Alkylierungsreagenzes hexyliert.

| Menge des Alkylierungsmittels | <i>Absorption</i> | $c(\text{Fluo}) / 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ | $c(\text{A}^+) / \text{cm}^2 / \mu\text{mol L}^{-1}$ |
|-------------------------------|-------------------|---|--|
| 37 % | 0.066 ± 0.003 | 9.7 | 10.7 |
| 50 % | 0.061 ± 0.018 | 9.0 | 9.9 |
| 60 % | 0.124 ± 0.011 | 18.0 | 19.9 |
| 70 % | 0.114 ± 0.009 | 16.8 | 18.6 |
| 85 % | 0.205 ± 0.021 | 30.1 | 33.3 |
| 85 % (Mikrowelle) | 0.184 ± 0.026 | 27.1 | 29.9 |

Die Ergebnisse des Fluorescein-Tests zeigen sehr schön, dass mit steigender Alkylierung auch die Anzahl der quartären Ammoniumgruppen auf der Oberfläche steigt. Bei Erhöhung des Alkylierungsmittels auf 85 % der zu alkylierenden Stickstoffatome erreicht die Konzentration mit $33.3 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ mindestens vergleichbar hohe Werte wie bei den hexylierten PVP-Silica-Hybridfilmen (vergleiche Tabelle 5.9). Auch wenn die Reaktion in der Mikrowelle durchgeführt wurde, zeigen sich ähnlich hohe Werte. Die Stabilität der Filme wurde mit Hilfe einer Soxhlet-Extraktionsapparatur getestet. Hierfür wurden die Filme zwei Tage mit

Ethanol extrahiert, was keine signifikante Auswirkung auf die Dichte der Ammoniumgruppen mit sich brachte. Die Stabilität gegenüber Reinwasser wurde ebenfalls geprüft, indem die Filme für einen Zeitraum zwischen zwei und fünf Tagen in Polyethylengefäßen bei 37 °C gelagert wurden. Auch in diesem Fall zeigen die Ergebnisse des Fluorescein-Tests unveränderte Werte. Die Ergebnisse der Stabilitätstests sind zusammenfassend in der Tabelle 5.12 dargestellt.

Tabelle 5.12: Ergebnisse der in Ethanol und Wasser durchgeführten Stabilitätstests anhand von Werten des Fluorescein-Tests an PVP-beschichteten Proben. Das PVP wurde nach Derivatisierung mit BPTMS auf Glasplättchen angebunden und mit verschiedenen Konzentrationen des Alkylierungsreagenzes hexyliert.

| Menge des Alkylierungsmittels | Testmedium | * $c(A^+) / \text{cm}^2$ / $\mu\text{mol L}^{-1}$ | # $c(A^+) / \text{cm}^2$ / $\mu\text{mol L}^{-1}$ |
|-------------------------------|------------|--|--|
| 37 % | Ethanol | 10.7 | 10.6 |
| 37 % | Wasser | 10.7 | 10.9 |
| 60 % | Ethanol | 19.9 | 20.1 |
| 60 % | Wasser | 19.9 | 19.8 |
| 85 % | Ethanol | 33.3 | 32.5 |
| 85 % | Wasser | 33.3 | 33.2 |

* vor dem Test

nach 3 Tagen Inkubation

Untersuchungen zu den antibakteriellen Eigenschaften der erhaltenen Materialien wurden von MUHAMMAD BADAR am Helmholtz Institut für Infektionsforschung in Braunschweig durchgeführt. Hierzu wurden die Bakterien mit einem sogenannten Live/Dead-Farbstoff angefärbt, unter dessen Einwirkung lebende Bakterien eine grüne Färbung annehmen, während tote Bakterien rot angefärbt werden. Durch Zellzählung kann dann auch eine quantitative Bewertung vorgenommen werden. Die zuvor beschriebenen Materialien erwiesen sich in diesen Tests als durchgehend nicht antibakteriell. So konnte stets eine deutlich höhere Anzahl überlebender Bakterien im Vergleich zu den abgetöteten Bakterien beobachtet werden (Abbildung 5.40).

Obwohl die Konzentration der Ammoniumgruppen mit bis zu $33.3 \mu\text{mol L}^{-1} \text{cm}^{-2}$ im ähnlichen Bereich liegt wie im Fall der hexylierten PVP-Silica-Hybridfilme, können hier die den antibakteriellen Effekt erzeugenden funktionellen Gruppen keine Wirkung auf die Bakterien ausüben.

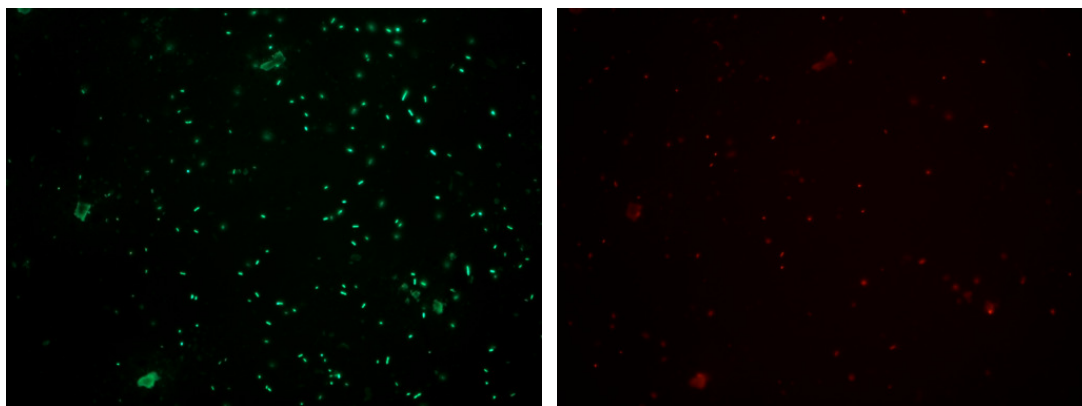


Abbildung 5.40: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Live/Dead-Farbuntersuchung an einer nach der Derivatisierung mit BPTMS mit hexyliertem PVP beschichteten Probe nach 30 min Inkubationszeit. Lebende Bakterien des Stammes *P. aeruginosa* werden grün angefärbt (links), während tote Bakterien auf derselben Probe rot gefärbt erscheinen.

Sicherlich muss hier bedacht werden, dass die Hybridfilme sehr gut löslich waren und die starke antibakterielle Wirksamkeit wohl hauptsächlich auf gelöstes antibakterielles Polymer zurückzuführen ist. Diese angebundene Menge an PVP ist hingegen nicht ausreichend für einen antibakteriellen Effekt.

Die Bewertung der Ergebnisse der antibakteriellen Untersuchungen ist vor dem Hintergrund, dass verschiedene Keime unterschiedliche Reaktionen auf die verschiedenen Beschichtungen zeigen könnten, sehr schwierig. Im Fall von *Pseudomonas aeruginosa*, einem typischen Keim des Mittelohrs, zeigte die Methode der Anbindung von PVP mit Hilfe der Modifizierung mit einem auf Silicaoberflächen selbsthaftenden Silan nicht die erforderliche Wirksamkeit. Weiterhin zeigen die unterschiedlichen Wirkmechanismen im direkten Vergleich, Freisetzung im Falle der hexylierten Hybridfilme versus Oberflächenkontakt im Falle der durch Silan angebondenen PVP-Filme, die Herausforderung, eine antibakterielle Beschichtung zu entwickeln, die nicht auf einen Freisetzungsmechanismus basiert.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit beschäftigte sich mit Hybridwerkstoffen aus silicatischen Materialien und stickstoffhaltigen Polymeren mit zwei unterschiedlichen Zielsetzungen. Im ersten Teil wurde die Bildung von Hybridmaterialien aus Polyaminen und amorphem Siliciumdioxid untersucht, ein biomimetisches System, das als Modell für die Abscheidung von Silica in den Schalen von Kieselalgen dient. Das Ziel im zweiten Teil der Arbeit war es, auf der Basis potentiell bakterizider Polymere, antibakterielle Beschichtungen für den Einsatz im biomedizinischen Bereich zu entwickeln.

Der erste Teil dieser Arbeit hatte als Zielsetzung die Untersuchung von Kieselsäurekondensationsreaktionen unter dem Einfluss von Polypropyleniminen verschiedener Kettenlängen. Lineare Polyamine sind ein charakteristischer Bestandteil von Diatomeenschalen, sie sind für ihre Fähigkeit bekannt, in Anwesenheit von multivalenten Anionen, wie zum Beispiel Phosphat, Silica auszufällen. Die Untersuchung der Einflüsse, die die Eigenschaften der Polyamine, wie zum Beispiel deren Kettenlänge und ihr Methylierungsgrad, auf die Bildung von amorphem Siliciumdioxid haben, ist daher von großem Interesse für die Aufklärung der Mechanismen der Biomineralisation. Vor allem über den Einfluss kurzer Polyamine auf diesen Prozess ist wenig bekannt. Hier wurden deshalb Polypropylenimine mit maximal acht Ketteneinheiten eingesetzt, Untersuchungen zu längeren Polyaminen finden sich in den Arbeiten von JAHNS [20,96]. Genauere Erkenntnisse über Wechselwirkungen zwischen Polyaminen und Kieselsäure könnten zukünftig auch als Basis für die Herstellung neuartiger Materialien interessant sein.

Zur Untersuchung des Reaktionssystems Polyamin-Silica auf niedermolekularer Ebene wurden zunächst kinetische Messungen gemäß der Molybdatmethode durchgeführt [178]. Diese zeigten keinen signifikanten Einfluss der Kettenlänge der Polyamine auf die Kieselsäurekondensation. Diese Erfahrungen wurden bereits in den Studien von JAHNS gemacht [96], so dass die aufgetretenen geringfügigen Unterschiede der kinetischen Kurven kleinen pH-Wert-Schwankungen zugeschrieben werden müssen. Den Ergebnissen zufolge reagieren erst höher kondensierte Kieselsäurespezies, als sie in der Initialphase vorliegen, mit den Polyaminen. Diese Kieselsäureoligomere sind bereits nicht mehr molybdatreaktiv, so

dass ihre Umwandlung zu Polyamin-Silica-Partikeln mit der Molybdatmethode auch nicht nachvollzogen werden kann.

Aus zahlreichen Studien ist die Präzipitationsaktivität langkettiger Polyamine im Polyamin-Silica-Reaktionssystem bekannt. Die in dieser Arbeit untersuchten Polyamine zeigen eine solche Aktivität im Falle des PPI₈ an; das methylierte Hexaazadocosan (MHAD) zeigt auch eine gewisse Aktivität, führt allerdings unter vergleichbaren Bedingungen lediglich zu einer Trübung der Lösung, ein Präzipitat konnte nicht isoliert werden. Die kürzeren Polyamine zeigten keine Effekte. Mit Messungen der Dynamischen Lichtstreuung konnten darüber hinaus die makromolekularen Silicaspezies sowie Polyamin-Phosphat-Aggregate beobachtet werden, die sich während dieser Präzipitationsexperimente bildeten. Dementsprechend konnte nur für die Reaktionen in Gegenwart von PPI₈ und MHAD ab einem Phosphatzusatz von 30 mM jeweils ein deutlicher Anstieg der Partikelgrößen zu Beginn der Kondensationsreaktion beobachtet werden. Der Vergleich mit Partikelgrößen, die in früheren Experimenten bei Reaktionen in Gegenwart längerer Polyamine gemessen wurden, zeigt einen Trend zu abnehmenden Partikeldurchmessern mit abnehmender Kettenlänge. Die erhaltenen Partikelgrößen d_Z sowie die maximalen Partikeldurchmesser d_{Zmax} , wie sie aus den DLS-Messungen erhalten wurden, sind in Tabelle 6.1 in Form der Z -Mittel dargestellt.

Tabelle 6.1: Zusammenfassung der in Gegenwart verschieden langer Polyamine sowie unterschiedlicher Phosphatkonzentrationen c_P erhaltenen Partikeldurchmesser d_Z und d_{Zmax} . Werte für PMPI₁₄ und PMPI₉ wurden aus [203] entnommen.

| Polyamin | c_P / mM | d_Z / nm | d_{Zmax} / nm |
|--------------------|------------|------------|-----------------|
| PMPI ₁₄ | 10 | 2400 | 2000 |
| PMPI ₉ | 10 | 1250 | 2600 |
| PPI ₈ | 30 | 600 | 1600 |
| MHAD | 30 | 220 | 500 |
| HAD | 30 | – | – |

Die Ergebnisse deuten tendenziell darauf hin, dass die Kettenlänge von Polyaminen durchaus für die Größe der Silicapartikel relevant ist. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass hier der hydrodynamische Radius der Partikel verglichen wird, bei denen es sich aber auch bereits um Aggregate/Agglomerate handeln kann.

Insgesamt kann aufgrund der Präzipitationsversuche sowie der DLS-Messungen somit eine untere Grenze der Präzipitationsaktivität, also der Fähigkeit der PPIs und PMPIs, mineralisierbare Polyamin-Aggregate bilden zu können, festgestellt werden. Diese ist für diese beiden Spezies unterschiedlich. Sie liegt bei acht Propylenimineinheiten im Falle der PPIs, im Falle der PMPIs ist bei sechs Methylpropylenimineinheiten zumindest noch eine Trübungsaktivität zu verzeichnen. Methylierte Polyamine üben also bei den gewählten Versuchsbedingungen einen stärkeren Einfluss auf die Kieselsäurekondensation aus, denn sie vermögen es auch bei kürzerer Kettenlänge, Silica auszufällen. Studien von PERRY et al., die sich mit Untersuchungen von kurzen Polyaminen sowie von Putrescin-Homologen beschäftigen, führen dies im Wesentlichen auf die Unterschiede in den hydrophoben Eigenschaften von Polyaminen zurück [21-23]. So führt die Methylierung zur Erhöhung des hydrophoben Charakters eines Polyamins, was die Bildung stabilerer Polyamin-Tröpfchen unterstützt [21], die dann in Folge der Kondensation mineralisiert werden. Eine weitere Folge der Methylierung ist, dass stärker geladene Spezies entstehen als im Fall unmethylierter Polyamine [21]. Somit liegen in diesem Fall auch stärkere elektrostatische Interaktionen zwischen Polyamin und Kieselsäure vor, was die Bildung von mineralisierbaren Polyamin-Aggregaten erleichtert. Auch die Länge der Polyamine ist den Studien zufolge für das Ausmaß des hydrophoben Effekts verantwortlich. So ist es nicht verwunderlich, dass mit abnehmender Kettenlänge auch die Fähigkeit nachlässt, Silica auszufällen. Dieser kettenlängenabhängige Effekt konnte hier besonders im Falle von MHAD beobachtet werden.

Die Berücksichtigung aller Ergebnisse führt folglich zum Schluss, dass für die Fähigkeit von methylierten sowie unmethylierten Propyleniminen, unter Präzipitatbildung mit Kieselsäure zu interagieren, eine Mindestkettenlänge der jeweiligen Spezies erforderlich ist. Der gefundene Wert stimmt dabei gut mit den Befunden an den lebenden Organismen überein, denn im Biosilica der Kieselalgen können natürliche Polyamine erst ab einer Kettenlänge von mindestens acht Propylenimineinheiten gefunden werden [9,14,74]. Aus den Ergebnissen, die hier mit

kurzkettigen Polyaminen (HAD, MHAD, Spermin, MSpermin) gewonnen wurden, ergeben sich Hinweise darauf, dass solche kurzkettigen Spezies für die Bildung von mineralisierbaren Polyamin-Aggregaten während des Schalenbaus in den Diatomeen nicht relevant sind und sich deshalb auch nicht im Biosilica finden.

Trotz der vorliegenden Beweise für eine von der Länge der Polyamine abhängigen Aktivität, wären weitere Untersuchungen an kurzen Polyaminen sinnvoll und interessant. So könnten Experimente an Polyaminen verschiedener Methylierungsgrade weiteren Aufschluss über ihre Reaktivität geben. Insbesondere *in situ* Messungen mit der Röntgen-Kleinwinkelstreuung (SAXS) könnten wichtige Informationen hinsichtlich der Struktur und der Form der Polyaminmakromoleküle in Lösung sowie der während des Mineralisationsprozesses entstehenden Aggregate und Partikel liefern.

Der zweite Teil der Arbeit behandelt die Entwicklung antibakterieller Beschichtungen für den Einsatz im biomedizinischen auf der Basis des kommerziell erhältlichen Poly(4-vinylpyridin) (PVP), welches nach einer Hexylierung gemäß Literatur [33,34,213] eine antibakterielle Wirkung entfaltet. Für den Aufbau einer bakteriziden Beschichtung wurde das Polymer kovalent an unterschiedlich modifizierte Glasoberflächen angebunden. Dabei handelte es sich um reines Glas sowie Glasplättchen, die mit einer amorphen oder mesoporösen Silicabeschichtung modifiziert wurden. Des Weiteren wurden unterschiedlich alkylierte Polymer-Silica-Hybridfilme präpariert. In einem dritten Ansatz wurde das Polymer mit reaktiven Methoxysilylgruppen ausgestattet und so kovalent an Glasoberflächen angebunden.

Im ersten Fall konnte die erfolgreiche Anbindung der einzelnen Linkermoleküle sowie des Polymers mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen verfolgt werden, die eine zunehmende Hydrophobisierung der Oberfläche auf Grund der eingeführten Alkylketten der verlinkten Substanzen zeigten. Die nach der Hexylierung eingeführten und für eine bakterizide Wirkung essentiellen quartären Ammoniumgruppen konnten mit Hilfe des Fluorescein-Tests quantitativ bestimmt werden. Alle drei Oberflächen (reines Glas, amorphe bzw. mesoporöse Beschichtung) erwiesen sich für eine Anbindung nach diesem Reaktionsschema als vergleichbar geeignet. So konnte im Fall der Hexylierung eine Ammoniumgruppendichte zwischen 4.5 und 4.9 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{cm}^{-2}$ ermittelt werden. Die octylierten bzw. decylierten Varianten zeigten dagegen weit niedrigere Werte.

Tabelle 6.2: Übersicht der mit Hilfe von Fluorescein-Tests gemessenen Konzentrationen der Ammoniumgruppen $c(A^+)$ von hexylierten, octylierten bzw. decylierten PVP-Proben. Die Beschichtungen wurden durch kovalente Anbindung von PVP nach Modifizierung der Oberfläche mit APTMS, in Form von PVP-Silica-Hybridfilmen oder durch kovalente Anbindung mit Hilfe von BPMTS-derivatisierten Polymeren erzeugt.

| Anbindung | $c(A^+) / \text{cm}^2 / \mu\text{mol L}^{-1}$ | | |
|-------------------------------------|---|-----------|-----------|
| | hexyliert | octyliert | decyliert |
| kovalent über APTMS | 4.9 | 1.6 | 1.9 |
| Hybridfilme | 28.8 | 25.3 | 22.8 |
| kovalent nach BPTMS-Derivatisierung | 33.3 | – | – |

In vitro-Untersuchungen zur Zellkompatibilität mit murinen und humanen Gingivafibroblasten zeigten keine toxischen Effekte der Polymere und somit eine prinzipielle Eignung zum Einsatz als potentiell bakterizide Beschichtungen. Untersuchungen zur antibakteriellen Wirkung der über das APTMS-System angebondenen Polymerbeschichtungen an zwei verschiedenen Keimen konnten aber keine biozide Wirkung der Substrate feststellen. Lediglich im Falle der amorph beschichteten Proben konnte in beiden Experimenten ein auffälliges Verhalten in Form von bakteriellem Stress vor allem im Randbereich der Probekörper beobachtet werden, der auf Grund des Spin Coating-Prozesses vermutlich sehr rau ist. Zahlreiche Studien gehen davon aus, dass raue Oberflächen bevorzugt von Bakterien besiedelt werden, während Oberflächen, deren Vertiefungen und Mulden eine für die Bakterienart unpassende Größe aufweisen, deutlich schlechter besiedelt werden [154,155]. Auf der anderen Seite liegen auch Ergebnisse vor, die eine Kolonisierung von bevorzugt glatten und nanostrukturierten Oberflächen belegen [212]. In jedem Fall zeigten die Proben nicht den gewünschten antibakteriellen Effekt, was vermutlich auf eine zu geringe Anzahl der Ammoniumgruppen auf der Oberfläche zurückzuführen ist.

Im Falle der Hybrid-Materialien konnte die Dichte der Ammoniumgruppen den Fluorescein-Tests zufolge im Vergleich zu den kovalent angebondenen Proben gesteigert werden. Untersuchungen zu den antibakteriellen Eigenschaften zeigten auch im Falle der reinen hexylierten Silica-Hybridfilme sowie aller silberhaltigen

Proben eine ausgezeichnete biozide Wirkung gegen *P. aeruginosa* (siehe Abbildung 5.39). Diese sind im Falle des hexylierten Hybridfilms (ohne silberhaltige Partikel) allerdings auf dessen geringe Stabilität in Wasser zurückzuführen, so dass hier vor allem das gelöste hexylierte Polymer als antibakterielles Agens gewirkt haben dürfte. Eine dauerhafte antibakterielle Beschichtung ließ sich auf diese Weise nicht generieren.

Dagegen zeigten die durch kovalente Anbindung von hexyliertem PVP, das mit BPTMS derivatisiert worden war, hergestellten Filme eine gute Stabilität gegenüber Wasser und Alkoholen. Bei dieser Variante konnten im Fluorescein-Test ähnliche Werte ermittelt werden, wie sie im Falle der hexylierten Hybridfilme erhalten wurden. Untersuchungen in Bakterienkulturen von *P. aeruginosa* konnten jedoch keine antibakterielle Wirksamkeit der Proben feststellen. Somit wurden mit dieser Methode zwar stabile Filme erhalten, die für den Einsatz im medizinischen Bereich geeignet wären, jedoch scheint diese Art der Anbindung des Polymers die antibakterielle Wirksamkeit im Vergleich zu der sehr guten von löslichem Poly(4-vinyl-*N*-hexylpyridiniumbromid) zu hemmen.

Somit konnte die in der Literatur beschriebene antibakterielle Wirkung mit den in dieser Arbeit hergestellten Beschichtungen nicht erreicht werden. Die Gründe liegen vermutlich in einer nicht ausreichenden Dichte an quaternären Ammoniumgruppen. Die zukünftige Forschung in diesem Bereich sollte daher die Vermehrung dieser Gruppen zum Ziel haben. Die Silicahybridfilme weisen hier einen Weg; allerdings müsste durch eine direkte kovalente Verknüpfung des Polymers mit den Silicapartikeln ein unlösliches Beschichtungsmaterial geschaffen werden. Eine Alternative stellen Beschichtungen dar, aus denen Biozide sehr langsam freigesetzt werden. Eine solche starke Kontrolle der Freisetzung könnte eine langfristige Wirkung ermöglichen. Dabei ist auch eine Kombination von verschiedenen Bioziden denkbar, die schrittweise kontrolliert abgegeben werden können, um verschiedenen Stadien einer Infektion gerecht zu werden. Eine andere Möglichkeit stellt eine geschickte Strukturierung der Oberfläche dar, die so eingestellt wird, dass Bakterien keinen geeigneten Lebensraum finden. Am Beispiel der amorphen Proben konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass die Topographie des Untergrunds eine große Rolle für die Bakterienadhäsion spielen kann.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Notch Consulting Group, *World Market for Precipitated Silica*, 2006, Amherst, MA.
- [2] Müller, W.E.G., *Silicon Biomineralization*, Springer, Berlin, 2003.
- [3] Hamm, C. E., Merkel, R., Springer, O., Jurkojc, P., Maier, C., Prechtel, K., Smetacek, V., *Nature*, 2003, **421**, 841-843.
- [4] Hildebrand, M., Doktysz, M.J., Allison, D.P., *Pflugers Arch - Eur. J. Physiol.*, 2008, **456**, 127-137.
- [5] Losic, D., Pillar, R.J., Dilger, T., Mitchell, J.G., *J. Porous Mater.*, 2007, **14**, 61-69.
- [6] Gordon, R., Losic, D., Tiffany, M.A., Nagy, S.S., Sterrenburg, F.A.S., *Trends in Biotechnology*, 2009, **27**, 116-127.
- [7] Betancor, L., Luckarift, H.R., *Trends in Biotechnology*, 2008, **26**, 566-571.
- [8] Lettieri, S., Setaro, A., De Stefano, L., De Stefano, M., Maddalena, P., *Adv. Funct. Mater.*, 2008, **18**, 1257-1264.
- [9] Sumper, M., Brunner, E., *Adv. Funct. Mater.*, 2006, **16**, 17-26.
- [10] Losic, D., Mitchell, J.H., Voelcker, N.H., *Chem. Comm.*, 2005, **39**, 4905-4907.
- [11] Tesson, B., Genet, M.J., Fernandez, V., Degand, S., Rouxhet, P.G., Martin-Jezequel, V., *Chem. Bio. Chem.*, 2009, **10**, 2011-2124.
- [12] Wetherbee, R., *Science*, 2002, **298**, 547.
- [13] Kröger, N., Deutzmann, R., Bergsdorf, C., Sumper, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, **26**, 14133-14138.
- [14] Sumper, M., Brunner, E., Lehmann, G., *FEBS Lett.* 2005, **579**, 3765-3769.
- [15] Kröger, N., Deutzmann, R., Sumper, M., *Science*, 1999, **286**, 1129-1132.
- [16] Sumper, M., Kröger, N., *J. Mater. Chem.*, 2004, **14**, 2059-2065.
- [17] Kröger, N., Deutzmann, R., Sumper, M., *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 26066-26070.
- [18] Wenzl, S., Hett, R., Richthammer, P., Sumper, M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 1729-1732.
- [19] Losic, D., Short, K., Mitchell, J.G., Ratnesh, L., Voelcker, N.H., *Langmuir*, 2007, **23**, 5014-5021.
- [20] Behrens, P., Jahns, M., Menzel, H., *The Polyamine Silica System: A biomimetic Model for the Biomineralization of Silica in Handbook of biomineralization*, Bd. 2, Behrens, P., Baeuerlein, E., Wiley-VCH Weinheim, 2007, 1-17.
- [21] Belton, D.J., Patwardhan, S.V., Annenkov, V.V., Danilovtseva, E.N., Perry, C. C., *Proc. Natl. Sci. U.S.A.*, 2008, **105**, 5963-5968.

- [22] Belton, D., Patwardhan, S.V., Perry, C.C., *Chem. Commun.*, 2005, 3475-3477.
- [23] Belton, D.J., Patwardhan, S.V., Perry, C.C., *J. Mater. Chem.*, 2005, **15**, 4629-4638.
- [24] Cornelius, F., *Synthese von Modellsystemen und deren Einfluss auf die Biomineralisation von Siliciumdioxid*, Dissertation, 2009, Technische Universität Braunschweig.
- [25] Widmer, A.F., *Clin. Infect. Dis.*, 2001, **33**, 94-106.
- [26] Campoccia, D., Montanaro, L., Arciola, C.R., *Biomaterials*, 2006, **27**, 2331-2339.
- [27] Ranucci, E., Ferruti, P., *Polymer.*, 1991, **32**, 2876-2879.
- [28] Ehlert, N., Behrens, P., Nanoporöses Silica, *Uni Magazin Hannover*, 2010, **1**, 28-31.
- [29] Matz, C., Bergfeld, T., Rice, S.A., Kjelleberg, S., *Environ. Microbiol.*, 2004, **6**, 218-226.
- [30] Sarro, M.I., Moreno, D.A., Chicote, E., Lorenzo, P.I., Garcia, A.M., Montero, F., *Materials Corrosion*, 2003, **54**, 535-540.
- [31] Schachter, B., *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**, 361-365.
- [32] Milovic, N.M., Wang, J., Lewis, K., Klibanov, A.M., *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, **90**, 715-722.
- [33] Klibanov, A.M., *J. Mater. Chem.*, 2007, **17**, 2479-2482.
- [34] Tiller, J., Liao, C.-J., Lewis, K., Klibanov, A.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001, **98**, 5981-5985.
- [35] Krueger, I., *Auf dem Weg zu neuartigen Biomaterialien: Nanoporöse Beschichtungen und organisch-anorganische Kompositwerkstoffe*, Dissertation, 2006, Universität Hannover.
- [36] Turck, C., Brandes, G., Krueger, I., Behrens, P., Lenarz, T., Stieve, M., *Acta Otolaryngo.*, 2007, **27**, 801.
- [37] Aichmayer, B., Fratzl, P., *Physik Journal*, 2010, **9**, 33-38.
- [38] www.digitalefolien.de/biologie/mensch/skelett/knochen.JPG, 09. April 2010.]
- [39] www.uni-mainz.de/presse/25814.php, 09. April 2010.
- [40] www.welt.de/wissenschaft/article2086062/Lebensrettendes_Reiskorn_hat_machtinge_Gegner.html, 09. April 2010.
- [41] Lowenstamm, H. A., Weiner, S., *On Biomineralization*, Oxford University Press, New York, 1989.
- [42] Epple, M., *Biomaterialien und Biomineralisation*, Teubner Studienbücher Chemie, Wiesbaden, 2003.
- [43] Termine, J.D., Kleinmann, H.K., Whitson, S.W., Conn, K.M., McGarvey, M.L., Martin, G.R., *Cell*, 1981, **26**, 99-105.
- [44] Wang, R.Z., Cui, F.Z., Lu, H.B., Wen, H.B., Ma, C.L., Li, H.D. *J. Mater. Sci. Lett.*, 1995, **14**, 490-492.

- [45] Olszta, M.J., Cheng, X., Sang, S.J., Kumar, R., *Mater. Sci. Eng. R.* 2007, **58**, 77-116.
- [46] Bayrhuber, H., Kull, U., *Linder Biologie*, 20. Ausgabe, Schroedel Schulbuchverlag, Hannover, 1989.
- [47] Richardson, W. D., *Science*, 1920, **51**, 546-551.
- [48] Lanning, F.C., Ponnaiya, B.W.X., Crumpton, C.W., *Plant Physiology.*, 1958, **33**, 339-343.
- [49] Sanchez-Flores, N.A., Pacheco-Malagon, G., Perez-Romero, P., Armendariz, H., de Guzman-Castillo, M., Saniger, J.M., Fripiat, J.J., *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2007, **82**, 614-619.
- [50] Holzhüter, G, Narayanan, K., Gerber, T., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **376**, 512-517.
- [51] Finkelstein, M.J., Nancollas, G.H., *J. Biomed. Mater. Res.*, 1980, **14**, 533-535.
- [52] Addadi, L., Raz, S., Weiner, S., *Adv. Mater.*, 2003, **15**, 959-970.
- [53] Nelson, D.M., Treguer, P.; Brzezinski, M.A., Leynaert, A., Queguiner, B., *Global Biogeochem. Cycles*, 1995, **9**, 359-372.
- [54] Falkowski, P.G., Barber, R.T., Smetacek, V., *Science*, 1998, **281**, 200-2006.
- [55] Brunner, E., Gröger, C., Lutz, K., Richthammer, P., Spinde, K., Sumper, M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, **84**, 607-616.
- [56] Sumper, M., Brunner, E., *Chem. Bio. Chem.*, 2008, **9**, 1187-1194.
- [57] Hildebrand, M., *Silic acid transport and its control during cell wall silification in diatoms in Biomineralization - from biology to biotechnology and medical applications*, Bäuerlein, Weinheim, 2000, 170-188.
- [58] Mann, D.G., Droop, S.J.M., *Hydrobiologia*, 1996, **336**, 19-32.
- [59] van den Hoek, C., Mann, D.G., Jahns, H.M., *Algae - An Introduction to Phycology*, Cambridge University Press, Cambridge, 1998.
- [60] Armbrust, E.V., Berges, J.A., Bowler, C., Green, B.R. *Science*, 2004, **306**, 79-86.
- [61] Mock, T., Samanta, M.P., Iverson, V., Berthiaume, C., Robison, M., Holtermann, K., Durkin, C., Splinter Bon Durant, S., Richmond, K., Rodesch, M., Kallas, T., Huttlin, E.L., Cerrina, F., Sussman, M.R., Armbrust, E.V., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2008, **105**, 1579-1584.
- [62] Crawford, S.A., Higgins, M J., Mulvaney, P., Wetherbee, R., *J. Phycol.*, 2001, **37**, 543-554.
- [63] Noll, F., Sumper, M., Hampp, N., *Nano Lett.*, 2002, **2**, 91-95.
- [64] Wenzl, S., Deutzmann, R., Hett, R., Hochmuth, E., Sumper, M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 5933-5936.
- [65] Kröger, N., Lorenz, S., Brunner, E., Sumper, M., *Science*, 2002, **298**, 584-586.
- [66] Knott, J.M., Römer, P., Sumper, M., *FEBS Lett.*, 2007, **581**, 3081-3086.

- [67] Cavanagh, J., Fairbrother, W.J., Palmer, A.G. III, Skelton, N.J., *Protein NMR spectroscopy*, Academic Press, San Diego, 1996.
- [68] Lutz, K., Gröger, C., Sumper, M., Brunner, E., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2005, **7**, 2812-2815.
- [69] Poulsen, N., Kröger, N., *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 42993-42999.
- [70] Barrer, R.M., *Zeolites*, 1981, **1**, 130-140.
- [71] Tabor, C. W., Tabor, H., *Annu. Rev. Biochem.*, 1984, **53**, 749-790.
- [72] Martin-Tanguy, J., *Plant Growth Regulat.*, 2000, **100**, 675-688.
- [73] Sumper, M., *Science*, **295**, 2002, 2430-2433.
- [74] Sumper, M., Lorenz, S., Brunner, E., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, **42**, 5192-5195.
- [75] Iler, R.K., *The chemistry of silica*, Wiley-Interscience, New York, 1979.
- [76] Tanaka, M., Takahashi, K., Urabe, T., Oikawa, T., Nemoto, M., Nagashima, H., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2009, **23**, 698-704.
- [77] Hildebrand, M., Volcani, B.E., Gassmann, W., Schroeder, J.I., *Nature*, 1997, **385**, 688-689.
- [78] Thamatrakoln, K., Hildebrand, M., *Eukaryotic Cell*, 2007, **6**, 271-279.
- [79] Martin-Jezequel, V., Hildebrand, M., Brzezinski, M.A., *J. Phycol.*, 2000, **36**, 821-840.
- [80] Martin-Jezequel, V., Lopez, P., *Silicon - a central metabolite for diatom growth and morphogenesis*, Müller, W.E.G., 2003, **33**, 99-124.
- [81] Baeuerlein, E., *Angew. Chem. Int.*, 2003, **42**, 614-641.
- [82] Bai, S., Tsuji, J., Okaue, Y., Yokoyama, T., *Chem Lett.*, 2008, **37**, 1168-1169.
- [83] Demadis, K.D., Ketsetzi, A., Pachis, K., Ramos, V.M., *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 3288-3293.
- [84] Vrieling, E.G., Gieskes, W.W.C., Beelen, T.P.M., *J. Phycol.*, 1999, **35**, 548-559.
- [85] Sumper, M., Brunner, E., *Chem. Bio. Chem.*, 2008, **9**, 1187-1194.
- [86] Zurzulo, C., Bowler, C., *Plant Phys.*, 2001, **127**, 1339-1345.
- [87] Gröger, C., Sumper, M., Brunner, E., *Journal of Structural Biology*, 2008, **161**, 55-63.
- [88] Gröger, C., Lutz, K., Brunner, E., *Cell Biochem. Biophys.*, 2008, **50**, 23-39.
- [89] Helmecke, O., Hirsch, A., Behrens, P., Menzel, H., *J. Colloid and Interface Science*, 2008, **321**, 44-51.
- [90] Kresge, C.T., Leonowicz, M.E., Roth, W.J., Vartuli, J.C., Beck, J.C., *Nature*, 1992, **359**, 710-712.
- [91] Beck, J.S., Vartuli, J.C., Roth, W.J., Leonowicz, M.E., Kresge, C.T., Schmitt, K.D., Chu, C.T-W., Olson, D.H., Sheppard, E.W., McCullen, S.B., Higgins, J.B., Schlenker, J.L., *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 10834-10843.

- [92] Vrieling, E.G., Beelen, T.P.M., van Santen, R.A., Gieskes, W.W.C., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 1543-1546.
- [93] Hazelaar, S., van der Strate, H.J., Gieskes, W.W.C., Vrieling, E.G., *Biomol. Eng.*, 2003, **20**, 163-169.
- [94] Poulsen, N., Sumper, M., Kröger, N., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2003, **100**, 12705-12080.
- [95] Brinker, C.J., *J. Non-Chryst. Solids*, 1998, **100**, 31-50.
- [96] Jahns, M., *Quantitative Untersuchungen an Modellsystemen zur Biomineralisation von Siliciumdioxid*, Dissertation, 2007, Leibniz Universität Hannover.
- [97] Lenarz, T., Stieve, M., *Implantate im Mittelohrbereich - Teil 2 in Medizintechnik - Life Science Engineering*, Wintermantel, E., Ha Suk-Woo, Springer Verlag, Berlin, 2008, 1425-1439.
- [98] Lenarz, T., Boenninghaus, H.-G., *HNO*, Springer Verlag, Heidelberg, 2005, 401.
- [99] Lippert, H., *Lehrbuch der Anatomie*, Urban & Fischer, München, 2003, 556-564.
- [100] Schmid, S., *Hörverbesserung nach Tympanoplastik III: Eine medizinische und medizinisch-ökonomische Betrachtung*, Dissertation, 2006, Wilhelms-Universität Münster.
- [101] Sobotta, J., *Atlas of human anatomy - head, neck and upper limb*, Vol. 1, Putz, R., Pabst, R., Bedoui, S., Urban & Fischer, Berlin, 2006, 384.
- [102] Federspil, P., Federspil, P.A., *HNO*, 2005, **53**, 11-28.
- [103] Ehlert, N., *Chemical and Biochemical Functionalization of Middle Ear Implants*, Dissertation, 2009, Leibniz Universität Hannover.
- [104] Geyer, G., *HNO*, 1999, **47**, 77-91.
- [105] Meister, H., Mickenhagen, A., Walger, M., Drück, M., von Wedel, H., Stennert, E., *HNO*, 2000, **48**, 204-208.
- [106] Baier, R.E., Meyer, A.E., Natiella, J.R., Natiella, R.R., Carter, J.M., *J. Biomed. Mater. Res.*, 1984, **18**, 327-355.
- [107] Heumann, H., Steinbach, E., Seuffer, E., *Laryngo-Rhino-Otologie*, 1982, **61**, 17-19.
- [108] Steinbach, E., Pusalkar, A., *Goldossikel zur Mittelohrrekonstruktion: histologische Befunde aus dem Mittelohr nach Implanatation*, Hagen, R., Geyer, G., Helms, J., *Chirurgie*, Bd. 1, Sympomed, München, 1996, 11-62.
- [109] Hulbert, S.F., Hench, L.L., Forbes, D., Bowman, L.S., *Materials science monographs, Ceramics in surgery*, Bd. 17, Vincenzini, P., *History of bioceramics*, Elsevier, Amsterdam, 1983, 3-29.
- [110] Yamamoto, E., Iwanaga, M., *J. Laryngol. Otol.*, 1987, **101**, 897-904.
- [111] Zöllner, C.H., Strutz, J., *Laryngol. Rhinol. Otol.*, 1987, **66**, 517-521.
- [112] Yamamoto, E., *Ceramic implants in middle ear surgery*, Babighian, G., Veldmann, J.E., *Transplants and implants in otology*, Kugler & Ghedini, Amsterdam, 1988, 269-276.

- [113] van Blitterswijk, C.A., Grote, J.J., Lutgert, H.W., Koerten, H.K., *Biological performance of hydroxyapatite as otologic biomaterial: an evaluation of clinically applied hydroxyapatite*, de Putter, C., *Advances in biomaterials 8: Implant materials in biofunction*, Elsevier, Amsterdam, 1988, 221-226.
- [114] van Blitterswijk, C.A., Grote, J.J., *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 1990, **144**, 3-11.
- [115] van Blitterswijk, C.A., Hesseling, S.C., Grote, J.J., *J. Biomed. Mater. Res.*, 1990, **24**, 433-453.
- [116] Grote, J.J., van Blitterswijk, C.A., *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. Suppl.*, 1986, **123**, 6.
- [117] Neumann, A., Jahnke, K., *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.*, 2003, **34**, 1052-1057.
- [118] Brewis, C., Orrell, J., Yung, M.W., *Otol. Neurotol.*, 2003, **24**, 20-23.
- [119] Shea, J.J., *Laryngoscope.*, 1976, **86**, 239-240.
- [120] Gjuric, M., Mladina, R., Koscak, J., *Laryngo-Rhino-Otologie.*, 1987, **66**, 522-525.
- [121] Teichgraeber, J.F., Soector, M., Per-Lee, J.H., *Am. J. Otol.*, 1983, **5**, 127-136.
- [122] Makek, M., Mattox, D.E., Schmid, S., Fisch, U., *Histopathology of synthetic ossicular prostheses*, Babighian, G., Veldmann, J.E., *Transplants and implants in otology*, Kugler & Ghedini, Amsterdam, 1988, 231-237.
- [123] Tomoda, K., *Arch. Otorhinolaryngol.*, 1985, **242**, 119-128.
- [124] Galic, M., Jahnke, K., *Laryngo-Rhino-Otologie*, 1982, **61**, 30-34.
- [125] Smyth, G.D.L., *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1982, **90**, 343-346.
- [126] Colletti, V., Fiorino, F.G., Sittoni, V., *Am. J. Otol.*, 1987, **8**, 553-559.
- [127] Shea, J.J., *J. Laryngol. Otol.*, 1988, **102**, 14-19.
- [128] Neudert, M., Ney, M., Beleites, T., Bornitz, M., Kluge, A., Zahnert, T., Abschlussbericht „Entwicklung eines neuartigen Prothesenkonzeptes für die Mittelohrchirurgie“, Fraunhofer Insitut für Werkzeugmaschinen und Umformtechnik, (Förderkennzeichen 03/4034A), Dresden, 2006.
- [129] Vogt, J.C., Brandes, G., Krueger, I., Behrens, P., *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2008, **19**, 2629-2636.
- [130] Vogt, J.C., Brandes, G., Ehlert, N., Behrens, P., Nolte, I., Müller, P.P., Lenarz, T., Stieve, M., *J. Biomater. Appl.*, 2009, **24**, 175-191.
- [131] Zahnert, T., *Laryngo. Rhino. Otol.*, 2003, **82**, 157-180.
- [132] Mojallal, H., Stieve, M., Krueger, I., Behrens, P., Mueller, P.P., Lenarz, T., *I.J.A.*, 2009, **48**, 876-884.
- [133] Hanefeld, U., Gardossi, L., Magner, E., *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 453-468.
- [134] Hartmann, M., *Chem. Mater.*, 2005, **17**, 4577-4593.
- [135] Ehlert, N., Müller, P.P., Stieve, M., Behrens, P., *Microporous Mesoporous Mater.*, 2010, **131**, 51-57.
- [136] Heiselmann, D., *J. Am. Med. Assoc.*, 1994, **272**, 1819-1820.

- [137] Veenstra, D.L., Saint, S., Sullivan, S.D., *J. Am. Med. Assoc.*, 1999, **282**, 554-560.
- [138] Scheie, A.A., *Adv. Dent. Res.*, 1994, **8**, 246-253.
- [139] Finanzierungsantrag 2. Förderperiode, SFB 599, *Zukunftsfähige bioresorbierbare und permanente Implantate aus metallischen und keramischen Werkstoffen*, Hannover, 2006.
- [140] Axelsson, P., Lindhe, J., *J. Clin. Periodontol.*, 1978, **5**, 133-151.
- [141] Merritt, K., Chang, C.C., *J. Biomater. Appl.*, 1991, **5**, 185-203.
- [142] Merritt, K., Shafer, J.W., Brown, S.A., *J. Biomed. Mater. Res.*, 1979, **13**, 101-108.
- [143] Wach, J.Y., Bonazzi, S., Gademann, K., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 7123-7126.
- [144] Roosjen, A., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Norde, W., *Langmuir*, 2004, **20**, 10949-10955.
- [145] Nejadnik, M.R., van der Mei, H.C., Norde, W., Busscher, H.J., *Biomaterials*, 2008, **29**, 4117-4121.
- [146] Hermansson, M., *Colloids. Surf. B.*, 1999, **14**, 105-119.
- [147] Pascual, A., *Clin. Microbiol. Infec.*, 2002, **8**, 256-264.
- [148] Katsikogianni, M., Missirlis, Y.F., *Eur. Cell Mater.*, 2004, **8**, 37-57.
- [149] O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., *Ann. Rev. Microbiol.*, 2000, **54**, 49-79.
- [150] Gotz, F., *Mol. Microb.*, 2002, **43**, 1367-1378.
- [151] Vuong, C., Otto, M., *Microbes Infect.*, 2002, **4**, 481-489.
- [152] Bunt, C.R., Jones, D.S., Tucker, I.G., *Intern. J. Pharm.*, 1993, **99**, 93-98.
- [153] Tegoulia, V.A., Cooper, S.L., *Col. Surf. B: Biointerf.*, 2002, **24**, 217-228.
- [154] Scheuerman, T.R., Camper, A.K., Hamilton, M.A., *J. Col. Interf. Sci.*, 1998, **208**, 23-33.
- [155] Taylor, R.L., Verran, J., Lees, G.C., Ward, A.J.P., *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 1998, **9**, 17-22.
- [156] Medilanski, E., Kaufmann, K., Wick, L., Wanner, O., Harms, H., *Bioful.*, 2002, **18**, 193-203.
- [157] Duguid, I.G., Evans, E., Brown, M.R., Gilbert, P., *J. Antimicrob. Chemother.*, 1992, **30**, 803-810.
- [158] Mah, T.-F.C., O'Toole, G.A., *Trends in Microbiol.*, 2001, **9**, 34-39.
- [159] Stewart, P.S., Costerton, J.W., *Lancet.*, 2001, **358**, 135-138.
- [160] Donlan, R.M., Costerton, J.W., *Clin. Microb. Reviews.*, 2002, **15**, 167-193.
- [161] Poelstra, K.A., Barekzi, N.A., Rediske, A.M., Felts, A.G., Slunt, J.B., Grainger, D.W., *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, **60**, 206-215.
- [162] Percival, S.L., Bowler, P.G., Russell, D., *J. Hosp. Infect.*, 2005, **60**, 1-7.
- [163] Lowy, F.D., *J. Clin. Invest.*, 2003, **111**, 1265-1273.

- [164] Krishnan, S., Ward, R.J., Hexemer, A., Sohn, K.E., Lee, K.L., Angert, E.R., Fisher, D.A., Kramer, E.J., Ober, C.K., *Langmuir*, 2006, **22**, 11255-11266.
- [165] Sambhy, V., Peterson, B.R., Ayusman, S., *Langmuir*, 2008, **24**, 7549-7558.
- [166] Prucker, O., Naumann, C.A., Rühle, J., Knoll, W., Frank, C.W., *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 8766-8770.
- [167] Dronavajjala, K.D., Rajagopalan, R., Uppili, S., Sen, A., Allara, D.L., Foley, H.C., *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 13040-13041.
- [168] Griep-Raming, N., Karger, M., Menzel, H., *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **20**, 11811-11814.
- [169] Ma, H., Wells, M., Beebe, T.P., Chilkoti, A., *Adv. Funct. Mater.*, 2006, **16**, 640-648.
- [170] Bauer, F., Gläsel, H.-J., Decker, U., Ernst, H., Freyer, A., Hartmann, E., Sauerland, V., Mehnert, R., *Progress in Organic Coatings*, 2003, **47**, 147-153.
- [171] Schmidt, H., *J. Non-Cryst. Solids.*, 1985, **73**, 681-691.
- [172] Ravaine, D., Seminel, A., Charbouillot, Y., Vincens, M., *J. Non-Cryst. Solids.*, 1986, **82**, 210-219.
- [173] Huang, H.-H., Orler, B., Wilkes, G.L., *Polym. Bull.*, 1985, **14**, 557-564.
- [174] Sanchez, C., Ribot, F., *New J. Chem.*, 1994, **18**, 1007-1047.
- [175] Judenstein, P., Sanchez, C., *J. Mater. Chem.*, 1996, **6**, 511-525.
- [176] Hoffmann, F., Cornelius, M., Morell, J., Fröba, M. *Angew. Chem.*, 2008, **118**, 3290-3328.
- [177] Brinker, C.J., Lu, Y., Sellinger, A., Fan, H., *Adv. Mater.*, 1999, **11**, 579-585.
- [178] Alexander, G. B., *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, **75**, 5655-5657.
- [179] Riedel, E., *Anorganische Chemie*, 2. Auflage, de Gruyter, Berlin, 1990.
- [180] Perry, C.C., Keeling-Tucker, T., *Colloid. Polym. Sci.*, 2003, **281**, 652-664.
- [181] Coudurier, M., Baudru, R., Donnet, J.B., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1971, **9**, 3147-3165.
- [182] Tarutani, T., *Anal. Sci.*, 1989, **5**, 245-252.
- [183] Alexander, G.B., Heston, W.M., Iler, R.K., *J. Phys. Chem.*, 1954, **58**, 453-455.
- [184] Alexander, G.B., *J. Phys. Chem.*, 1957, **61**, 1563-1564.
- [185] Malvern Instruments, *Zetasizer Nano Series User Manual, Issue 1.0.*, 2003.
- [186] Meyerhofer, D., *J. Appl. Phys.*, 1978, **49**, 3993-3997.
- [187] Flack, W.W., Soong, D.S., Bell, A.T., Hess, D.W., *J. Appl. Phys.*, 1983, **56**, 1199-1206.
- [188] Grosso, D., Cagnol, F., Soler-Illia, G.J. de A.A., Crepaldi, E.L., Amenitsch, H., Brunet-Bruneau, A., Burgeois, A., Sanchez, C., *Adv. Func. Mater.*, 2004, **14**, 309-322.

- [189] Chujo, Y., Yoshifuji, Y., Sada, K., Saegusa, T., *Macromolecules*, 1989, **22**, 1074-1077.
- [190] Lee, J., Lee, K., Kim, H., *Bull. Korean. Chem. Soc.*, 1996, **17**, 115-116.
- [191] Saegusa, T., Kobayashi, S., Nagura, Y., *Macromolecules*, 1974, **7**, 713-716.
- [192] Krueger, I., *Biomimetische Bildung von Siliciumdioxid an anorganisch-organischen Grenzflächen*, Diplomarbeit, 2006, Leibniz Universität Hannover.
- [193] Dietrich, B., Hosseini, M.W., Lehn, J.-M., Sessions, R.B., *Helv. Chim. Acta.*, 1983, **66**, 1262-1278.
- [194] Bergeron, R.J., Neims, A.H., McManis, J.S., *J. Med. Chem.*, 1988, **31**, 1183-1190.
- [195] Yamada, T., Zhou, H.S., Uchida, H., Honma, I., Katsube, T., *J. Phys. Chem. B.*, 2004, **108**, 13341-13346.
- [196] Lüßenhop, T., *Präparation und Charakterisierung von Silberverbindungen im Hinblick auf ihre antibakterielle Wirksamkeit*, Diplomarbeit, 2009, Leibniz Universität Hannover.
- [197] Münzer, S., *Herstellung von Zeolith-Nanokristallen und Präparation von Sodalith-Filmen*, Dissertation, 2008, Leibniz Universität Hannover.
- [198] Behrens, P., Kempa, P., Assmann, S., Wiebcke, M., Felsche, J., *J. Solid State Chem.*, 1995, **115**, 55-65.
- [199] Wang, H., Holmberg, B., Yan, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 9928-9929.
- [200] Li, D., Huang, Y., Ratinac, K.R., Ringer, S.P., Wang, H., *Microporous Mesoporous Mater.*, 2008, **116**, 416-423.
- [201] Slistan-Grjalva, A., Herrera-Urbina, R., Rivas-Silva, J.F., *Mater. Res. Bull.*, 2008, **43**, 90-96.
- [202] Ledbetter, J.W., Jr., Bowen, J.R., *Anal. Chem.*, 1969, **41**, 1345-1347.
- [203] Kufelt, O., *Einfluss von Polyaminen auf die Bildung von amorphem Siliciumdioxid*, Diplomarbeit, 2007, Leibniz Universität Hannover.
- [204] Cordes, P., *Streng biomimetische Modellsysteme für die Biomineralisation von Siliciumdioxid auf der Basis von Polyaminen oder Alkylglycosiden*, Dissertation, 2006, Leibniz Universität Hannover
- [205] Menzel, H., Horstmann, S., Behrens, P., Bärnreuther, P., Krueger, I., Jahns, M., *Chem. Commun.*, 2003, 2994-2995.
- [206] Bärnreuther, P., Jahns, M., Krueger, I., Behrens, P., Horstmann, S., Menzel, H., *Investigations into the Kinetics of the Polyamine-silica system and its Relevance to Biomineralization in Organosilicon Chemistry VI*, Bd. 9, Wiley-VCH, Weinheim, 2005, 49-954.
- [207] Fiscaro, E., Compari, C., Braibanti, A., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2004, **6**, 4156-4166.
- [208] Eggers, D.K., Valentine, J.S., *J. Mol. Biol.*, 2001, **314**, 911-922.
- [209] Compari, C., Fiscaro, E., Braibanti, A., *Polyhedron*, 2002, **21**, 1503-1511.

- [210] Somasundaran, P., Kramer, G., *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2004, **250**, 189-193.
- [211] Brunner, E., Lutz, K., Sumper, M., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2004, **6**, 854-857.
- [212] Ivanova, E., *Bacterial Cell Interactions with Nano-structured Surfaces*, Vortrag, Laser Zentrum Hannover, 09.06.2010.
- [213] Lin, J., Tiller, J.C., Lee, S.B., Lewis, K., Kibanov, A.M., *Biotech.Lett.*, 2002, **24**, 801-805.
- [214] Imazato, S., Russell, R.R.B., McCabe, J.F., *J. Dent. Res.*, 1995, **23**, 177-181.
- [215] Imazato, S., Ehara, A., Torii, M., Ebisu, S., *J. Dent. Res.*, 1998, **26**, 267-271.
- [216] Kenawy, El-R., Abdel-Hay, F.I., El-Shanshoury, A. El-R., El-Newehy, M.H., *J. Controlled Release*, 1998, **50**, 145-152.
- [217] Kokubo, T., Ito, S., Huang, Z.T., Hayashi, T., Sakka, S., Kitsugi, T., Yamamuro, T., *J. Biomed. Mater. Res.*, 1990, **24**, 331-343.

8 Anhang

A Verwendete Chemikalien

| Name | Hesteller | Reinheit | CAS-Nummer |
|--|---------------|----------|------------|
| Aceton | Fluka | 99 % | 67-64-1 |
| Acrylnitril | Aldrich | ≥ 99 % | 107-13-1 |
| Ameisensäure | Fluka | ~ 98 % | 64-18-6 |
| 3-Aminopropyltrimethoxysilan | Sigma-Aldrich | 98 % | 919-30-2 |
| Ammoniummolybdat·Tetrahydrat | Fluka | ≥ 99 % | 12054-85-2 |
| Boran-THF-Komplex | Aldrich | 1 M | 14044-65-6 |
| 1-Bromdekan | Aldrich | 98 % | 112-29-8 |
| 1-Bromhexan | Aldrich | 98 % | 111-25-1 |
| 1-Bromoktan | Aldrich | 99 % | 111-83-1 |
| 3-Brompropyltrimethoxysilan | Sigma | ≥ 97 % | 51826-90-5 |
| HBr in Essigsäure | Sigma-Aldrich | 33 % | 37348-16-6 |
| 1,4-Dibrombutan | Aldrich | 99 % | 110-52-1 |
| Dichlormethan (DCM) | Sigma-Aldrich | ≥ 98 % | 75-09-2 |
| Dimethylformamid (DMF) | Fluka | ≥ 98 % | 68-12-2 |
| Ethanol (EtOH) | Merck | ≥ 99.5 % | 64-17-5 |
| Formaldehyd | Sigma | 37 % | 50-00-0 |
| Kaliumcarbonat (K ₂ CO ₃) | Fluka | ≥ 99 % | 584-08-7 |
| Methanol (MeOH) | Fluka | ≥ 99.5 % | 67-56-1 |

| | | | |
|--|----------------|----------|------------|
| Natriumchlorid (NaCl) | Sigma | ≥ 99.5 % | 7647-14-5 |
| Natriumdihydrogenphosphat | Merck | ≥ 98 % | 7558-80-2 |
| Natriumhydrogenphosphat | Fluka | ≥99 % | 10028-24-7 |
| Natriumfluorescein | Fluka | ≥ 98.5 % | 2321-07-5 |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Sigma-Aldrich | ≥ 98 % | 1310-73-2 |
| Natronlauge | Riedel-de Häen | 1 M | 1310-73-2 |
| Nitromethan | Acrôs | 99 % | 72-52-5 |
| Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄) | Sigma-Aldrich | ≥ 99 % | 7757-82-6 |
| Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) | Fluka | 85 % | 766-93-9 |
| Spermin | Fluka | ≥ 99 % | 71-44-3 |
| Phosphatpuffer (PBS) | Sigma | – | – |
| Poly(4-vinylpyridin) | Aldrich | – | 25232-41-1 |
| Propionsäure | Riedel-de Häen | 95 % | 79-09-4 |
| Tetrahydrofuran (THF) | Sigma-Aldrich | ≥99.5 | 109-99-9 |
| Tetraethoxysilan (TEOS) | Aldrich | ≥ 99 % | 78-10-4 |
| Tetramethoxysilan (TMOS) | Fluka | ≥ 98 % | 681-84-5 |
| Triethylamin (NEt ₃) | Fluka | ≥ 99.5 % | 121-44-8 |
| Salzsäure (HCl) | Fluka | 37 % | 7647-01-0 |
| Wasserstoffperoxid | Sigma | 35 % | 95-29-9 |

B Konferenzbeiträge

Poster Präsentationen

Silver release and antimicrobial properties of silver sodalites and silver zeolite A

T. Lüßenhop, N. Ehlert, O. Kufelt, C. Vogt, S. Kittel, M. Badar, P.P. Müller, P. Behrens Jahrestagung 2010 der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), Heilbad Heiligenstadt, *eingereicht*

Comparison of in vitro and in vivo test systems for controlled release antibacterial implant coatings

Muhammad Badar, Tammo Lüßenhop, N. Ehlert, O. Kufelt, Peter Behrens, Martin Stieve, Meike Stiesch, Thomas Lenarz, Hansjörg Hauser, Ute Möllmann, Sebastian Vogt, Matthias Schnabelrauch, Peter P. Mueller
Jahrestagung 2010 der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), Heilbad Heiligenstadt, *eingereicht*

Polymer-based antibacterial coatings for biomedical applications

Olga Kufelt, Tammo Lüßenhop, Natalja Wendt, Wieland Heuer, Andreas Winkel, Mohammad Badar, Lysann Ringenberg, Meike Stiesch, Peter Müller, Peter Behrens
Jahrestagung 2009 der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), 8. - 10. Oktober 2009, Tübingen

Cytotoxicity of poly-(4-vinyl-n-hexylpyridiniumbromide) as an antibacterial polymer-coating to human gingival-fibroblasts

Wieland Heuer, Andreas Winkel, Lysann Ringenberg, Olga Kufelt, Peter Behrens, Meike Stiesch
International Association for Dental Research (IADR) 1 - 4th April 2009, Miami, USA

Polymer-based antibacterial coatings on differently modified glass surfaces

Olga Kufelt, Wieland Heuer, Andreas Winkel, Lysann Ringenberg, Meike Stiesch, Peter Müller, Peter Behrens
Hybrid Materials Conference, 15 - 19. März 2009, Tours, Frankreich

Polymer-based antibacterial coatings on differently modified glass surfaces

Olga Kufelt, Wieland Heuer, Andreas Winkel, Lysann Ringenberg, Meike Stiesch, Peter Behrens

Jahrestagung 2008 der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM),
20. - 22. November 2008, Hamburg

**Influence of poly(methylpropyleneimines) on the formation of amorphous silica
- a model system for biomineralization**

Olga Kufelt, Michael Jahns, Frauke Cornelius, Henning Menzel, Peter Behrens

Polymer Symposium (BPS 2007), 9. - 11. September 2007, Bayreuth

C Lebenslauf

| | |
|------------------------------------|---|
| Name | Olga Kufelt |
| Geburtsdatum | 16.11.1981 |
| Geburtsort | Lebedewka |
| Adresse | Fuldaer Wende 8, 30419 Hannover |
| Schulbildung | |
| 1995 – 2002 | Albertus Magnus Gymnasium Friesoythe |
| 2002 | Abitur |
| Studium | |
| Oktober 2002 – Mai 2007 | Studiengang Chemie Diplom an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover Titel der Diplomarbeit: „Einfluss von Polyaminen auf die Bildung von amorphem Siliciumdioxid“ |
| seit Juni 2007 | Beginn der Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Behrens, Institut für Anorganische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover Titel der Dissertation: „Polymer-Silica-Materialien: Ihre Bedeutung bei der Biomineralisation und in der Biomaterialforschung“ |

